



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La influencia del sistema vasopresinérgico del hipotálamo
sobre los ritmos hipocámpicos: análisis sobre la
sincronización y el acoplamiento oscilatorios y sus
impactos en el comportamiento

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

P R E S E N T A:

MARIANA MÁRQUEZ MACHORRO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LIMEI ZHANG
Ciudad de México, junio de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Márquez

Machorro

Mariana

54218541

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Física

410005066

2. Datos del tutor

Dra.

Limei

Zhang

Ji

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Rafael Ángel

Barrio

Paredes

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Carlos

Villareal

Luján

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Javier

Miranda

Martín del Campo

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Faustino

Sánchez

Garduño

7. Datos del trabajo escrito

La influencia del sistema vasopresinérgico del hipotálamo sobre los ritmos hipocámpicos: análisis sobre la sincronización y el acoplamiento oscilatorios y sus impactos en el comportamiento

p. 68

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Limei por mostrarme un mundo emocionante de exploración y descubrimientos, por tanto apoyo y esfuerzo de encaminarme hacia él - con toda mi admiración y agradecimiento

A Vito, por tantas enseñanzas y conversaciones. Por destemplan casi todas mis ideas y mostrarme una perspectiva que sola no hubiera sido capaz de hallar. Gracias por la revisión exhaustiva y muchas más gracias por la paciencia.

Al comité jurado que revisó este trabajo: Dr. Rafael Barrio, Dr. Carlos Villareal, Dr. Javier Miranda, Dr. Faustino Sánchez. Muchísimas gracias por su tiempo y sus comentarios.

A Erika por compartirme de una manera tan bonita una pequeña parte de todo lo que sabe y es capaz de hacer.

A Alicia por rescatarme una y otra vez. Y por seguir haciéndolo.

A Hernán, Elba, Diana y Óscar☺.

A mis padres y a mi hermana. A mi familia que quiero tanto.

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
1.1. OSCILACIONES	8
1.2. BASES FISIOLÓGICAS DE LAS OSCILACIONES EN EL CEREBRO	8
1.2.1. PATRONES DE OSCILACIÓN NEURONAL.....	8
1.2.2. GENERACIÓN DEL POTENCIAL LOCAL DE CAMPO	10
1.3. EL HIPOCAMPO COMO UNA ESTRUCTURA OSCILATORIA	11
1.3.1. ANATOMÍA	11
1.3.2. NEUROFISIOLOGÍA DEL HIPOCAMPO	15
1.3.3. ONDAS THETA.....	17
1.4. SINCRONIZACIÓN EN SISTEMAS FISIOLÓGICOS	18
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	20
2.1. EL SISTEMA VASOPRESINÉRGICO.....	20
2.2. VÍA DE INERVACIÓN VASOPRESINÉRGICA-HIPOTALÁMICA HACIA EL HIPOCAMPO.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	23
4. MÉTODOS.....	24
4.1. ANIMALES	24
4.2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	24
4.3. REGISTROS DE POTENCIAL LOCAL DE CAMPO	25
4.4. ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA AVP	25
4.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	26
4.6. ANÁLISIS DE DATOS	26
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA OSCILACIÓN THETA EN REGISTROS INDIVIDUALES EN PVN, DHI Y VHI	28
5.1.1. NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO (PVN).....	28

5.1.2.	HIPOCAMPO DORSAL (DHI)	28
5.1.3.	HIPOCAMPO VENTRAL (VHI).....	29
5.2.	ANÁLISIS DE VALOR DE ACOPLAMIENTO DE FASE (PLV) EN REGISTROS SIMULTÁNEOS 36	
6.	DISCUSIÓN	37
6.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA OSCILACIÓN THETA EN REGISTROS INDIVIDUALES EN PVN, DHI Y VHI	37
6.2.	ANÁLISIS DE VALOR DE ACOPLAMIENTO DE FASE (PLV) EN REGISTROS SIMULTÁNEOS 39	
7.	CONCLUSIONES	41
8.	BIBLIOGRAFÍA	42
A.	ANEXOS.....	46
A.1.	ANÁLISIS DE OSCILACIONES EN EL DOMINIO TIEMPO-FRECUENCIA	46
A.2.	TRANSFORMADA DE FOURIER COMO MÉTODO DE DESCOMPOSICIÓN	47
A.3.	MEDIDAS DE ACOPLAMIENTO	49
A.4.	TRANSFORMADA DE FOURIER DE CORTA DURACIÓN PARA LA GENERACIÓN DE ESPECTROGRAMAS	51
A.5.	CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE MIS ESTUDIOS	54

Resumen

La arginina vasopresina (AVP) se sintetiza principalmente en el hipotálamo y se secreta masivamente hacia la neurohipófisis donde entra al torrente circulatorio. Sus funciones periféricas principales son la regulación de la homeostasis hidroeléctrica corporal y la presión arterial.

Dentro del sistema nervioso central existe una amplia inervación vasopresinérgica. En años recientes, el grupo de trabajo del que formo parte ha descrito que los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo son una fuente importante de la inervación vasopresinérgica hacia estructuras extrahipotálamicas del sistema nervioso central (SNC), en particular hacia la formación hipocámpica, siendo la región CA2 del hipocampo ventral la más densamente inervada.

En la rata, la regulación a la alta o a la baja del sistema vasopresinérgico genera déficits en el aprendizaje espacial y la memoria, así como respuestas emocionales tales como depresión y ansiedad. Por lo tanto, es interesante una caracterización detallada sobre esta inervación y sus funciones moduladoras sobre los estados cerebrales.

Bajo la hipótesis de que el papel de la AVP en la modulación de la función del hipocampo podía revelarse por la coherencia de los ritmos de oscilación eléctrica theta (propios de la estructura hipocámpal), realicé registros de potencial local de campo (en inglés *local field potential*: LFP) en el núcleo PVN, la región dorsal del hipocampo (dHi) y la región ventral del hipocampo (vHi), en la condición basal y la condición de regulación a la alta del sistema con un reto osmótico.

Se observó un aumento significativo en la frecuencia predominante de la oscilación theta y una tendencia a aumentar su potencia en los tres sitios. Se observó un aumento significativo en la prevalencia de ésta respecto a otras bandas en ambas regiones hipocámpales. Estos resultados sugieren que el sistema vasopresinérgico ejerce una modulación importante a la función hipocámpica.

Por otra parte, realicé registros simultáneos de LFP entre el núcleo PVN y el hipocampo ventral (vHi), y entre el hipocampo dorsal (dHi) y el hipocampo ventral (vHi) e hice un análisis de sincronización medida mediante el valor de acoplamiento de fase (PLV). Únicamente se observó un aumento significativo de este parámetro entre las regiones PVN y vHi, lo que se interpretó como un aumento de sincronización entre las dos regiones que lograría una comunicación más eficiente para la realización de una tarea en conjunto entre ambas estructuras.

1. Introducción general

1.1. Oscilaciones

Una oscilación es una variación en el tiempo del estado de un sistema físico medido respecto a un valor central. La variación típicamente ocurre más de una vez, dando lugar a fenómenos oscilatorios. El estudio de estos fenómenos representa una gran rama de la física y la ingeniería.

Los dos ejemplos clásicos de un sistema oscilatorio son la posición del centro de masa de un resorte alrededor de una posición de equilibrio, y la posición de un péndulo bajo la acción de la gravedad. Éstos son ejemplos de sistemas oscilatorios mecánicos, donde la variable de oscilación es la posición. Otros ejemplos también ampliamente estudiados son los sistemas oscilatorios eléctricos. Aunque físicamente representen conceptos independientes, el abordaje matemático es equivalente.

1.2. Bases fisiológicas de las oscilaciones en el cerebro

En 1875, Richard Caton, publicó la primera evidencia conocida sobre las oscilaciones en el cerebro. En su descripción de los registros que realizó en varios animales reportó: “corrientes débiles de direcciones variables pasan a través del multiplicador cuando los electrodos se colocan en dos puntos de la superficie externa, o un electrodo en la materia gris y otro en la superficie del cráneo” (Caton, 1875). Posteriormente reportó: “la corriente por lo general está en constante fluctuación; el índice de oscilación es generalmente pequeño ... En otras ocasiones, se observan grandes fluctuaciones, que en algunos casos coinciden con algunos movimientos musculares o cambios en el estado mental del animal”(Caton, 1971)*.

1.2.1. Patrones de oscilación neuronal

El intercambio de información entre las células del sistema nervioso se da por medio de corrientes eléctricas. En conjunto, esta actividad neuronal da origen a variaciones del potencial eléctrico en el espacio extracelular, variaciones en espacio y tiempo que pueden ser registradas y estudiadas para caracterizar sistemas neuronales. Estas variaciones se conocen como potencial local de campo (LFP: *Local Field Potential*) (Buzsaki, Anastassiou, & Koch, 2012).

En el cerebro de mamíferos se han observado variaciones del potencial eléctrico (LFP) en bandas de frecuencia bien definidas que van aproximadamente desde 0.05 Hz

hasta 500 Hz. (Fig. 1.1-1) (Buzsaki & Draguhn, 2004). Estas bandas han sido asociadas a diferentes redes locales de neuronas ligadas transitoriamente por conexiones dinámicas reciprocas. A estas redes se les denomina ensambles neuronales y dentro del cerebro, se piensa que la computación de todo acto cognitivo reside en el surgimiento de un ensamble neuronal específico (Varela, Lachaux, Rodriguez, & Martinerie, 2001).

Esta idea tiene sustento en múltiples observaciones realizadas de manera independiente. Como ejemplo: el hecho de que la actividad de cada neurona tuviera la capacidad de oscilar y resonar en múltiples frecuencias, como una indicación de que un ritmo específico podría representar información a nivel de la red.

Por otro lado, que los patrones de actividad vistos durante estados inconscientes se asemejaran a estados de vigilia previamente observados correlacionó la activación de grupos de neuronas con diferentes tipos de oscilación y distintos procesos mentales (Wilson & McNaughton, 1994).

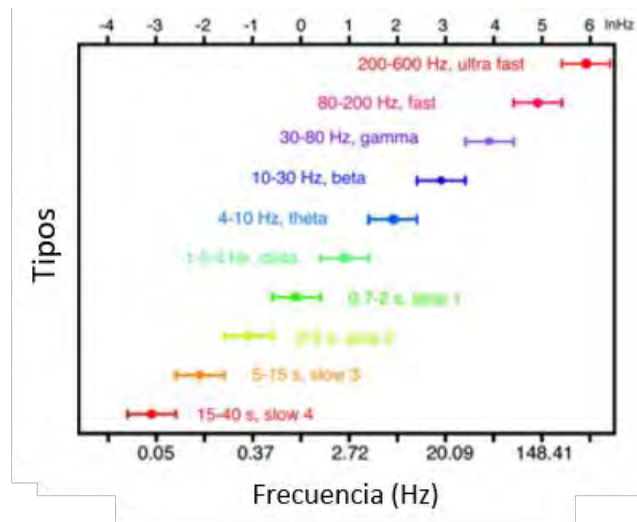


Fig. 1.1-1 Patrones de oscilación observados en la corteza de ratas. Tomado de (Buzsaki & Draguhn, 2004)

Los patrones de oscilación eléctrica observados en el cerebro de mamíferos han sido asociados a diferentes estados mentales por medio de técnicas que registran el LFP (o a niveles más superficiales: electroencefalograma (EEG), electrocorticograma (ECoG)).

Por ejemplo, en humanos y con registros de EEG, se ha observado oscilación theta (4 Hz-8 Hz) durante tareas asociadas a la memoria. El ritmo beta (15 Hz-30 Hz) se ha asociado a la preparación de los movimientos y el control inhibitorio del sistema motor. Las oscilaciones en la banda gamma (30 Hz-80 Hz) se han observado en estados de atención.

Por otro lado, las oscilaciones ultra-rápidas (>100 Hz) han sido observadas durante estados de inmovilidad, vigilia, comportamientos consumatorios y sueño no-REM (REM: *rapid eye movement*). Las oscilaciones lentas (<1 Hz) se han observado principalmente durante sueño no-REM (Wang, 2010).

La técnica de registro de EEG ha sido muy empleada en humanos porque no es invasiva; sin embargo, tiene poca resolución espacial si se compara con registros de LFP. Uno de los animales donde más se han estudiado las oscilaciones de LFP es la rata. En estos animales cabe destacar algunas de las funciones cognitivas que se han asociado a las distintas bandas de oscilación, a saber: durante sueño REM, locomoción y procesos de memoria se observa la oscilación theta en la estructura hipocampal (Buzsaki, 2002; Jouvet, 1969; Vanderwolf, 1969).

Un problema que continúa abierto en neurociencias es si estos patrones de oscilación son consecuencia de la actividad local espontánea de los circuitos dentro del hipocampo o si son producidos por la influencia de otras estructuras cerebrales. En 1954, Green y Arduini fueron los primeros en mostrar que era posible inducir oscilación theta en el hipocampo si se estimulaba la formación reticular. Estudios más recientes sugieren que las neuronas colinérgicas de la banda diagonal de Broca y el núcleo septal medial que inervan la formación hipocampal son las responsables de la generación del ritmo theta en ratas bajo anestesia (Boulton & Baker, 1985; Green & Arduini, 1954).

1.2.2. Generación del potencial local de campo

Cualquier corriente transmembranal genera una contribución al potencial eléctrico extracelular; sin embargo, el peso de la contribución depende de la intensidad de corriente. Así, el LFP medido en un punto va a estar determinado principalmente por los potenciales de acción de las células más cercanas.

Existen múltiples contribuciones a la corriente extracelular provenientes del intercambio de información axón-dendritas (actividad sináptica), en la zona apical de todas las neuronas. Aún si la magnitud de esta corriente es menor a la magnitud de la corriente generada por potenciales de acción (potenciales de acción de Na^+ , o disparos de Ca^+), el conjunto contribuye considerablemente al LFP.

Otro elemento que da forma al LFP son las corrientes intrínsecas que aparecen como respuesta a cualquier cambio de potencial a través de las membranas, no

directamente relacionadas con el intercambio de información celular. Algunas de estas corrientes dan lugar a fenómenos de resonancia de potencial transmembranal, los cuales también se consideran contribuciones importantes al LFP (Buzsaki et al., 2012).

Por otro lado, la comunicación intercelular directa mediada por sinapsis eléctricas (*gap junctions*) también contribuye al potencial eléctrico extracelular. Y es que, a pesar de ser un fenómeno que no involucra intercambio directo de iones con el espacio extracelular, puede generar un cambio de permeabilidad en las membranas de las células involucradas, haciéndolas más propensas a responder a pequeños estímulos y variar considerablemente su potencial respecto al medio.

1.3. El hipocampo como una estructura oscilatoria

1.3.1. Anatomía

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más ampliamente estudiadas. Nombrado así por el anatomista Aranzio en 1587 debido a su semejanza al caballo de mar, es parte de la formación hipocampal. Ésta incluye además del hipocampo; el giro dentado (DG), el subículo, presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal (EC) (Fig. 1.2-1).

El hipocampo propiamente, está dividido en tres regiones: CA1, CA2 y CA3. El término CA es por cuerno de Amón, y fue denominado así por De Garengot en 1742 debido a su similitud con la iconografía del dios egipcio Amón.

Las principales aferencias y eferencias (vías de entrada y salida de información) del hipocampo son el haz angular, que comprende todas las proyecciones desde la corteza entorrinal; la vía fimbria-fórnix, que es la principal vía de inervación desde regiones subcorticales; y el sistema comisural que se encarga de la comunicación hipocampal contralateral.

Como red neuronal, la formación hipocampal tiene un gran flujo de información a través de conexiones con otros sitios. La mayor parte de información neocortical llega al hipocampo a través de la corteza entorrinal, el circuito hipocampal excitatorio más simple que se distingue (el circuito trisináptico) comienza en esta región (Fig. 1.2-1C).

Las neuronas de la EC tienen proyecciones hacia el giro dentado, donde establecen sinapsis con dendritas de las neuronas principales del DG o células granulares. Esta vía se conoce como vía perforante. Las células granulares mandan axones hacia las neuronas piramidales de CA3, estas proyecciones se conocen como fibras musgosas. A su vez, las neuronas piramidales de CA3 se conectan con las neuronas en CA1 mediante proyecciones

llamadas colaterales de Schaffer. Dichas proyecciones forman la principal aferencia hacia la región CA1. El cierre del circuito se da con las neuronas de CA1 que mandan proyecciones hacia el subículo. Ambas estructuras tienen importantes proyecciones de regreso hacia la corteza entorrinal

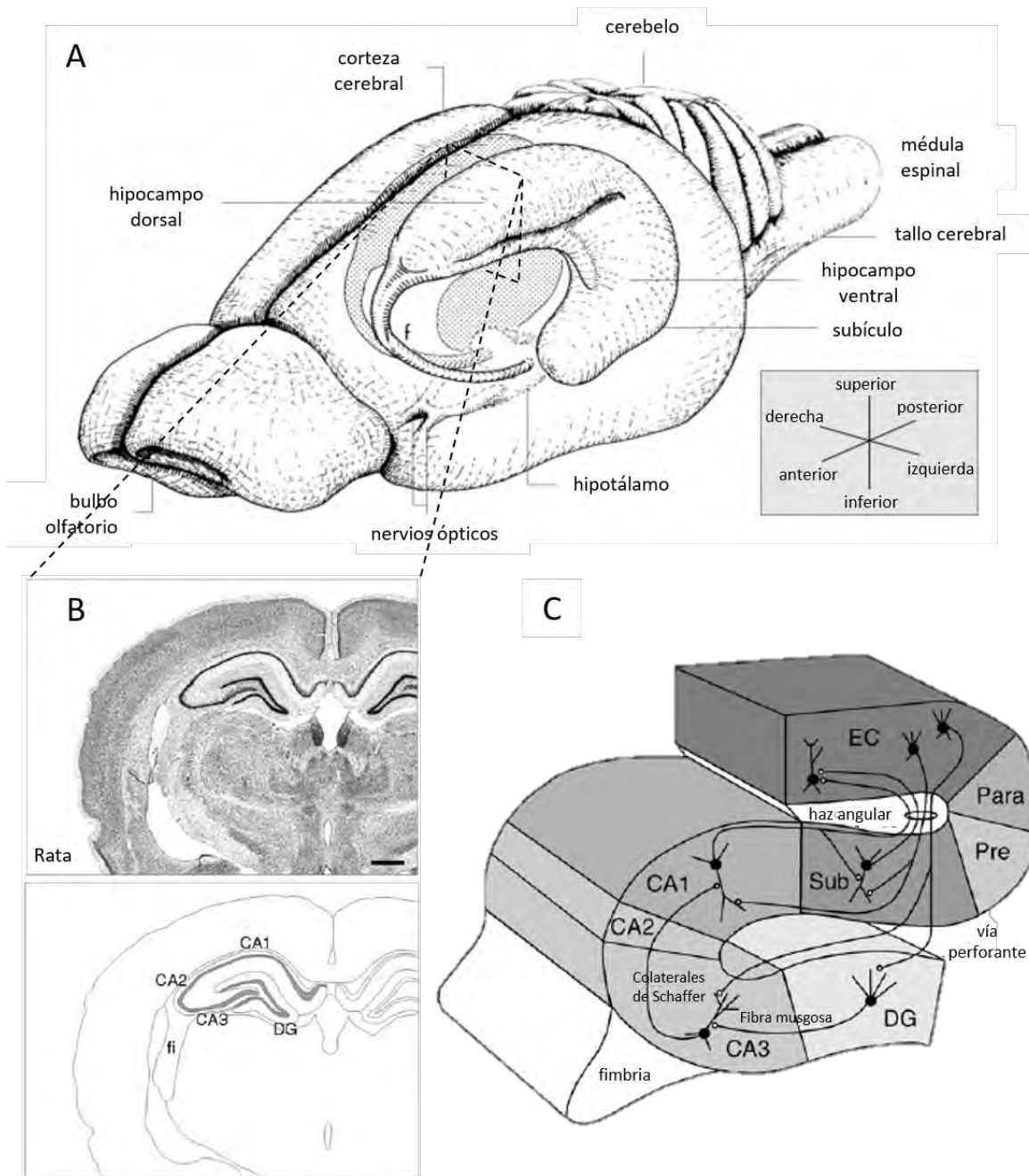


Fig. 1.2-1 Organización general del hipocampo de rata. A. Localización del hipocampo respecto a otras estructuras, modificado de (Cheung & Cardinal, 2005). B. Cortes coronales del hipocampo de rata, arriba: tinción de Nissl de una sección que incluye la región dorsal de hipocampo, abajo: dibujo de la misma sección. Se observan las regiones que conforman el hipocampo. DG: giro dentado, EC: corteza entorrinal, para: parasubículo, pre: presubículo, sub: subículo, fi: fimbria. Barra de escala = 1mm. C. Esquema de la formación hipocampal y principales proyecciones excitatorias que en conjunto forman el circuito trisináptico. Tomada del libro (Andersen, 2007).

Una de las características más sobresalientes del hipocampo es la presencia de bandas de oscilación de potencial eléctrico prominentes; algunos autores argumentan que es por la organización estructural de las capas celulares en él que se observa esta propiedad (Buzsaki, 2002; Holsheimer, Boer, Lopes da Silva, & van Rotterdam, 1982; Leung, 1984).

La capa celular principal es la capa celular piramidal, donde se encuentran los somas de las neuronas principales del hipocampo. Debajo, se encuentra el *stratum oriens*, que contiene las dendritas de las neuronas piramidales. Por encima de la capa piramidal, se encuentra el *stratum radiatum* en las regiones CA1 y CA2, en CA3. Antes de esta capa existe el *stratum lucidum* donde se encuentran las fibras musgosas. En la parte más superficial se encuentra el *stratum lacunosum-moleculare* (Fig. 1.2-2). Dentro de esta organización laminar, existen muchos tipos de interneuronas, tan sólo en la región CA1 se han descrito al menos 16 tipos (Somogyi & Klausberger, 2005).

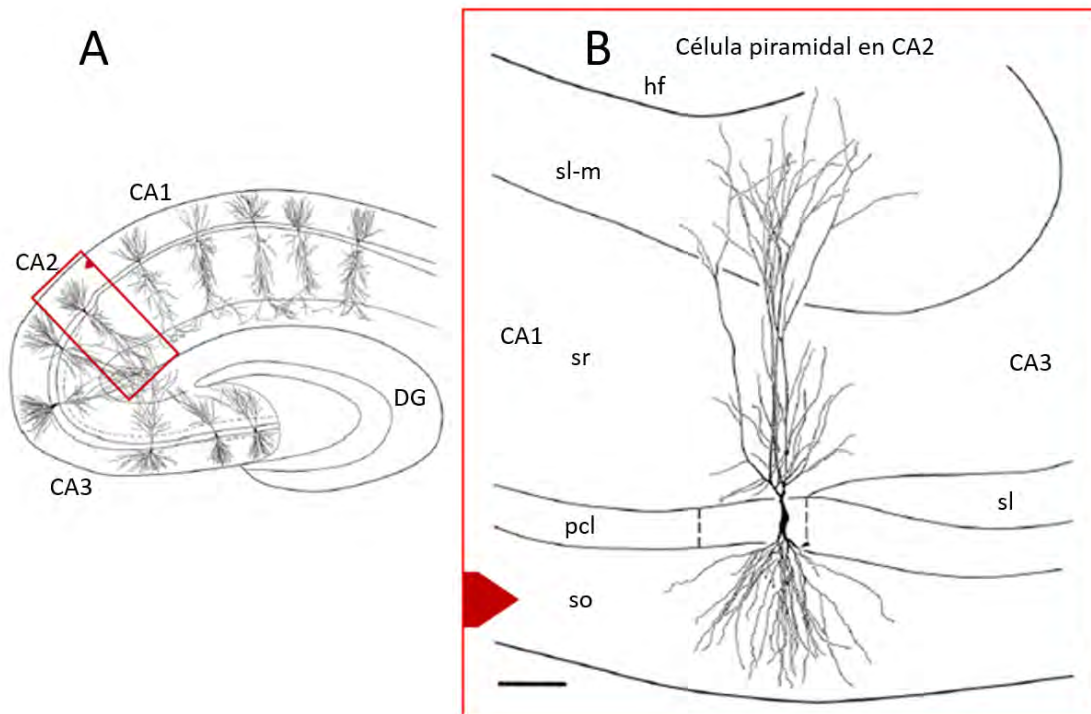


Fig. 1.2-2 Estructura laminar del hipocampo. A. Esquema del hipocampo dorsal, se observa la organización de las neuronas piramidales (principales) a lo largo de las regiones CA1, CA2 y CA3. B. Acercamiento a una neurona piramidal sobre la región CA2. El soma ocupa la capa piramidal (pcl), las dendritas de la zona basal se encuentran en el *stratum oriens* (so), se extienden procesos neuronales hasta el *stratum lacunosum-moleculare* (sl-m). hf, fisura hipocampal; sl, *stratum lucidum*; sr, *stratum radiatum*. Barra de escala= 100 µm. Modificado de (Ishizuka, Cowan, & Amaral, 1995).

1.3.2. Neurofisiología del hipocampo

A mediados de la década de los 60 del siglo pasado, Vanderwolf y su grupo registraron patrones de oscilación neuronal en el hipocampo de ratas durante distintos comportamientos (Boulton & Baker, 1985). De sus observaciones identificaron tres tipos de actividad eléctrica: actividad rítmica theta, actividad irregular de gran amplitud (LIA: *large irregular amplitud activity*) y actividad irregular de baja amplitud (SIA: *small irregular amplitud activity*) (Andersen, 2007).

Actualmente, la actividad eléctrica observada en el hipocampo de ratas en movimiento libre se clasifica en 4 patrones rítmicos: ondas theta (3 Hz-12 Hz), beta (12 Hz-30 Hz), gamma (30 Hz-100 Hz) y ripples (100 Hz-200 Hz); y 2 patrones arrítmicos: LIA y SIA (Fig. 1.2-3).

La oscilación irregular de gran amplitud consiste en ondas agudas que forman un patrón aleatorio junto con ondas de baja frecuencia. El espectro de potencias suele tener mayor potencia en las oscilaciones con frecuencia menor que 3 Hz. Por otro lado, la oscilación irregular de amplitud baja consiste en un patrón de ondas de poca amplitud y alta frecuencia que se presenta de manera ocasional (Andersen, 2007).

Estos patrones se han relacionado con comportamientos específicos. Por ejemplo, la actividad LIA se ha observado durante conductas que no cambian la posición de la rata (mientras comen o toman agua, al estar quietas, en acicalamiento) y durante sueño de ondas lentas. La actividad SIA se observa de manera menos frecuente cuando ocurre un cambio de descanso/sueño a alerta.

Respecto a los patrones rítmicos, las ondas beta y gamma se han asociado a conductas olfativas y poco se sabe sobre su presencia bajo otras circunstancias. Las ondas theta han sido las oscilaciones más ampliamente observadas y estudiadas en rata.

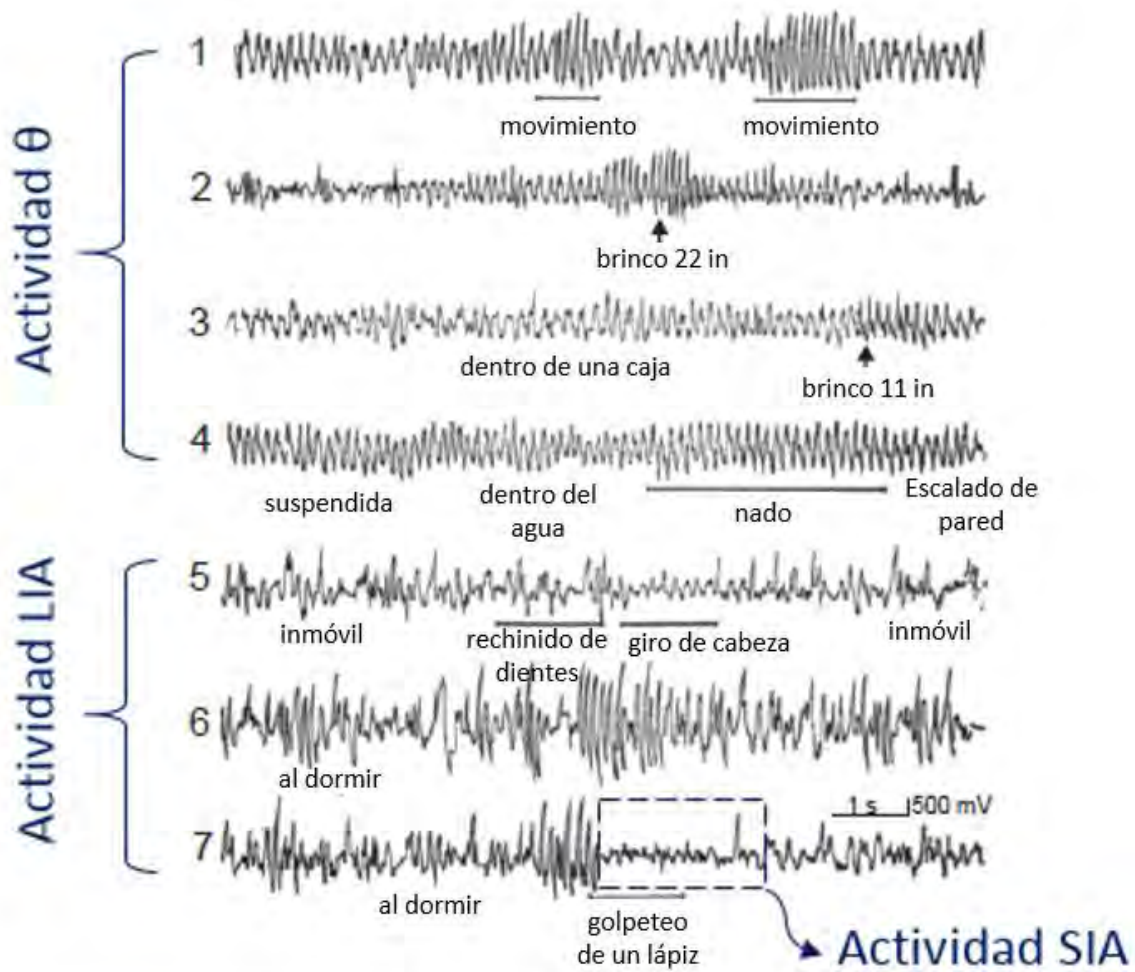


Fig. 1.2-3 Patrones de oscilación eléctrica observados en el hipocampo de ratas. Actividad theta durante 1) sueño REM, 2) y 3) al saltar, 4) durante el nado. Actividad irregular de gran amplitud (LIA) 5) al estar quieto, 6) y 7) en sueño de ondas lentas. Se observa actividad irregular de baja amplitud (SIA) en la transición del sueño a la alerta después de golpear una superficie con un lápiz mientras la rata duerme. Modificado de (Whishaw & Vanderwolf, 1973).

1.3.3. Ondas theta

Para 1975 el grupo de Vanderwolf distinguió dos subtipos de oscilación theta en ratas. La oscilación theta tipo 1 (~ entre 7 Hz-12 Hz) que aparece durante la locomoción y presenta cambios en la frecuencia de oscilación al variar la velocidad con que se inicia o realiza un movimiento (Rivas, Gaztelu, & Garcia-Austt, 1996; Slawinska & Kasicki, 1998; Whishaw & Vanderwolf, 1973).

La oscilación theta tipo 2 de frecuencias más bajas (~ entre 4 Hz-7 Hz) aparece en la vigilia durante estados de inmovilidad-atención (justo antes de iniciar un movimiento, o cuando la rata se inmoviliza debido a un estímulo aversivo), y se observa también en ratas anestesiadas con uretano (Kramis, Vanderwolf, & Bland, 1975).

Con base en la respuesta farmacológica, medida con un bloqueador de receptores colinérgicos: atropina, se ha establecido una clasificación para la oscilación theta tipo 1 o “resistente a atropina” y la oscilación theta tipo 2 o “sensible a la atropina”(Sainsbury, Harris, & Rowland, 1987; Sainsbury, Heynen, & Montoya, 1987).

Por medio de estudios de lesión se ha visto que los dos tipos de oscilación theta desaparecen después de lesionar el núcleo septal medial.

Se ha visto que la oscilación theta tipo 1 desaparece después de lesionar la corteza entorrinal y además desaparece al bloquear el receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA), asociado a conexiones glutamatérgicas. Estos resultados sugieren que la oscilación theta tipo 1 pudiera ser generada por las aferencias excitatorias del núcleo septal medial que pasan por la corteza entorrinal hacia el hipocampo (Andersen, 2007; Bland & Oddie, 2001; Buzsaki, 2002; Lawson & Bland, 1993).

En cuanto a la oscilación theta tipo 2, se ha observado que al inyectar antagonistas colinérgicos en el núcleo septal medial, la oscilación desaparece. Así, se sugiere que las proyecciones colinérgicas provenientes del núcleo septal son las responsables de la oscilación theta tipo 2 (Kramis et al., 1975; Lawson & Bland, 1993).

Diversas regiones subcorticales se han propuesto como participantes clave en la generación del ritmo theta. Aferencias de estos núcleos liberan neurotransmisores que podrían permitir la emergencia de oscilaciones de las redes del hipocampo y sus estructuras asociadas (acción permisiva), o proveer una activación coherente en la frecuencia theta (acción de marcapasos) (Buzsaki, 2002). En particular hay estudios que sugieren que el núcleo supramamilar del hipotálamo puede ser un marcapaso para las oscilaciones theta tipo 2 (Kirk, 1998), mientras que para las oscilaciones tipo 1, la propuesta más aceptada involucra la interacción entre el septum y el hipocampo (Wang, 2002)

1.4. Sincronización en sistemas fisiológicos

Se han realizado muchos trabajos buscando una relación funcional entre estructuras en base a modificaciones en sus ritmos de oscilación. Se cree que la sincronización de la actividad oscilatoria neuronal es uno de los mecanismos más plausibles para lograr tareas en conjunto (Varela et al., 2001).

En el caso de sistemas neuronales, se suele inferir sincronización mediante parámetros de correlación entre oscilaciones. Se dice que dos señales están correlacionadas si es posible predecir las variaciones de una en función de la otra.

Dos de los métodos más usados en neurociencias para evaluar correlación son análisis de coherencia, que mide el coeficiente de correlación entre señales filtradas; y el análisis de acoplamiento de fase o *phase locking value* (PLV) que mide el promedio de la diferencia de las fases instantáneas de las oscilaciones (ver apéndice A2).

En un trabajo pionero de análisis de coherencia, el grupo de Bressler observó un aumento en la coherencia en las bandas gamma y beta entre dos sitios de la corteza de monos durante una tarea de atención sostenida y control de respuesta (Bressler, Coppola, & Nakamura, 1993). Roelfsema y sus colaboradores encontraron un aumento de coherencia entre las oscilaciones de la corteza visual y motora en gatos, cuando debían realizar una tarea somatosensorial para obtener comida (Roelfsema, Engel, König, & Singer, 1997). En general, en humanos y monos se ha observado un aumento de coherencia entre las oscilaciones de distintas regiones de la corteza durante la realización de una tarea particular (Aoki, Fetz, Shupe, Lettich, & Ojemann, 1999; Miltner, Braun, Arnold, Witte, & Taub, 1999; Sarnthein, Petsche, Rappelsberger, Shaw, & von Stein, 1998; Srinivasan, Russell, Edelman, & Tononi, 1999; von Stein, Rappelsberger, Sarnthein, & Petsche, 1999).

Otros trabajos han encontrado un aumento en el valor de acoplamiento de fase (PLV) en las oscilaciones de la corteza de humanos al realizar tareas de atención (Lachaux, Rodriguez, Martinerie, & Varela, 1999; Rodriguez et al., 1999). En registros simultáneos entre el hipocampo ventral, el hipocampo dorsal y la corteza prefrontal medial (mPFC), se observó que durante periodos de ansiedad, se fortalece el valor de acoplamiento de fase (PLV) en la oscilación theta entre el vHi y mPFC, sugiriendo una sincronización para facilitar la transferencia de información relacionada con ansiedad entre estas estructuras (Adhikari, Topiwala, & Gordon, 2011).

Estudios que ponen énfasis en la comunicación funcional de circuitos involucrados en conductas de miedo, sugieren que las oscilaciones theta pueden servir como una

ventana de comunicación entre áreas del sistema límbico y el hipocampo. Registros simultáneos en la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo durante la presencia de estímulos que generan una respuesta de miedo, o durante el sueño REM después de estos estímulos, muestran un aumento de sincronía entre las oscilaciones theta registradas, posiblemente como un mecanismo para facilitar la consolidación de la memoria asociada al miedo (Popa, Duvarci, Popescu, Lena, & Pare, 2010; Seidenbecher, Laxmi, Stork, & Pape, 2003).

El mecanismo celular a través del cual se da la sincronización en redes neuronales aún no ha sido descrito completamente. De manera general, las estructuras cerebrales están compuestas por dos tipos de neuronas: excitatorias o inhibitorias. Por lo tanto, la interacción de cada grupo o una combinación de ambos deberían generar esta actividad sincronizada.

Bremer en 1958 sugirió que las oscilaciones corticales eran producto de conexiones excitatorias que provocaban la activación simultánea de neuronas. En apoyo a esta idea, varios estudios computacionales demostraron que al bloquear la inhibición sináptica cortical se generaban patrones sincronizados similares a los observados empíricamente (Bremer, 1958; Traub, Miles, & Wong, 1989).

Por otro lado, modelos teóricos y trabajos experimentales han demostrado que es posible sincronizar una población de neuronas mediante interacciones sinápticas inhibitorias, en particular en oscilaciones gamma de rebanadas de hipocampo in vitro (Traub et al., 1989).

La idea de una combinación de interacciones inhibitorias y excitatorias se ha considerado ampliamente, y aún se sigue trabajando en modelos para comprender este posible mecanismo de sincronización (Wang, 2010).

2. Antecedentes directos

2.1. El sistema vasopresinérgico

La arginina vasopresina (AVP) u hormona antidiurética es un nona-péptido que se sintetiza principalmente en las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo (Buijs, 1978).

Las principales funciones que se asocian a esta neurohormona están mediadas por el sistema hipotálamo-neurohipofisial, que consiste en proyecciones axonales desde los cuerpos de neuronas magnocelulares en el PVN y SON hacia la neurohipófisis, donde se libera AVP al torrente circulatorio ante una disminución de volumen sanguíneo o un aumento en la osmolaridad plasmática (Fig. 2.1-1).

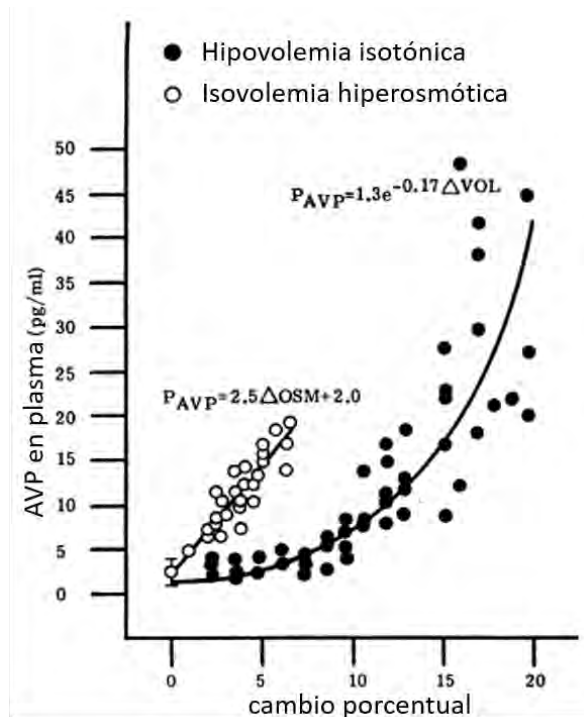


Fig. 2.1-1 Variación de la concentración de AVP al cambiar el volumen sanguíneo y la osmolaridad plasmática. Tomado de (Dunn, Brennan, Nelson, & Robertson, 1973).

Los efectos principales de la unión de esta neurohormona a sus receptores en vasos sanguíneos y en el riñón son aumentar la presión arterial mediante vasoconstricción, y mantener el equilibrio hidroelectrolítico al aumentar la reabsorción de agua por los túbulos distales del riñón.

Además del sistema descrito anteriormente, se han encontrado neuronas productoras de vasopresina en el núcleo supraquiasmático (SQN), el núcleo del lecho de la estría terminalis (BNST) y la amígdala medial (MeA) (De Vries & Buijs, 1983; van Leeuwen & Caffè, 1983), y se han hallado receptores para AVP en varias regiones del cerebro. ¿Cuál es el origen, la función y el mecanismo de acción de la innervación vasopresinérgica hacia otras regiones del sistema nervioso central? Son preguntas que no han sido completamente elucidadas.

2.2. Vía de innervación vasopresinérgica-hipotalámica hacia el hipocampo

Además de la corteza entorrinal, el hipocampo recibe innervación proveniente de otros sitios. Dos estudios anatómicos recientes revelaron que en ratas, axones que contenían vasopresina provenientes de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo establecían sinápsis con neuronas piramidales e interneuronas del hipocampo dorsal y ventral, principalmente en la región CA2 (Cui, Gerfen, & Young, 2013; Zhang & Hernandez, 2013).

Por medio de un estudio de inmunohistoquímica y marcaje retrógrado, Zhang y Hernández hicieron un análisis semicuantitativo de la innervación de fibras de AVP en las regiones del hipocampo y encontraron una alta densidad de fibras en el stratum oriens y radiatum de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo ventral (Fig. 2.2-1).

En menor densidad, pero de manera significativa se encontró innervación en las regiones CA2 y CA3 del hipocampo dorsal. En el hipocampo hallaron fibras AVP delgadas y gruesas y mediante microscopía electrónica se determinó que las fibras gruesas establecían sinápsis excitatorias con las dendritas de neuronas piramidales de la región CA2 y CA3, mientras las fibras delgadas establecían sinápsis inhibitorias en las dendritas de interneuronas.

Por último, mediante la inyección del marcador retrógrado fluoro-gold en las regiones de más alta innervación vasopresinérgica en el hipocampo dorsal y ventral, se confirmó que algunas de las fibras observadas en estas regiones tenían su origen en los núcleos hipotalámicos PVN y SON. El trabajo de Cui et al, usando trazadores virales, llegó a las mismas conclusiones sobre la innervación del área CA2 del hipocampo por fibras vasopresinérgicas con origen en neuronas del núcleo PVN del hipotálamo (Cui et al., 2013).

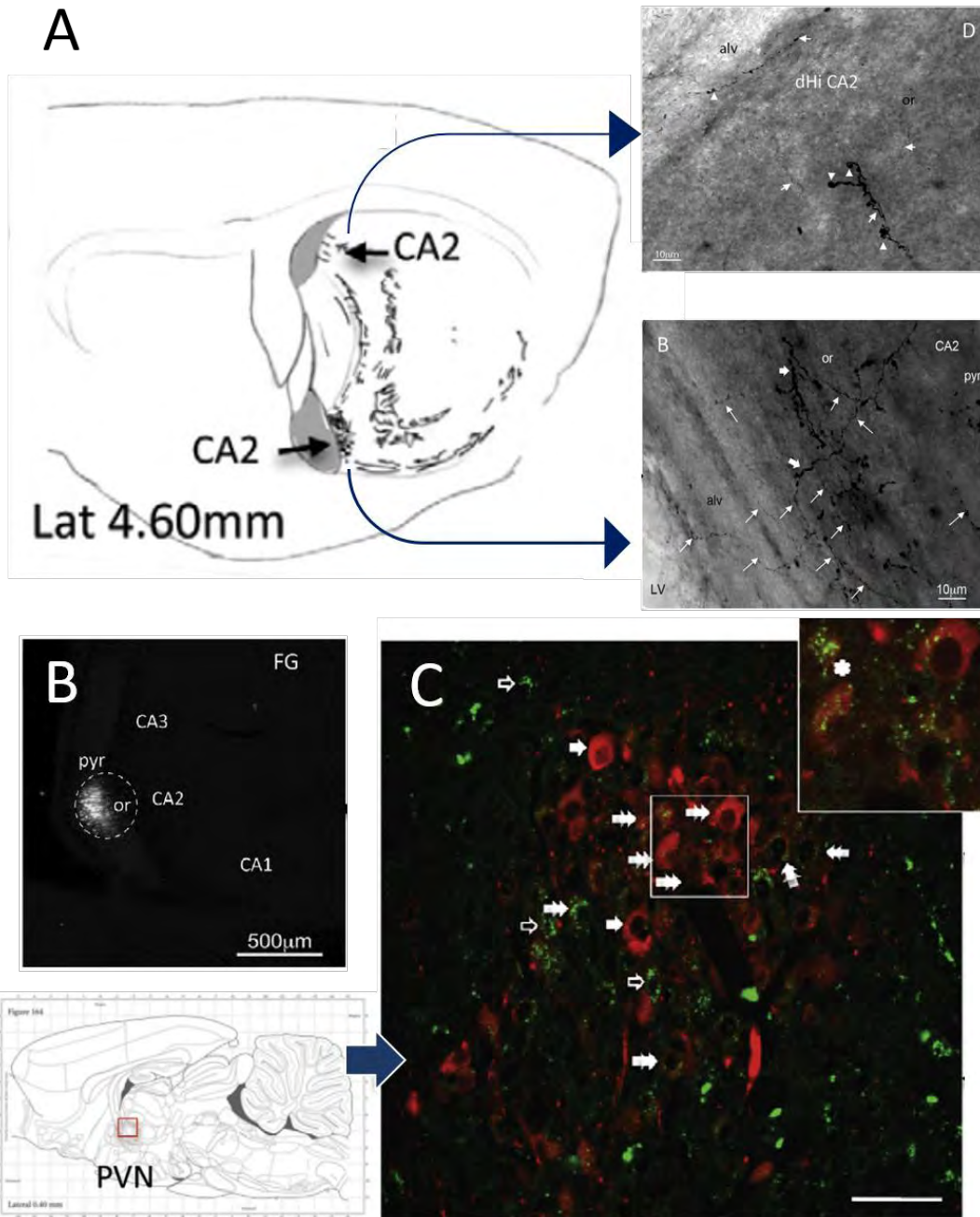


Fig. 2.2-1 Inervación de fibras de vasopresina provenientes del núcleo PVN en las regiones dorsal y ventral del hipocampo. A. Sección sagital con líneas que representan la distribución de fibras de AVP en el hipocampo. A la derecha, visualización inmunohistoquímica de las fibras en un corte coronal de la región CA2 del hipocampo dorsal (parte superior) y la región CA2 del hipocampo ventral (parte inferior). B. Sitio de inyección de fluorogold (FG) en CA2 vHi. C. Células con marcaje retrógrado de FG en el núcleo PVN del hipotálamo: en rojo marca de FG, en verde marca de AVP. Abajo a la izquierda, representación esquemática con un cuadro rojo indicando el sitio donde se observa el marcaje. Barra de escala = 50 µm. Modificado de (Zhang & Hernandez, 2013)

3. Planteamiento del problema y objetivos

Las oscilaciones del potencial eléctrico en el cerebro son un reflejo directo de la actividad en conjunto de diferentes tipos neuronales. En consecuencia, la caracterización de esta oscilación dará información del estado de activación/ no activación de la red en el momento en que se mida.

En un sistema complejo (formado por más de una red neuronal) un análisis sobre la relación temporal entre distintas oscilaciones podría aportar información sobre la interacción entre los ensambles neuronales asociados a dichas oscilaciones.

De manera que cuando existe una interacción directa, como es una conexión anatómica entre dos estructuras cerebrales, deberá ser posible caracterizar el estado de sincronización entre las oscilaciones que presenten, y observar si al modificar el estado de uno de los ensambles es posible reflejar esta modificación en el modo de oscilación del otro, así como en el grado de sincronización entre ambos.

El objetivo general de este trabajo es descifrar la influencia moduladora de la inervación vasopresinérgica del hipotálamo sobre la actividad oscilatoria de redes hipocámpales en ratas.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- I. Realizar registros del potencial local de campo en el núcleo paraventricular para obtener datos electrofisiológicos sobre la presencia de oscilaciones en la banda theta.
- II. Caracterizar el cambio en la oscilación de la banda theta en el hipocampo (dorsal y ventral) y en el núcleo PVN (si presenta oscilaciones theta) al activar el sistema vasopresinérgico durante registros de potencial local de campo *in vivo* midiendo: i) su prevalencia respecto a otras bandas, ii) su componente principal de frecuencia.
- III. Hacer un análisis de sincronización de fase de la oscilación theta entre el núcleo PVN y el hipocampo ventral y entre el hipocampo dorsal y ventral antes y después de la activación del sistema vasopresinérgico, en registros simultáneos *in vivo*.

4. Métodos

4.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* (250g-300g) facilitados por el bioterio de la facultad de Medicina de la UNAM, que cumple con la norma NOM-062-ZOO-1999 titulada “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Los animales fueron alojados en un cuarto con ventilación controlada, agua y comida *ad libitum* (excepto la noche anterior al registro, que se dejaban en ayuno de 12 horas) y ciclo luz/obscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 21 horas). Los experimentos se realizaron siempre a la misma hora (periodo de actividad de la rata) para evitar sesgos debido a las variaciones hormonales que se dan en el día de manera natural.

Todos los registros electrofisiológicos fueron realizados en base a las guías para el cuidado y uso de mamíferos en Investigación en Neurociencias, editada por el *National Research Council (Academies, 2003)*.

4.2. Procedimiento quirúrgico

La fase de inducción de la anestesia general se realizó mediante inhalación de isoflurano al 4% en O₂ con una unidad de anestesia (*VetTech Solutions*). El mantenimiento de la anestesia general se realizó con 1.5 g/kg de uretano al 25% en solución salina fisiológica (al 0.9%) vía intraperitoneal (con esta dosis se consigue una anestesia de larga duración ~ 8 horas). Se operaron sólo aquellas ratas que presentaron pérdida total de reflejos alrededor de 30 minutos después de la inducción de la anestesia.

Para cada animal, la cabeza se fijó mediante un marco estereotáxico (*David Kopf Instruments*) colocando una barra en cada canal auditivo externo y fijando a otra los incisivos y el maxilar. La rata se mantenía a una temperatura de 34 °C al colocarla sobre una almohadilla térmica conectada a un termómetro rectal (*Physitemp Instruments*).

La incisión de la piel sobre el cráneo se realizó en dirección rostro-caudal y con ganchos se sostuvo la piel y el músculo de manera que quedara expuesto el cráneo. Se utilizó un microscopio esterotáxico (*Carl Zeiss*) para buscar la intersección de suturas Bregma, un punto anatómico de referencia.

A partir de Bregma, se calculó una distancia anteroposterior (AP) de -3.0 mm, lateral-medial (LM) de 2.4 mm para CA2-dHi; AP de -5.0 mm, LM de 5.0 mm para CA2-vHi; y AP de -1.7 mm, LM de 0.5 mm para el núcleo PVN (Paxinos & Watson, 2007). Alrededor de

estos puntos se removió el cráneo con un taladro eléctrico (*Ram Products, Inc.*) y se quitaron las meninges.

Durante toda la cirugía se cuidó no generar sangrado excesivo y el cerebro expuesto se mantuvo hidratado con solución salina fisiológica. Se colocó un alambre de plata clorurado de forma subcutánea en la nuca como electrodo de referencia (tierra).

4.3. Registros de potencial local de campo

Se utilizaron electrodos hechos a partir de capilares de vidrio borosilicado con microfilamento de 1.65 mm de diámetro externo / 0.86mm de diámetro interno (*Sutter Instruments*), con una resistencia de entre 8 M Ω -15 M Ω . Los electrodos se llenaron con solución salina fisiológica y se impregnaron con marcador lipofílico fluorescente dil (*Sigma-Aldrich*) para verificar posteriormente el sitio de posición del electrodo.

Para colocar los electrodos en los sitios correspondientes: CA2-dHi (AP -3.0 mm, LM 2.4mm, DV 2.5mm); CA2-vHi (Ap -5.0 mm, LM 5.0 mm, DV 7.0mm) y PVN (AP -1.7 mm, LM 0.5 mm, DV 7.0 mm) se utilizó un microposicionador (*Kopff*).

La señal captada por los electrodos fue amplificada en primera instancia por un cabezal o *headstage* (*Npi electronic GmbH*) y después por un módulo de amplificación ELC-01MX (*Npi electronic GmbH*). Después del primer paso de amplificación, la señal se dividió en dos: pasaba por un circuito amplificador diferencial con filtro analógico DPA-2FX (*Npi electronic GmbH*) entre 0.3 Hz y 300 Hz para registro de LFP, y otro módulo DPA-2FX (*Npi electronic GmbH*) entre 300 Hz y 3000 Hz para el registro de actividad unitaria. La señal fue digitalizada a 1 kHz para registro de LFP y a 20 kHz para registro de actividad unitaria con un módulo (*Npi electronic GmbH*). Finalmente se almacenó en *sweeps* o 'barridas de datos' de 500 ms.

4.4. Estimulación del sistema AVP

El registro basal de LFP se tomó de aproximadamente 30 minutos una vez colocados los electrodos. Pasado este periodo, se inyectó una dosis correspondiente al 2% del peso corporal del animal de una solución salina hipertónica (NaCl 900 mM) vía intraperitoneal. Como se mencionó anteriormente, este estímulo activa a las neuronas vasopresinérgicas del hipotálamo. A partir de la inyección se registró un lapso de aproximadamente 40 minutos bajo condición hiperosmótica.

4.5. Análisis histológico

Después de cada registro, las ratas eran perfundidas y examinadas para verificar la localización de los electrodos. Se realizaron perfusiones transcardiales con solución salina al 0.9% y posteriormente 400 ml de fijador (4% paraformaldehído (PFA) en amortiguador de fosfatos (PB 0.1 M) más 15% ácido pícrico saturado).

Una vez fijados, los cerebros eran colocados en PB 0.1 M y rebanados en secciones coronales de 70 μm con un vibratomo (*Leica Biosystems*). Se localizaron las rebanadas donde se observó el trayecto del electrodo y se montaron 6 secciones consecutivas alrededor de ellas. Se usó medio de montaje *vectashield* (*Vector Laboratories*), se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (*Nikon Instruments*).

4.6. Análisis de datos

Las señales registradas fueron analizadas posteriormente con los programas **SciWorks** (*DataWave* v. 8.1), **Clampfit** (*Axon Instruments* v. 10.5.1.0) y **MATLAB** (*MathWorks* v. R2014b). El análisis de los registros de LFP se dividió en dos: En la primera parte se analizaron las propiedades oscilatorias de cada estructura de manera individual, mientras en la segunda se realizó un análisis bivariante de sincronización.

I. Caracterización individual de la oscilación theta

Para la visualización global de los registros, se realizó un análisis de transformada rápida de Fourier de corta duración (sFT, ver apéndice A3) usando el programa **SciWorks**. Se tomaron ventanas de 4 s con un solapamiento de 50% y se usó una función de Hamming como *taper*. Puesto que la frecuencia de muestreo fue de 1 kHz, el intervalo de frecuencias obtenido fue de 0 Hz a 500 Hz con una resolución de 0.25 Hz. Todos los espectrogramas (apéndice A3) mostrados en este trabajo fueron realizados con estos parámetros.

Los espectros de potencia se realizaron en intervalos de 5 minutos: considerando los primeros minutos basales y los minutos que siguieron después de 30 minutos de haber sido aplicado el estímulo, este periodo se eligió de manera empírica, al observar en la mayoría de los casos un cambio estable. Se realizó un análisis de sFT por medio del programa **Clampfit**, bajo los mismos parámetros con los que se realizaron los espectrogramas.

A partir de este análisis, se obtuvo la frecuencia y la potencia de la componente más prominente de la oscilación theta (3 Hz a 10 Hz, en este trabajo) en estado basal y de condición hiperosmótica. Se obtuvo también el porcentaje de potencia de la banda theta respecto al resto de las bandas del espectro (0 Hz a 500 Hz), en condición basal e hiperosmótica.

II. Análisis bivalente de sincronización

Se realizó un análisis de acoplamiento de fase entre las oscilaciones registradas en el núcleo PVN y el hipocampo ventral, y entre el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral por medio del cálculo de valor de acoplamiento de fase PLV (ver apéndice A2).

Se realizó un análisis de Fourier con el programa **MATLAB** para calcular la fase instantánea y amplitud de la señal en condición basal y de hiperosmolaridad. Se tomaron ventanas de 2 s de longitud y se calculó la potencia de las bandas de frecuencia theta (3 Hz-10 Hz) y delta (1 Hz-2.9 Hz). De estas ventanas, se extrajeron aquellas donde la razón de la suma total de potencias de banda theta y la suma de potencias correspondientes a la banda delta fuera mayor que 2.

El cálculo de PLV se realizó en episodios de al menos 3 ventanas continuas (6s) donde ocurriera la condición de que la razón de potencias en las bandas theta y delta fuera mayor que 2.

Se filtró la señal mediante un filtro pasa-banda entre 3 Hz y 7 Hz, hecho en **MATLAB**, se calculó el PLV en ventanas de 10 s y se calculó el promedio.

4.7. Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias entre los promedios de las frecuencias y potencias medidas eran significativas, se utilizó una prueba de T Student pareada. Este tipo de prueba se utiliza para determinar la probabilidad de que las observaciones realizadas antes y después de un tratamiento procedan de distribuciones con medias de población iguales. El valor estadístico t entre dos poblaciones x_1, x_2 se calcula:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad (1)$$

Donde \bar{x} es la media de las poblaciones, s la varianza y m y n el número de datos de cada población (Microsoft Office, v. 2013). Los límites de significancia estadística se tomaron por convención como * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

5. Resultados

5.1. Caracterización de la oscilación theta en registros individuales en PVN, dHi y vHi

5.1.1. Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)

Se observó una característica muy novedosa respecto a la oscilación de ese núcleo: la presencia de una banda en el intervalo theta. Este hallazgo dio lugar al estudio de la red hipotálamo-hipocampal a nivel de oscilación local. Estos son los resultados:

Un ejemplo representativo de un registro en el PVN se muestra en la Fig. 5.2-1. El espectrograma muestra la evolución temporal tanto de la frecuencia de oscilación, como de la potencia asociada a esa frecuencia. Se observa un aumento en la frecuencia theta predominante (alrededor de 4 Hz) después de la aplicación del estímulo. Este aumento se mantiene después de 30 minutos de la inyección de solución hipertónica.

De nueve registros que se hicieron en esta estructura, se observó un aumento en la frecuencia predominante en el 78% de los casos. En promedio, esta frecuencia pasó de 3.3 ± 0.1 Hz a 4.3 ± 0.2 Hz; $p = 0.0004$. Aumentó su potencia en 56% de los casos de 0.020 ± 0.009 mV²/Hz a 0.100 ± 0.078 mV²/Hz; $p = 0.3$ (Fig. 5.1-2).

No se observó una tendencia clara en cuanto al porcentaje de oscilación correspondiente al intervalo theta respecto a otras bandas.

5.1.2. Hipocampo dorsal (dHi)

En la Fig. 5.2-3 se reporta un registro de LFP en la región CA2 del hipocampo dorsal. Se observa que la frecuencia predominante tiene un desplazamiento hacia un valor mayor luego de la inyección de solución hiperosmótica. Aproximadamente 20 minutos después, la potencia de esta frecuencia incrementa.

Se realizaron 13 registros en esta región y se observó el efecto de incremento de frecuencia y potencia en 78% de los casos (10 registros). En promedio la frecuencia predominante pasó de 3.2 ± 0.1 Hz a 3.6 ± 0.1 Hz; $p = 0.00002$, y la potencia aumentó de 0.3 ± 0.1 mV²/Hz a 0.6 ± 0.2 mV²/Hz; $p = 0.03$. El porcentaje del espectrograma que corresponde al intervalo de oscilación theta aumentó en promedio de 10% a 25%; $p = 0.00004$. Este fenómeno se observó en todos los registros realizados (Fig. 5.2-4).

5.1.3. Hipocampo ventral (vHi)

En la Fig. 5.2-5 se muestra uno de los registros de LFP en el hipocampo ventral. De acuerdo al espectro de potencias en condición basal e hipertónica existe un aumento en el valor de la frecuencia dominante en el intervalo theta y existe también un incremento en la potencia asociada a esa frecuencia.

En total se analizaron 21 registros en vHi, en 14 de ellos se observó un fenómeno de aumento de frecuencia y potencia de la oscilación predominante, esto representa el 67% de los casos. En promedio la frecuencia se incrementó de $3.3 \text{ Hz} \pm 0.1$ a $3.7 \text{ Hz} \pm 0.1 \text{ Hz}$; $p = 0.0002$, y la potencia incrementó de $0.17 \pm 0.08 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ a $0.32 \pm 0.15 \text{ mV}^2/\text{Hz}$; $p = 0.09$. El porcentaje del espectrograma que corresponde al intervalo theta aumentó de 6% a 17%; $p = 0.001$. Este aumento se observó en 57% de los casos.

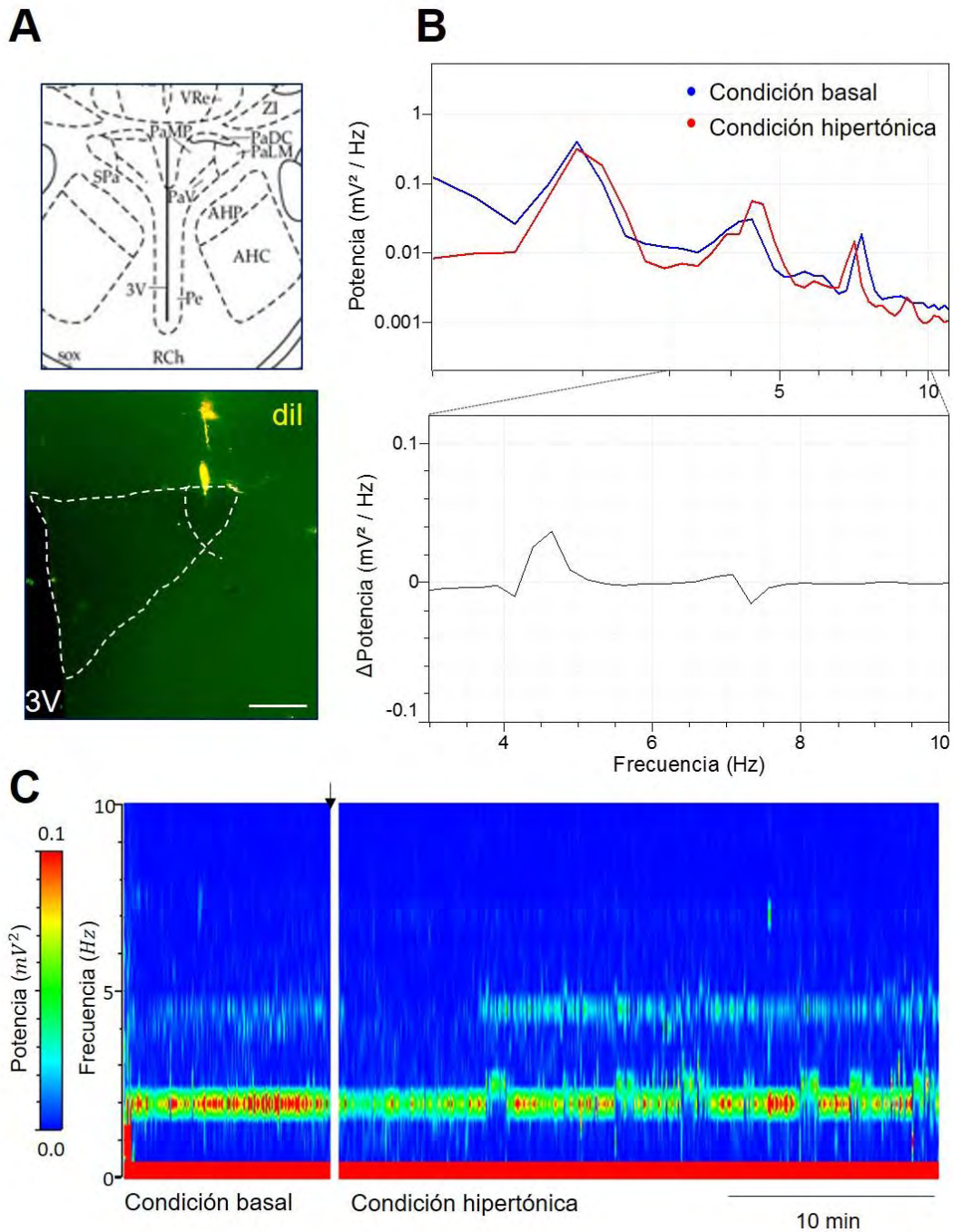


Fig. 52-1 Registro de LFP en PVN. A. Fotografía de la posición del electrodo en el hipotálamo junto a un esquema de las estructuras alrededor de él. Posición AP = -1.7 mm. Barra de escala = 200 μm . 3V: tercer ventrículo. B. Arriba: espectro de potencia en estado basal (5 minutos iniciales) e hipertónico (periodo de 5 minutos, 30 minutos después de proporcionar el estímulo). Gráfica en escala logarítmica. Abajo, diferencia de potencias entre estado hipertónico y basal en el intervalo theta. C. Espectrograma del registro completo. El código de color muestra la potencia asociada a cada frecuencia. Se observa claro un aumento en el valor de la frecuencia predominante (4 Hz) en el intervalo theta y su potencia asociada. La flecha negra indica el momento de la inyección de solución hipertónica.

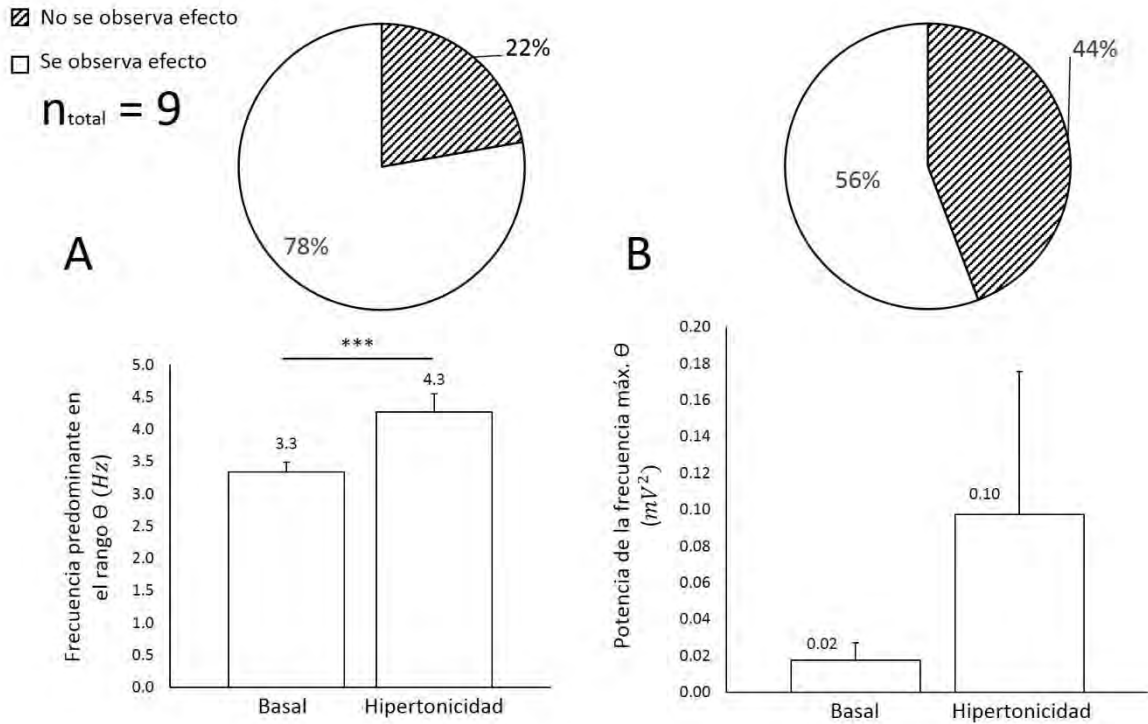


Fig. 52-2 Estadística de 9 registros de LFP en PVN. A. Incremento de 1.0 Hz en el valor de la frecuencia predominante bajo condición basal y de activación del sistema AVP, se observó el efecto en 78% de los casos, en el resto no hubo cambio. $p < 0.001$. B. Incremento de 0.08 mV^2/Hz de la potencia de la oscilación predominante en el 56% de los casos después de la activación del sistema AVP, en el resto no hubo cambio. Más adelante se discute el valor del error estadístico asociado.

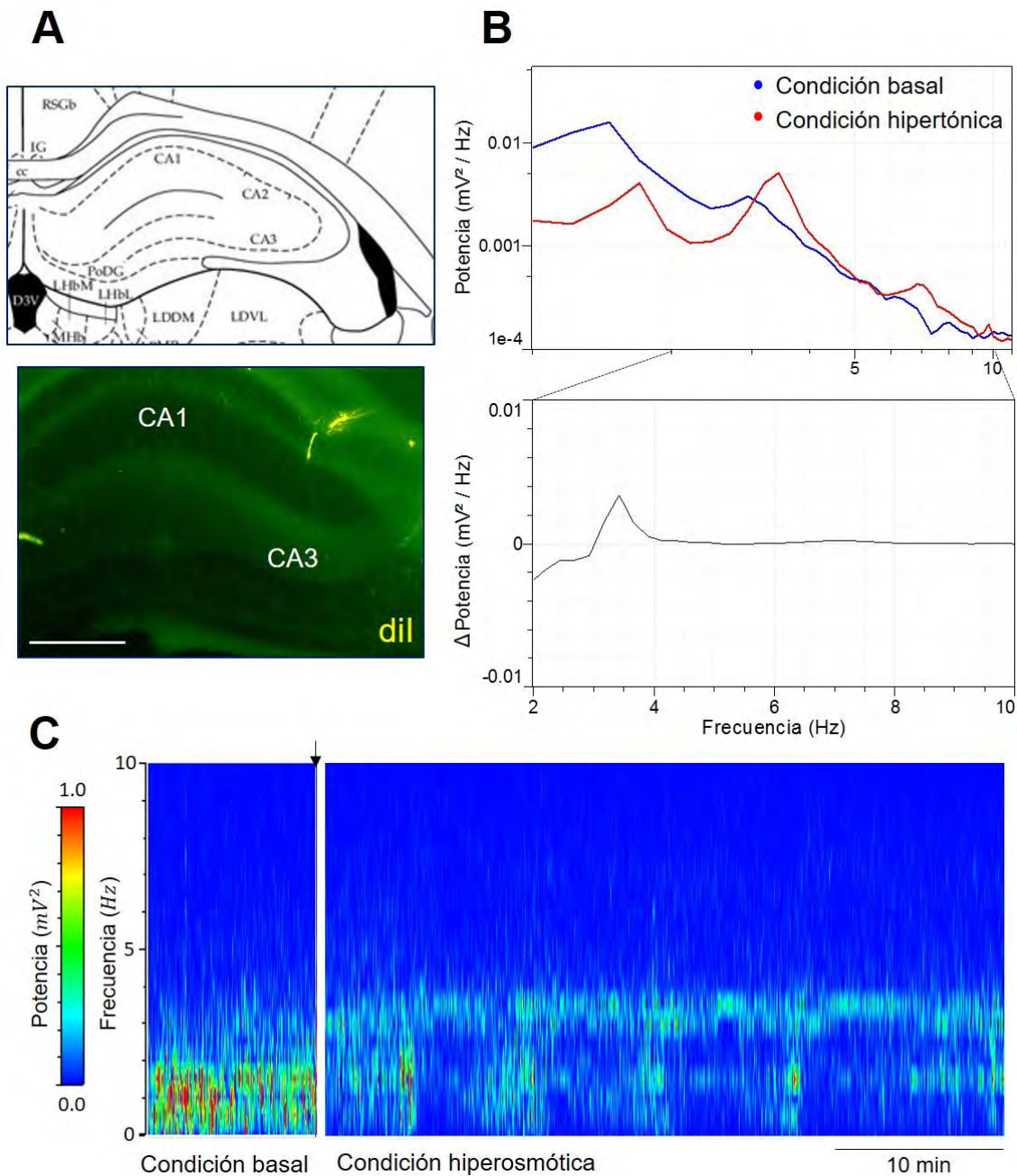


Fig. 52-3 Registro de LFP en dHi. A. Fotografía de la posición del electrodo en la región CA2 del hipocampo dorsal junto a un esquema de las estructuras a su alrededor. Posición AP = -2.5 mm. Barra de escala = 500 μ m. B. Arriba: espectro de potencias en estado basal (5 minutos iniciales) e hipertónico (periodo de 5 minutos, 30 minutos después de proporcionar el estímulo). Gráfica en escala logarítmica. Abajo, diferencia de potencias entre estado hipertónico y basal en el intervalo theta. C. Espectrograma del registro completo. El código de color muestra la potencia asociada a cada frecuencia. Se observa claro un aumento en el valor de la frecuencia predominante (3 Hz) en el intervalo theta y su potencia asociada. La flecha negra indica el momento de la inyección de solución hipertónica.

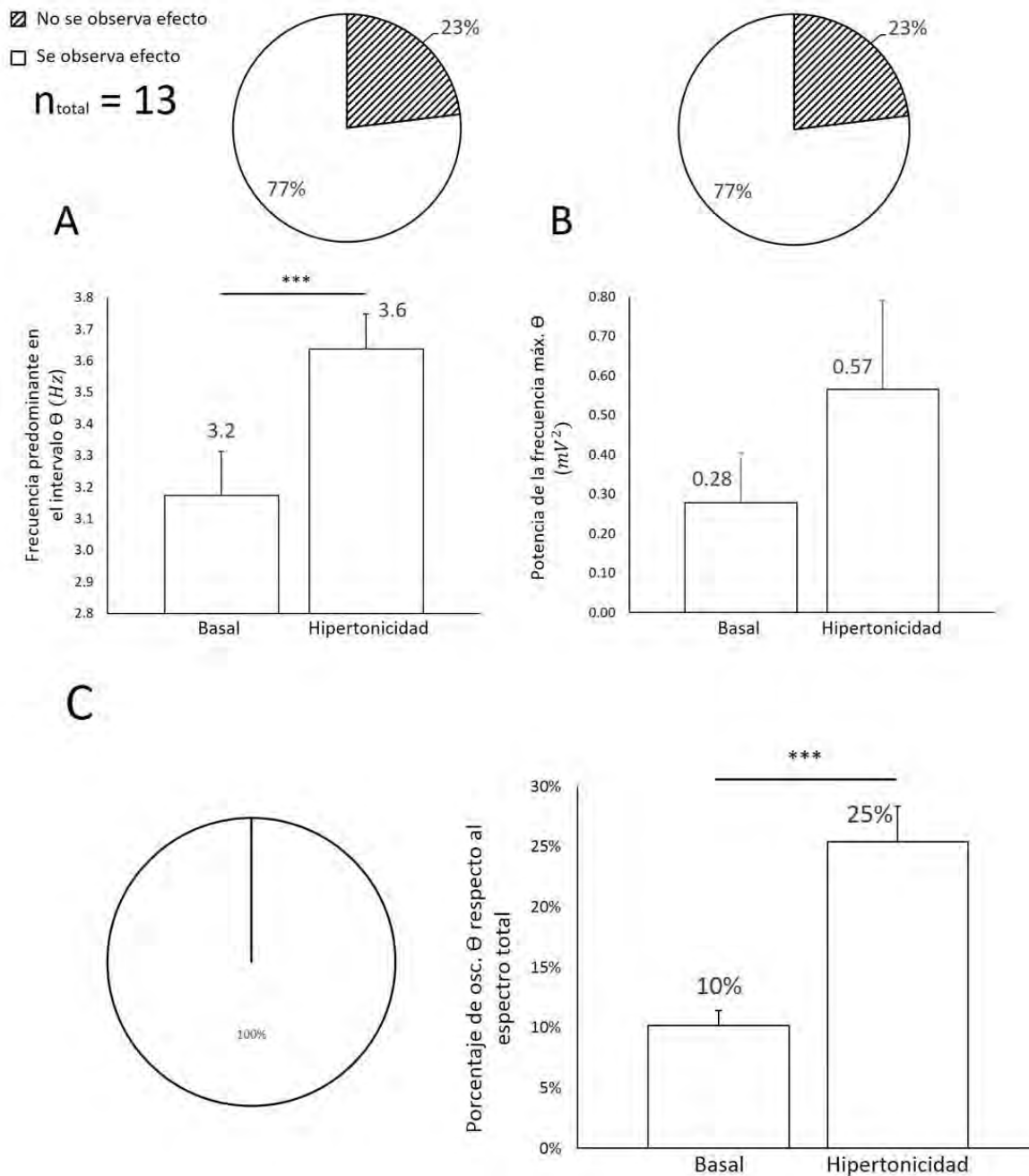


Fig. 5.2-4 Estadística de 13 registros de LFP en dHi. A. Incremento de 0.4 Hz en el valor de la frecuencia predominante bajo condición basal y de activación del sistema AVP. Según el gráfico circular, se observó el efecto en 77% de los casos, no se observó cambio en el resto. $p < 0.001$. B. Incremento de 0.29 mV^2/Hz de la potencia de la oscilación predominante en el 77% de los casos después de la activación del sistema AVP. C. Aumento en el porcentaje de oscilación en el intervalo theta de 15% respecto a otras bandas de oscilación, el gráfico circular muestra que este efecto ocurrió en 100% de los casos. $p < 0.001$.

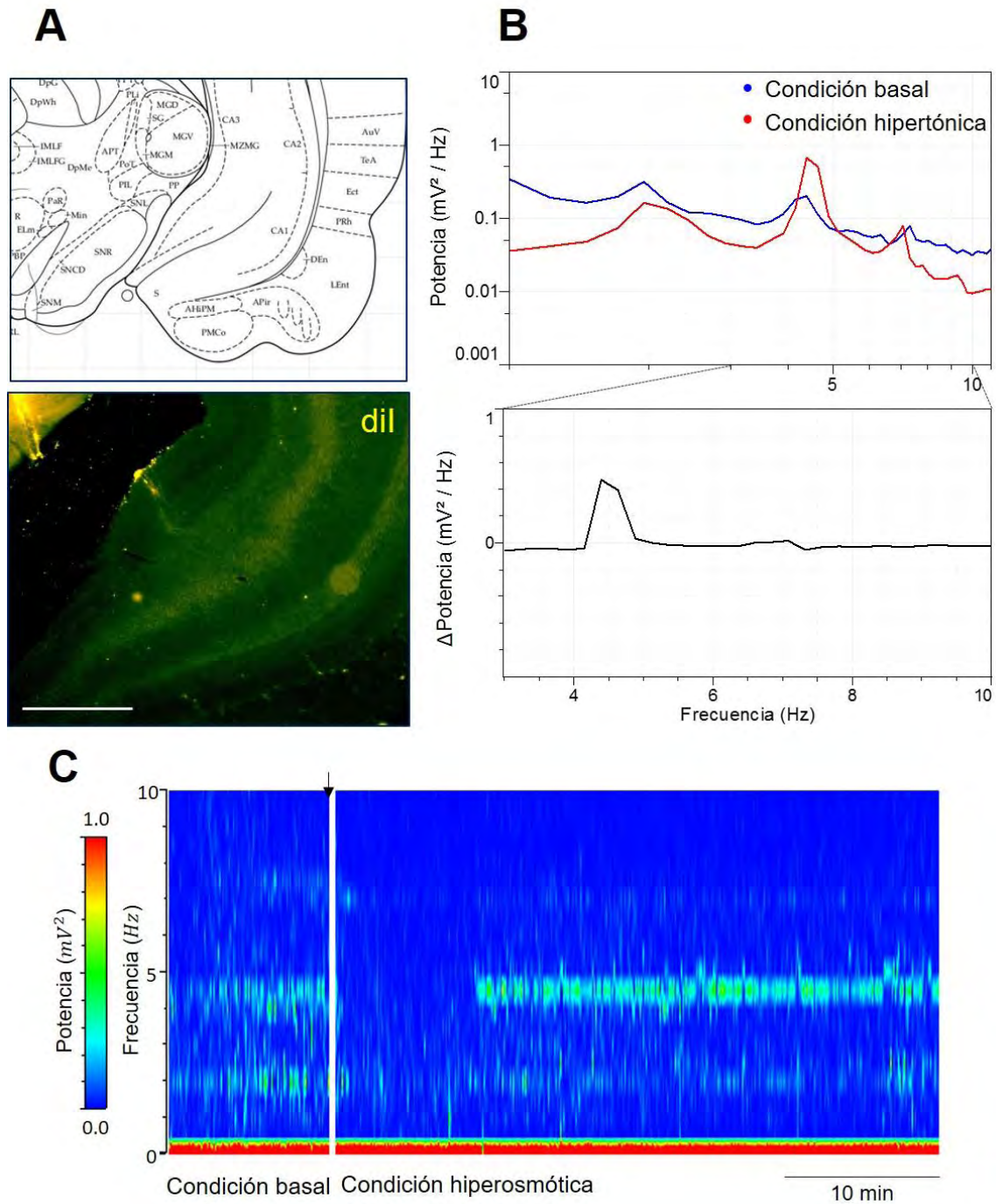


Fig. 52-5 Registro de LFP en vHi. A. Fotografía de la posición del electrodo en el hipocampo ventral junto a un esquema de las estructuras a su alrededor. Posición AP = -5.6 mm. Barra de escala = 500 μ m. B. Arriba: espectro de potencias en estado basal (5 minutos iniciales) e hipertónico (periodo de 5 minutos, 30 minutos después de proporcionar el estímulo). Gráfica en escala logarítmica. Abajo, diferencia de potencias entre estado hipertónico y basal en el intervalo theta. C. Espectrograma del registro completo. El código de color muestra la potencia asociada a cada frecuencia. Se observa claramente un aumento en el valor de la frecuencia predominante (4Hz) en el intervalo theta y su potencia asociada. La flecha negra indica el momento de la inyección de solución hipertónica.

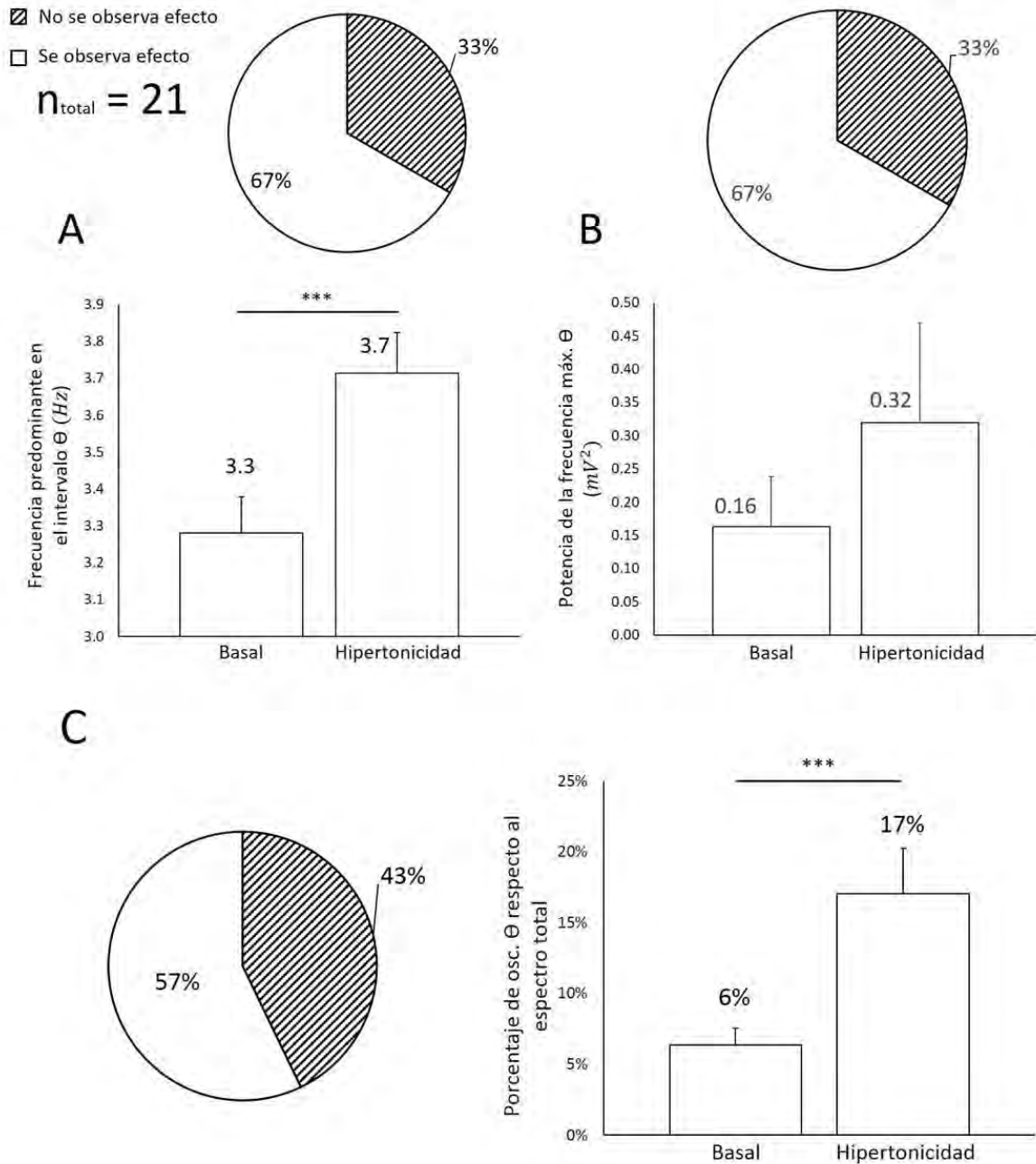


Fig. 5.2-6 Estadística de 21 registros de LFP en vHi. A. Incremento de 0.4 Hz en el valor de la frecuencia predominante bajo condición basal y de activación del sistema AVP. Según el gráfico circular, se observó el efecto en 67% de los casos, no se observó cambio en el resto. $p < 0.001$. B. En 67% de los casos hay un incremento de 0.16 mV^2/Hz de la potencia de la oscilación predominante después de la activación del sistema AVP. C. Aumento en el porcentaje de oscilación en el intervalo theta de 11% respecto a otras bandas de oscilación, el gráfico circular muestra que este efecto ocurrió en 57% de los casos. $p = 0.001$.

5.2. Análisis de valor de acoplamiento de fase (PLV) en registros simultáneos

Se realizaron 5 registros simultáneos entre el núcleo PVN y la región ventral del hipocampo. De estos 5 registros, en 4 se observó un incremento del 10% en el valor de acoplamiento de fase.

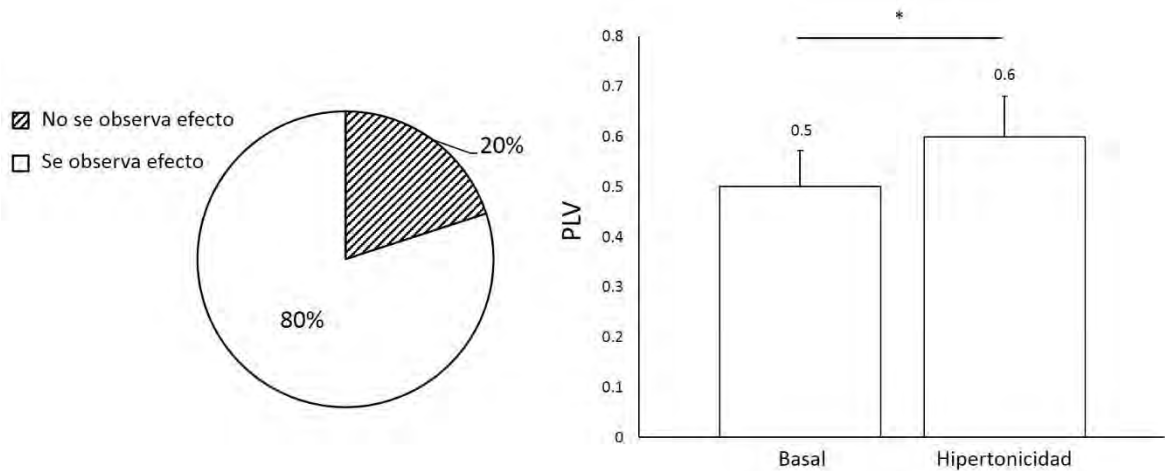


Fig. 5.3-1 Estadística de 5 registros simultáneos de LFP en vHi y PVN. Se observa el efecto en 80% de los casos, el valor de amarramiento de fase aumentó en 0.1. $p=0.05$.

Se realizaron 4 registros simultáneos entre la región ventral del hipocampo (vHi) y la región dorsal del hipocampo (dHi). De estos 4 registros, se observó un incremento del valor de acoplamiento de fase en la mitad de los casos y una disminución del valor de acoplamiento de fase en la otra mitad.

6. Discusión

6.1. Caracterización de la oscilación theta en registros individuales en PVN, dHi y vHi

Los resultados de este trabajo muestran una propiedad novedosa del núcleo paraventricular PVN: la presencia de oscilaciones en el rango de la oscilación theta. Se muestra además, que un estímulo sistemático que aumenta la actividad de las neuronas AVP del núcleo PVN, potencia esta oscilación. En la literatura se han encontrado trabajos que modelan las oscilaciones de potencial eléctrico en el hipocampo de acuerdo a la organización estructural de las neuronas principales (piramidales) que lo componen (Buzsaki, 2002; Holsheimer, Boer, Lopes da Silva, & van Rotterdam, 1982; Leung, 1984). Sin embargo no existe un trabajo similar para las neuronas del núcleo PVN, pues las neuronas de este núcleo no presentan una organización similar.

Esta observación permite hacer la implicación para este circuito, de que los eventos que ocurren a nivel celular transfieren información a nivel de la red neuronal, como otro mecanismo cuya finalidad es lograr la comunicación, más allá de una propiedad emergente del sistema físico.

Por otro lado, se observaron aumentos en la frecuencia predominante de la banda theta en las tres estructuras estudiadas en este trabajo: el núcleo PVN, el hipocampo dorsal (dHi) y el hipocampo ventral (vHi). Stewart y Fox (Stewart & Fox, 1990) hicieron un trabajo en hipocampo donde describen la presencia de oscilaciones theta como una consecuencia de la activación de un circuito local de interneuronas y células piramidales. En específico, Stewart y Fox explican que una vía excitatoria colinérgica proveniente del septum medial activa de manera sincronizada la actividad de las interneuronas, que a su vez inhiben neuronas piramidales generando la oscilación theta.

En analogía con el trabajo de Stewart y Fox, y puesto que existen neuronas vasopresinérgicas que establecen sinápsis con interneuronas en el hipocampo (Zhang & Hernandez, 2013), es posible que la activación de la vía vasopresinérgica modifique sustanciosamente ciertos circuitos interneurona-célula piramidal y esta información esté siendo codificada en la frecuencia y la potencia de la oscilación theta.

¿Cómo se da esta codificación? Otro trabajo que involucra un control excitatorio sobre las oscilaciones de potencial eléctrico en el hipocampo es el de Traub et al. En 1996, ellos sugirieron que la frecuencia de la oscilación gamma en el hipocampo era controlada

por la cantidad de control excitatorio dirigido a una red de interneuronas. Mediante modelos computacionales y experimentos realizados in vitro, sugirieron que mientras mayor fuera la entrada excitatoria a una red interneuronal, mayor sería la frecuencia de la oscilación gamma registrada en la región (Traub, Whittington, Colling, Buzsaki, & Jefferys, 1996).

En 1998, Sawinska y Kasicki observaron un aumento en la frecuencia de la actividad hipocampal asociada a locomoción en el EEG de ratas cuando se estimulaba eléctricamente la región posterior hipotalámica. Quizás porque la estimulación eléctrica produce un impulso excitatorio de mayor magnitud que cuando el movimiento es espontáneo (Slawinska & Kasicki, 1998).

Una justificación de funcionalidad del aumento de frecuencia en una banda de oscilación de LFP se ha propuesto en las células de lugar (*place-cells*) en el hipocampo de ratas. Las células de lugar son neuronas en el hipocampo que se descubrieron en 1982, su principal característica es que tienen mayor preferencia de activación (disparo) cuando la rata pasa por un lugar en específico.

En trabajos donde se registró la oscilación de LFP en la región CA1 del hipocampo dorsal, se encontró que cuando la rata corría se daba un aumento en la frecuencia de la banda theta y gamma. Este aumento de frecuencia se ha asociado a la preservación de la especificidad espacial de las células de lugar. La hipótesis es que las células de lugar deben preservar su preferencia de disparo en una fase específica de la oscilación theta y gamma durante el movimiento de la rata, aún si ésta aumenta su velocidad de traslado. Si esto ocurre, entonces al aumentar la frecuencia de la oscilación se lograría el disparo preferencial de fase en menor tiempo (Ahmed & Mehta, 2012; Geisler, Robbe, Zugaro, Sirota, & Buzsaki, 2007).

En lo que respecta a este trabajo, es claro que existe una diferencia significativa en la frecuencia predominante de la oscilación theta antes y después de la activación del sistema vasopresinérgico. Para dar una descripción completa de lo que ocurre en el circuito PVN-hipocampo se propone entonces: demostrar que la modificación se da a través de la interacción interneurona-célula piramidal y hallar cómo la vasopresina está involucrada en esta interacción, así como describir si existen otros neurotransmisores involucrados que quizás estén siendo coexpresados en esta vía.

El aumento de potencia de la banda theta de oscilación en las regiones registradas no muestra una diferencia significativa, aunque sí se observa una tendencia a aumentar en más de la mitad de los casos. Una de las explicaciones es que el valor de la amplitud de la

oscilación, y por lo tanto el valor de la potencia, depende de la resistencia de la pipeta así como de la distancia entre el electrodo y los cuerpos neuronales que contribuyen en mayor parte a la oscilación de LFP en la región. Así, la potencia es una variable más sensible a la condición experimental lo que explica que la dispersión sea mayor. Si además se considera una cantidad pequeña de experimentos, se vuelve más difícil encontrar una diferencia significativa, aún si se observa la tendencia de aumento.

Aunque pocos, existen trabajos donde se ha observado un aumento en la potencia de una banda de oscilación de LFP (principalmente la banda gamma). En estos trabajos se ha asociado un aumento de la potencia gamma con la mejora de la señal de entrada hacia la estructura que se está registrando. En este sentido, la principal región de inervación al hipocampo no es el hipotálamo, por lo tanto, una mejora en una vía que no es tan prominente pudiera no ser observable en un pequeño intervalo de una frecuencia específica.

6.2. Análisis de valor de acoplamiento de fase (PLV) en registros simultáneos

La idea al usar un análisis de sincronización basado en la fase instantánea de la oscilación viene de la simplicidad matemática subyacente (ver apéndice A3). Los resultados de este análisis muestran un aumento en el valor de acoplamiento de fase entre el núcleo PVN y el hipocampo ventral (vHi) de 0.5 a 0.6 en el 80% de los casos. Desde el punto de vista fisiológico puede interpretarse como un acoplamiento entre las señales para la realización más eficiente de una tarea en conjunto, de acuerdo a lo que se mencionó en la sección 1.4.

El error estándar asociado a las mediciones fue del mismo orden de magnitud que el aumento observado. Se cree que este resultado se debe al número pequeño de muestras, consecuencia de la dificultad experimental de colocar los electrodos en el sitio correcto de manera simultánea. Sin embargo, la prueba T Student mostró que existe una diferencia significativa entre los valores de PLV antes y después de la activación del sistema vasopresinérgico, lo que implica un aumento en el estado de sincronización del sistema.

No se observó una tendencia clara en los resultados de análisis de sincronización entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo. Probablemente un factor que contribuyó a este resultado fue la cantidad de experimentos ($n=4$); sin embargo, el hecho de haber observado en pocas muestras una tendencia en los resultados de sincronización entre las

regiones PVN y vHi sugiere que el análisis de PLV no es suficiente para observar si existe o no sincronización entre las regiones hipocampales.

La observación de un sistema con base en una sola de sus variables puede ocultar información relevante, por eso, quizás un análisis de correlación que involucra información de fase y amplitud de las oscilaciones, podría discernir si existe un aumento de sincronización entre las regiones hipocampales.

7. Conclusiones

Antecedentes de este proyecto demuestran la comunicación neuronal entre el núcleo PVN del hipotálamo y las regiones dorsal (dHi) y ventral (vHi) del hipocampo, que se encuentran entre sí comunicadas. El circuito de comunicación expresa el neuropéptido vasopresina, por lo tanto se usó un estímulo sistemático (una inyección intraperitoneal de solución hipertónica) que aumenta la actividad de las neuronas de vasopresina (AVP).

Se estudiaron las consecuencias de la activación de este circuito a nivel de oscilación de redes neuronales y por primera vez se muestra la existencia de oscilaciones de potencial eléctrico de la banda theta (3Hz – 10Hz) en el núcleo PVN del hipotálamo de ratas anestesiadas con uretano. Las oscilaciones theta en el núcleo PVN, las regiones dorsal (dHi) y ventral (vHi) del hipocampo se modifican con el estímulo antes mencionado.

La modificación es un aumento significativo del valor de la frecuencia predominante de la oscilación, y una tendencia a aumentar la potencia asociada a esta frecuencia. No fue posible demostrar una diferencia significativa en el aumento de la potencia de la oscilación theta en ninguno de los tres sitios, pero se discute la posible causa.

Estos resultados se interpretan como una mejoría en la transferencia de información del circuito PVN-hipocampo, en base a muchos trabajos realizados con anterioridad en otros sistemas. Sin embargo, esos trabajos se han realizado mayormente en circuitos que involucran regiones corticales y, en el área de neurociencias, las regiones corticales se consideran regiones para realizar tareas más elaboradas. Al realizar este trabajo en un circuito que involucra al hipocampo (región subcortical) y al hipotálamo, se está extrapolando la modificación en una estructura por decir más fina, por una estructura que de manera clásica se asocia con funciones de sobrevivencia básicas de las ratas.

Más aún, el análisis de sincronización medido como valor de acoplamiento de fase (PLV) ha demostrado un aumento significativo en la sincronización entre la oscilación del PVN y la región ventral del hipocampo (vHi) al aplicar un estímulo que activa el sistema vasopresinérgico. Al considerar la sincronización entre oscilaciones neuronales un mecanismo para realizar de manera eficiente una tarea en conjunto, se tiene entonces una fuerte sugerencia de la coordinación de la región hipotalámica al hipocampo que puede reflejarse a nivel de oscilaciones de circuitos neuronales.

8. Bibliografía

Artículos científicos

- Adhikari, A., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2011). Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron*, 71(5), 898-910. doi: 10.1016/j.neuron.2011.07.027
- Aoki, F., Fetz, E. E., Shupe, L., Lettich, E., & Ojemann, G. A. (1999). Increased gamma-range activity in human sensorimotor cortex during performance of visuomotor tasks. *Clin Neurophysiol*, 110(3), 524-537.
- Bland, B. H., & Oddie, S. D. (2001). Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Res*, 127(1-2), 119-136.
- Bremer, F. (1958). Cerebral and cerebellar potentials. *Physiol Rev*, 38(3), 357-388.
- Bressler, S. L., Coppola, R., & Nakamura, R. (1993). Episodic multiregional cortical coherence at multiple frequencies during visual task performance. *Nature*, 366(6451), 153-156. doi: 10.1038/366153a0
- Bruns, A. (2004). Fourier-, Hilbert- and wavelet-based signal analysis: are they really different approaches? *J Neurosci Methods*, 137(2), 321-332. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.002
- Buijs, R. M. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res*, 192(3), 423-435.
- Buzsaki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325-340.
- Buzsaki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*, 13(6), 407-420. doi: 10.1038/nrn3241
- Buzsaki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304(5679), 1926-1929. doi: 10.1126/science.1099745
- Caton, R. (1875). Electrical Currents of the Brain. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 2(4), 610.
- Caton, R. (1971). IV.—Interim Report on Investigation of the Electric Currents of the Brain. *American Journal of EEG Technology*, 11(1), 23-24. doi: 10.1080/00029238.1971.11080813
- Cui, Z., Gerfen, C. R., & Young, W. S., 3rd. (2013). Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 521(8), 1844-1866. doi: 10.1002/cne.23263
- Cheung, T. H., & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci*, 6, 36. doi: 10.1186/1471-2202-6-36
- De Vries, G. J., & Buijs, R. M. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res*, 273(2), 307-317.
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest*, 52(12), 3212-3219. doi: 10.1172/JCI107521
- Green, J. D., & Arduini, A. A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*, 17(6), 533-557.
- Hernandez, V. S., Vazquez-Juarez, E., Marquez, M. M., Jauregui-Huerta, F., Barrio, R. A., & Zhang, L. (2015). Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual

- vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Front Neuroanat*, 9, 130. doi: 10.3389/fnana.2015.00130
- Holsheimer, J., Boer, J., Lopes da Silva, F. H., & van Rotterdam, A. (1982). The double dipole model of theta rhythm generation: simulation of laminar field potential profiles in dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res*, 235(1), 31-50.
- Ishizuka, N., Cowan, W. M., & Amaral, D. G. (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 362(1), 17-45. doi: 10.1002/cne.903620103
- Jouvet, M. (1969). Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, 163(3862), 32-41.
- Kirk, I. J. (1998). Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(2), 291-302.
- Kramis, R., Vanderwolf, C. H., & Bland, B. H. (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol*, 49(1 Pt 1), 58-85.
- Lachaux, J. P., Rodriguez, E., Martinerie, J., & Varela, F. J. (1999). Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp*, 8(4), 194-208.
- Lawson, V. H., & Bland, B. H. (1993). The role of the septohippocampal pathway in the regulation of hippocampal field activity and behavior: analysis by the intraseptal microinfusion of carbachol, atropine, and procaine. *Exp Neurol*, 120(1), 132-144. doi: 10.1006/exnr.1993.1047
- Leung, L. W. (1984). Model of gradual phase shift of theta rhythm in the rat. *J Neurophysiol*, 52(6), 1051-1065.
- Miltner, W. H., Braun, C., Arnold, M., Witte, H., & Taub, E. (1999). Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning. *Nature*, 397(6718), 434-436. doi: 10.1038/17126
- Popa, D., Duvarci, S., Popescu, A. T., Lena, C., & Pare, D. (2010). Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), 6516-6519. doi: 10.1073/pnas.0913016107
- Rivas, J., Gaztelu, J. M., & Garcia-Austt, E. (1996). Changes in hippocampal cell discharge patterns and theta rhythm spectral properties as a function of walking velocity in the guinea pig. *Exp Brain Res*, 108(1), 113-118.
- 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. doi: 10.1038/17120
- Roelfsema, P. R., Engel, A. K., Konig, P., & Singer, W. (1997). Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature*, 385(6612), 157-161. doi: 10.1038/385157a0
- Sainsbury, R. S., Harris, J. L., & Rowland, G. L. (1987). Sensitization and hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav*, 41(5), 489-493.
- Sainsbury, R. S., Heynen, A., & Montoya, C. P. (1987). Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav*, 39(4), 513-519.
- Sarnthein, J., Petsche, H., Rappelsberger, P., Shaw, G. L., & von Stein, A. (1998). Synchronization between prefrontal and posterior association cortex during human working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 7092-7096.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., & Pape, H. C. (2003). Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301(5634), 846-850. doi: 10.1126/science.1085818

- Sejdic, E., Djurovic, I., & Jiang, J. (2009). Time-frequency feature representation using energy concentration: An overview of recent advances. *Digital Signal Processing*, 19(1), 153-183. doi: 10.1016/j.dsp.2007.12.004
- Slawinska, U., & Kasicki, S. (1998). The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Res*, 796(1-2), 327-331.
- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*, 562(Pt 1), 9-26. doi: 10.1113/jphysiol.2004.078915
- Srinivasan, R., Russell, D. P., Edelman, G. M., & Tononi, G. (1999). Increased synchronization of neuromagnetic responses during conscious perception. *J Neurosci*, 19(13), 5435-5448.
- Stewart, M., & Fox, S. E. (1990). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci*, 13(5), 163-168.
- Traub, R. D., Miles, R., & Wong, R. K. (1989). Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science*, 243(4896), 1319-1325.
- Traub, R. D., Whittington, M. A., Colling, S. B., Buzsaki, G., & Jefferys, J. G. (1996). Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol*, 493 (Pt 2), 471-484.
- van Leeuwen, F., & Caffè, R. (1983). Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Cell Tissue Res*, 228(3), 525-534.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 26(4), 407-418.
- Varela, F., Lachaux, J. P., Rodriguez, E., & Martinerie, J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci*, 2(4), 229-239. doi: 10.1038/35067550
- von Stein, A., Rappelsberger, P., Sarnthein, J., & Petsche, H. (1999). Synchronization between temporal and parietal cortex during multimodal object processing in man. *Cereb Cortex*, 9(2), 137-150.
- Wang, X. J. (2002). Pacemaker neurons for the theta rhythm and their synchronization in the septohippocampal reciprocal loop. *J Neurophysiol*, 87(2), 889-900.
- Wang, X. J. (2010). Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiol Rev*, 90(3), 1195-1268. doi: 10.1152/physrev.00035.2008
- Whishaw, I. Q., & Vanderwolf, C. H. (1973). Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol*, 8(4), 461-484.
- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, 265(5172), 676-679.
- Zhang, L., & Hernandez, V. S. (2013). Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience*, 228, 139-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.010

Libros

- Academies, N. R. C. o. t. N. (2003) *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*. Washington (DC): The National Academic Press.
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Antoniou, A. (1993). *Digital filters : analysis, design, and applications* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

- Arfken, G. B., & Weber, H.-J. (2005). *Mathematical methods for physicists* (6th ed. ed.). Amsterdam ; London: Elsevier Academic.
- Boulton, A. A., & Baker, G. B. (1985). *General neurochemical techniques*. Clifton, N.J.: Humana Press.
- Brown, J. W., & Churchill, R. V. (1993). *Fourier series and boundary value problems* (5th ed, James Ward Brown, Ruel V. Churchill. ed.): McGraw-Hill.
- Cohen, M. X. *Analyzing neural time series data : theory and practice*.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier.

Recursos electrónicos

- Commons, W. (2015, 1 May 2015). File:Wave new sine.svg. Retrieved 24 abril, 2016, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wave_new_sine.svg
- Math.StackExchange. (2016, 2016). Mathematics Community Blog. Retrieved June 2nd, 2016, from <http://math.stackexchange.com/questions/221137/difference-between-fourier-series-and-fourier-transformation>
- The MathWorks, I. (2016). MathWorks.
Retrieved 21 de Abril 2016 from <http://www.mathworks.com/help/simrf/ref/filter.html?searchHighlight=bandpass%20filter>

A. Anexos

A.1. Análisis de oscilaciones en el dominio tiempo-frecuencia

Una onda sinusoidal simple se describe matemáticamente como:

$$\psi(x, t) = \phi(x)e^{i\omega t} \quad (2)$$

Donde ϕ es la amplitud de la onda, que cuando se eleva al cuadrado se conoce como la potencia de la onda, ω es la frecuencia de la onda, t es el tiempo en que se mide (ver Fig. A.1-1).

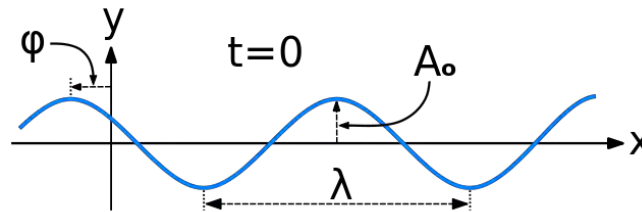


Fig. A.1-1 Representación gráfica de una onda a un tiempo $t=0$. La amplitud A_0 es el máximo valor que puede tomar la variable de oscilación. La frecuencia es el número de ciclos que completa la señal en 1 segundo. λ Longitud de onda, es la distancia entre dos puntos donde la forma de la onda se repite. ϕ Es la fracción del ciclo completo que ha transcurrido, se conoce como fase. Imagen tomada de (Commons, 2015).

En general, el movimiento ondulatorio de un sistema no se restringe a una única frecuencia, cuando esto ocurre se dice que hay una superposición de ondas, de manera que la ecuación (2) se puede reescribir como una onda resultante:

$$\psi(x, t) = \sum_n \phi_n(x)e^{i\omega_n t} \quad (3)$$

La descripción de los elementos que componen a una onda resultante se conoce como análisis espectral. Estos parámetros (frecuencia, amplitud) han ayudado a la cuantificación de interdependencias estadísticas entre señales fisiológicas de diferentes poblaciones neuronales, facilitando el estudio de la conectividad entre dichas poblaciones (Bruns, 2004).

Cuando se estudia la variación de la señal en el espacio de las frecuencias y el espacio de tiempo de manera simultánea, se dice que se hace un abordaje en el dominio tiempo-frecuencia (Sejdic, Djurovic, & Jiang, 2009). Una de las ventajas de este enfoque es que se obtiene información que no es aparente en una representación únicamente temporal o de frecuencia de una señal.

A.2. Transformada de Fourier como método de descomposición

La base matemática del enfoque en el dominio tiempo-frecuencia es la transformada de Fourier (FT: *Fourier Transform*). Una transformación se define como un operador matemático que cambia elementos de un espacio vectorial a otro, en este caso son de interés el espacio de frecuencias (ω) y el espacio de tiempo (t). La base del espacio de Fourier es la exponencial compleja. Se define la FT $g(\omega)$ de una función integrable $f(t)$ (Arfken & Weber, 2005) como:

$$g(\omega) \equiv \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt \quad (4)$$

Y su relación inversa es:

$$f(t) \equiv \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} g(\omega)e^{-i\omega t} d\omega \quad (5)$$

El teorema de la integral de Fourier (también llamado teorema de inversión) establece que es posible recuperar una función a partir de su transformada de Fourier. Dada una función f continua en x tal que f y su transformada de Fourier son absolutamente integrables, es decir que cumplan que $\int_{-\infty}^{\infty} |f(x)| dx$ es finita, se tiene entonces:

$$f(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega x} d\omega \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt \quad (6)$$

El teorema de inversión de Fourier no es válido en todos los casos, pues no necesariamente la transformada de Fourier de una función integrable es integrable también.

Para calcular la transformada de Fourier de funciones definidas en valores de tiempo discretos t_k , la integral de las ecuaciones (4) y (5) se reemplaza por una suma. A partir de la propiedad de la función exponencial imaginaria, de ser ortogonal sobre una serie de puntos discretos igualmente espaciados en un periodo, y considerando un conjunto de $2N$ valores en un intervalo de tiempo T , se construye la transformada de Fourier discreta (DFT: *Discrete Fourier Transform*) $F(\omega_p)$ de una función $f(t_k)$ (Arfken & Weber, 2005)

$$F(\omega_p) = \frac{1}{2N} \sum_{k=0}^{2N-1} f(t_k)e^{-i\omega_p t_k} \quad (7)$$

Y su relación inversa es:

$$f(t_k) = \sum_{p=0}^{2N-1} F(\omega_p)e^{i\omega_p t_k} \quad (8)$$

La transformada de Fourier representa una función general en términos de una superposición de exponenciales complejas, para el caso de una función discontinua y periódica, se puede representar mediante su serie de Fourier.

Para una función que cumple las condiciones de Dirichlet, es decir, que es integrable, regular a trozos (es decir, con un número finito de discontinuidades) y con un número finito de valores extremos en un intervalo, se define su serie de Fourier:

$$f(x) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos nx + b_n \sin nx) \quad (9)$$

Donde los coeficientes a_0 , a_n y b_n están relacionados con $f(x)$ mediante las integrales:

$$a_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} f(x) \cos nx \, dx \quad (10)$$

$$b_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} f(x) \sin nx \, dx \quad (11)$$

Con $n = 0, 1, 2, \dots$ y considerando el intervalo $[0, 2\pi]$. Expresando las funciones seno y coseno en su forma exponencial, la ecuación (9) puede reescribirse:

$$f(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n e^{inx} \quad (12)$$

Donde $c_n = \frac{1}{2}(a_n - ib_n)$, $c_{-n} = \frac{1}{2}(a_n + ib_n)$, $n > 0$ y $c_0 = \frac{1}{2}a_0$.

Una de las propiedades de las series de Fourier es que son convergentes (Brown & Churchill, 1993). Es decir, es válida la ecuación (12) siempre que i) $f(x)$ sea continua en un intervalo $-\pi < x < \pi$, ii) $f(\pi) = f(-\pi)$ y iii) $f'(x)$ sea regular a trozos. Estas condiciones no exigen que la función $f(x)$ sea periódica, pero las funciones periódicas las cumplen.

Se cumple también que la serie de Fourier convergente de una función es integrable y su integral converge a la integral de la función original.

Las series de Fourier tienen la ventaja respecto a otras representaciones, de poder representar funciones discontinuas y periódicas. Se puede demostrar que los coeficientes de la serie de Fourier de una función periódica son los valores de la transformada de Fourier en un periodo de la función (Math.StackExchange, 2016).

A.3. Medidas de acoplamiento

En general los análisis de acoplamiento entre señales neurofisiológicas son bivariantes, esto quiere decir que se consideran señales únicamente de dos sitios diferentes de manera simultánea.

Dos de los análisis más empleados en neurociencias son los siguientes: 1) Coherencia, que incorpora información de amplitud y fase. 2) Acoplamiento de fase, como su nombre indica basado únicamente en la fase de la señal.

En las siguientes descripciones sean $s_{X,n}(t)$ y $s_{Y,n}(t)$ las señales provenientes de dos sitios diferentes y $S_{X,n}(f)$ y $S_{Y,n}(f)$ el espectro de cada una, donde $n = 1, \dots, N$.

- 1) Coherencia. Se dice que dos señales son perfectamente coherentes durante un intervalo de tiempo si a una frecuencia dada, la diferencia de fase y la razón entre sus amplitudes permanece constante. Según Bendat y Piersol (1971), la coherencia κ_{XY} se define:

$$\kappa_{XY}^2 = \frac{|\langle S_X(f) \cdot S_Y^*(f) \rangle|^2}{\langle |S_X(f)|^2 \rangle \cdot \langle |S_Y(f)|^2 \rangle} \quad (13)$$

Donde * indica la conjugación compleja, y $\langle \cdot \rangle$ el valor esperado, que puede ser calculado como un valor promedio. Así:

$$\kappa_{XY}^2 = \frac{|\sum_{n=1}^N S_{X,n}(f) \cdot S_{Y,n}^*(f)|^2}{\sum_{n=1}^N |S_{X,n}(f)|^2 \cdot \sum_{n=1}^N |S_{Y,n}(f)|^2} \quad (14)$$

Aunque incorpora ambos parámetros, las contribuciones de cada uno no son equiparables. Un acoplamiento de fase es necesario y suficiente para hacer que el coeficiente de coherencia sea distinto de 0. Por otro lado, amplitudes independientes pueden tener el mismo efecto ya que la coherencia entre amplitudes positivas es siempre mayor que cero.

Esto quiere decir que en el análisis de coherencia de dos señales siempre se verá reflejado el acoplamiento de fase entre ellas, mientras que un acoplamiento de amplitud podrá fortalecer o disminuir el coeficiente de coherencia.

- 2) Acoplamiento de fase. Un indicador de una relación de fase entre dos señales, independientemente de su amplitud, es el valor de acoplamiento de fase o valor de *phase locking* (PLV). Definido como:

$$PLV = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=1}^N e^{i(\varphi_{X,n}(f,t) - \varphi_{Y,n}(f,t))} \right| \quad (15)$$

Donde φ_n es la fase instantánea de la n-ésima entrada del vector de señal. El PLV mide la variabilidad de la diferencia de fase durante un tiempo t. Si la diferencia varía poco el PLV se acerca a 1, por el contrario si la variación es grande se acerca a 0.

A.4. Transformada de Fourier de corta duración para la generación de espectrogramas

En la práctica, las variables relevantes en un análisis de tiempo-frecuencia son la amplitud, la frecuencia, el tiempo y la región donde se miden. Existen muchas representaciones donde se puede ver la modificación de cada variable según la tarea que se estudie, en este trabajo se muestran dos: espectro de potencia y espectrograma.

Un espectro de potencia es una gráfica de potencia vs frecuencia para un periodo de tiempo y una región específicos.

Un espectrograma es una gráfica de frecuencia vs tiempo, que incluye un código de color para codificar la potencia asociada a cada frecuencia en cada intervalo de tiempo, para una región en específico.

Para generar estas representaciones se puede usar el método de transformada de Fourier de corta duración (sFT). Este método es una modificación al método de transformada de Fourier (FT) mencionado anteriormente. Consiste en tomar ventanas de corto tiempo para calcular la FT, en lugar de transformar la señal completa. Con esto, se pueden observar variaciones en la estructura temporal de las frecuencias que conforman la señal con mejor resolución.

En la Fig. A.4-1 se muestra un resumen del método. Al emplearlo se deben considerar los siguientes parámetros:

- Resolución temporal. Está definida por la frecuencia de muestreo. Mientras más puntos se tengan, mayor resolución temporal.
- Resolución de frecuencia. El número de frecuencias que pueden obtenerse en una serie temporal es $N/2 + 1$ según el teorema de Nyquist, donde N es la longitud de la serie. Así, mientras mayor sea la longitud de la serie mayor resolución en frecuencias se tendrá.
- Duración de la ventana. Este parámetro se relaciona con la mínima frecuencia que se quiera analizar. Se toma entonces el tiempo necesario para observar al menos un ciclo en la frecuencia de interés.
- Atenuación (*Tapering*). Es necesario atenuar la amplitud de la señal al inicio y al final de cada ventana a analizar, para evitar en mayor medida los efectos de borde. Lo que se busca es disminuir lo más que se pueda la amplitud en los bordes de la ventana al mismo tiempo que no se atenúe demasiado la señal válida. Algunos tipos de *tapers* son Hann, Hamming y Gaussian.

- Sobrelape. Algunas veces es posible hacer un sobre lape de ventanas de análisis con el fin de mejorar la resolución temporal y evitar la pérdida de datos por *tapering*. No existen normas exactas de cuánto sobrelape debe emplearse, pero en general se aceptan valores de entre 50% y 90% del tamaño de la ventana.

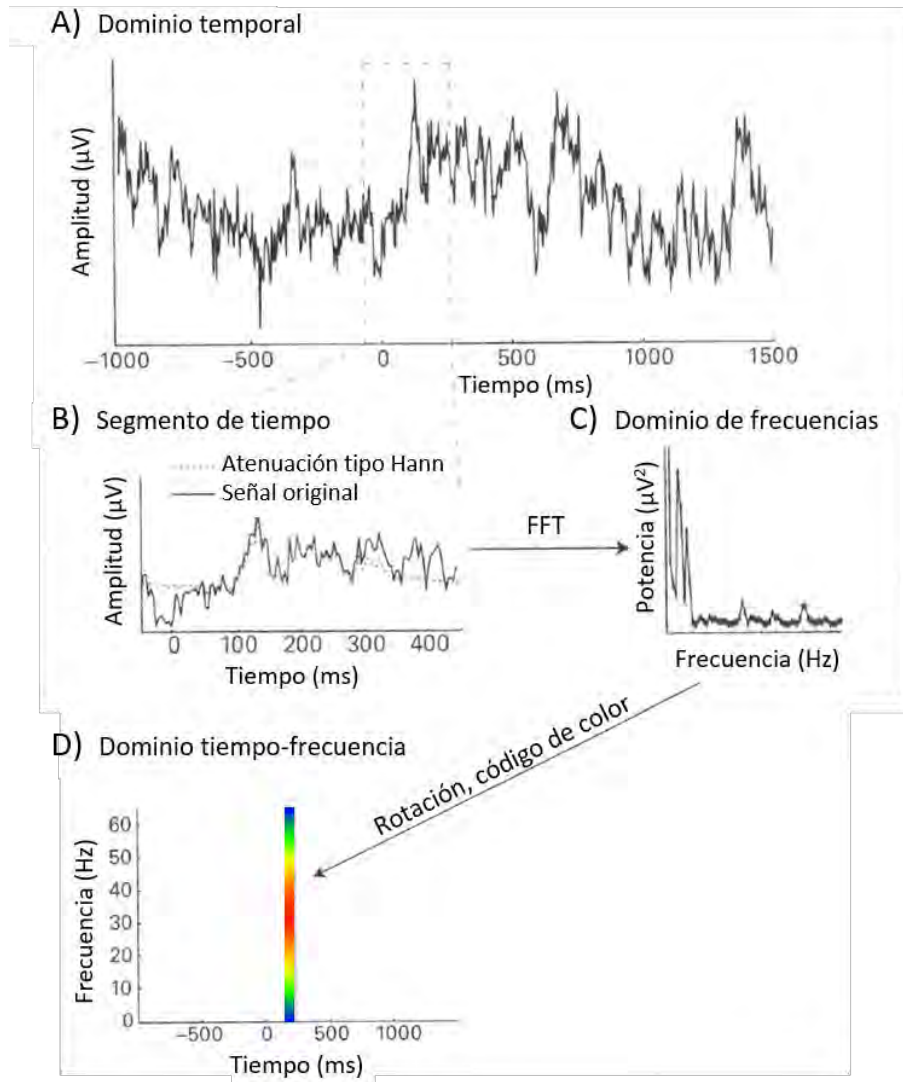


Fig. A.4-1 Esquema general del método de transformada de Fourier de corta duración. A) Señal completa en el dominio de tiempo, B) se extrae un intervalo del orden de milisegundos, en este caso se aplica un *taper* tipo Hann para eliminar efectos de borde. Se obtiene la FFT de la señal en ese intervalo de tiempo y la información de la frecuencia y potencia obtenida en ese periodo puede representarse con C) un espectro de potencias o D) un espectrograma que incluye un código de color. Tomado de (Cohen).

En el análisis de señales neurofisiológicas son de interés las modificaciones que se presentan en pequeños intervalos de frecuencia. Para afinar una señal se emplean filtros.

Un filtro digital está caracterizado por su función de transferencia, que determina la respuesta del filtro ante un estímulo, de acuerdo a ésta se suelen clasificar en filtros de respuesta finita (FIR: *finite impulse response*) y de respuesta infinita (IIR: *infinite impulse response*). En general se prefieren los filtros de respuesta finita pues son más estables e introducen menos distorsiones, aunque requieren más capacidad computacional (Antoniou, 1993).

Existen 4 tipos de filtros FIR, cuya respuesta se representa en la Fig. A.4-2.

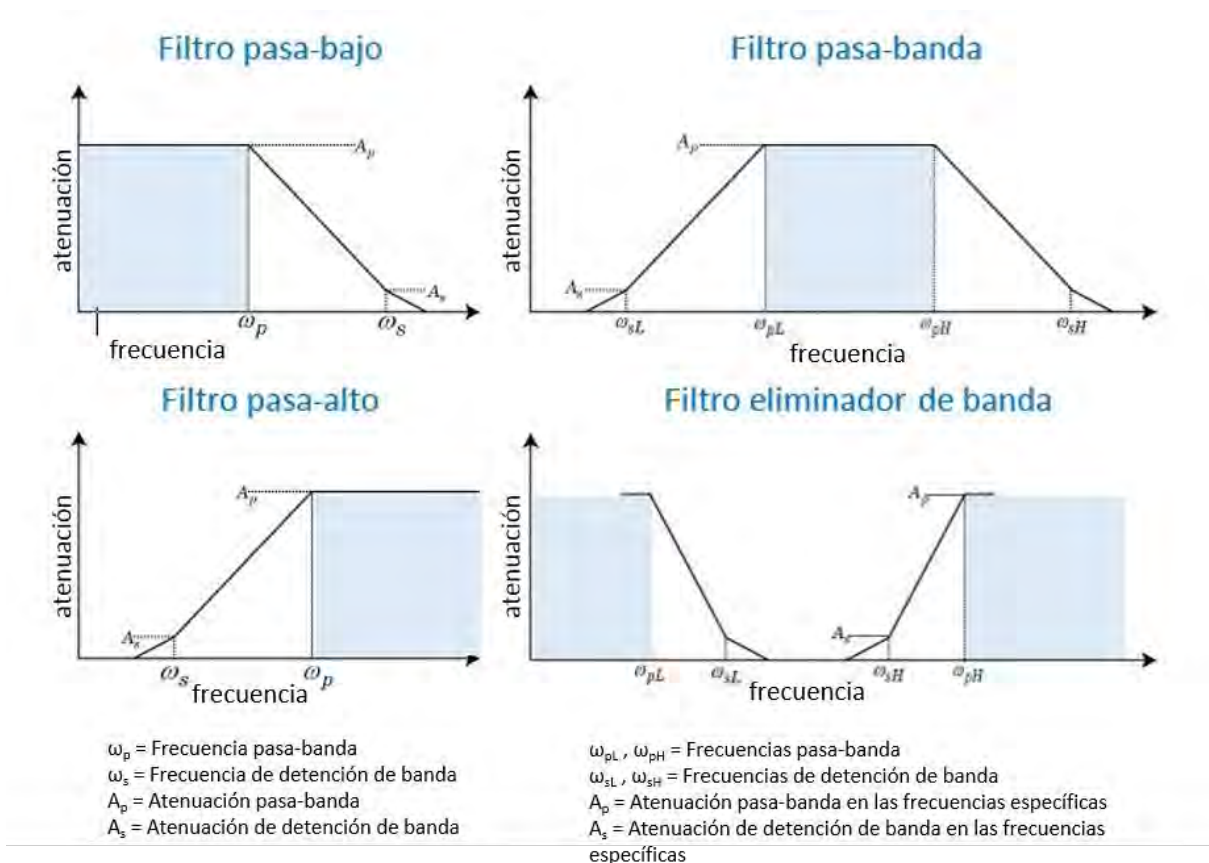


Fig. A.4-2 Respuestas de atenuación de frecuencias para diferentes tipos de filtros. Las frecuencias ω_p definen la forma ideal del filtro que en la práctica suele aproximarse por mínimos cuadrados. En azul, el intervalo de frecuencias que se filtran. Las regiones entre las frecuencias ω_p y ω_s se conocen como regiones de transición. Modificado de (The MathWorks, 2016).

A.5. Contribuciones científicas derivadas de mis estudios

Durante la realización de esta tesis, aprendí la técnica de marcaje yuxtacelular. Algunos de mis resultados experimentales forman parte de un artículo de investigación original publicado en Octubre de 2015 en la revista Fronteras en Neuroanatomía (Hernandez et al., 2015).



Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus

Vito S. Hernández^{1†}, Erika Vázquez-Juárez^{1†}, Mariana M. Márquez^{1†}, Fernando Jáuregui-Huerta², Rafael A. Barrio³ and Limei Zhang^{1*}

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico, ³ Departamento de Física Química, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Yun-Qing Li,
The Fourth Military Medical University,
China

Reviewed by:

Izumi Sugihara,
Tokyo Medical and Dental University,
Japan
Bill Armstrong,
University of Tennessee, USA

*Correspondence:

Limei Zhang,
Departamento de Fisiología, Facultad
de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. Universidad
3000, Mexico City 04510,
Distrito Federal, Mexico
limei@unam.mx

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 12 May 2015

Accepted: 18 September 2015

Published: 06 October 2015

Citation:

Hernández VS, Vázquez-Juárez E,
Márquez MM, Jáuregui-Huerta F,
Barrio RA and Zhang L (2015)
Extra-neurohypophyseal axonal
projections from individual
vasopressin-containing magnocellular
neurons in rat hypothalamus.
Front. Neuroanat. 9:130.
doi: 10.3389/fnana.2015.00130

Conventional neuroanatomical, immunohistochemical techniques, and electrophysiological recording, as well as *in vitro* labeling methods may fail to detect long range extra-neurohypophyseal-projecting axons from vasopressin (AVP)-containing magnocellular neurons (magnocells) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). Here, we used *in vivo* extracellular recording, juxtacellular labeling, *post-hoc* anatomo-immunohistochemical analysis and camera lucida reconstruction to address this question. We demonstrate that all well-labeled AVP immunopositive neurons inside the PVN possess main axons joining the tract of Greving and multi-axon-like processes, as well as axonal collaterals branching very near to the somata, which project to extra-neurohypophyseal regions. The detected regions in this study include the medial and lateral preoptical area, suprachiasmatic nucleus (SCN), lateral habenula (LHb), medial and central amygdala and the conducting systems, such as *stria medullaris*, the fornix and the internal capsule. Expression of vesicular glutamate transporter 2 was observed in axon-collaterals. These results, in congruency with several previous reports in the literature, provided unequivocal evidence that AVP magnocells have an uncommon feature of possessing multiple axon-like processes emanating from somata or proximal dendrites. Furthermore, the long-range non-neurohypophyseal projections are more common than an “occasional” phenomenon as previously thought.

Keywords: paraventricular nucleus (PVN), juxtacellular labeling, vasopressin, extra-hypothalamic projections, axon collaterals, magnocellular neurosecretory system

Introduction

According to the generally accepted theory of neurosecretion, arginine-vasopressin (AVP)-containing cells, located in the lateral division of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), project to the neural lobe of the hypophysis via the paraventriculo-neurohypophysial tract. These neurons have large somata (diameters around 20–35 μm) and are traditionally referred

to as magnocellular neurosecretory neurons (Armstrong, 2004), referred to as “magnocells” henceforward. The AVP-magnocells synthesize and release the nonapeptide vasopressin, which is critical for cardiovascular functions and hydro-electrolytic homeostasis (Bargmann and Scharrer, 1951).

It has been established that AVP-magnocell axons emanate either from the soma or a primary dendrite (Armstrong et al., 1980; van den Pol, 1982; Hatton et al., 1985; Rho and Swanson, 1989) and course in a wide arc, passing over or beneath the fornix before turning medially above the supraoptic nucleus to join the hypothalamo-neurohypophysial tract, reaching the internal medial eminence (MEI) and then the neural lobe. R. Greving was the first anatomist to describe this tract, coining the name *tractus paraventricularis-cinereus*, in a series of papers published in the early twentieth century (Greving, 1923, 1926, 1928). Hence, the tract also bears the name Tract of Greving. Axons from AVP magnocellular neurons have been seen to occasionally branch (van den Pol, 1982; Hatton et al., 1985; Ray and Choudhury, 1990), but the final destination and synaptic relationship of collaterals remain to be determined (Armstrong, 2004).

Besides the finding of dendritic AVP release in their vicinity, influencing local neuronal activity through paracrine mechanisms (Pow and Morris, 1989; Son et al., 2013), recent investigations using both *in vivo* and *in vitro* electrophysiological recording (Inyushkin et al., 2009), anatomical analysis and fluorogold retrograde tracing (Hernandez and Zhang, 2012; Zhang and Hernández, 2013) have suggested that the AVP-magnocells have important extra-neurohypophysial axonal projections, establishing synaptic innervations in some limbic regions, such as the hippocampus (Zhang and Hernández, 2013) and the amygdala (Hernandez and Zhang, 2012). Activation of the AVP-magnocells modifies significantly the conditioned anxiety state (Zhang et al., 2012) and spatial learning (Hernandez et al., 2012).

Conventional neuroanatomical, immunohistochemical techniques, electrophysiological recording and *in vitro* labeling methods may fail to detect long-range extra-neurohypophysial-projecting axons of AVP-magnocells in the PVN. The difficulties include the large cell size for any kind of brain slide-based methods; the high somatic density inside the nucleus and the intermingled populations of both AVP parvo- and magnocells; the chemical structural changes of the peptide from propressophysin to vasopressin during the intra-axonal transport (Brownstein et al., 1980), which decrease labeling with a single antibody (Zhang and Hernández, 2013); also the uneven axonal distribution of the dense core vesicles makes it confusing when following the thin axons under light and electron microscopy (Zhang and Hernández, 2013). In contrast, the *in vivo* extracellular recording with juxtacellular labeling technique (Deschênes et al., 1994; Pinault, 1994, 1996), combined with a *post-hoc* anatomo-immunohistological analysis, provides a powerful method to investigate the overall magnocellular neuron's morphology and its long-range projections.

Hence, the aim of this work is to reinforce our previous observation of the extra-neurohypophysial AVP-containing innervation by AVP-magnocells, using *in vivo* juxtacellular single-neuron labeling, to accurately identify the

extra-neurohypophysial projections of these neurons from the PVN.

Materials and Methods

Animals

Experiments were conducted in 155 adult male Wistar rats (250–400 g) provided by the local animal facility and housed at 20–24°C on a 12 h dark/light cycle (lights-on at 19:00 h) with tap water and standard rat chow pellets available *ad libitum*. The local bioethical and research committees approved all procedures involving experimental animals (approval ID CIEFM-086-2013).

In vivo Extracellular Recording and Juxtacellular Labeling

The procedures for *in vivo* extracellular recording and juxtacellular labeling were based on the methods described in several references (Leng and Dyball, 1991; Pinault, 1996; Tukker et al., 2013). Anesthesia was induced with 4% isoflurane in oxygen, followed by urethane injection (1.3 g/kg, Sigma-Aldrich, intraperitoneal i.p.), with supplemental doses of xylazine (30 mg/kg), as necessary. Body temperature was maintained at 36°C with a heating pad. Once anesthetized, animals were placed on a stereotaxic frame and craniotomy was performed around the coordinates: –1.7 mm posterior to Bregma and 0.4 mm lateral. A long-taper glass electrode (8–15 M Ω) filled with 1–2% neurobiotin (Vector Laboratories) in 0.15 M NaCl was vertically placed at previously standardized hypothalamic PVN coordinates (Bregma: –1.7 mm; lateral: 0.4 mm; dorsoventral: 6.9 mm) and referenced against a wire implanted subcutaneously in the neck.

Extracellular single-unit activities under both basal conditions and hypertonic stimulation (NaCl 900 mM, 2% of body weight, i.p.) were detected, amplified and filtered using amplifiers ELC-01MX and DPA-2FL (npi electronics, GmbH, Tamm, Germany).

After recording, the cell was iontophoretically labeled with neurobiotin, using juxtacellular-labeling (Pinault, 1994). Current pulses of 1–10 nA, at 2.5 Hz, with a 50% duty cycle, were delivered through the recording electrode. The current was gradually increased to induce and maintain entrainment of the activity of the neuron, yielding a higher number of spikes on the current “on” periods. Cells were entrained for 1–10 min.

Tissue Processing and Immunohistological Analysis

Two to five hours after labeling a cell, cardiac perfusion with saline was performed and followed by 15 min of fixation with a solution containing 4% paraformaldehyde, 15% (v/v) saturated picric acid and 0.05% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Each recorded cell was coded with the electrophysiologist's initials followed by the sequential number of experiments for internal control.

Coronal sections cut at 70 μ m thickness with a vibratome (Leica VT 1000S) were stored serially in tissue culture wells in 0.1 M PB containing 0.05% NaN₃. Four to six sections containing the electrode tract were initially incubated with streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen) in

TBST (Tris-buffered saline with 0.3% Triton X-100) for 1 h at room temperature (RT). Sections mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) were assessed under light microscope. Sections of interest (containing well-labeled soma or axon/axon collaterals) were de-mounted and further incubated, first with 10% normal donkey serum in TBST and with rabbit anti-AVP (1:2000; Peninsula Laboratories, T-4563), the specificity of which was confirmed by the absence of immunoreactivity after preabsorption with vasopressin peptide (Taylor et al., 2008), and/or guinea-pig anti-vesicular glutamate transporter (vGluT2-GP-Af810, 1:1000, Frontier Institute Co., LTD, Ishikari, Japan) the specificity of which was confirmed via immunoblotting and preabsorption (Miyazaki et al., 2003).

Camera Lucida Reconstruction of AVP+ Magnocells Labeled with Neurobiotin

Six neurobiotin well-labeled AVP+ magnocells were selected for reconstruction, described elsewhere (Losonczy et al., 2002; Tukker et al., 2013). Briefly, immunohistochemically processed sections were de-mounted again and converted to polymerized 3,3'-diaminobenzidine (DAB) horseradish peroxidase (HRP) end product for analysis of neuronal processes at high resolution. This was done by incubating first the sections containing streptavidin-fluorescence signals with component B (1:100) of Vector ABC Elite kit overnight and then incubating them with A+B (1:100 each, in 0.1 M PB, Vector ABC Elite kit) for 1 h at room temperature. Reactions for HRP were done with DAB (0.05%) as a chromogen and 0.01% H₂O₂ as a substrate. Sections were air-dried and mounted with Permount Mounting Medium (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Further adjacent sections were chosen in an alternate manner to process with streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen) to establish the extension of neurobiotin labeled processes. Once the labeling borders were defined, these sections were processed as described above. The remaining sections inside the defined limits were converted to DAB-HRP end product using freeze-thaw permeabilization (no detergent used). Neurobiotin was revealed by the glucose oxidase method (Shu et al., 1988), further treated with OsO₄ (0.1–1%) and mounted on slides in epoxy resin for future electron microscopy study.

The somatic, dendritic and axonal patterns of each neuron were analyzed at high magnifications and were subsequently reconstructed using a drawing tube (Nikon; for methodological references see Losonczy et al., 2002). The soma and dendrites were represented in black and axonal segments were represented in red. Some short finely beaded process of “unknown nature” as defined by Sofroniew and Glasmann (1981), were labeled in green. The “main axons” were judged by the classical description of beaded neurosecretory axons, which emit laterally from either the soma or a primary dendrite and curve in a wide arc, passing over or beneath the fornix before turning medially above the supraoptic nucleus and optical tract, toward the MEI (Armstrong, 2004). The “axon-collaterals” were assigned to the branches arisen from the main axons and the “axon-like” processes were judged by either expressing vesicular glutamate transporter 2 (vGluT2) and/or being long distance projection and/or branched extensively (axon terminals) with constantly

thin “strings of pearls” shaped swellings (Sofroniew, 1983; Armstrong, 2004).

For a clearer visualization from a different angle of the labeled AVP immunopositive neuron EV16, we also performed computer aided reconstructions based on the light microscopic observations and Brain Atlas (Paxinos and Watson, 2006) using a generic 3D content creation suite BLENDER (<http://www.blender.org/>).

Identification Criteria for Paraventricular Vasopressin Containing Magnocellular Neuroendocrine Neurons (AVP-Magnocells)

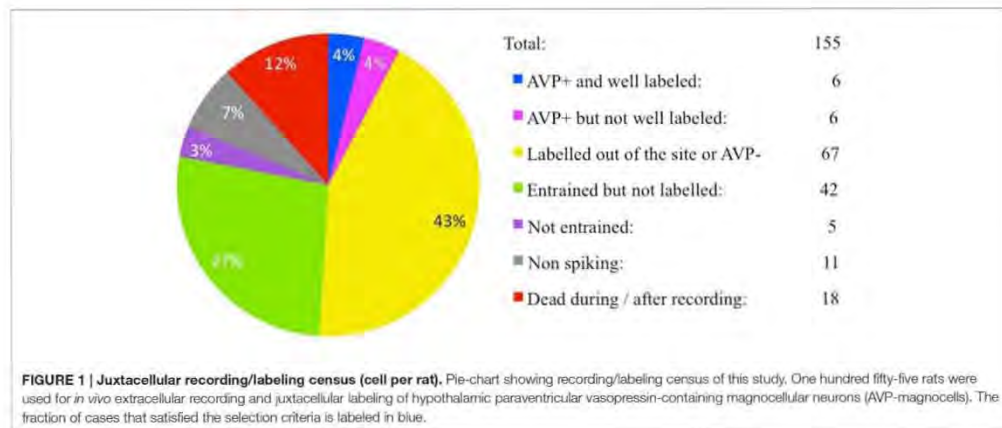
We proceeded with juxtacellular labeling when the recorded cells showed a slow and irregular firing pattern under basal condition and increased firing rate under hypertonic stimulus (Gainer, 1972; Leng and Dyball, 1991). Individually labeled somata located in the lateral paraventricular region complying the anatomical criteria established in the literature (Harris, 1948; Bisset et al., 1967; Hayward and Jennings, 1973; Sofroniew, 1983; Leng and Dyball, 1991; Armstrong, 2004), exhibiting a long, thick and beaded process joining the tract of Greving, were selected to test immunoreactivity to AVP. The positive cases were further filtered with the criterion of labeling span, i.e., only the cells having a labeling span of more than 20 sections, 1.4 mm in antero-posterior axis, were considered well labeled.

Results

We recorded the activity of vasopressin containing magnocells in the hypothalamic PVN in anesthetized rats with extracellular glass electrodes. After recording the physiological activity, the recorded cells were approached by the electrode and filled with neurobiotin using juxtacellular-labeling technique. From 155 recordings performed, six cells from six rats were found to satisfy the selection criteria. The cell bodies were in the PVN, lateral magnocellular division (PaLM, $n = 3$, EV16, MM22, and VH25) or posterior division (PaPo, $n = 3$, EV40, VH52, and MM15). All six cells were tested to be immunopositive for AVP and had more than 20 s (70 μ m of thickness each) with labeled soma and/or processes, as well as exhibiting characteristic electrophysiological properties during *in vivo* recording. A census of all recordings and labeling for this study is given in Figure 1.

Morphological Features of AVP-Magnocells Recorded in the PaLM

The location of cell bodies was ascertained on the basis of neurobiotin–streptavidin–Alexa 488 reaction on serial sections in/around the electrode penetration site. The dendrites and axons in the consecutive sections were drawn under 100 \times objective with the help of a drawing tube and superimposed manually in a 2-dimension (2D) projection drawing on a coronal view of the rat hypothalamus, except for EV16, in which a 3D computer aided reconstruction for a lateral view was also made (Figure 2D). The neuron EV16 fired slow irregular spike trains under basal conditions (<1 spike/s) but increased its firing rate measured 5 min after the i.p. hypertonic saline injection (1.8 spikes/s) (Figure 2A, blue and red traces, respectively). The soma of EV16



was located in the medial part of PaLM (Figure 2B), with its long axis 30° oblique to the midline (Figure 2C). The soma gave rise initially to two short and thick primary dendrites, which branched proximally. The bottom dendrite branched extensively until the fifth order of branches—all directed medially reaching the wall of the third ventricle (3V). The top dendrite emitted two secondary branches, the medial and the lateral ones. The medial branch was similar to the bottom group. The lateral branch curled up proximally near the soma but gave rise to the main axon. The main axon coursed laterally passing on top of the fornix (fx), turned ventrally and then medio-posteriorly (Figures 2C,D). Further caudal labeling could not be established due to high background DAB reaction and ruptures due to freeze-thaw permeabilization procedures. Two main collaterals were observed. C2 indicates the first branch position. This tracer containing process coursed dorsally and reached the border of the *stria medullaris* (sm). The continuation was lost temporarily in the myelinated conducting structure but was established again in the surface of sm and entered the lateral habenula (LHb) (Figure 2C4). The second branch arose from the parent axon (Figure 2C3), coursed medially and was lost in the border of the fornix. One of the ventrally directed axons coursed further ventrally along the periventricular region, reaching the suprachiasmatic nucleus (SCN), where labeled axonal processes were found. Another labeled axon process ended inside the PaLM (Figure 2C1c).

During the *in vivo* recording, the neuron MM22 fired irregularly under basal conditions and showed a firing rate of 4.5 spikes/s (Figure 3A, blue trace). Five minutes after the i.p. hypertonic saline injection, the cell fired with a frequency of 10.2 spikes/s (Figure 3A, red trace). The soma was located in the medial part of the PaLM mid-way through its antero-posterior axis (Figure 3B) and emanated three primary dendrites with few further branches (Figure 3C). Similar to EV16, the dendrites were mainly orientated toward the medial direction. Two main axons were found originating from the soma and a proximal dendrite, (Figure 3C2). The axon that coursed laterally joined the tract of Greving. The labeling was lost when it turned

medially due to the loss of tissue during the slicing procedure. The medial axon turned ventrally near the 3V (Figure 3C3) and coursed along the periventricular region emitting numerous axon branches. The longest distance of branches was found in the dorsal part of the SCN. Neuron VH25 (Figure 4) is another *in vivo* recorded and labeled AVP-magnocell with similar physiological properties and somatic, dendritic and axonal distributions.

Morphological Features of AVP-Magnocells Recorded in Paraventricular Nucleus Posterior Part (PaPo)

The selected neurons EV40, VH52, and MM15 were located in the PaPo, which was not our original labeling target. The unexpected labeling was probably due to the Bregma variation among rats and the narrow antero-posterior extension of the PaLM (about 200 μm). However, the vasopressin-containing neurons recorded and labeled in these regions fulfilled the selection criteria. The neuron EV40, located in the ventral part of the PaPo (Figure 5B), fired spontaneous action potentials *in vivo* and increased its firing rate after hypertonic saline injection (2.5 spikes/s vs. 5.9 spikes/s, Figure 5A). Unlike the three neurons inside the PaLM, this neuron had its dendritic arborization extended both medially and laterally. Anatomical analysis showed that this neuron clearly possessed 3 axons. One dendritic point proximal to the soma gave origin to two primary (parents) axons in opposite directions (Figure 5C, red and blue arrows, both in the drawing and the photomicrographs Figures 5C1b,C2, white circled region). The dorsal primary axon turned ventrally to further branch into two secondary axons, one projected to the tract of Greving and the other projected to the border of the optical tract (red arrowheads). Labeled axon traces were found inside the medial and central amygdala, which should be the extensions of this axon (some tissue was lost during its processing). The ventral primary axon (blue arrow) was split into two branches of axon-collaterals (indicated with blue arrowheads) directed either medially or laterally. The lateral branch entered the fornix (fx). A third axon left the soma at the

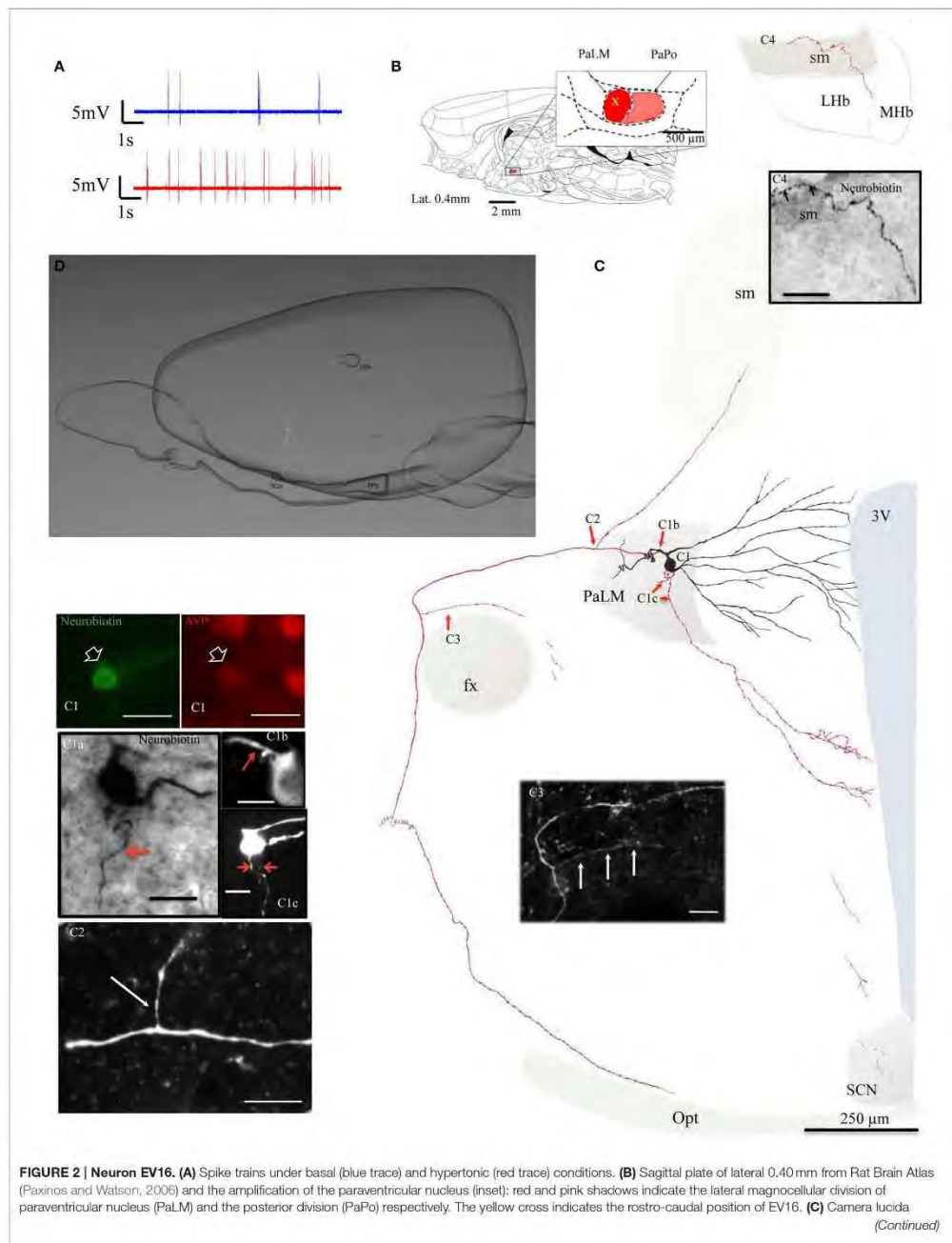


FIGURE 2 | Neuron EV16. (A) Spike trains under basal (blue trace) and hypertonic (red trace) conditions. **(B)** Sagittal plate of lateral 0.40 mm from Rat Brain Atlas (Paxinos and Watson, 2006) and the amplification of the paraventricular nucleus (inset): red and pink shadows indicate the lateral magnocellular division of paraventricular nucleus (PaLM) and the posterior division (PaPo) respectively. The yellow cross indicates the rostro-caudal position of EV16. **(C)** Camera lucida (Continued)

FIGURE 2 | Continued

reconstruction of the neuron's soma, dendrites and axons. Drawings from serial sections were superimposed manually in a 2-dimension (2D) projection drawing on a coronal view of the rat hypothalamus. The soma and dendrites were represented in black and axonal segments were represented in red. **(C1)** AVP-containing nature was ascertained by AVP immunoreaction. The soma gave rise initially to two short thick primary dendrites, which branched proximally. The bottom dendrite branched extensively until the fifth order of branches; all directed medially reaching the wall of the third ventricle (3V). The top dendrite gave rise to two secondary branches, the medial and the lateral ones. The medial branch was similar to the bottom group. The lateral portion curled up proximally near the soma but gave rise to the main axon. Photomicrograph **(C1a)**, from neurobiotin HRP/DAB reaction; **(C1b,C1c)**, from neurobiotin-streptavidin-Alexa 488 fluorescence in two consecutive sections showing the sites where three axons were originated (red arrows). The main axon coursed laterally passing the fornix (fx), turned ventro-caudally toward the posterior pituitary gland (PPit) **(D)**. Two main collaterals emanated from this axon **(C2,C3)**. The first collateral **(C2)** coursed dorsomedially joining the *stria medullaris* (sm). Neurobiotin labeled processes were found inside the lateral habenula **(C4)**. The second collateral originated passing the fx and coursed medially **(C3)**. The labeling of one of the ventrally directed axons coursed further ventrally along the periventricular region, reaching the suprachiasmatic nucleus (SCN). **(D)** Computer aided schematic reconstruction based on observations of serial coronal sections to facilitate the perspective of axonal projections from a sagittal view. Note that the size of cell vs. brain is not in strict proportion. LHb and MHb, lateral and medial habenula; PPit, posterior pituitary gland; sm, *stria medullaris*; fx, fornix; 3V, third ventricle; opt, optical tract. Scale bars: 50 μ m for **(C1)**, 20 μ m for the rest of panels.

site indicated by the pink arrow and coursed medio-ventrally reaching the ventral periventricular region. Additionally, several beaded processes (green arrowheads) were originated from dendrites, some of them entered the fornix. This kind of processes was described in an early study and were considered to be axonal processes (Sofroniew and Glasmann, 1981).

The neuron VH52 had similar electrophysiological behaviors as EV40 during *in vivo* recording (Figure 6A). The neuron fired irregular spontaneous action potentials *in vivo* and increased its firing rate after hypertonic saline injection (1.2 spikes/s vs. 4.8 spikes/s, Figure 6A). The soma was located in the medial part of the PaPo (Figure 6B). The dendritic and axonal extensions are depicted in Figure 6C. Vasopressin (AVP)-containing nature was ascertained by AVP immunoreaction (Figure 6C1). A particular structure was observed: axon with several small branches and classical image of *strings-of-pearls* in a small region in both medial preoptical region and lateral hypothalamic area (Figure 6C, blue square and Figure 6C2). The main axon coursed ventral-laterally joining the tract of Greving. This axon emitted a collateral entering the fornix (fx) (Figure 6C3). The main axon coursed further and curled and branched at the basal forebrain region. One branch coursed dorso-laterally entering the ventral pallidum (VP) and internal capsule (ic). Unfortunately, one part of the tissue was lost during the slicing due to insufficient fixation (Figure 6C, irregular light gray line depicts the fracture). In Figures 6C3–6 show the presence of labeled axon segments in or near the conducting systems, fornix (fx), internal capsule (ic), and *stria medullaris* (sm). The cell MM15 also increased its firing rate after hypertonic saline injection (1.9 spikes/s vs. 3.2 spikes/s, Figure 7A). It was located in the top lateral border of PaPo (Figure 7B). In contrast with EV16, MM22 and VH25, which were located in the medial part of the PVN, this neuron's dendrites extended laterally. The medial proximal dendrites gave origin to two tract of Greving-projecting thick varicose axons and two locally branching thin axons, which tested to be vGluT2 immunopositive (Figure 7C and Supplemental information).

Discussion

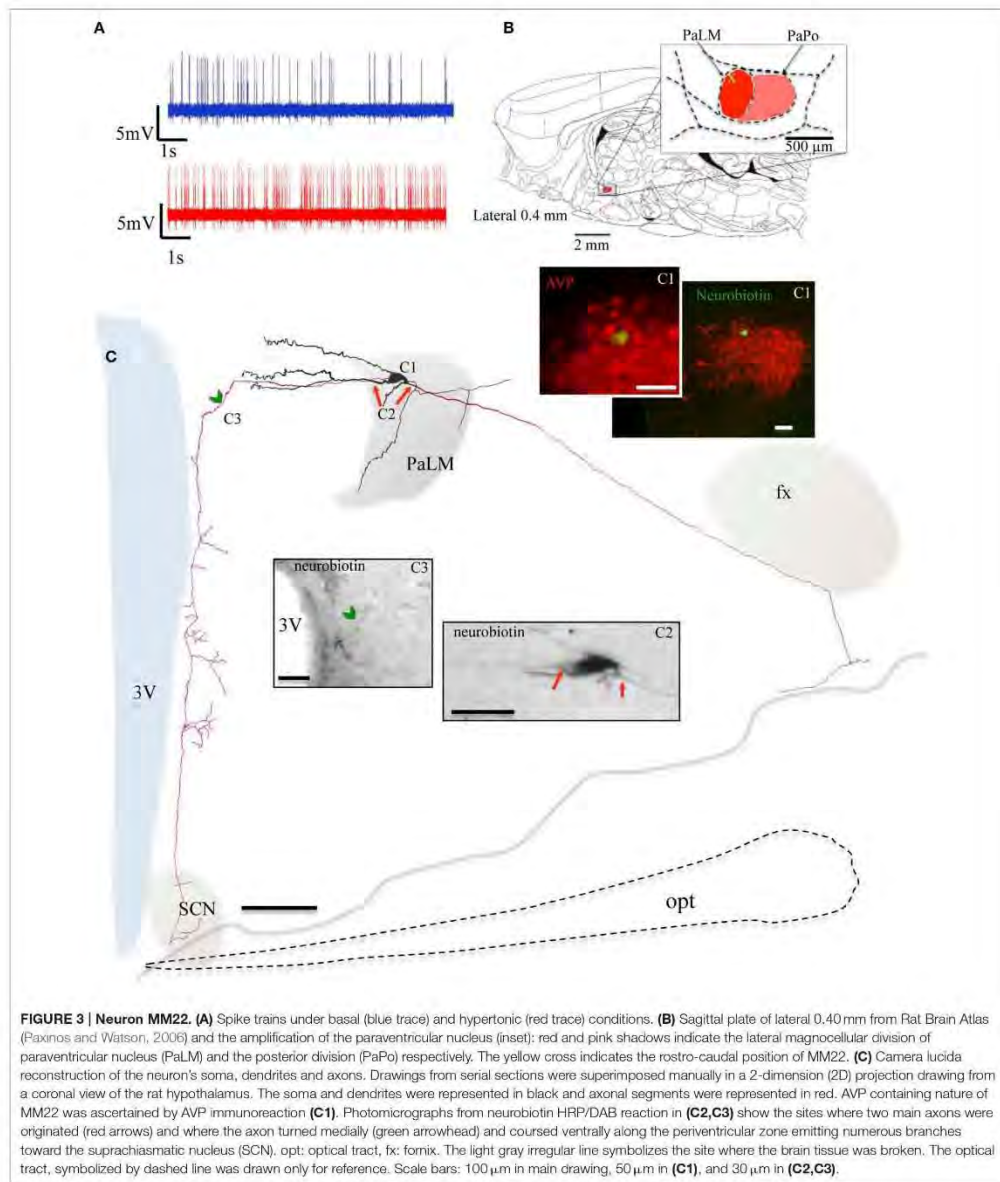
We have used *in vivo* electrophysiological recording and juxtacellular labeling procedures for *post-hoc* anatomical

visualization of single vasopressin containing magnocellular neurons in the hypothalamic PVN of anesthetized rats. Our results revealed some unusual and important anatomical features at single cell level: (1) all six cells that met the inclusion criteria for vasopressin-containing magnocells possessed multi-axons originated in the soma or a proximal dendrite and four out of the six cells also exhibited axon collaterals branching from the main axons; (2) in addition to the axons, which joined the tract of Greving, all these cells projected also to other intra- and extra-hypothalamic regions; (3) some of the downstream regions were identified by localizing labeled axon/axon terminals.

New Contributions to the Morphology and Efferent Paths of Paraventricular AVP Containing Magnocells

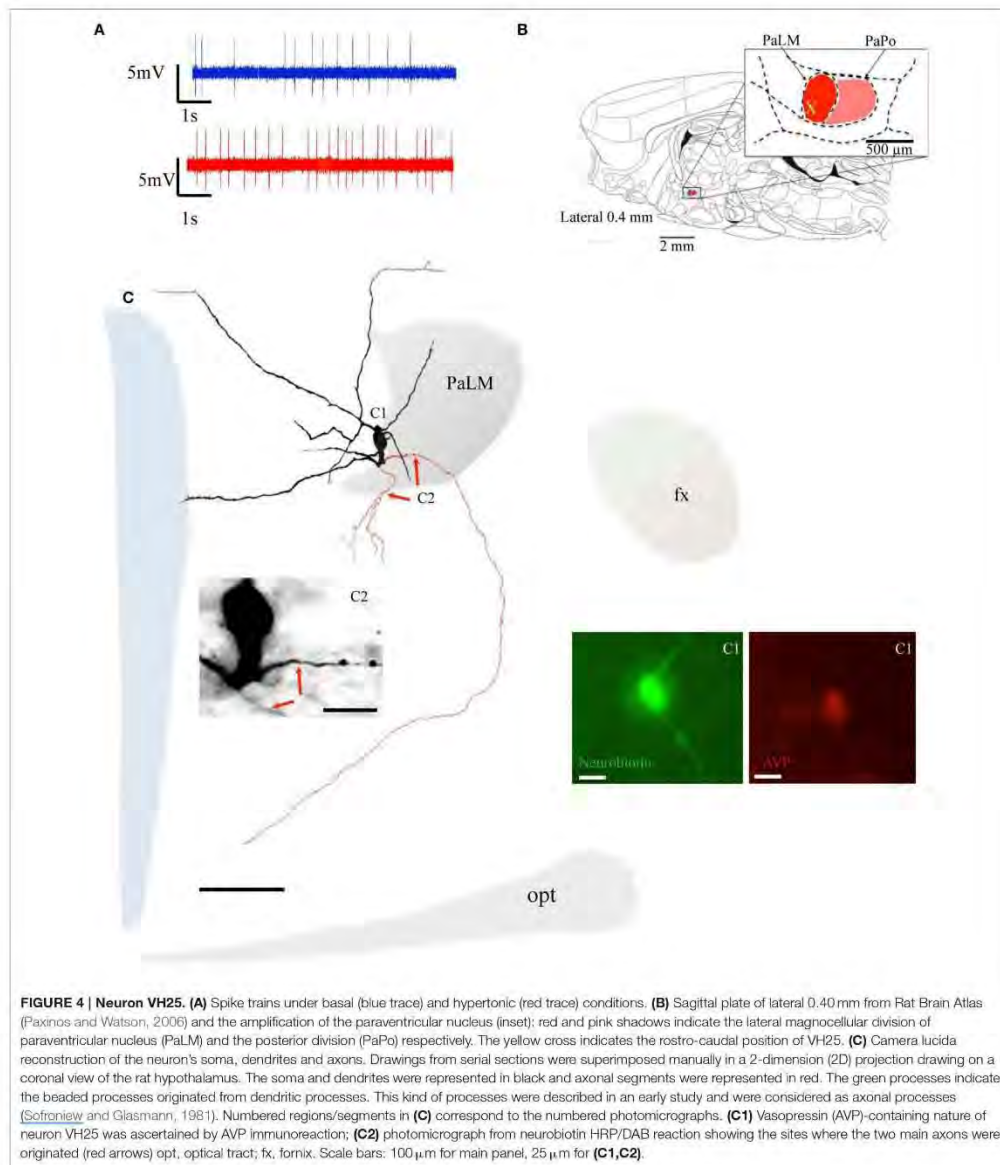
In the late 70s, R. M. Buijs and colleagues provided detailed characterization of intra- and extra-hypothalamic innervation of vasopressin containing fibers, specifically the connections with limbic regions (Buijs, 1978; Buijs and Swaab, 1979). However, the knowledge on the origin of these AVP innervations is limited. There have been some excellent studies on the morphology of the magnocellular neurosecretory neurons (magnocells) using immunohistochemical and Golgi-like immunoperoxidase staining methods (Sofroniew and Glasmann, 1981; van den Pol, 1982; Armstrong, 2004). However, the quasi-two-dimension nature of the previous methods (i.e., labeling and reactions on brain slices, as thick as 350 μ m) impaired crucially the overall visualization of individual magnocellular neurons. This is particularly true regarding the efferent pathways. Traditionally it has been described that the axons of paraventricular magnocells egress laterally from either the soma or a primary dendrite (Armstrong et al., 1980; van den Pol, 1982; Hatton et al., 1985; Rho and Swanson, 1989) to join the tract of Greving before reaching the medial eminence internal part and the neural lobe (Armstrong, 2004). It was thought that the PVN AVP+ axons from magnocellular neurons only occasionally branch (van den Pol, 1982; Hatton et al., 1985; Ray and Choudhury, 1990).

In vivo extracellular recording and juxtacellular neuronal labeling technique has proven to be a powerful method to decipher the morpho-functional relationship at a single neuron level and its projection targets (Pinaut, 1996). It provides precise information of anatomical location, morphology and



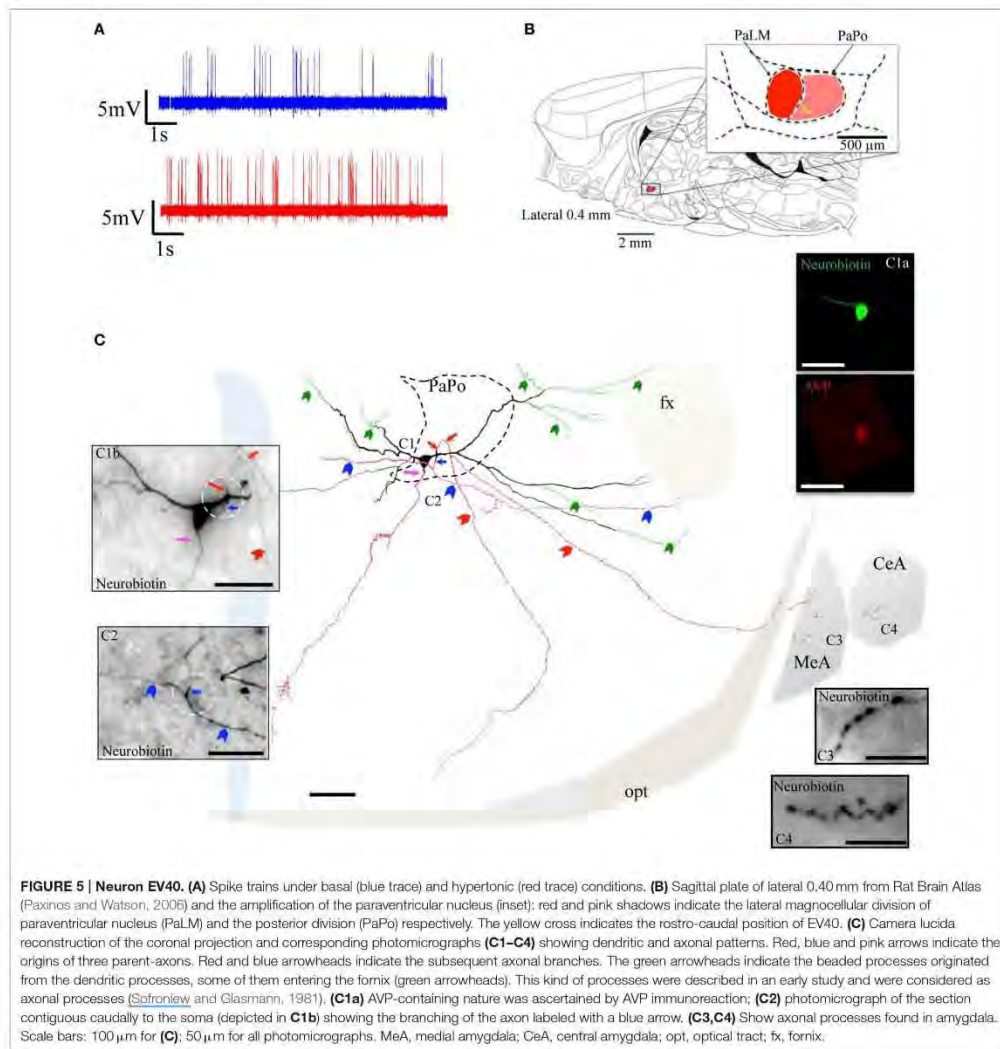
neurochemical phenotype, of the neuron labeled (Toney and Daws, 2006) and long range axon projections. Herein, we report that all the AVP-containing magnocellular neurons that met the

inclusion criteria we stated in the method section for this study, possessed multi-axonal projections or axon collaterals branching very near the soma projecting to several brain regions, such as



the preoptical and anterior hypothalamic areas and SCN; it is especially interesting to see a long range projection which was detected entering the *stria medullaris* fiber-system innervating LHb (Figures 2C,D).

The labeled neurons reported in this study were grouped into two classes. The first three cells, EV16, MM22, and VH25 were located in the medial part of the PaLM region. These neurons showed some similarities in their dendritic and axonal branching



patterns: their dendrites predominantly extended toward the medial parvocellular region of the PVN, reaching the border of the third ventricle (3V) and all the three neurons possessed at least two axons, the lateral-bound joining the tract of Greving and the medial-bound axon. The region between the PaLM and the 3V consists of the main population of corticotrophin releasing factor (CRF) synthesizing neurons, which mainly project to the medial eminence portal system to regulate the stress response.

This dendritic distribution at single cellular level, adding to the evidence that CRF containing axon terminals establish Gray type I synapse with AVP+ dendritic segments in this region (Zhang et al., 2010), and that AVP dendritic release in their vicinity influence the local activity through paracrine mechanisms (Pow and Morris, 1989; Morris et al., 1998; Son et al., 2013), suggests an important crosstalk between these two neuronal populations, especially under stressful conditions, to coordinate

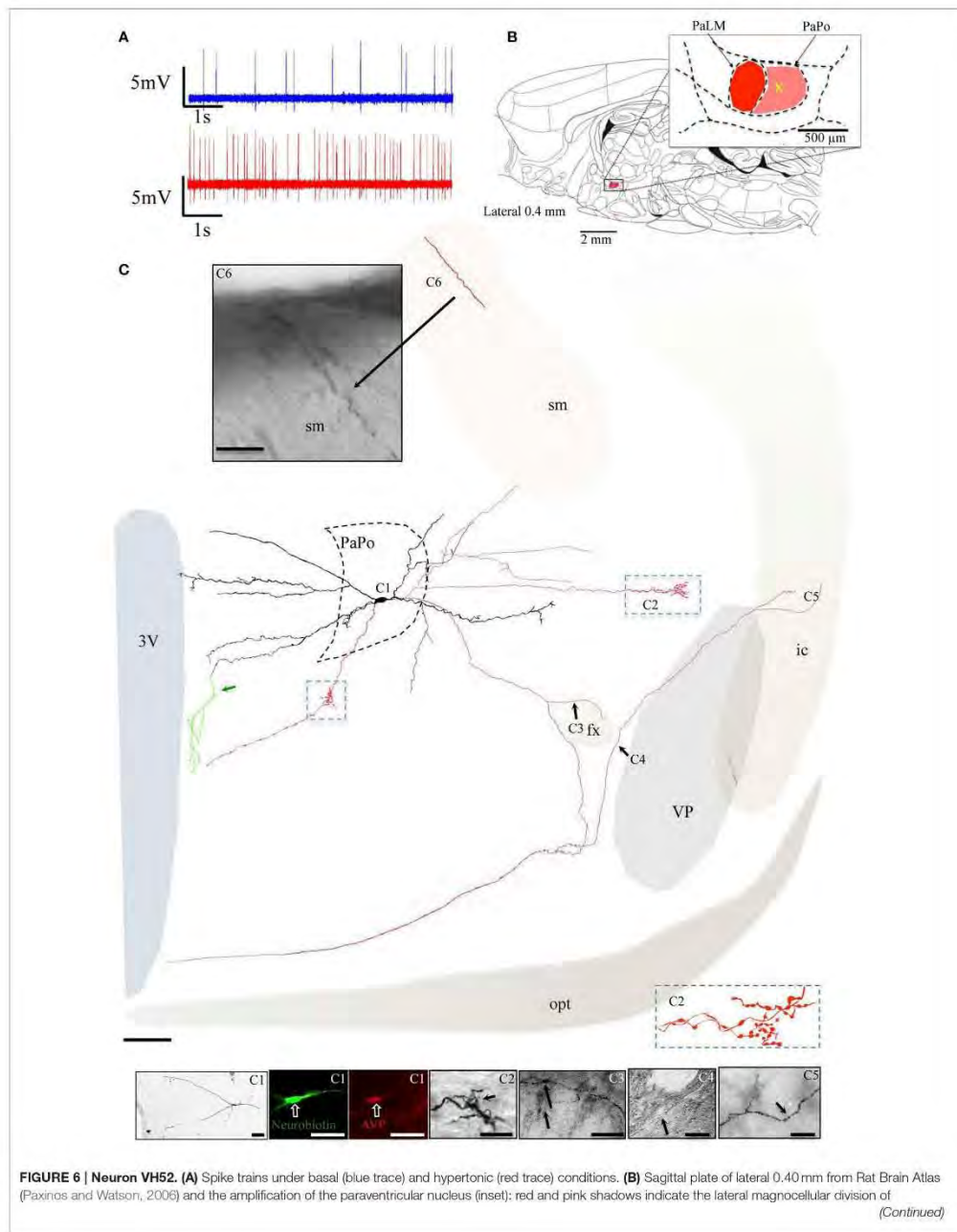


FIGURE 6 | Continued

paraventricular nucleus (PaLM) and the posterior division (PaPo), respectively. The yellow cross indicates the rostro-caudal position of VH52. **(C)** Coronal projection of camera lucida two-dimensional reconstruction and corresponding photomicrographs **(C1–C6)** showing dendritic and axonal patterns, **(C1)** Shows that the AVP-containing nature was ascertained by AVP immunoreaction; **(C2)** shows an axon with several small branches and classical image of strings of pearls in a small region in the lateral preoptical area; **(C3–C6)** show the presence of labeled axon segments in or near the conducting systems, fornix (fx), internal capsule (ic), and *stria medullaris* (sm). Green traces indicated by the green arrow, showing the beaded processes originated from the dendritic processes branching extensively in the periventricular region. This kind of processes were described in an early study and were considered as axonal processes (Sofroniew and Glasmann, 1981). Scale bars: 100 μm for **(C)**; 50 μm for all photomicrographs. VP, Ventral pallidum (symbolized with gray shadow); conducting systems (i.e., optical tract, opt, *stria medullaris* st, fornix, fx, internal capsule, ic) were symbolized with light beige shadows.

body's adaptive responses. Since 1934, M. I. Laruelle described two groups of paraventriculo-hypophyseal fibers, an external and an internal set (Harris, 1948), which can be observed clearly under conventional immunohistochemical reaction against AVP. Our contribution to this established concept is that, at least some of these AVP+ fibers have the same cellular origin as the lateral-bound ones. The structure-functional relationship for this arrangement remains to be established. The demonstration that axons projecting to the tract of Greving also emitted two axon collaterals to the lateral hypothalamus and to the LHB, through *stria medullaris*, is of specific interest. Recently, we have observed that the AVP-containing axons establish synaptic innervation onto LHB neurons and its up-regulation promotes motivational behavior during multifaceted stress coping by suppressing the functional activation of this region (unpublished data). Hence, this observation provides one cellular substrate to understand this neural circuit function.

The neuron MM15 was found located on the postero-lateral border between PaLM and PaPo. In contrast with the neurons previously mentioned, this neuron extended its dendrites mainly to the lateral hypothalamus. It seemed that the magnocells tend to extend their dendrites avoiding the densely packed PaLM regions. Afferents for these dendritic segments remain to be determined. This cell emitted several shortly branching axons.

The two neurons located in the PaPo regions (EV40 and VH52) had symmetric patterns regarding their dendritic arborization. Both neurons exhibited clear multi-axonal features sending projections to the conducting systems such as fornix, optical tract, and internal capsule, also to the medial and central amygdala. Several other reports found in the literature are in good agreement with our observations (Sofroniew and Glasmann, 1981; Inyushkin et al., 2009). In spite of their location in PaPo, these two neurons had similar physiological behavior to the previous cells located inside the PaLM region, during the osmotic challenge. We have observed Fos expression in this region, post-salt loading (unpublished data), which is in congruence with the observation from this study.

It is generally considered that the magnocellular neurosecretory neurons of PVN and SON, almost exclusively, project through the *zona interna* of the median eminence to the posterior pituitary, where they terminate at fenestrated capillaries and secrete AVP and OT into the blood circulation upon appropriate stimulation (Armstrong, 2004). Sofroniew and Glasmann by using a Golgi-like immunoperoxidase staining, first reported three types of processes originating from the soma of AVP immunoreactive magnocells (Sofroniew and Glasmann,

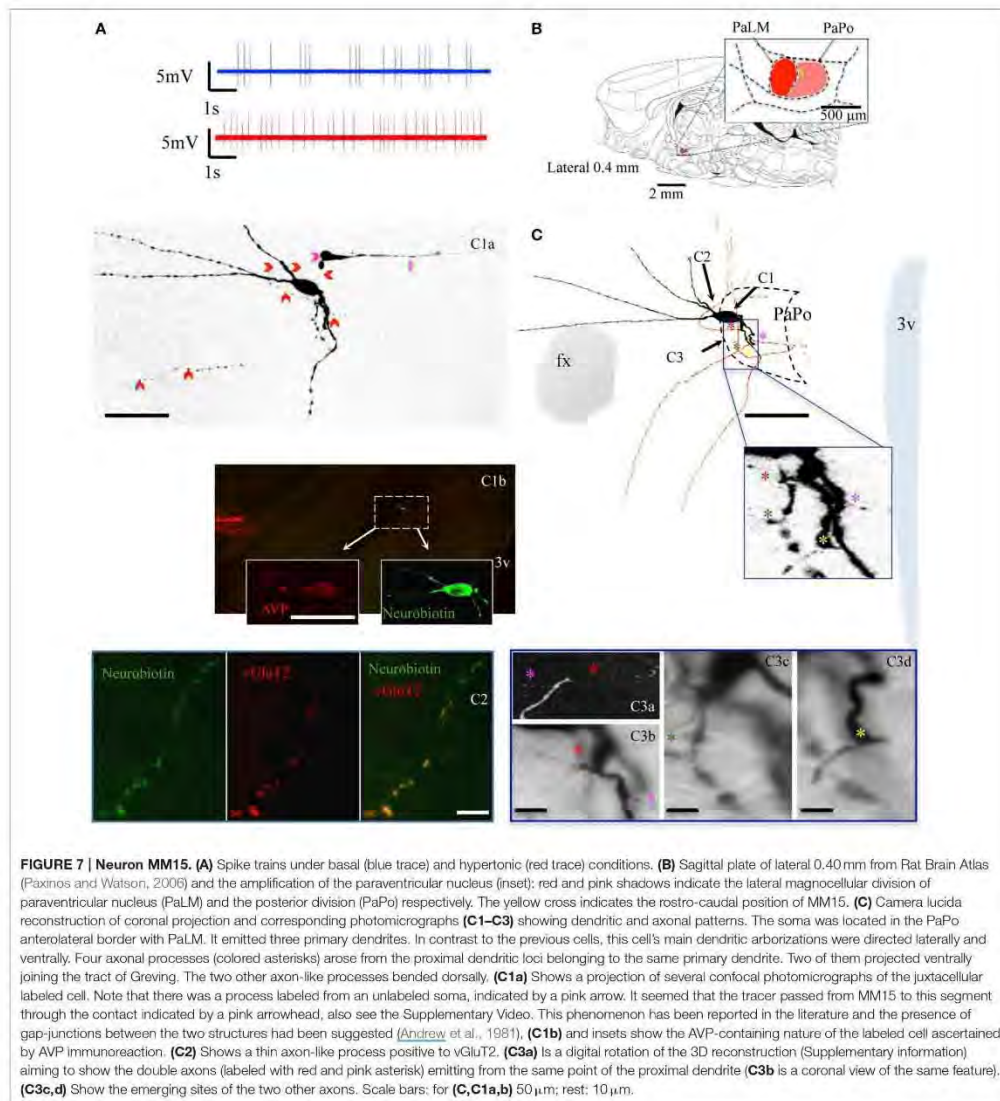
1981; Sofroniew, 1983): (1) beaded processes; (2) dendritic processes, and (3) thick peptide containing processes. The first group can be originated from the perikaryon, a dendrite or the main axon (as axon collaterals). They had an appearance similar to the classical descriptions of beaded neurosecretory axons, hence were considered by the authors as axons (Sofroniew and Glasmann, 1981). However, this observation had not received widespread appreciation due to the possible ambiguity of the method. Inyushkin et al. using *in vivo* electrophysiological recording, demonstrated a clear dual projection system, neurohypophyseal and central, from the AVP-immunopositive magnocellular neurons of the SON and suggested the existence of projections from these neurons in the SON that are much more widespread and longer than had previously been suspected (Inyushkin et al., 2009). The observations obtained from this study complement the previous observation providing additional anatomical evidence of the multi-axonal nature of the hypothalamic magnocellular neurosecretory neurons.

It is now known that hypothalamic neurosecretory neurons not only control the body homeostasis but also exert powerful control on individual emotional states, social behavior and decision making (Stoop, 2012). Our group has published a series of papers in recent years on the AVP magnocell's influence on hippocampal function and anxiety (Hernandez et al., 2012; Zhang et al., 2012; Zhang and Hernández, 2013). Fluorogold retrograde tracing from hippocampus (Zhang and Hernández, 2013) and LHB (unpublished data) has showed clearly the labeling in the lateral magnocellular AVP containing neurons. Hence, we consider that results from this study contribute to the unveiling of the complexity of the subcortical influence on the cortical physiological circuits.

Technical Considerations

Definition of "Axon" or "Axon-like" Processes

We should clarify that the criteria used in this study for "axon" or "axon-like" processes were solely based on anatomical and immunohistochemical criteria as published in the literature (Sofroniew and Glasmann, 1981; van den Pol, 1982; Armstrong, 2004). These criteria include long distance projections with constant fiber diameter and ramification in the targeting regions. The presence of "string-of-pearls" appearance and strong AVP immunoreaction with granular appearance under confocal microscopy were the main criteria to assign axon-like fibers. The latter aspect is because most part of the dendrites lacks Golgi packaging organelles. We are fully aware that this is debatable



and that ultrastructural features, such as the presence of axon-initial segment, remain to be determined by electron microscopy study.

Firing Rate Variations

All six AVP+ magnocellular neurons reported here increased their firing rate after hypertonic stimulus. However, their basal

and post-stimulus firing rates were heterogeneous. Besides the expected individual and circadian time physiological variations, each surgery procedure could contribute to the basal firing rate since the AVP magnocells are particularly sensitive to blood volume variations and the close proximity between the penetration site and the central venous sinus on the brain surface caused frequent bleeding during the craniotomy.

Juxtacellular Labeling and Post-hoc Anatomical Study: Advantages and Limitations of this Study

One of the main advantages of *in vivo* juxtacellular labeling for neuron reconstruction is that one can generally unequivocally connect the neurobiotin labeled processes (the main ones, at least), emitted from the labeled soma. The advantageous factors include the global fixation (not done on brain slices but done from integral animal without differential shrinkage between sections), the homogenous slicing, done by freely floating sections with a vibratome, and the resin treated relatively thick sections (70 μm) mounted on slides, which better conserves the 3D structure. With the help of a light microscope, at high magnifications, and a drawing tube, one can identify and clearly draw the trajectory and 3D coordinates of a given labeled process, especially its endings in X, Y, and Z planes (top vs. bottom). The accompanying anatomical structures, such as blood vessels, ventricles, prominent white matters, were also drawn on paper to help the *post-hoc* matching process.

There is always background “labeling” coming from endogenous biotin, mainly inside the mitochondria, which reacts with streptavidin or AB complex. However, at high magnification one can easily distinguish the endogenous background from labeling, since the endogenous patterns consisted in dots, contrasting with the exogenous tube-like continuous labeling pattern.

There were indeed processes labeled from non-labeled somata, the process indicated by a pink arrow in Figure 7C1a is an example. It was apparently a dendritic segment coming from an unlabeled soma. The tracer passed from the MM15 to this segment through a conjunction where a labeled axon from MM15 contacted the unlabeled cell's dendrite. This phenomenon has been reported in the literature and the presence of gap-junctions in this neuronal population had been suggested (Andrew et al., 1981).

In this study we did not use the neurohypophysis labeling as an inclusion criterion since in most of cases, this part of tissue was lost during the processing steps. The neurobiotin-axonal filling/visualization was incomplete in all cases. The time-lapse between labeling and perfusion/fixation, metabolism of the exogenous neurobiotin, and the possible presence of myelinization, among other factors, may contribute to this failure. As we reported in Figure 1, our success rate for this study was rather low (4%). Among other factors that hampered the experimental effectiveness, we could mention (1) the small size of the PVN; (2) the individual coordinate differences; (3) the high presence of pulsatile blood vessels (3.3 times) and longer lumen perimeters (3.6 times) more than in control regions of ventrolateral hypothalamus (van den Pol, 1982) and (4) the very

low spontaneous firing rates (<0.1 Hz) of AVP-magnocells under basal conditions in urethane anesthetized rats.

As we stated in the method section, most of the sections were processed and mounted—dismounted 2–3 times, for different procedures. Some of them were air-dried and mounted in permount medium (detergent treated) and others underwent freeze-thaw procedure (non-detergent treated) and dehydrated with ethanol, propylene oxide and further contrasted with osmium for future electron microscopy studies. The permanently mounted sections were used for camera lucida reconstruction. In most cases, there were processes that were difficult to connect between sections. Among the possible factors for this limitation we would like to mention (1) the Z-collapse was variable for differently treated sections; (2) the fractures due to freeze thaw procedure and dehydration and (3) the high background in no detergent AB reaction. All these factors made the connections of distant axons/terminals not always feasible.

However, these results, in congruency with several previous reports in the literature, provided unequivocal evidence that the magnocells have an uncommon feature of possessing multiple axon-like processes emanating from the soma or a proximal dendrite. Furthermore, the long-range non-neurohypophyseal projections are more common than an “occasional” phenomenon as previously thought.

Acknowledgments

This work was supported by grants PAPIIT-UNAM 216214 (LZ) and CONACyT grants 238744 (LZ), and 176916 (RB), 221092 (FJ). We would like to thank E. Pedernera and M. J. Gómora for providing the confocal imaging facility, E. Pinzon for technical assistance and A. N. Kopp for language editing. EV, VH were supported by DGAPA-UNAM for postdoctoral fellowship and CONACyT for PhD student scholarship and postdoctoral fellowships. A part of this work was completed while LZ was visiting NIDA/NIH supported by a CONACyT and PASPA-DGAPA-UNAM fellowships for a short research stay. This work forms part of the thesis of VSH to obtain the degree of *Doctor en Ciencias Biomédicas* from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors report no conflicts of interest.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00130>

References

- Andrew, R. D., Macvicar, B. A., Dudek, F. E., and Hatton, G. I. (1981). Dye transfer through gap junctions between neuroendocrine cells of rat hypothalamus. *Science* 211, 1187–1189. doi: 10.1126/science.7466393
- Armstrong, W. (2004). “Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei,” in *The Rat Nervous System, 3rd Edn.*, Chapter 15, ed. G. Paxinos (Amsterdam: Elsevier), 369–388.
- Armstrong, W. E., Warach, S., Hatton, G. I., and McNeill, T. H. (1980). Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 5, 1931–1958. doi: 10.1016/0306-4522(80)90040-8
- Bargmann, W., and Scharrer, E. (1951). The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am. Sci.* 39, 255–259.
- Bisset, G. W., Hilton, S. M., and Poisner, A. M. (1967). Hypothalamic pathways for independent release of vasopressin and oxytocin. *Proc.*

- R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 166, 422–442. doi: 10.1098/rspb.1967.0005
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., and Gainer, H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207, 373–378. doi: 10.1126/science.6153132
- Buijs, R. M. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192, 423–435. doi: 10.1007/BF00224932
- Buijs, R. M., and Swaab, D. F. (1979). Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell Tissue Res.* 204, 355–365. doi: 10.1007/BF00233648
- Deschênes, M., Bourassa, J., and Pinault, D. (1994). Corticothalamic projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Res.* 664, 215–219. doi: 10.1016/0006-8993(94)91974-7
- Gainer, H. (1972). Electrophysiological behavior of an endogenously active neurosecretory cell. *Brain Res.* 39, 403–418. doi: 10.1016/0006-8993(72)90444-1
- Greving, R. (1923). Zur anatomie, physiologie und pathologie der vegetativen zentren im zwischenhirn. *Ergebn. Anat. EntwGesch.* 24, 348–413.
- Greving, R. (1926). Beitrage zur anatomie der hypophyse und ihrer funktion. *Dtsch. Z. Nervenhk.* 89, 179–198. doi: 10.1007/BF01653054
- Greving, R. (1928). Das Zwischenhirn-hypophysensystem. Seine morphologie, phylogense und klinische bedeutung. *Klinische Wochenschrift* 7, 734–737. doi: 10.1007/BF01732231
- Harris, G. W. (1948). Neural control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.* 28, 139–179.
- Hatton, G. L., Cobbett, P., and Salm, A. K. (1985). Extranuclear axon collaterals of paraventricular neurons in the rat hypothalamus: intracellular staining, immunocytochemistry and electrophysiology. *Brain Res. Bull.* 14, 123–132. doi: 10.1016/0361-9230(85)90072-3
- Hayward, J. N., and Jennings, D. P. (1973). Activity of magnocellular neuroendocrine cells in the hypothalamus of unanaesthetized monkeys. II. Osmosensitivity of functional cell types in the supraoptic nucleus and the internuclear zone. *J. Physiol.* 232, 545–572. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010285
- Hernandez, V. S., Ruiz-Velazco, S., and Zhang, L. (2012). Differential effects of osmotic and SSR149415 challenges in maternally separated and control rats: the role of vasopressin on spatial learning. *Neurosci. Lett.* 528, 143–147. doi: 10.1016/j.neulet.2012.09.002
- Hernandez, V. S., and Zhang, L. (2012). "Vasopressin containing fibers distribution and synaptic innervation in the medial and central amygdala: an immunohistochemical study using light and electron microscopy," in *Work presented at SFN Annual meeting* (New Orleans, LA).
- Inyushkin, A. N., Orlans, H. O., and Dyball, R. E. (2009). Secretory cells of the supraoptic nucleus have central as well as neurohypophysial projections. *J. Anat.* 215, 425–434. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01121.x
- Leng, G., and Dyball, R. E. J. (1991). "Functional identification of magnocellular neuroendocrine neurons," in *Neuroendocrine Research Methods*, ed B. Greenstein (Chur: Harwood Academics Publishers GmbH), 769–791.
- Losonczy, A., Zhang, L., Shigemoto, R., Somogyi, P., and Nusser, Z. (2002). Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons. *J. Physiol.* 542, 193–210. doi: 10.1113/jphysiol.2002.020024
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., and Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2563–2572. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02698.x
- Morris, J. F., Budd, T. C., Epton, M. J., Ma, D., Pow, D. V., and Wang, H. (1998). Functions of the perikaryon and dendrites in magnocellular vasopressin-secreting neurons: new insights from ultrastructural studies. *Prog. Brain Res.* 119, 21–30. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61559-9
- Paxinos, G., and Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. San Diego, CA: Academic Press.
- Pinault, D. (1994). Golgi-like labeling of a single neuron recorded extracellularly. *Neurosci. Lett.* 170, 255–260. doi: 10.1016/0304-3940(94)90332-8
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed *in vivo* under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* 65, 113–136. doi: 10.1016/0165-0270(95)00144-1
- Pow, D. V., and Morris, J. F. (1989). Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience* 32, 435–439. doi: 10.1016/0306-4522(89)90091-2
- Ray, P. K., and Choudhury, S. R. (1990). Vasopressinergic axon collaterals and axon terminals in the magnocellular neurosecretory nuclei of the rat hypothalamus. *Acta Anat. (Basel)* 137, 37–44. doi: 10.1159/000146855
- Rho, J. H., and Swanson, L. W. (1989). A morphometric analysis of functionally defined subpopulations of neurons in the paraventricular nucleus of the rat with observations on the effects of colchicine. *J. Neurosci.* 9, 1375–1388.
- Shu, S. Y., Ju, G., and Fan, L. Z. (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.* 85, 169–171. doi: 10.1016/0304-3940(88)90346-1
- Sofroniew, M. V. (1983). Morphology of vasopressin and oxytocin neurons and their central and vascular projections. *Prog. Brain Res.* 60, 101–114. doi: 10.1016/S0079-6123(08)64378-2
- Sofroniew, M. V., and Glasmann, W. (1981). Golgi-like immunoperoxidase staining of hypothalamic magnocellular neurons that contain vasopressin, oxytocin or neurophysin in the rat. *Neuroscience* 6, 619–643. doi: 10.1016/0306-4522(81)90147-0
- Son, S. J., Filosa, J. A., Potapenko, E. S., Biancardi, V. C., Zheng, H., Patel, K. P., et al. (2013). Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron* 78, 1036–1049. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.025
- Stoop, R. (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76, 142–159. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.025
- Taylor, A. C., McCarthy, J. J., and Stocker, S. D. (2008). Mice lacking the transient receptor vanilloid potential 1 channel display normal thirst responses and central Fos activation to hypernatremia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1285–1293. doi: 10.1152/ajpregu.00003.2008
- Toney, G. M., and Daws, L. C. (2006). Juxtacellular labeling and chemical phenotyping of extracellularly recorded neurons *in vivo*. *Methods Mol. Biol.* 337, 127–137. doi: 10.1385/1-59745-095-2:127
- Tukker, J. J., Laszłóci, B., Katona, L., Roberts, J. D., Dalezios, Y., et al. (2013). Distinct dendritic arborization and *in vivo* firing patterns of parvalbumin-expressing basket cells in the hippocampal area CA3. *J. Neurosci.* 33, 6809–6825. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5052-12.2013
- van den Pol, A. N. (1982). The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J. Comp. Neurol.* 206, 317–345. doi: 10.1002/cnc.902060402
- Zhang, L., and Hernández, V. S. (2013). Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience* 228, 139–162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.010
- Zhang, L., Hernández, V. S., Liu, B., Medina, M. P., Nava-Kopp, A. T., Irls, C., et al. (2012). Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: its impact on anxiety in rats. *Neuroscience* 215, 135–148. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.046
- Zhang, L., Medina, M. P., Hernandez, V. S., Estrada, F. S., and Vega-Gonzalez, A. (2010). Vasopressinergic network abnormalities potentiate conditioned anxious state of rats subjected to maternal hyperthyroidism. *Neuroscience* 168, 416–428. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.059

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Hernández, Vázquez-Juárez, Márquez, Jáuregui-Huerta, Barrio and Zhang. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.