



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Neurobiología

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LAS OSCILACIONES THETA
REGISTRADAS EN LOS ESTRATOS DEL CIRCUITO HIPOCAMPAL DURANTE
LA EJECUCIÓN DE UNA TAREA DE MEMORIA ESPACIAL, EN LA RATA**

TESIS

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

Presenta:
el M. en C. J. Jesús Hernández Pérez

Director de Tesis:

Dra. María Esther Olvera Cortés
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS.
Instituto de neurobiología, UNAM.

Comité tutor:

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH.
Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. María de la Luz Torner Aguilar
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS.
Instituto de neurobiología, UNAM

Campus Juriquilla, Querétaro. Febrero 2017



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.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue financiado por el FONDO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. Numero de financiamiento: FIS/IMSS/PROT/ G11/921, Matricula 98172365. Becario CONACYT 232364.

ABREVIATURAS:

ANOVA, Análisis de varianza; GD, Giro Dentado; EEG, Electroencefalograma; LFP, Potencial de campo local; MOR, Sueño de movimientos oculares rápidos; SSA, Sistema sincronizador ascendente; spCA1, estrato piramidal de CA1; spCA3, estrato piramidal de CA3; sr, estrato radiado; slm, estrato lacunoso molecular;

INDICE					
1.0	ABSTRACT				1
1.1	RESUMEN				2
2	INTRODUCCIÓN				3
2.1	Aprendizaje y Memoria				3
2.2	Hipocampo				4
2.3	Papel del hipocampo en la memoria				5
2.4	Organización anatómica de los circuitos hipocampales				8
3	ANTECEDENTES				12
3.1	Actividad oscilatoria theta en los circuitos hipocampales				12
3.2	Origen de las oscilaciones theta del hipocampo				14
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA				22
5	JUSTIFICACIÓN				22
6	HIPÓTESIS				22
7	OBJETIVO GENERAL				23
8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS				23
9	MATERIAL Y METODOS				24
9.1	Construcción del arreglo de electrodos				24
9.2	Procedimiento quirúrgico para el implante de los multielectrodos				25
9.3	Procedimiento de registro				26
9.4	Ajuste de la posición del arreglo de multielectrodos				27
9.5	Evaluación conductual y registro de EEG				29
9.6	Análisis de datos				30
10	RESULTADOS				32
10.1	Conducta en el laberinto acuático de Morris				32
10.2	Incremento progresivo de la frecuencia pico durante el aprendizaje espacial				33
10.3	La velocidad de nado y la frecuencia pico no se correlacionan durante el Aprendizaje espacial				36
10.4	El aprendizaje espacial modifica la potencia relativa (RP) de las frecuencias theta				39
10.5	Distribución diferencial de PR en la relación basal-aprendizaje espacial a través de los días de aprendizaje				42
10.6	Resultados coherencia				45
11	DISCUSIÓN				48
11.1	Frecuencia theta lenta está asociada con la adquisición temprana de información espacial				49
11.2	Modificación de las oscilaciones theta durante el aprendizaje espacial				50
11.3	La adquisición y la recuperación de la información espacial diferencialmente por las oscilaciones theta en los circuitos intrahipocampales				53
11.4	Posibles implicaciones funcionales de los cambios en la frecuencia theta del hipocampo sobre el código neuronal.				54
11.5	Acoplamiento diferencial de las redes intrahipocampales durante las diferentes fases de aprendizaje espacial				56
12	CONCLUSIÓN				59
13	REFERENCIAS				60

ABSTRACT

The theta rhythm is necessary for hippocampal-dependent spatial learning. It has been proposed that each hippocampal stratum can generate a current theta dipole. Therefore, considering that each hippocampal circuit (CA1, CA3, and Dentate Gyrus (DG)) contributes differently to distinct aspects of a spatial memory, the theta oscillations on each stratum and their couplings may exhibit oscillatory dynamics associated with different stages of learning. To test this hypothesis, the theta oscillations from five hippocampal strata were recorded in the rat during different stages of learning in a Morris maze. The peak frequency, the relative power (RP) and the coherence between hippocampal strata were analyzed. The early acquisition stage of the Morris task was characterized by the predominance of slow frequency theta activity and high coupling between specific hippocampal strata at slow frequencies. However, during the retrieval stage on last training day, the theta oscillations were faster in all hippocampal strata, with tighter coupling at fast frequencies between the CA3 pyramidal stratum and other strata. Our results suggest that modifications to the theta frequency and its coupling can be a means by which the hippocampus differentially operates during acquisition and retrieval states.

RESUMEN

El ritmo theta es necesario para el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo. Se ha propuesto que cada estrato hipocampal puede generar un dipolo de corriente theta. Por lo tanto, considerando que cada circuito hipocampal (CA1, CA3, Giro Dentado [GD]) contribuye diferencialmente a distintos aspectos de la memoria espacial, las oscilaciones theta de cada estrato, así como su acoplamiento podrían exhibir dinámicas asociadas con las diferentes fases del aprendizaje. Para probar esta hipótesis, se registraron las oscilaciones theta de cinco estratos hipocampales de la rata durante diferentes fases del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Se analizó la frecuencia pico, la potencia relativa y la coherencia de las oscilaciones theta de los estratos del hipocampo. La fase de adquisición temprana de la tarea se caracterizó por el predominio de la actividad theta de baja frecuencia, y un alto acoplamiento en frecuencias lentas entre estratos específicos. Mientras que, en la fase de recuperación correspondiente al último día de entrenamiento, las oscilaciones theta fueron rápidas en todos los estratos del hipocampo, con un mayor acoplamiento en frecuencias rápidas entre el área de CA3 y el resto de los estratos. Nuestros resultados sugieren que las modificaciones en la frecuencia y en el acoplamiento pueden ser el medio a través del cual el hipocampo opera diferencialmente durante los estados de adquisición y recuperación.

INTRODUCCIÓN

Aprendizaje y Memoria

La memoria y el aprendizaje son procesos cognoscitivos que requieren de la coordinación espacial y temporal de circuitos neuronales que se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Estos circuitos participan en diferentes aspectos de la memoria desde la adquisición y el almacén hasta la recuperación de la información contenida en las experiencias personales (Buzsáki, 2006; Fuster, 1997).

La habilidad para recordar los eventos personales únicos de la vida diaria, así como el lugar y el tiempo en el cual se desarrollaron es sustentada por la memoria de tipo declarativa, la cual es dependiente de la integridad de las estructuras del lóbulo temporal medial (Squire y Zola, 1996; Scoville y Milner, 1957); así *“cada pensamiento que tenemos, cada palabra que decimos, cada acción que realizamos, de hecho, nuestro sentido del yo, y nuestro sentido de conexión con los otros se lo debemos a la memoria. La memoria es la habilidad de nuestros cerebros para almacenar y recordar nuestras experiencias”* (Squire y Kandel, 2009).

En la búsqueda del conocimiento de los procesos cerebrales, se han planteado algunas preguntas fundamentales en relación al estudio de la memoria, como son: ¿Qué procesos ocurren en nuestro cerebro cuando aprendemos y recordamos?, ¿Cómo estos procesos son afectados en las condiciones de enfermedad?, ¿Cómo podemos restaurar estos procesos una vez que han sido afectados por las patologías neurológicas? Se conoce que en todas las condiciones patológicas en las que se ve afectada la memoria, tales como la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, algunas infecciones virales y tumores cerebrales, así como en la pérdida de memoria asociada al envejecimiento normal y patológico, se presenta un deterioro en las estructuras del lóbulo temporal medial (Nadel y Moscovitch, 1997; Aggleton y Brown, 1999; Squire, 1986; Squire y Zola-Morgan, 1991).

Hipocampo

Con base en los resultados de estudios efectuados en animales de experimentación y en seres humanos se ha demostrado que el sistema cortical encargado de la memoria declarativa tanto en los seres humanos como en otras especies de mamíferos se encuentra constituido por la formación hipocampal (el giro dentado, CA1, CA3 y el complejo subicular), la corteza entorrinal, las cortezas parahipocampales adyacentes (la corteza postrinal en ratas o la corteza parahipocampal en primates y la corteza perirrinal) y estructuras subcorticales del sistema límbico (Aggleton y Brown, 1999; Brown y Aggleton, 2001; Squire y Zola, 1991; Colom, 2005) (Figura 1).

En la fase de adquisición de la memoria, la información es codificada en prácticamente todas las áreas neocorticales de asociación para posteriormente ser enviada a la región parahipocampal, que a su vez envía la información altamente procesada a la corteza entorrinal (Burwell y Agster, 2008; Nadel y Moscovitch, 1997).

Debido a que la mayor parte de la información procedente de la neocorteza hacia el hipocampo y la información que regresa del hipocampo hacia la neocorteza circula a través de la corteza entorrinal, se ha considerado a esta estructura como el puente que permite la transferencia de información entre las áreas neocorticales y el sistema hipocampal.

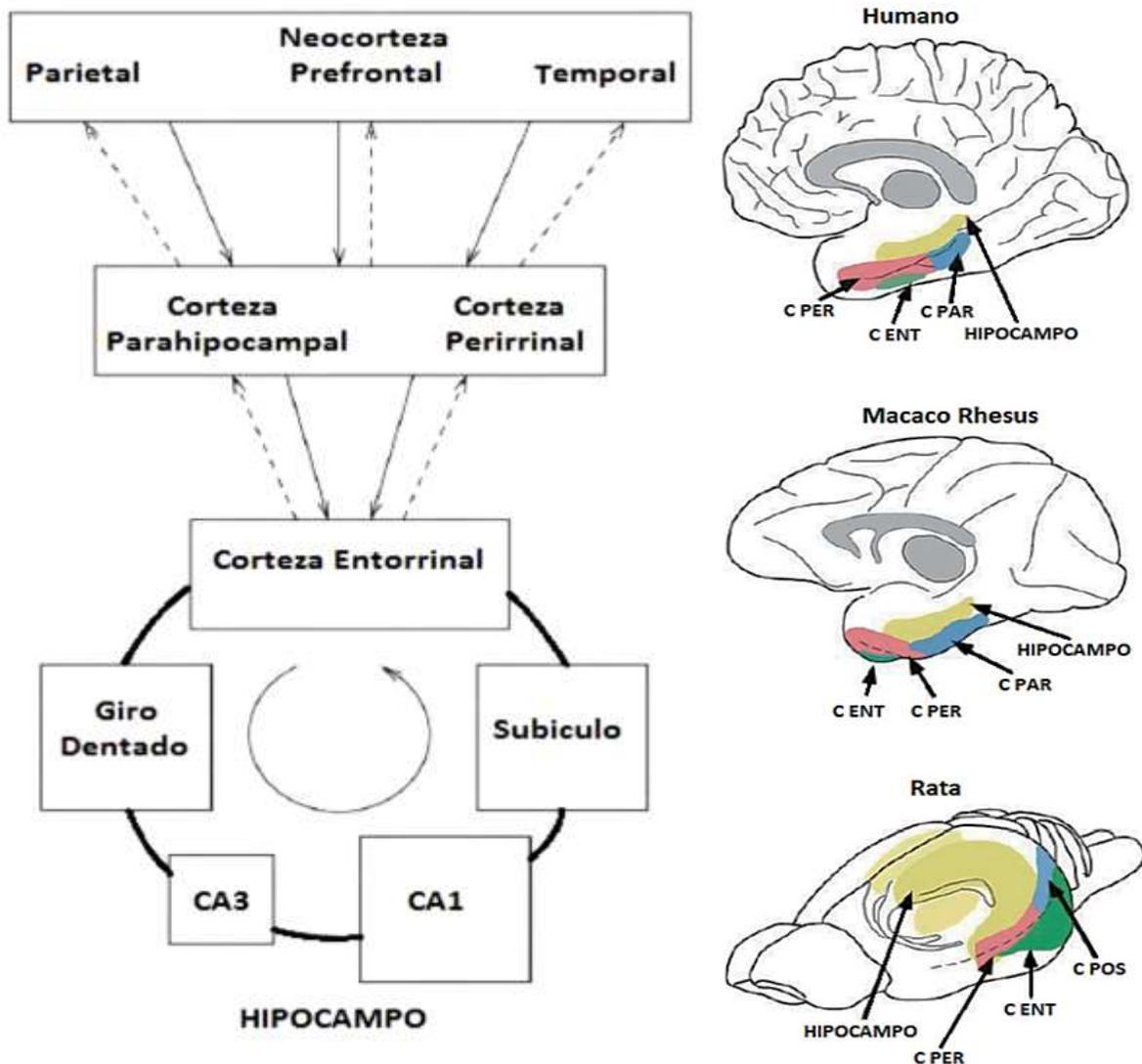


Figura 1.- La figura representa esquemáticamente el sustrato neural involucrado en la memoria declarativa, en humanos, macacos y ratas (izquierda). Se puede apreciar que el sistema de memoria está constituido por las mismas estructuras cerebrales en las tres especies (derecha). C ENT, corteza entorrinal; C PER, corteza perirrinal; C PAR, corteza parahipocampal; C POS, corteza postrinal. En el diagrama inferior se muestra la conectividad entre las áreas que conforman el sistema encargado de la memoria declarativa. Modificado de: Rolls y Kesner, 2006; Burwell y Agster, 2008.

Papel del hipocampo en la memoria

En 1957, Scoville y Milner encontraron que la extracción quirúrgica de la región hipocampal de un paciente que presentaba epilepsia intratable produjo amnesia, ya que el sujeto no podía recordar los eventos que le ocurrieron en el tiempo posterior a la cirugía (amnesia anterógrada), así como tampoco los eventos que le ocurrieron en el pasado reciente antes de la cirugía (amnesia retrograda). Sin embargo, el paciente sí era capaz de recordar los eventos de su vida que se habían almacenado en el pasado distante a la cirugía (Scoville y Milner, 1957), lo cual sugería que la memoria remota permanecía intacta. Estudios posteriores realizados en pacientes que presentaban lesión del hipocampo mostraron resultados similares (Zola-Morgan et al., 1986; Rempel-Clower et al., 1996).

Los resultados conjuntos de estudios clínicos y un gran número de trabajos en animales de experimentación han sustentado las bases de una teoría estándar de la consolidación de la memoria declarativa (Scoville y Milner, 1957; Zola-Morgan et al., 1986; Nadel y Moscovitch, 1997; Squire, 1986; Squire et al., 2004), la cual, sugiere que la formación hipocampal funciona como un sistema de memoria temporal que se encarga de la consolidación inicial de las experiencias adquiridas. Mientras que, en la etapa final del proceso de consolidación, los contenidos de información son gradualmente transferidos a la neocorteza como trazos de memoria de largo plazo permanentes. En esta etapa la contribución del hipocampo para la recuperación de los contenidos de la memoria disminuye progresivamente hasta que ésta se vuelve independiente del hipocampo (Nadel y Moscovitch, 1997; Squire et al., 2004). La teoría estándar de la consolidación de la memoria es una de las teorías que presenta mayor coincidencia con los datos neuropsicológicos. Sin embargo, esta teoría no explica en detalle los mecanismos neurales que subyacen al almacenamiento y el recuerdo de la memoria (Bird y Burgess, 2008), lo que se ha tratado de explicar mediante estudios en modelos de aprendizaje y memoria en animales de experimentación.

El desarrollo de estos modelos experimentales para el estudio de la memoria trajo consigo dos importantes descubrimientos:

- 1) La lesión del hipocampo produce la pérdida de la memoria de tipo espacial, la cual es considerada como un componente de la memoria episódica declarativa en humanos, esto permitió realizar evaluaciones equivalentes de la función hipocampal en seres humanos y en roedores (Morris et al., 1982).
- 2) El registro electrofisiológico de las células piramidales del hipocampo en roedores en libre movimiento demostró que éstas son capaces de responder al ambiente externo, ya que diferentes neuronas se activan exclusivamente cuando el animal se ubica o se desplaza en regiones específicas de un ambiente conocido; por lo que debido a esta característica se denominó a dichas neuronas células de lugar. Este descubrimiento llevó a sugerir que estas células representan la información espacial de un evento (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Estudios posteriores mostraron que el registro de una población grande de éstas células es capaz de representar completamente un ambiente conocido (Wilson y McNaughton, 1993). En conjunto, estos descubrimientos llevaron a proponer como función del hipocampo la memoria espacial (O'Keefe y Nadel, 1978).

A la par de estos descubrimientos, se originaron otras teorías (teoría relacional, teoría de múltiples trazas de memoria) que tratan de explicar desde el nivel celular hasta el nivel de sistemas cómo se desarrollan los procesos cerebrales que subyacen a la memoria (Moscovitch et al., 2005; Cohen et al., 1997). Sin embargo, estas teorías fallan en las predicciones acerca de los efectos que generan la modificación o manipulación de tales procesos. Debido a que el cerebro está organizado en circuitos neurales, las fallas en la predicción de los mecanismos neurales responsables de la memoria pueden ser originadas por el escaso conocimiento acerca de los principios de operación que rigen la forma de interactuar de los circuitos.

Para entender cómo interactúan los elementos de un sistema, es fundamental conocer como están organizadas las conexiones físicas del sistema neuronal. En este sentido, destacados neurofisiólogos y neuroanatomistas como Santiago Ramon y Cajal, y Rafael Lorente de No, han acertado en su postura acerca de que la estructura puede ayudar a determinar la función. Si se conoce el diseño del circuito y las reglas que gobiernan la interacción entre grupos neuronales durante la conducta, es posible entender cómo funciona el cerebro (Buzsáki, 2006).

Organización anatómica de los circuitos hipocampales

El hipocampo es una estructura que presenta una organización laminar (Amaral y Witter, 1995; Klausberger y Somogyi, 2008), y que está principalmente constituida por dos tipos de neuronas: neuronas excitadoras (de carácter glutamatérgico) que corresponden aproximadamente al 90% y neuronas inhibitoras (de identidad GABAérgica), que constituyen menos del 10% de las neuronas del hipocampo (Freund y Buzsaki, 1996).

Debido a que las células glutamatérgicas constituyen el mayor número de neuronas del hipocampo (figura 2), los eventos eléctricos en las redes neuronales del hipocampo son causados por los cambios en el flujo de corriente a través de estas neuronas y de sus conexiones sinápticas (Glickfeld et al., 2009; Oren et al., 2006; Bragin et al., 1995). Sin embargo, estos eventos sinápticos son la consecuencia de la actividad excitadora e inhibitora que inciden sobre la estructura somato-dendrítica de las neuronas glutamatérgicas, con una participación importante de las interneuronas inhibitoras (Bazelot et al., 2010; Kamodi et al., 1998).

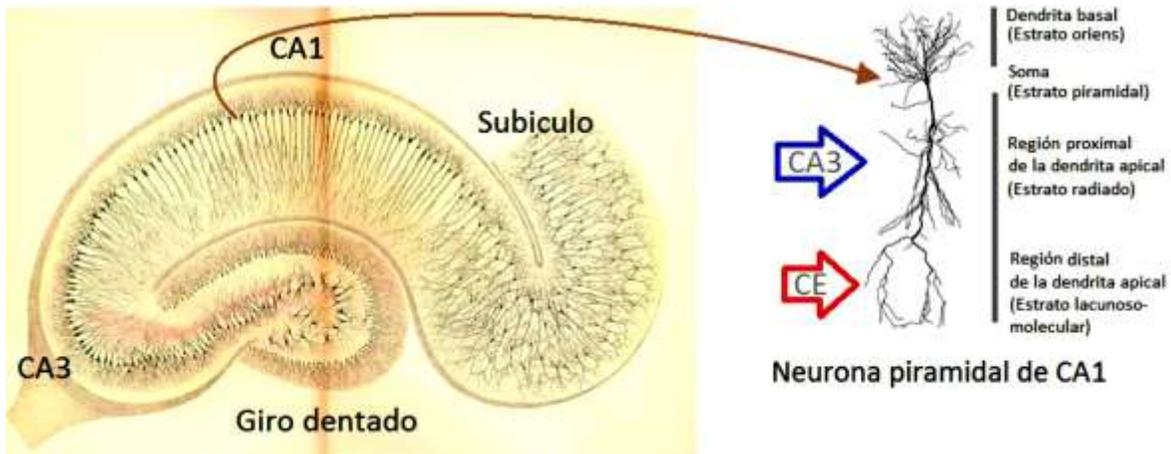


Figura 2. Organización neuronal de la formación hipocampal. En la figura izquierda se muestra un dibujo de la formación hipocampal realizado por Camilo Golgi en 1883, en la cual se puede apreciar el acomodo lineal de las neuronas. La figura derecha muestra la estructura citoarquitectónica de una neurona piramidal y los correspondientes estratos a que contribuye cada región de dicha neurona. La posición de las flechas de color azul y rojo representa el sitio donde llegan las aferentes excitadoras provenientes del área de CA3 y de la corteza entorrinal respectivamente. Modificado de: Camillo Golgi, 1883; Spruston, 2009.

La organización de las conexiones glutamatérgicas del circuito hipocampal es de tipo unidireccional, es decir, la corteza entorrinal (CE) proyecta al hipocampo por medio de la vía perforante lateral (VPL) y medial (VPM), estas llegan al estrato molecular del giro dentado el cual está principalmente constituido por arborizaciones dendríticas de las células granulares, a su vez, los axones de las células granulares proyectan hacia el estrato *lucidum* de la región de CA3, en donde hacen contacto principalmente con la porción proximal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 (Witter Y Amaral, 2004) (Figura 3). La región de CA3 presenta una organización más elaborada, ya que sus fibras de proyección forman colaterales recurrentes que conectan con las mismas neuronas de esta región y a su vez, establecen conexiones a través de las colaterales de Schaffer con estructuras neuronales en los estratos radiado y *oriens* de la región de CA1 (Witter Y Amaral, 2004). Por su parte, la región de CA1 proyecta sus eferentes hacia el subículo y de regreso a la corteza entorrinal, de esta manera se cierra el circuito entorrino-hipocampal-entorrinal. Además de las conexiones intrahipocampales, la

corteza entorrinal también genera conexiones eferentes directamente sobre la región de CA3 por medio de la vía perforante y sobre la región de CA1, a través de la vía temporo-amónica (Witter Y Amaral, 2004) (Figura 3). La conectividad intra- o extra- hipocampal glutamatérgica, demuestra que el hipocampo está organizado de forma laminar.

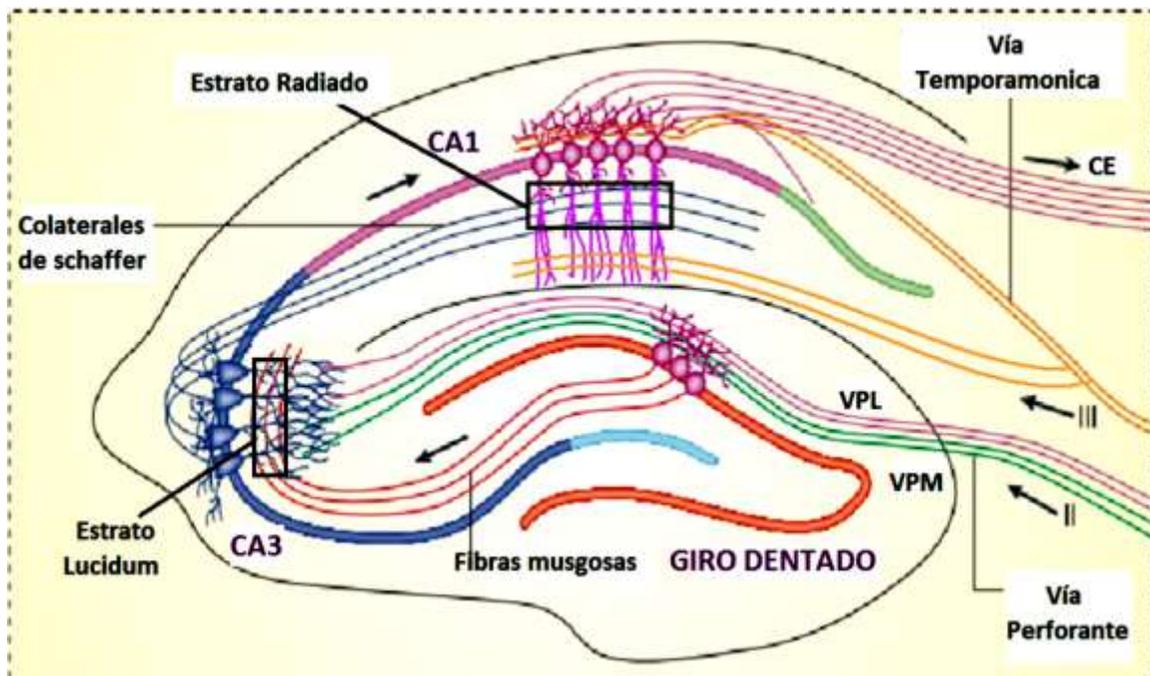


Figura 3.- Circuito hipocampal. El hipocampo está compuesto de tres áreas principales (giro dentado, CA3 y CA1). La Conectividad de las aferentes excitadoras intra y extrahipocampales se encuentra organizada de manera laminar.

En el mismo sentido, las entradas GABAérgicas se organizan de forma laminar, por ejemplo: los estratos granular y piramidal del hipocampo (donde se encuentran los somas de las células glutamatérgicas) son invadidos exclusivamente por un tipo especial de interneuronas GABAérgicas (células en forma de canasta), mientras que cada lámina o dominio de las dendritas es invadida por un tipo distinto de interneuronas (Figura 4). De esta forma, cada dominio dendrítico recibe tanto una proyección excitadora como una inhibitoria (Somogyi y Klausberger, 2005; Klausberger y Somogyi, 2008).

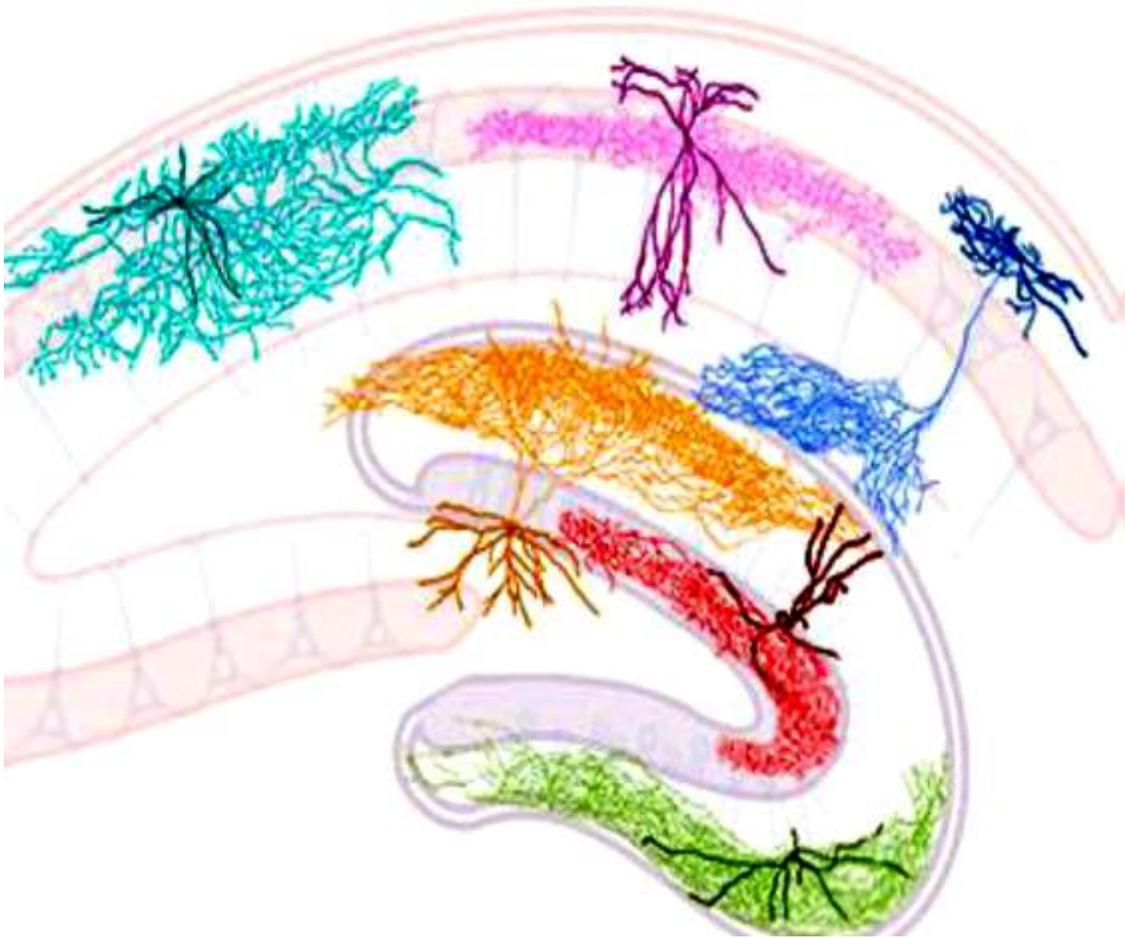


Figura 4.-Sistema de interneuronas del hipocampo. Cada entrada excitadora mostrada en la figura anterior es igualada por una aferente inhibitoria, en esta figura se puede apreciar la diversidad de interneuronas clasificadas en base a los dominios de proyección axónica. Modificado de: Freund y Kali, 2008.

Este tipo de organización permite que la acción de las entradas excitadoras que llegan a los dominios dendríticos específicos pueda ser controlada por los tipos de interneuronas particulares que llegan al mismo dominio (Glickfeld et al., 2009; Somogyi y Klausberger, 2005). Mientras, la sincronización de los disparos de las neuronas principales puede ser regulada por la actividad de las interneuronas que inervan el dominio somático (Somogyi y Klausberger, 2005; Freund y Katona, 2007).

ANTECEDENTES

Actividad oscilatoria theta en los circuitos hipocampales

El hipocampo presenta uno de los patrones de actividad eléctrica oscilatoria, entre 4 y 12 Hz, más prominentes del cerebro llamado actividad theta, (Figura 5), la cual ha sido registrada durante conductas asociadas con la extracción de información ambiental (caminando, corriendo, nadando, postura de erguida, olfateo, y movimientos de cabeza) y durante el sueño MOR (Vandewolf, 1969; Buzsáki et al., 1983).

En estructuras con organización laminar como el hipocampo, es posible conocer el origen de la actividad sináptica (Buzsáki, 2006). Las entradas inhibitoras generan un flujo de corriente (cargas positivas) del espacio intracelular al espacio extracelular que es llamado fuente de corriente, mientras que las entradas excitadoras generan un flujo de corriente (cargas positivas) del espacio extracelular al espacio intracelular denominado sumidero (Mitzdorf, 1985; Montgomery, et al 2009).

La acción conjunta de las aferentes excitadoras e inhibitoras sobre las neuronas principales glutamatérgicas genera corrientes extracelulares que pueden ser registradas a través de un electrodo de registro extracelular sensible a las fluctuaciones oscilatorias de voltaje del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés) (Buzsáki, 2006). A este respecto, se ha sugerido que en el hipocampo la actividad sincrónica de las aferentes excitadoras e inhibitoras que llegan específicamente hacia cada lámina es capaz de generar un dipolo independiente de actividad theta, y que la actividad conjunta de estos dipolos genera el patrón de actividad theta global (Buzsáki 2006; Montgomery et al., 2009).

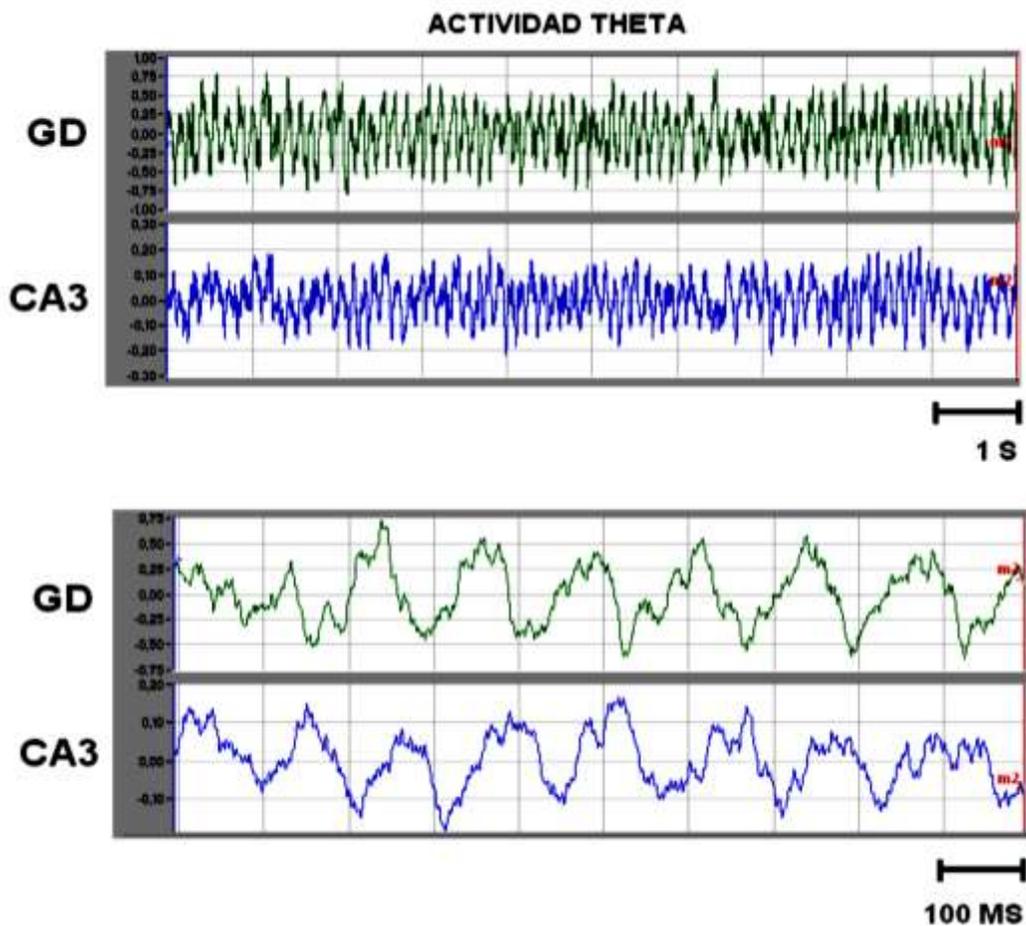


Figura 5.- Actividad theta registrada en el Giro dentado (GD) y CA3. En la figura superior, el trazo corresponde a una muestra de 10 segundos, en la figura inferior el trazo corresponde a una muestra de un segundo. El eje Y representa valores en miliVolts.

Para conocer la relación dinámica de los elementos del circuito hipocampal debemos identificar a los dipolos de frecuencia theta que son generados en cada lámina. Para este propósito es necesario el uso de microelectrodos (con un diámetro en el orden de micras) que registran principalmente el EEG originado por la actividad sináptica local de algunos cientos de neuronas (Buzsáki, et al., 1983; Buzsáki 2006). Con un arreglo lineal de múltiples sitios de registro es posible registrar la actividad de campo de cada lamina (Figura 6).

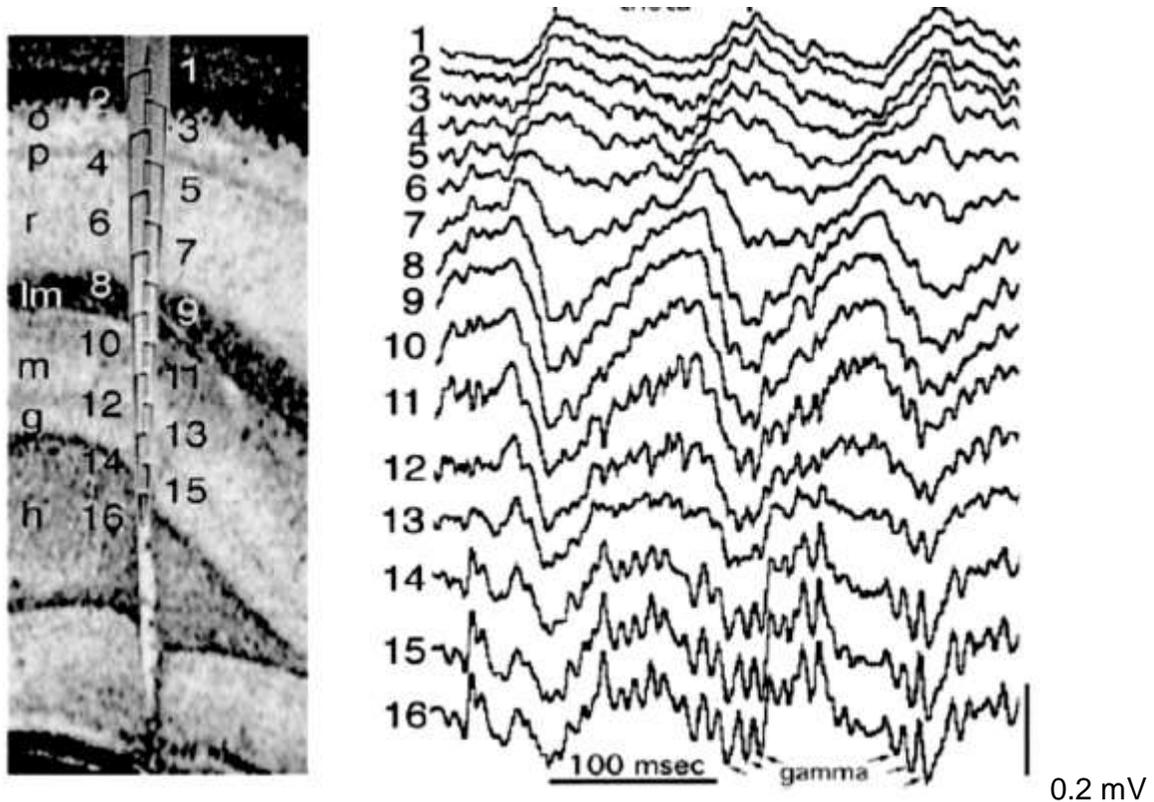


Figura 6.- Patrón de actividad theta a través de las diferentes laminas del hipocampo. De lado izquierdo se observa una sonda de silicón con 16 sitios de registro sobre el hipocampo. Lado derecho se aprecia cada trazo de la actividad theta obtenida de cada sitio de registro. (Laminas o estratos): o, oriens; p, piramidal; r, radiado; lm, lacunoso molecular; m, moléculas; g, granular; h, hilus. Modificado de; Bragin et al., 1995.

Origen de las oscilaciones theta del hipocampo

El modelo que propone el origen celular del ritmo theta establece que la entrada GABAérgica fásica del septo medial hacia el hipocampo actúa como un marcapasos que encarrila coherentemente la actividad hipocampal (Petsche et al., 1962). La lesión del complejo septal (principal entrada subcortical) elimina el ritmo theta hipocampal y produce severas deficiencias en la ejecución de las pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Winson, 1978; Yoder y Pang 2005). Debido a que la frecuencia de la actividad theta es controlada por núcleos hipotalámicos (núcleos supramamilares) que proyectan hacia el septo medial e hipocampo, es

probable que los cambios en el patrón de la actividad theta hipocampal se originen por la influencia de tales núcleos sobre el complejo septal o hipocampo, o por la retroalimentación de la actividad hipocampal sobre el núcleo supramamilar o directamente sobre el complejo septal (Green y Arduini, 1954; M'Harzi y Monmaur, 1985; Bland et al, 1999).

Estudios farmacológicos posteriores han identificado al menos dos mecanismos independientes que están involucrados en la generación del ritmo theta hipocampal, uno que es dependiente de la actividad colinérgica (actividad theta de frecuencia lenta, de 4 a 6Hz) y otro es inducido por la actividad locomotora y es resistente a antagonistas colinérgicos muscarínicos (atropina) (actividad theta de alta frecuencia, 6 a 9Hz) (Bland, 1986; Monmaur y Brenton 1990; Monmaur et al., 1993; Lawson y Bland, 1993; Buzsáki, 2002).

Posteriormente se demostró que las oscilaciones theta inducidas por la actividad motora son dependientes de las entradas glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal, ya que estas (oscilaciones theta resistentes a atropina) fueron eliminadas tras la lesión de la corteza entorrinal (Buzsáki et al., 1983; Vanderwolf y Leung, 1983; Kamodi et al., 1998); mientras que la actividad theta dependiente de la actividad colinérgica puede estar sustentada por el complejo septal ya que este contiene neuronas colinérgicas que proyectan hacia el hipocampo.

Adicionalmente se ha observado que las regiones de CA3 y CA1 del hipocampo intacto *in vitro*, son capaces de generar actividad theta independientemente de las entradas septales, por lo cual los autores sugieren que este ritmo theta depende de la integridad de las redes intrahipocampales (Goutagny et al., 2009). Del mismo modo, en ese estudio se demostró que la región de CA1 es capaz de generar actividad theta de forma independiente de la influencia del área de CA3. Lo cual sugiere que el área de CA1 posee la infraestructura necesaria para originar este patrón de actividad. Un aspecto interesante de este estudio fue que se mostró que el patrón de actividad theta *in vitro* es semejante al patrón de actividad generado en

los animales en libre movimiento, ya que los perfiles de voltaje obtenidos *in vitro*, a lo largo de las láminas hipocampales muestran una relación de fase similar a la presentada en los animales en libre movimiento (Goutagny et al., 2009).

Por lo tanto, estas evidencias sugieren que existen diferentes mecanismos involucrados en la generación de las oscilaciones theta en el hipocampo. Sin embargo, es probable que las oscilaciones theta expresadas durante la conducta sean el resultado de la acción conjunta de los elementos externos al hipocampo como el complejo septal y la corteza entorrinal, así como de la circuitería interna del propio hipocampo. En este sentido existe evidencia que demuestra que al afectar cualquiera de estos elementos se modifica o pierde la actividad theta (Kamodi et al., 1998; Steffenach et al., 2005). Por otro lado, se ha encontrado que la aplicación del agonista a receptor canabinoide CB1 (CP55940) produce una reducción de la potencia de la actividad theta hipocampal acompañada de un deterioro en la ejecución de una tarea de memoria espacial dependiente del hipocampo y de la pérdida de la coordinación temporal de ensambles neuronales (Robbe et al., 2006). Adicionalmente, se ha demostrado que la inactivación del septo medial o de la corteza entorrinal (procedimientos que también producen pérdida de la potencia de la actividad theta) generan deficiencias en la ejecución de tareas de memoria, así como alteraciones en los patrones de disparo de las neuronas del sistema entorrino-hipocampal (Winson, 1978, Koenig et al., 2011; Sasaki et al., 2014; Schlesiger et al., 2015). Lo cual sugiere, que los procedimientos que interrumpen o alteran la potencia de la actividad theta producen deterioro en los procesos de aprendizaje y de memoria espacial dependientes del hipocampo.

Evidencia reciente en animales en libre movimiento sugiere que, cada lámina del circuito hipocampal es capaz de generar un dipolo de corriente theta de manera independiente (Montgomery, et al., 2009), esto fue mostrado por medio de dos diferentes estrategias:

1.-) El análisis de densidad de fuente de corriente mostró que en cada lámina hipocampal se generan fuentes y sumideros de frecuencia theta que corresponden a las entradas excitadoras e inhibitoras (figura 7, izquierda).

2.-) El análisis de coherencia de las oscilaciones registradas en cada estrato y el análisis de densidad de fuente de corriente, demostraron que la coherencia es alta entre los sitios de medición que se encuentran en la misma lamina o estrato sin importar la distancia (0 a 2 mm) y que esta disminuye de manera dependiente de la distancia cuando se comparó entre las diferentes láminas o estratos del hipocampo (figura7, derecha).

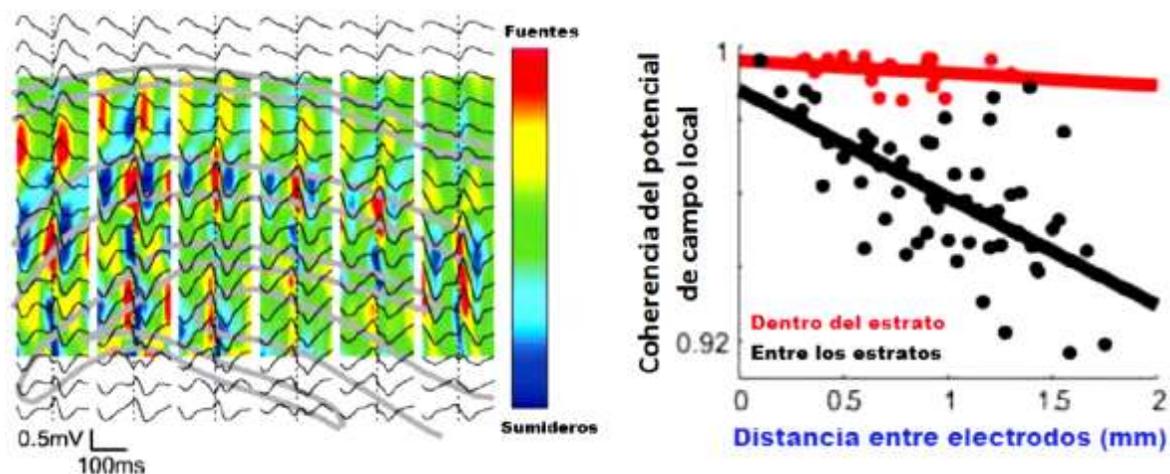


Figura 7.- Relación entre los diferentes generadores de corriente theta. Izquierda, trazos promediados del potencial de campo (color; negro) y densidad de fuente de corriente (color; rojo, fuentes; azul, sumideros) con referencia al estrato lacunosomoleculare. Diferente perfil de fuentes y sumideros en cada lamina hipocampal. Derecha, coherencia promediada en función de la distancia dentro y entre estratos. Modificado de: Montgomery et al 2009.

Las oscilaciones theta observadas en cada lámina del hipocampo pueden brindar una idea de cómo la información está llegando a los estratos dendríticos y somáticos, además de la relación funcional que guardan como consecuencia de las conexiones intrahipocampales y de la entrada de información extrahipocampal. Funcionalmente, se ha sugerido que el ritmo theta se encarga de agrupar y segregar

los ensambles neuronales asignados a varias tareas computacionales dentro de las redes hipocampales (Buzsáki, 2002). Por ejemplo, se ha observado que la actividad de las células de lugar hipocampales es controlada por el código temporal impuesto por el ritmo theta, ya que los disparos de estas neuronas son controlados por la fase del ritmo theta en marcha, este fenómeno es llamado precesión de fase (O'Keefe y Recce, 1993).

Debido a que las oscilaciones theta son un requisito básico para el establecimiento del aprendizaje, se ha sugerido que estas pueden dirigir el procesamiento de la información, por ello es indispensable saber si estas oscilaciones se modifican en función del aprendizaje. Interesantemente, un estudio reciente encontró cambios de las oscilaciones theta específicos del estrato en el hipocampo (Montgomery et al., 2009); sin embargo, similar a otros estudios (Schmidt et al., 2013; Belchior et al., 2014), ese trabajo se enfocó en las dinámicas del ritmo theta cuando el animal ya había aprendido la tarea (Montgomery et al., 2009) durante periodos de toma de decisiones, implicando principalmente la recuperación de información. A diferencia de este proceso, el interés del presente estudio es analizar las dinámicas oscilatorias en frecuencia theta de los circuitos intrahipocampales durante el aprendizaje de navegación espacial con el objetivo de comprender cómo las oscilaciones de cada estrato están organizadas durante el proceso de aprendizaje.

Se ha sugerido que, si las oscilaciones theta juegan participar en el proceso de aprendizaje por lo que éstas pueden variar en función de la fase de entrenamiento, de temprana a tardía. Para probar esta hipótesis, en este trabajo se utilizó la tarea de aprendizaje de lugar del laberinto acuático de Morris, la cual es exitosa para evaluar el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo. En trabajos previos, se han encontrado modificaciones de las oscilaciones theta hipocampales durante el aprendizaje (Olvera-Cortés et al., 2002, 2004; Gutiérrez-Guzmán et al., 2011, 2012; Hernández-Pérez et al., 2015). Por ejemplo, se ha observado que el aprendizaje espacial de lugar (dependiente de la integridad del hipocampo) evaluado en el

laberinto acuático de Morris genera modificaciones en la potencia de la actividad theta (Figura 8, superior).

Específicamente, durante el aprendizaje espacial de lugar se encontró un aumento en la potencia de la banda theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) y una disminución en la potencia de la banda de baja frecuencia (4-6 Hz) a través de los días de aprendizaje con respecto a la condición basal (Olvera-Cortés, et al., 2002, 2004). Durante el aprendizaje de señal (tarea no dependiente de la función hipocampal) no se produjeron modificaciones de la actividad theta (Figura 8, inferior). Estos resultados llevaron a concluir a los autores, que los cambios en la actividad theta probablemente pueden deberse al procesamiento cognitivo de la información espacial (Olvera-Cortés et al., 2002).

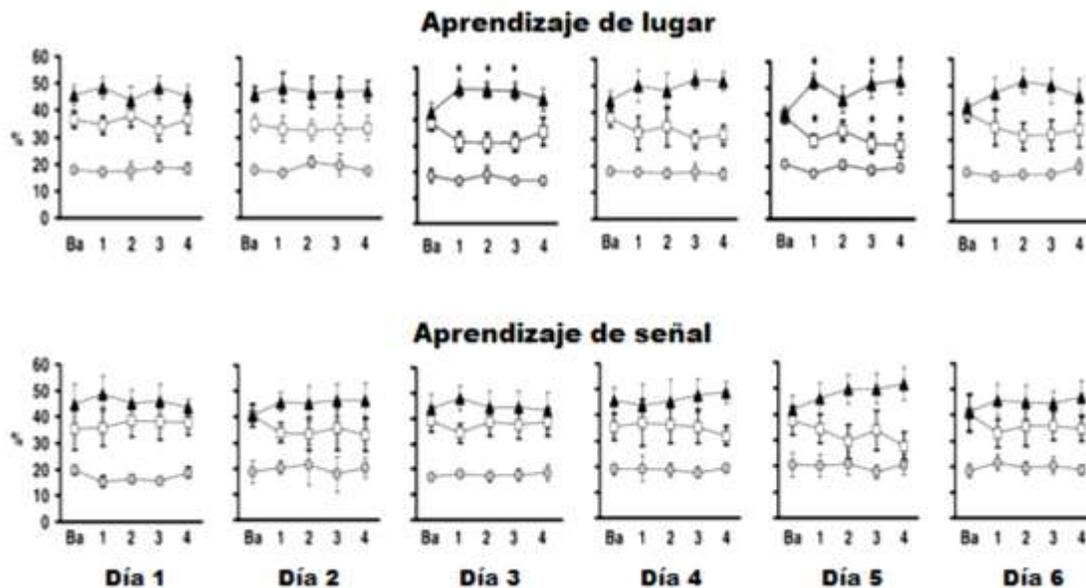


Figura 8.- Potencia relativa de la actividad theta registrada durante la ejecución de prueba de memoria dependiente y una no dependiente de la integridad del hipocampo. Durante la fase de aprendizaje la actividad theta de alta frecuencia incrementa su potencia, mientras que la banda de baja frecuencia disminuyó su potencia con respecto a la condición basal. Los triángulos negros corresponden a la banda de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz), los cuadros blancos a la banda de baja frecuencia (4-6.5 Hz), los círculos grises a la banda de máxima frecuencia (9.5-12 Hz). * $p < 0.05$. Modificado de Olvera-Cortés 2002.

Las evidencias anteriormente mencionadas sugieren que las oscilaciones theta pueden jugar un papel en el procesamiento de la información espacial codificada en el hipocampo. Sin embargo, las dinámicas del EEG de los circuitos hipocampales no han sido estudiadas durante el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, además se ha demostrado que cada área hipocampal (GD, CA1 y CA3) contribuye de manera diferente a distintos aspectos del aprendizaje y la memoria espacial. Por ejemplo, el GD ha sido asociado a la codificación de información novedosa, mientras que las áreas de CA3 y CA1 han sido implicadas en la recuperación de información ya almacenada, en este sentido se ha encontrado que la lesión de la entrada de GD hacia CA3 interfiere con la codificación de información novedosa, mientras que la lesión de la vía perforante (entrada de la corteza entorrinal hacia CA3) daña la recuperación sin afectar la codificación (Lee y Kesner, 2004; Kesner et al., 2004). Modelos computacionales basados en la estructura, conectividad de las redes hipocampales, así como en datos experimentales sugieren que estas dos regiones ejecutan distintas operaciones computacionales, el GD actúa como un separador de patrones que se encarga de la extracción o amplificación de diferencias procedentes de dos patrones de entrada similares, en tanto que el área de CA3 ejecuta la terminación de patrones que permite la recuperación de un patrón de información completo a partir de la entrada de información parcial o degradada (Rolls, 1996; Rolls y Kesner, 2006; Yassa y Stark, 2011).

La separación de patrones permite detectar diferencias o cambios sutiles dentro de un ambiente familiar, o reconocer un ambiente como novedoso respecto a ambientes conocidos, en este sentido, se ha observado que animales con lesión del GD son incapaces de discriminar entre un ambiente conocido respecto a un ambiente en el cual la distancia entre dos objetos ha sido levemente modificada (Hunsaker et al., 2008). En este sentido, la generación de un nuevo patrón de actividad en el GD, asociado a la codificación de las diferencias entre dos ambientes similares permite diferenciar entre un ambiente familiar respecto a un ambiente con ligeras modificaciones. De la misma forma, los nuevos patrones de actividad de un

aprendizaje novedoso podrían parcialmente ser sustentados por el mecanismo de separación de patrones establecido en el GD. Por otra parte, las colaterales recurrentes establecidas en el área de CA3 han sido consideradas como un sistema que permite la generación de nuevas asociaciones, así como el almacén de patrones de actividad reverberantes, que podrían participar en el recuerdo de información previamente codificada (Rolls, 1996; Kesner et al., 2004; Rolls y Kesner, 2006). Por lo que la presentación de una señal, podría desencadenar el recuerdo de un evento completo en el sistema recurrente de CA3. Estudios recientes han encontrado que el área de CA3 es requerida para la ejecución de pruebas de memoria en donde los roedores tienen que encortar alimento en diferentes posiciones de un ambiente familiar en el cual la mayor parte de las señales extra-laberinto (que utilizan para ubicarse) son removidas (Gold y Kesner, 2005).

Debido a que las distintas regiones del hipocampo ejecutan distintas operaciones computacionales, es importante analizar cómo estas regiones están interactuando durante los procesos de aprendizaje y de memoria. En este contexto, conocer la dinámica de las oscilaciones theta generadas en cada estrato de las tres principales áreas del hipocampo (GD, CA1, y CA3), nos ayudará a entender cómo el hipocampo está operando durante la ejecución de tareas de navegación espacial. Con base en lo anterior, el principal objetivo del presente trabajo fue estudiar las características de las oscilaciones theta generadas en cada estrato del circuito hipocampal, así como su interacción, durante el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo. Esto se realizó a través del registro de la actividad oscilatoria (por medio de un arreglo de multielectrodos lineal de ocho electrodos de 25 μm de diámetro espaciados 180 micras entre cada uno) de los circuitos intrahipocampales durante la ejecución de una tarea de memoria de referencia espacial en el laberinto acuático de Morris.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la función cognitiva del hipocampo depende de la actividad theta y a que las láminas de cada región hipocampal son capaces de generar un dipolo de corriente theta de forma independiente, es importante determinar si el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo modifica la coordinación de los dipolos de la actividad theta en los circuitos del sistema.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el hipocampo es una estructura fundamental para la memoria de tipo declarativa, y a que su actividad oscilatoria es el resultado de la interacción de los circuitos que lo constituyen, el análisis de las características de las oscilaciones theta de los diferentes componentes del circuito ayudará a conocer cuáles son los mecanismos neurales que subyacen al aprendizaje y a la memoria.

HIPÓTESIS:

El aprendizaje espacial dependiente del hipocampo modifica la frecuencia y la coordinación de los dipolos de la actividad theta en los circuitos del sistema.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación que guardan las oscilaciones theta de los circuitos intrahipocampales en condiciones basales y durante el aprendizaje de una tarea de memoria espacial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la relación que existe entre la actividad oscilatoria theta de los estratos hipocampales en condiciones basales por medio de los análisis de potencia, frecuencia pico y coherencia.

- Evaluar la relación que existe entre la actividad oscilatoria theta de los estratos hipocampales durante el aprendizaje espacial por medio de los análisis de potencia, frecuencia pico y coherencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron seis ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 400 a 500g de peso de 4-5 meses de edad. Todos los experimentos fueron conducidos de acuerdo con la “Norma Oficial Mexicana para el uso de animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y con la norma internacional “National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 80-23). El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones estándar de bioterio, que incluyen ciclo de luz-obscuridad de 12 h/12 h, temperatura controlada de 22 ± 1 °C, agua y comida disponible ad libitum. Todos los experimentos fueron efectuados durante el periodo de luz en grupos de tres animales iniciando a las 10:00 am. El orden en que los animales iniciaron las pruebas fue contrabalanceado de tal manera que cada animal inició el entrenamiento entre las 10:00 y 11:00 am.

Construcción del arreglo de multielectrodos

Para registrar las oscilaciones theta de los estratos del hipocampo se construyó un arreglo de multielectrodos que consistió de ocho alambres de nicromo de 25 μm de diámetro insertados dentro de una cánula guía. Los electrodos fueron alineados y espaciados 180 μm entre cada punta de registro con el objetivo de alcanzar cinco estratos del hipocampo; piramidal de CA1 (spCA1), radiado (sr), lacunoso-molecular (sml), molecular del GD (sm), y piramidal de CA3 (spCA3) (Figura 9B). Los electrodos fueron acoplados a una micro-tableta de interface de electrodos (Triangle Biosystems International: Electrode Interface Boards, EIB).

Con el objetivo de ajustar la posición del arreglo de electrodos en sitios de registro óptimos, en el laboratorio se construyeron micro manipuladores previamente descritos por el grupo de Buzsáki (Vandecasteele et al., 2012), los cuales fueron utilizados para ajustar la posición de registro en cuatro ratas. Los micro manipuladores fueron construidos con dos soportes y un tornillo central que permitía descender el arreglo de multielectrodos 150 micras en cada giro de 360°.

Procedimiento quirúrgico para el implante de los arreglos de multielectrodos

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (60 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y colocadas en un aparato estereotáxico (AnyAngle, Stoelting). Posteriormente, el cuero cabelludo fue desinfectado con una solución de yodo, se inyectó anestésico local (Lidocaína, 0.5 ml of 20 mg/ml) antes de la incisión quirúrgica. La piel fue cuidadosamente retraída del cráneo y sobre la superficie del cráneo del hipocampo derecho (HPC; 3.8 mm posterior, y 3.5 mm lateral respecto a bregma) se realizó una craneotomía (1.8 mm en diámetro, Trepine bone drill bits, BASi) para el implante del arreglo de multielectrodos.

De las seis ratas utilizadas en este trabajo, a dos se les implanto el arreglo de multielectrodos con posición de profundidad fija, mientras que a las cuatro restantes se les implanto el arreglo de multielectrodos móvil junto con el micro manipulador para ajustar la posición de profundidad antes de iniciar las pruebas. Para las ratas con implante en posición fija, el arreglo de multielectrodos descendió lentamente 3.0 mm debajo de la superficie del cerebro para ser fijado con cemento dental a la superficie del cráneo. Mientras que, para las cuatro ratas restantes, el arreglo de multielectrodos descendió a una profundidad de 1.8 mm debajo de la superficie de cerebro y se sujetó al micro manipulador con cemento dental, posteriormente el micro manipulador fue sujetado al cráneo con cemento dental.

Adicionalmente, se insertaron dos tornillos sobre el cráneo a la altura del cerebelo para ser utilizados como tierra y referencia. Para proteger el arreglo de multielectrodos se colocó una base de plástico que cubrió el implante. Después de la cirugía, las ratas fueron trasladadas al cuarto de recuperación donde se mantuvieron bajo condiciones de cuidado estándar por 14 días. Transcurrido el tiempo de recuperación, las ratas fueron entrenadas en el laberinto acuático de Morris en forma simultánea al registro del EEG.

Procedimiento de registro

Las ratas con el arreglo de multielectrodo móvil se conectaron a un preamplificador (headstage, Triangle BioSystems) de 16 canales, la señal fue preamplificada 100X, mientras que las ratas con arreglo fijo fueron conectadas a un preamplificador (headstage, Neurotek-IT) de ocho canales, la señal fue preamplificada 1X. Para evitar un cortocircuito por posible contacto con el agua durante la prueba conductual en el laberinto acuático, el preamplificador y los conectores fueron protegidos con un pequeño tubo de plástico que se sujetó a la base de cemento dental del conector del animal.

La señal de EEG fue enviada por medio de un conmutador motorizado de 32 canales (Neurotek-IT), a un amplificador Grass modelo 15A54 donde fue amplificada 50X en ratas cuya señal fue preamplificada 100X, mientras que la señal fue amplificada 1000X en ratas cuya señal fue preamplificada 1X.

La señal fue procesada con un filtro pasa banda de 1-6000 Hz, un filtro Notch de 60 Hz también fue aplicado, posteriormente, la señal fue digitalizada con el sistema de adquisición de datos DataWave Technologies. Para la obtención del EEG la señal fue sub-muestreada a 1.2 KHz. La conducta de movimiento del animal fue detectada por medio de un pequeño diodo que emitía luz acoplado al preamplificador a una frecuencia de muestreo de 30 Hz. La conducta fue evaluada con el software VideoBench de DataWave.

Ajuste de la posición del arreglo de multielectrodos

Para las cuatro ratas implantadas con un arreglo de electrodos movable, una semana después de la cirugía, el arreglo de electrodos se ajustó descendiendo en pasos de 50 μm , hasta que fue alcanzada la posición dentro de los estratos deseados. La posición de los electrodos en cada estrato fue estimada usando parámetros electrofisiológicos (Bragin et al., 1995; Montgomery y Buzsáki, 2007; Montgomery et al., 2009) con patrones de actividad característicos de cada estrato; por ejemplo, los eventos de onda rápida (100-250 Hz) presentes en el spCA1, las ondas afiladas del sr, inversión de fase theta en sm y slm, prominente actividad gama en sm y spCA3, y la actividad multiunitaria en los estratos piramidales de CA1 y CA3 (Figura 9C y D).

Al finalizar los experimentos las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg) para perfusión intracardiaca con solución de formaldehído al 4%. El cerebro fue removido del cráneo y procesado a través de la tinción de violeta de cresilo para la verificación histológica de la posición de los electrodos (Figura 9A).

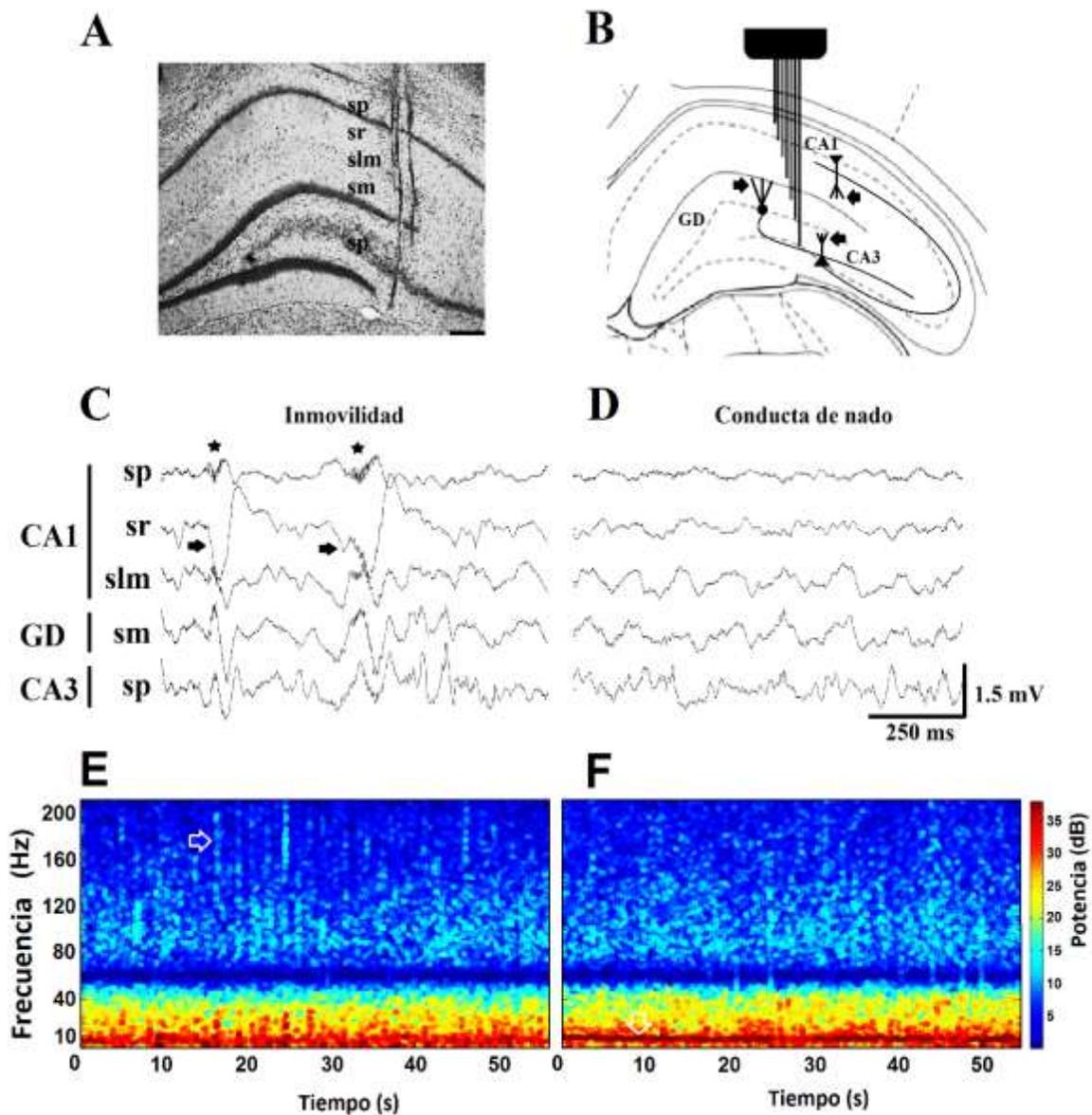


Figura 9. Posición de los electrodos y perfil de la actividad oscilatoria de los estratos hipocámpales. (A) La fotomicrografía muestra los trazos correspondientes a algunos electrodos del arreglo multielectrodo de ocho sitios de registro, esquematizado en la figura (B), la organización de las conexiones internas y externas son representadas por las líneas y flechas negras respectivamente. (C) y (D) muestran el perfil de la actividad oscilatoria específica del estrato; se observan los eventos de ondas afiladas/rápidas durante inmovilidad y actividad theta durante el nado. Las ondas rápidas son representadas por estrellas y las ondas afiladas por flechas. (E) y (F) espectrograma de la actividad del estrato piramidal durante episodios de inmovilidad y de nado. Estrato piramidal (sp), estrato radiado (sr), estrato lacunoso-molecular (slm), estrato molecular (sm).

Evaluación conductual y registro de EEG

Las pruebas conductuales se realizaron en un cuarto que contenía señales visuales externas al laberinto acuático de Morris: una tina de 1.5 m de diámetro, 0.5 m de altura, con agua teñida con violeta de genciana hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, mantenida a temperatura constante (23-24 °C), con una plataforma circular de 9 cm de diámetro sumergida 2 cm debajo de la superficie del agua, ubicada permanentemente en un sitio específico del laberinto. La prueba en el laberinto acuático se llevó a cabo en cuatro días, con seis ensayos cada día. En cada ensayo, la rata fue colocada y liberada aleatoriamente en diferentes sitios frente a la pared de la tina en cualquiera de 4 cuadrantes imaginarios (con referencia a los puntos cardinales) a partir de los cuales la rata nadaba buscando la plataforma durante un tiempo máximo de 60 segundos, si en este lapso no encontraba la plataforma, la rata era conducida hacia la plataforma y ubicada sobre esta durante 15 segundos para posteriormente ser trasladada a la caja de mantenimiento donde permanecía por 2 minutos (periodo inter-ensayo) hasta el siguiente ensayo. Los parámetros conductuales de aprendizaje como la distancia recorrida y tiempo para llegar a la plataforma en cada día, así como la velocidad de nado fueron calculados a través del software Video- Bench, DataWave.

Con el objetivo de concentrar diferentes fases de ejecución de la tarea, desde la adquisición temprana hasta la ejecución exitosa a los diferentes días de entrenamiento, se estableció el protocolo de entrenamiento de seis ensayos diarios en cuatro días. Además, para descartar cambios inespecíficos en frecuencia y coherencia a través de los días de entrenamiento, la actividad theta fue registrada en dos condiciones; basal y aprendizaje espacial. La condición basal correspondió a la actividad theta registrada cuando el animal se encontraba caminando en la caja de mantenimiento antes de iniciar las pruebas conductuales, mientras la condición de aprendizaje espacial correspondió a la actividad theta presente durante la ejecución de la tarea espacial en la conducta de nado en busca de la plataforma.

Adicionalmente, es conocido que cambios drásticos en la temperatura central de las ratas modifica la frecuencia theta, para determinar si el protocolo de entrenamiento modifica la temperatura central, un grupo de cinco animales fue colocado en el laberinto acuático y se mantuvo nadando el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de temperatura que el grupo de registro de EEG. Se midió la temperatura rectal de los cinco animales después de cada ensayo de nado.

Análisis de datos

Los datos de EEG fueron importados a MATLAB (Mathworks, Inc.) para su análisis, la eliminación de artefactos se realizó a través del software EEGLAB (Delorme y Makeig, 2004). El EEG fue analizado con scripts adaptados de Ken's MATLAB library, los cuales fueron escritos por Ken Harris y disponibles en <http://osiris.rutgers.edu/Buzsaki/software>. La potencia del EEG fue estimada a través del análisis de densidad de potencia espectral usando el método de peridiograma de Welch's. La coherencia fue analizada usando la función 'cohere' (Signal Processing Toolbox) de matlab. La coherencia fue procesada como la magnitud cuadrada de la coherencia $C_{xy}(f)$ a través de Welch's promediado, usando el método de peridiograma modificado como es mostrado en la siguiente fórmula:

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{P_{xx}(f)P_{yy}(f)}$$

Donde $P_{xx}(f)$ y $P_{yy}(f)$ son la densidad de potencia espectral de cada señal individual $x(t)$, $y(t)$, y $P_{xy}(f)$ es su densidad de potencia espectral cruzada. Debido a que la coherencia es una medida que refleja la asociación lineal entre dos señales, puede ser considerada como una medida que provee información acerca de la interacción funcional entre regiones cerebrales (Sabolek et al., 2009).

El análisis espectral fue realizado en ventanas de dos segundos para asegurar una resolución de 0.5 Hz de la banda theta (4-12). La frecuencia pico de cada ensayo

correspondió a la frecuencia que expresaba la potencia máxima entre los 19 valores (bines de 0.5 Hz) en que está dividida la banda theta 4-12 Hz. Posteriormente, para calcular la frecuencia pico por día, se promedió la frecuencia pico de los seis ensayos diarios. La potencia y coherencia de la actividad theta de cada día fueron obtenidos del promedio de los valores de los seis ensayos diarios. La potencia absoluta de la actividad theta calculada en bins de 0.5 Hz, esta fue convertida en valores relativos con respecto al valor de potencia total de la banda theta (4-12 Hz) con el objetivo de normalizar los datos y determinar la contribución de cada 0.5 Hz a la banda theta. Se realizaron las comparaciones de potencia relativa para cada estrato, las variables dependientes fueron las frecuencias en bins de 0.5 Hz y los días de entrenamiento, las variables independientes fueron los valores de potencia y coherencia. Para evaluar cambios en potencia y coherencia a través de los días de entrenamiento, se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas y prueba Tukey. Las pruebas de normalidad D'Agostino y Pearson ómnibus también fueron realizadas.

RESULTADOS

Conducta en el laberinto acuático de Morris

El aprendizaje en la prueba de navegación espacial del laberinto acuático de Morris fue valorado mediante la reducción en la distancia de nado a través de los días de entrenamiento. El ANOVA de medidas repetidas de una vía (factor día de entrenamiento [4], con Tukey como prueba pareada) mostró significancia ($F_{3,19}=13.67$, $p=0.0004$), ya que los animales redujeron la distancia desde el día dos comparado con el día uno ($p<0.05$) (Figura 10A).

La velocidad de nado no mostró cambios (ANOVA de medidas repetidas de una vía) en el transcurso de los cuatro días de entrenamiento ($F_{3,19}=0.8751$, $p=0.4811$) (Figura 10B), ni a través de los seis ensayos de entrenamiento del día uno ($F_{5,29}=0.4328$, $p=0.8203$) (Figura 10C). El análisis estadístico de la distancia y velocidad fue calculado en los mismos cinco animales en los que se realizó el análisis de potencia.

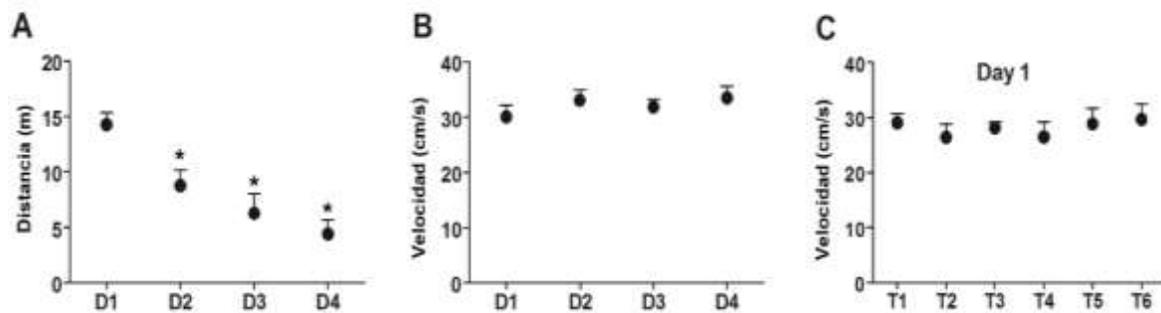


Figura 10. El aprendizaje espacial es evaluado a través de una reducción en la distancia recorrida a través de los días de entrenamiento (A) (media \pm EE). La velocidad de nado permaneció estable a través de los días de entrenamiento (media \pm EE) (B), y a través de los ensayos del día uno (media \pm EE) (C). D = Día, T = tiempo de ensayo. * $p<0.05$.

Incremento progresivo de la frecuencia pico durante el aprendizaje espacial

Partiendo de la idea de que las oscilaciones theta pueden ser la vía a través de la cual las redes intrahipocampales organizan la información (el contenido cognoscitivo) que es procesada en las diferentes fases del aprendizaje espacial (codificación, consolidación y recuperación), sus variaciones en frecuencia, y/o acoplamiento entre los osciladores de los circuitos intrahipocampales pueden sustentar el aprendizaje espacial subyacente.

Para evaluar esta hipótesis, se analizaron y compararon las oscilaciones theta expresadas en dos condiciones; las oscilaciones theta evocadas durante la actividad motora que involucra el procesamiento cognoscitivo de información relevante conductualmente (condición de aprendizaje espacial), obtenidas durante la ejecución de la tarea de laberinto acuático de Morris, y las oscilaciones theta registradas durante la actividad motora que no requiere esfuerzo cognoscitivo (condición basal), como es el caso para los episodios en los que la rata camina de forma espontánea dentro de su caja de mantenimiento antes de iniciar la prueba del laberinto acuático de Morris en los cuatro días de entrenamiento.

En la figura 11A, se muestran los trazos representativos del EEG del estrato radiado de un animal durante las condiciones basal y aprendizaje espacial. Los análisis de potencia fueron realizados en cinco ratas, excepto para spCA1, donde se analizó la señal de cuatro ratas. En la figura 11B, se muestran el espectrograma representativo de la señal del spCA1 de un animal durante las condiciones basal y durante el nado en la condición de aprendizaje espacial. Visualmente se puede apreciar que la potencia de la banda theta presenta frecuencias más bajas en el primer día de entrenamiento.

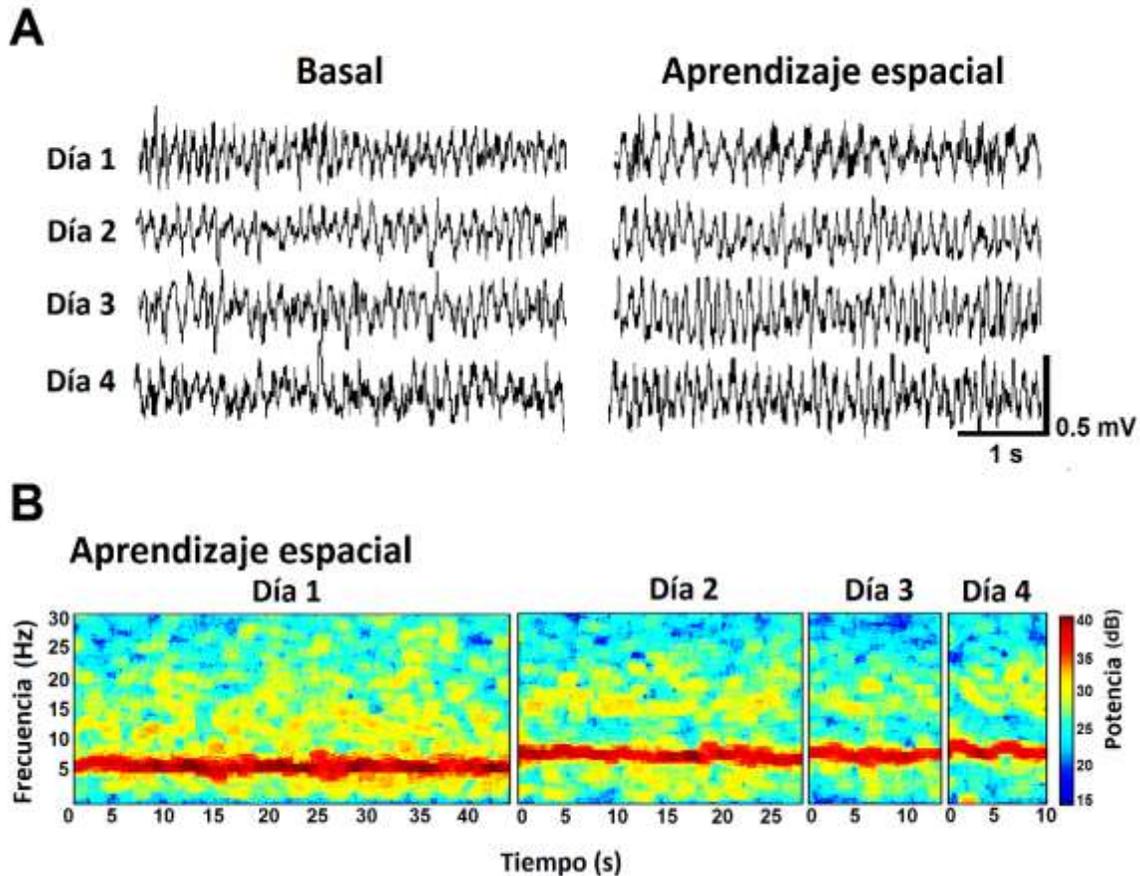


Figura 11. (A) Trazos representativos de la actividad oscilatoria en el estrato radiado de un animal durante la actividad theta basal (caminando en su caja de mantenimiento) y de aprendizaje espacial (nadando durante la tarea) a través de los cuatro días de entrenamiento. (B) espectrograma representativo de un animal durante la ejecución de la tarea espacial en el laberinto acuático de Morris.

Para determinar la frecuencia pico, en la condición de aprendizaje espacial, la frecuencia pico de cada día fue calculada como el promedio de la frecuencia pico de los seis ensayos de cada día, mientras que para la condición basal se calculó de un periodo de 90 segundos extraído de los momentos en los que el animal se encontraba caminando. El análisis de la potencia pico se realizó por medio un ANOVA de medidas repetidas de dos vías, con los factores; días de entrenamiento (uno al cuatro) y condición (basal y aprendizaje espacial). La interacción para los dos factores fue significativa en todos los estratos spCA1 ($F_{3,18}=7.997$, $p=0.0013$),

sr ($F_{3,24}=7.528$, $p=0.001$), slm ($F_{3,24}=18.96$, $p=0.0001$), sm ($F_{3,24}=13.59$, $p=0.0001$) y spCA3 ($F_{3,24}=6.162$, $p=0.002$) (Figura 12). El análisis *post hoc* reveló cambios en la condición de aprendizaje espacial a través de los días de entrenamiento, incrementando la frecuencia pico a través de los días respecto al día uno en spCA1 ($p<0.05$), sr ($p<0.05$), sml ($p<0.05$), sm ($p<0.05$), y spCA3 ($p<0.05$) (Figura 12). Sin embargo, la frecuencia pico de la condición basal no cambio en spCA1, sr, sm y spCA3, solo una reducción en la frecuencia pico fue encontrada en el día cuatro respecto al día dos en el slm ($p<0.05$) (Figura 12). Estos resultados muestran que las oscilaciones theta expresadas durante el aprendizaje espacial son diferentes de las oscilaciones theta evocadas por la actividad locomotora de la condición basal. Resaltando la relación entre frecuencia pico y fases de aprendizaje, una frecuencia theta lenta (6.5 Hz) predominó durante la fase de adquisición temprana de aprendizaje (principalmente en el día uno), mientras que una frecuencia rápida (8 Hz) estuvo presente en la fase tardía del aprendizaje (predominantemente en el último día de aprendizaje).

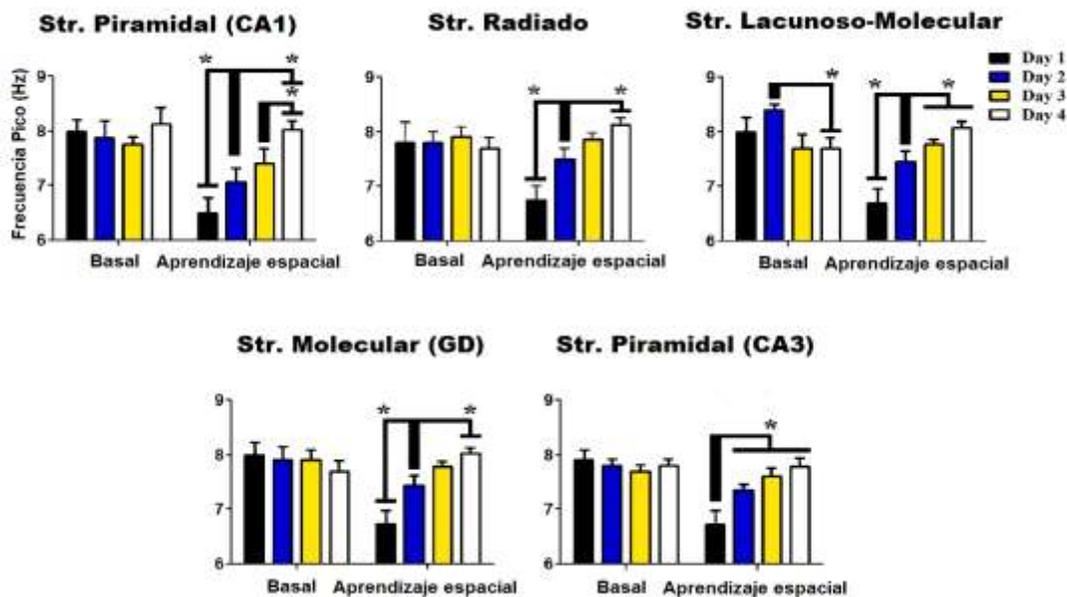


Figura 12. Incremento progresivo de la frecuencia pico en los cinco estratos del hipocampo a través de los días de entrenamiento en la condición de aprendizaje espacial. Media \pm EE.

La velocidad de nado y la frecuencia pico no se correlacionan durante el aprendizaje espacial

Para determinar si existe una relación entre la frecuencia pico y la velocidad de nado que pueda explicar los cambios en frecuencia, se realizó una correlación de Pearson entre la frecuencia pico y la velocidad de nado de la señal obtenida del estrato radiado; el análisis no mostró correlación significativa entre ambas variables durante el entrenamiento en el laberinto de Morris (Figura 13). Adicionalmente, la relación entre la distancia y la frecuencia pico fue evaluada con la correlación de Pearson, donde los resultados mostraron una correlación negativa ($r = -0.494$, $p = 0.006$) en el día uno, mientras que no existió un efecto significativo en los días restantes (Figura 13).

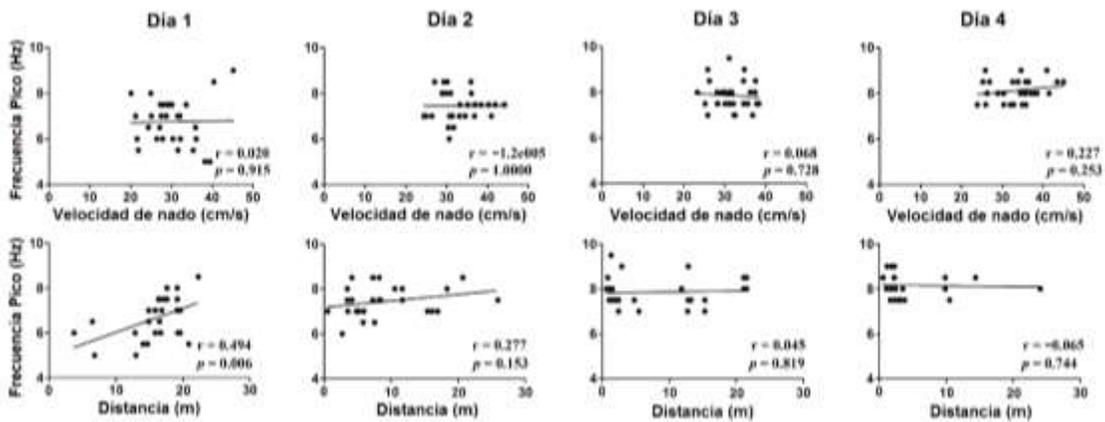
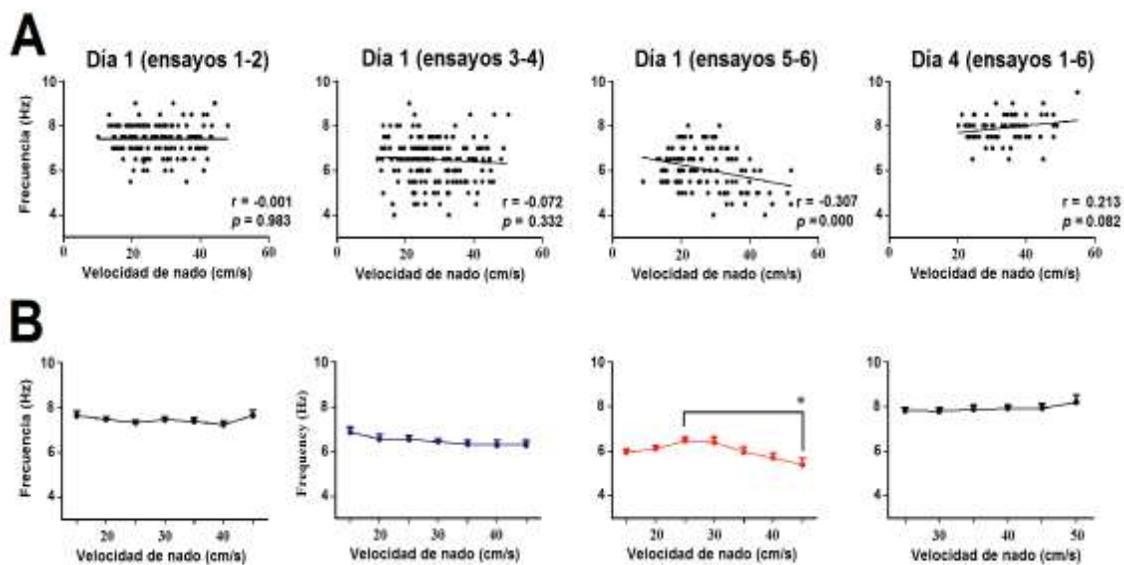


Figura 13. Correlación de Pearson entre la frecuencia pico y velocidad de nado (panel superior) o distancia recorrida (panel inferior) en cada día de entrenamiento en el laberinto acústico de Morris.

Por otra parte, cuando se analiza la relación entre frecuencia y velocidad promediando la velocidad en cada ensayo, la relación puede enmascarse, por tal motivo, adicionalmente se calculó la correlación entre la frecuencia y la velocidad en segmentos de dos segundos. Se realizó el análisis en bloques de dos ensayos en el día uno, y de un bloque de seis ensayos en el día cuatro (Figura 14A, B). Una correlación negativa ($r = -0.3076$, $p = 0.0007$) fue establecida en los ensayos 5 y 6 del día 1 (Figura 14A). Indicando que las frecuencias lentas estuvieron presentes

durante episodios de nado de alta velocidad. Estos resultados fueron corroborados cuando se agruparon los segmentos de dos segundos de señal en diferentes intensidades de velocidad de nado de 15 a 45 cm/s, en bins de 5cm/s (ANOVA de medidas repetidas, factor velocidad de nado y prueba Tukey). No se encontraron cambios en la frecuencia asociados con la velocidad de nado en los bloques de ensayos 1-2, 3-4 del día uno, ni el bloque con los 6 ensayos del día cuatro (Figura 14B). Solo en el tercer bloque (ensayos 5-6) del día uno ($F_{6,117}=2.714$, $p=0.0169$) se encontró alta frecuencia en la velocidad de 25 cm/s con respecto a la velocidad de 45 cm/s ($p<0.05$) (Figura 14B), lo cual confirma los resultados previos donde se demuestra que en alta velocidad de nado se pueden expresar frecuencias lentas, perdiéndose así la relación positiva previamente reportada en condiciones basales entre velocidad y frecuencia. Adicionalmente, se observó una disminución progresiva en la frecuencia a través de los bloques de ensayos de entrenamiento (incluyendo las diferentes intensidades de velocidad nado) en el día uno (Figura 14B). Por lo tanto, cambios en la frecuencia theta durante el aprendizaje espacial no pueden ser explicados por variaciones en la velocidad de nado.



14. (A) Correlación de Pearson entre frecuencia pico y velocidad de nado en segmentos de dos segundos, agrupados en bloques de dos ensayos (1-2, 3-4 y 5-6) en el día uno y en un bloque de seis ensayos en el día cuatro (ensayos 1-6). (B) Frecuencia theta a diferentes intervalos de velocidad. Media \pm EE.

Previamente se ha reportado que cambios prominentes en la temperatura central del animal producen disminución en la frecuencia theta, por lo cual, para descartar importantes modificaciones en la temperatura central asociadas a nuestro protocolo de entrenamiento, se midió la temperatura central a un grupo adicional de animales que permanecieron en el laberinto acuático el mismo tiempo y a la misma temperatura del agua que las del grupo de registro de EEG. Los resultados mostraron solo una leve pérdida de temperatura (ANOVA de medidas repetidas, prueba Tukey) a través de los días de entrenamiento ($F_{3,19}=3.556$, $p=0.0001$).

Los días uno y dos mostraron una reducción de 0.9 y 0.5 °C, respectivamente en comparación con su temperatura inicial (37.8 °C) ($p<0.05$) (Figura 15). Por lo tanto, los cambios en la temperatura central no fueron suficientemente para afectar la frecuencia theta durante el nado en el laberinto de Morris, ya que se ha observado una leve disminución en la frecuencia cuando la temperatura central se encuentra por debajo de los 35 °C (Whishaw y Vanderwolf, 1971). Mientras que, en el presente experimento, la temperatura observada en el día uno de nado fue de 36.9 °C.

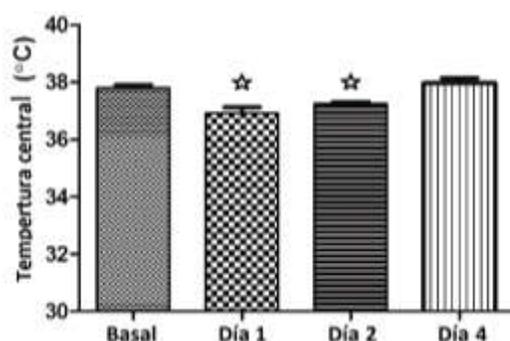


Figura 14. Temperatura rectal de un grupo de cinco animales que permanecieron nadando el mismo tiempo, bajo la misma temperatura, que los animales de registro de EEG. Media \pm EE. (* $p < 0.05$).

El aprendizaje espacial modifica la potencia relativa (RP) de las frecuencias theta

La banda theta ha sido descrita en un amplio rango de frecuencias (4-12 Hz), sin embargo, se han propuesto dos distintos tipos de ritmo theta. El ritmo theta tipo 1 es usualmente compuesto de frecuencias rápidas (6-10 Hz), resistente a atropina (antagonista muscarínico) y aparece durante movimientos voluntarios y sueño MOR. El ritmo theta tipo 2 es sensitivo a atropina y frecuentemente caracterizado por oscilaciones lentas (5-8 Hz), aparece durante periodos de inmovilidad en estado atento, y durante la estimulación sensorial en ratas anestesiadas con uretano (Kramis et al., 1975; Robinson, 1980).

Por lo cual, con el objetivo de determinar si algunas frecuencias específicas (rápidas o lentas) predominan durante el proceso de aprendizaje, los valores de la banda theta fueron transformados a valores relativos en bins de 0.5 Hz. Para determinar cambios en PR de las frecuencias theta (4-12 Hz) a través de los días, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías (día [4] x frecuencia [19]) en cada estrato y condición (basal y aprendizaje espacial).

La condición basal mostró significancia para la interacción de los dos factores solo en dos estratos, sm ($F_{48,204} = 1.794$, $p = 0.0028$) y spCA3 ($F_{48,204} = .761$, $p = 0.0037$) (Figura 16). El análisis post hoc reveló que en sm, la PR para las frecuencias de 7.5, 8, y 8-8.5 Hz fue más baja en los días dos, tres y cuatro respectivamente en comparación con el día uno ($p < 0.05$), mientras que en el spCA3 la PR de 7.5 a 8 Hz disminuyó en el día cuatro con respecto al día uno ($p < 0.05$) (Figura 16). Sin embargo, no hubo cambio en las frecuencias que mostraban la máxima PR, por lo que la mayor PR se mantuvo en las mismas frecuencias a través de los días de entrenamiento.

El análisis de las oscilaciones theta durante el aprendizaje espacial mostró cambios en la PR de diferentes frecuencias a través de los días de entrenamiento en todos

los estratos analizados (ANOVA de medidas repetidas de dos vías, día x frecuencia): spCA1 ($F_{48,153} = 3.221, p < 0.0001$), sr ($F_{48,204} = 4.909, p < 0.0001$), slm ($F_{48,204} = 5.560, p < 0.0001$), sm ($F_{48,204} = 5.470, p < 0.0001$), y spCA3 ($F_{48,204} = 3.466, p < 0.0001$) (Figura 16).

El análisis post hoc demostró una distribución diferencial de la PR de las frecuencias theta a través de los días de entrenamiento (del día uno al día cuatro) que se caracterizó por un incremento en la PR de las frecuencias lentas (5.5–6.5 Hz) en los estratos: spCA1, sr, sm y slm y de 5.5 Hz en el spCA3 en el día uno con respecto al día cuatro ($p < 0.05$). Mientras que en día cuatro las frecuencias rápidas expresaron mayor PR; 7.5–8.5 Hz en spCA1, 8–9 Hz en sr, slm y sm, y 8.5–9 en spCA3, en comparación con el día uno ($p < 0.05$) (Figura 16).

Por lo tanto, en el día uno (adquisición inicial de la tarea), se estableció un predominio en la PR de las frecuencias lentas, sin embargo, este patrón fue cambiando a través de los días de entrenamiento de forma progresiva. En este sentido, la PR de las frecuencias lentas fue disminuyendo mientras que la PR de las frecuencias rápidas fue incrementando gradualmente en los días dos a cuatro. Los cambios más notorios ocurrieron en los estratos dendríticos (sr, slm, sm), mientras que las oscilaciones theta del spCA3 también mostraron cambios en PR a través de los días, solo que fueron menos pronunciados, lo cual puede ser observado en la distribución de la PR de las diferentes frecuencias de la banda theta (Figura 16).

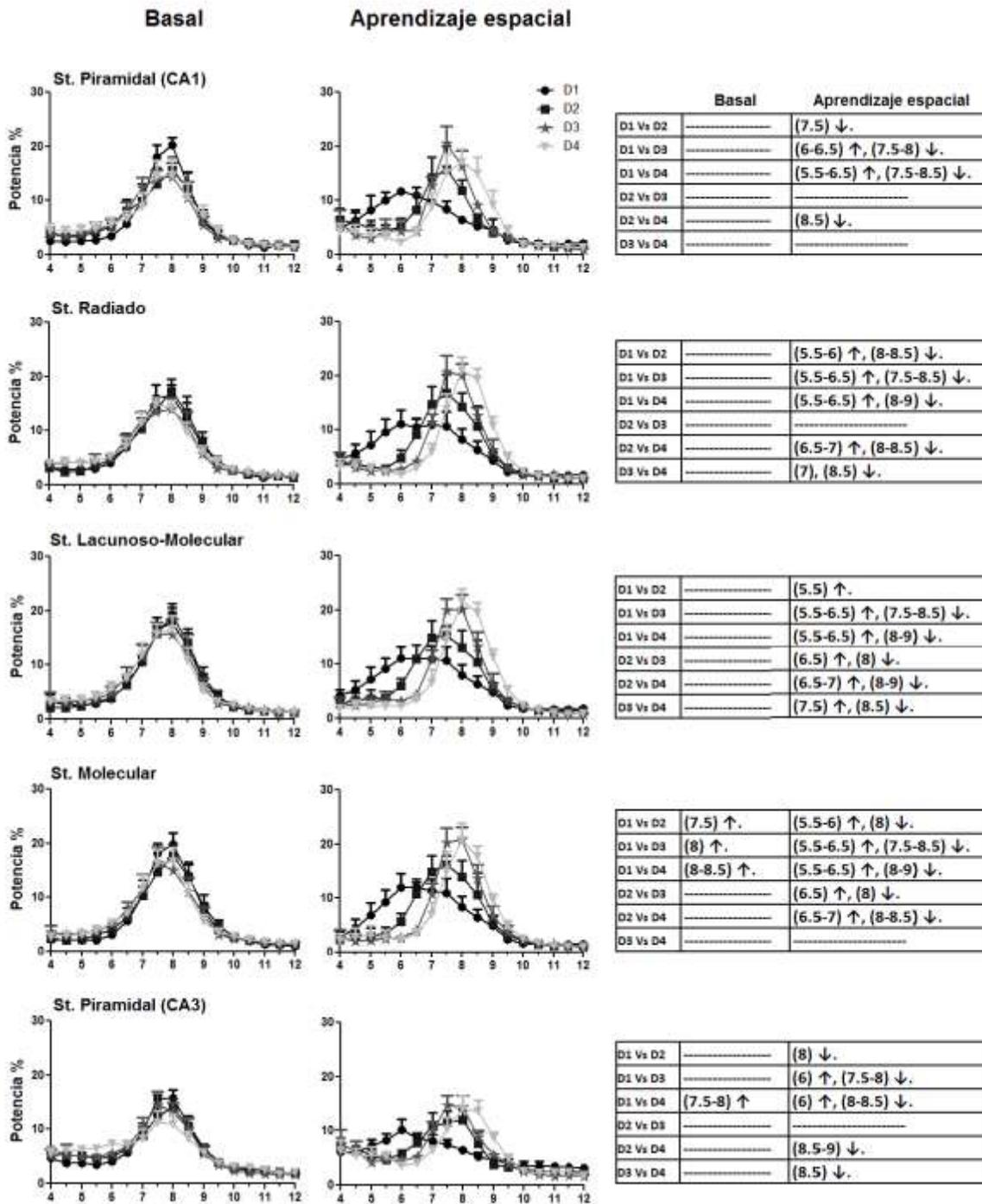


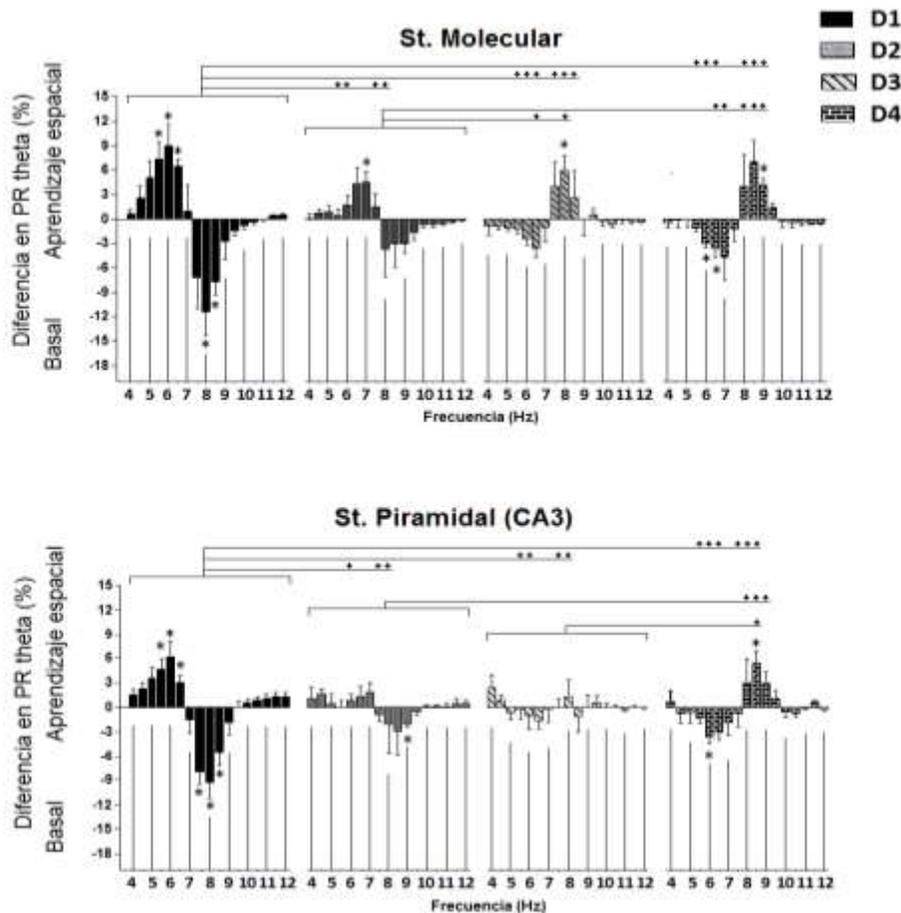
Figura 16. Distribución de la PR de las frecuencias de la banda theta registradas en los circuitos intrahipocampales en las condiciones basal y aprendizaje espacial en los cuatro días de entrenamiento. D = Día. Media ± EE. (↓reducción y ↑incremento = $p < 0.05$).

Distribución diferencial de PR en la relación basal-aprendizaje espacial a través de los días de aprendizaje

Con la intención de resaltar la actividad theta relacionada con el procesamiento cognoscitivo, se analizó la diferencia en PR (en cada rata) que resulta de substrair en cada día la actividad theta basal a la actividad theta registrada durante la ejecución de la tarea de aprendizaje espacial (Figuras 17 y 18). Las frecuencias theta con valores positivos corresponden a la predominancia en PR durante el aprendizaje espacial sobre la condición basal; los valores negativos en cambio indican la predominancia en PR de la condición basal sobre el aprendizaje espacial; mientras que los valores cercanos a cero indican la ausencia de predominancia de alguna condición. El día uno de entrenamiento fue caracterizado por la predominancia de frecuencias lentas a la par con una reducción de frecuencias rápidas en la condición de aprendizaje espacial (Figuras 17 y 18). En el día cuatro, la PR de las frecuencias lentas se redujo, mientras que las frecuencias rápidas incrementaron su PR con respecto a la condición basal (análisis de intervalo de confianza de cero) (Figuras 17 y 18). Estos resultados sugieren que las frecuencias lentas y rápidas cambian su PR a través de los días de entrenamiento en el laberinto de Morris. En resumen, dos patrones de oscilaciones theta pueden ser observados en todos los estratos, un patrón theta lento que predomina en la fase temprana de adquisición de la tarea y un patrón theta rápido presente en la fase tardía del aprendizaje, durante el recuerdo de la información previamente aprendida.

Para comparar cambios en la distribución de frecuencia a través de los días de entrenamiento se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías (día [4], frecuencia [19]) en cada estrato. Se encontró significancia en la interacción de los dos factores en todos los estratos: spCA1 ($F_{48,153} = 4.7371$, $p < 0.0001$), sr ($F_{48,204} = 6.212$, $p < 0.0001$), slm ($F_{48,204} = 5.560$, $p < 0.0001$), sm ($F_{48,204} = 6.838$, $p < 0.0001$), y spCA3 ($F_{48,204} = 5.436$, $p < 0.0001$) (Figuras 17 y 18). El análisis post hoc reveló que la diferencia en la distribución de PR entre las condiciones basal y aprendizaje espacial cambio gradualmente durante los días

sucesivos de entrenamiento. La PR de las frecuencias rápidas incrementó progresivamente, mientras que la PR de las frecuencias lentas fue disminuyendo de tal forma que el patrón de PR se invirtió en el día cuatro en comparación con el día uno ($p < 0.05$) (Figuras 17 y 18). La frecuencia theta lenta predominó en todos los estratos cuando las ratas se encontraban adquiriendo información espacial para resolver la tarea (el día uno), por otra parte, las frecuencias rápidas predominaron en el día cuatro de entrenamiento, cuando el animal ya había aprendido la tarea de forma exitosa. En los días dos y tres de entrenamiento se observó una distribución intermedia en PR con respecto a los días uno y cuatro. Sin embargo, la distribución de PR mostró cambios específicos del estrato ya que las oscilaciones en los estratos piramidales (CA1 y CA3) no mostraron cambios en la distribución de PR entre los días dos y tres, en tanto que los estratos dendríticos (sr, slm, sm), la distribución en PR fue diferente en estos días ($p < 0.05$) (Figuras 17 y 18).



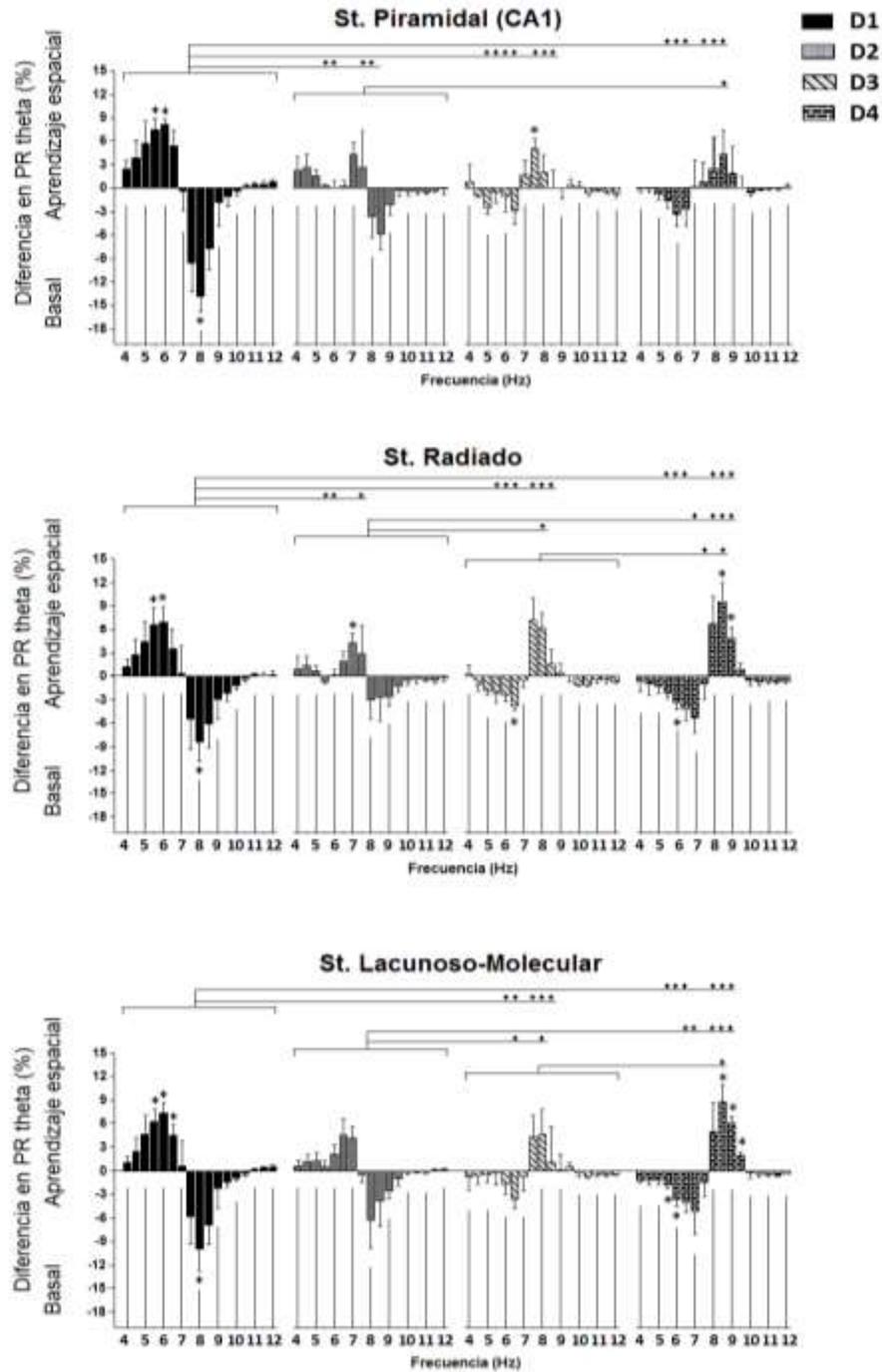


Figura 17. – Diferencia en PR entre aprendizaje espacial y basal a través de los días de entrenamiento en slm y spCA3. Los valores positivos representan el predominio en PR de las frecuencias presentes durante el aprendizaje espacial, mientras que los valores negativos indican el predominio en PR de frecuencias presentes en la condición basal, valores cercanos a cero representan ausencia de cambio en PR entre las dos condiciones. D = Día. Media \pm EE. (+p < 0.05), (*p < 0.05 de cero con análisis de intervalo de confianza).

Figura 18. – Diferencia en PR entre aprendizaje espacial y basal a través de los días de entrenamiento en spCA1, sr y slm. Los valores positivos representan el predominio en PR de las frecuencias presentes durante el aprendizaje espacial, mientras que los valores negativos indican el predominio en PR de frecuencias presentes en la condición basal, valores cercanos a cero representan ausencia de cambio en PR entre las dos condiciones. D = Día. Media \pm EE. ($+p < 0.05$), ($*p < 0.05$ de cero con análisis de intervalo de confianza)

Resultados coherencia

Se realizó un análisis de coherencia para determinar cómo están interactuando los circuitos internos del hipocampo durante el proceso de aprendizaje, el análisis fue conducido a través de los días de entrenamiento de forma independiente para las dos condiciones, basal y aprendizaje espacial. Se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (día [4] x frecuencia [19]) para cada comparación entre los estratos del hipocampo, los resultados mostraron significancia exclusivamente en la condición de aprendizaje espacial (Figura 19).

El acoplamiento entre spCA1 y sm cambió a través de los días de entrenamiento ($F_{42,180} = 2.087$, $p < 0.0005$), por otra parte, se observó un incremento en el acoplamiento entre spCA3 con respecto al resto de los estratos analizados: sr ($F_{42,225} = 2.748$, $p < 0.0001$), sml ($F_{42,225} = 1.497$, $p = 0.0341$), sm ($F_{42,225} = 1.845$, $p = 0.0025$), y spCA1 ($F_{42,180} = 1.624$, $p = 0.0160$). La coherencia entre sr con respecto al slm ($F_{42,225} = 2.704$, $p < 0.0001$) y sm ($F_{42,225} = 3.397$, $p < 0.0001$) también cambió a través de los días de entrenamiento de la tarea de aprendizaje espacial (Figura 19).

El análisis post hoc mostró que la coherencia en las frecuencias lentas de spCA–sm fue alta en el día uno con respecto a los días: dos (6 Hz), tres (6Hz) y cuatro (5.5-6 Hz), mientras que la coherencia de frecuencias altas se incrementó en los

días tres (8.5 Hz) y cuatro (8.5 Hz) en comparación con el día uno ($p < 0.05$) (Figura 19). El spCA3 incrementó su acoplamiento con todos los estratos en las frecuencias rápidas en los días tres y cuatro con respecto al día uno.

Específicamente, la comparación de coherencia entre spCA1-spCA3 mostró valores altos en los días tres (8–9 Hz) y cuatro (8.5–9.5 Hz) respecto al día uno. La coherencia entre spCA3-sr fue alta en los días tres (8.5–9.5 Hz) y cuatro (8–10 Hz) con respecto al día uno, mientras que la coherencia entre spCA3 con slm y sm también mostró un aumento similar en las frecuencias rápidas en los días tres (8–8.5 y 8–9 Hz) y cuatro (8–9 y 8.5 Hz) respecto al día uno ($p < 0.05$) (Figura 19).

El acoplamiento del sr con slm y sm también cambió durante el aprendizaje espacial, siendo la coherencia sr-slm alta para las frecuencias lentas en el día uno respecto al día cuatro y alta en las frecuencias rápidas en los días tres y cuatro en comparación al día uno ($p < 0.05$). La coherencia sr-sm también se incrementó en las frecuencias lentas en el día uno comparada con los días tres y cuatro, en tanto que un alto acoplamiento de las frecuencias rápidas fue establecido del día dos al cuatro respecto al día uno ($p < 0.05$) (Figura 19).

El alto acoplamiento entre estratos dendríticos en frecuencias lentas (5-7 Hz) establecido en el día uno, fortalece la noción de que la reducción en la frecuencia oscilatoria del ritmo theta puede jugar un papel importante en la adquisición de información espacial novedosa utilizada para navegar en un ambiente complejo.

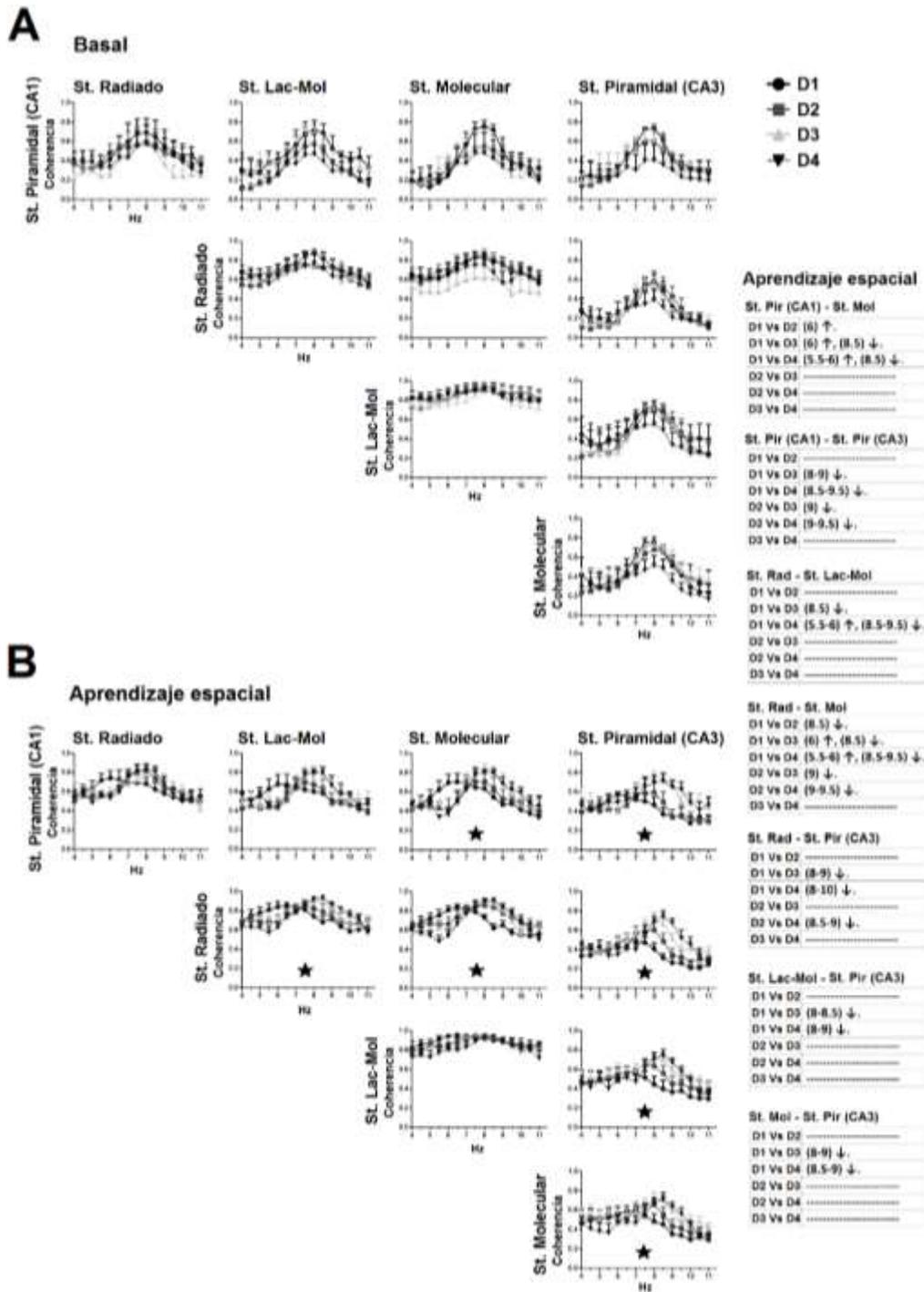


Figura 19. Valores de coherencia theta de las condiciones basal (A) y aprendizaje espacial (B) a través de los días de entrenamiento de la tarea. D = Día. Media \pm EE. (\downarrow reducción y \uparrow incremento = $p < 0.05$). El símbolo de Estrella representa significancia estadística del ANOVA de medidas repetidas de dos vías.

DISCUSIÓN

La actividad oscilatoria de los circuitos intrahipocampales cambia durante el aprendizaje de una tarea de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris; en este trabajo se sugiere que estos cambios a nivel de la actividad de la red pueden subyacer al aprendizaje espacial. Los resultados mostraron que la fase de adquisición temprana de la tarea se caracterizó por la presencia de un ritmo theta de frecuencia lenta de entre 5 a 8 Hz, y un alto acoplamiento entre circuitos internos específicos en frecuencias lentas. En tanto que el establecimiento del aprendizaje a través de los días de entrenamiento se caracterizó por una gradual predominancia de frecuencias rápidas (7.5 a 9.5 Hz) a la par con un incremento en el acoplamiento en frecuencias rápidas entre el estrato de CA3 con respecto al resto de los estratos del hipocampo (Figura 20).

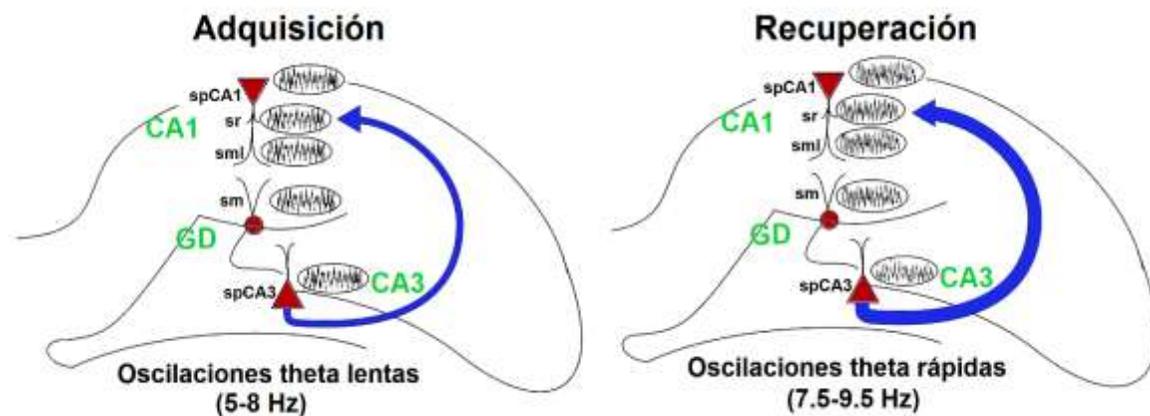


Figura 20. Representación esquemática de la actividad oscilatoria theta de los circuitos hipocampales durante diferentes fases de procesamiento de información, de adquisición a recuperación. La fase de recuperación es caracterizada por un incremento en el acoplamiento entre las áreas de CA3 y CA1.

Frecuencia theta lenta está asociada con la adquisición temprana de información espacial

La reducción en frecuencia encontrada en el día uno coincide con reportes previos en los cuales se observa una reducción en la frecuencia theta durante la exploración de un ambiente novedoso en una tarea estándar de forrajeo en campo abierto (Jeewajee et al., 2008; Wells et al., 2013) y cuando las ratas alternan en brazos novedosos de un laberinto (Penley et al., 2013). Sin embargo, de estos trabajos, Wells et al. (2013) tomó en cuenta la relación bien establecida entre velocidad de desplazamiento y frecuencia theta, y encontraron que la reducción en la frecuencia durante la novedad ambiental fue asociada con un aplanamiento de la pendiente frecuencia-velocidad, perdiéndose así tal relación. Este fenómeno fue interpretado como una subestimación de las métricas espaciales del ambiente novedoso (Wells et al., 2013). Sin embargo, la reducción en frecuencia encontrada en Wells et al. (2013) y Jeewajee et al. (2008) no fue más allá de los 8 Hz, mientras que, en el presente trabajo la reducción en frecuencia alcanzó los 6.5 Hz en el día uno. Tales diferencias pueden ser atribuidas a los diferentes procesos cognoscitivos involucrados en ambos paradigmas, ya que la exploración de un ambiente novedoso implica la codificación pasiva de la información espacial, mientras que la adquisición temprana de información espacial en el laberinto de Morris requiere de la codificación y del uso de nueva información espacial adquirida en el día uno con el objetivo de resolver la tarea.

Adicionalmente, para evaluar si los cambios en la frecuencia pueden ser explicados por modificaciones inespecíficas de la actividad theta a través de los días de entrenamiento, la actividad theta basal asociada al movimiento fue analizada y comparada con la actividad theta registrada durante el aprendizaje espacial. El análisis reveló que la actividad theta basal fue constante a través de los días de entrenamiento y que los cambios en la coherencia y la frecuencia solo fueron encontrados en la condición de aprendizaje espacial. Por otra parte, la relación positiva entre la velocidad de locomoción respecto a la frecuencia y potencia

(Vanderwolf, 1969; McFarland et al., 1975; Jeewajee et al., 2008; Hinman et al., 2011; Wells et al., 2013) ha sido utilizada en modelos computacionales para explicar la codificación de las métricas espaciales de los animales cuando transitan sobre un ambiente conocido (Burgess et al., 2007; Burgess, 2008). Sin embargo, en el presente trabajo, no encontramos una relación entre la velocidad de nado y la frecuencia theta, ya que, no hubo cambios en la velocidad de nado a través de los días de entrenamiento, mientras que la frecuencia y la coherencia theta cambiaron dinámicamente en las diferentes fases del aprendizaje. Nuestros resultados son acordes con observaciones previas en las que se ha encontrado que la relación entre frecuencia theta y la velocidad de desplazamiento es desacoplada o disminuida cuando el animal está codificando información conductualmente relevante (toma de decisiones, aprendizaje espacial, o novedad espacial), (Jeewajee et al., 2008; Montgomery et al., 2009; Schmidt et al., 2013; Wells et al., 2013; Belchior et al., 2014). En este sentido, la actividad de red en frecuencia theta de los circuitos hipocampales puede mostrar cambios relacionados a diversos procesos cognoscitivos en lugar de una relación exclusiva con la velocidad de movimiento.

Modificación de las oscilaciones theta durante el aprendizaje espacial

Las modificaciones en la frecuencia theta observadas en el presente trabajo son consistentes con reportes previos en los cuales el aprendizaje espacial (Olvera-Cortés et al., 2002, 2004; DeCoteau et al., 2007; Benchenane et al., 2010) y la toma de decisiones (Jones et al., 2005; Montgomery et al., 2009; Schmidt et al., 2013; Belchior et al., 2014) son caracterizadas por cambios en las oscilaciones theta o en su acoplamiento, sugiriendo un papel en los procesos cognitivos. Adicionalmente, manipulaciones farmacológicas, tales como una reducción en los niveles de serotonina hipocampal (Gutiérrez-Guzmán et al., 2011) o del septo medial (López-Vázquez et al., 2014) producen una facilitación del aprendizaje y un cambio temprano de frecuencias theta lentas a rápidas a través de los días de

entrenamiento. Por otra parte, se han observado alteraciones en las dinámicas de las oscilaciones theta (caracterizadas por la interferencia en el cambio de frecuencias lentas a rápidas) inducidas por la reducción de serotonina del núcleo supramamilar (Hernández-Pérez et al., 2015) o por su reducción combinada en los núcleos supramamilar e hipotalámico posterior (Gutiérrez-Guzmán et al., 2012) durante el aprendizaje espacial produce deficiencias en el desempeño de la tarea. Mientras que la inyección de clordiazepóxido en el núcleo supramamilar produce un modesto daño en el aprendizaje espacial y una reducción en la frecuencia theta (Pan y McNaughton, 1997).

Adicionalmente, se ha relacionado la ejecución diferencial del aprendizaje de lugar en el laberinto de Morris entre ratas jóvenes y viejas con distintos patrones de actividad theta, donde la mejor ejecución de las ratas jóvenes coincidió con un predominio de frecuencias theta rápidas (Olvera-Cortés et al., 2012). Por lo cual, modificaciones en la frecuencia theta pueden estar asociadas a diferentes aspectos del aprendizaje espacial. En este sentido, nosotros partimos de la noción que en el mismo estado conductual (quieto, caminando, nadando, corriendo) el patrón de red puede cambiar como consecuencia del procesamiento de información ejecutado momento a momento. La capacidad de los circuitos intrahipocampales para ejecutar diferentes operaciones computacionales tales como la codificación, la consolidación o la recuperación de información mnémica en la misma red puede requerir de la modificación dinámica de los patrones oscilatorios. Por lo cual, acorde a nuestros resultados, es posible sugerir que la reducción en la frecuencia theta puede propiciar un estado de actividad de la red favorable para la adquisición de información conductualmente relevante, mientras que la fase de recuperación de información previamente adquirida puede favorecerse por un cambio en la actividad de la red que implica, la restauración y/o el incremento en la frecuencia theta, junto con un incremento en el acoplamiento entre los circuitos intrahipocampales respecto a la actividad theta registrada durante movimiento en la condición basal.

En relación con este punto de vista, recientes datos experimentales y modelos computacionales sugieren que una reducción en la frecuencia theta puede ayudar a codificar información novedosa (Barry et al., 2012a, 2012b). El mecanismo propuesto sugiere que el alto tono colinérgico generado por la novedad ambiental puede disminuir la frecuencia de resonancia theta de las células de estrella de la corteza entorrinal (Heys et al., 2010), lo que resulta en propiedades alteradas de las células en malla (células con múltiples campos de disparo dentro de un ambiente formando un patrón periódico hexagonal), como un incremento en el tamaño del campo de respuesta, una regularidad de activación disminuida y en una reducción en la frecuencia intrínseca de disparos modulados por la actividad theta, tal como ocurre durante la novedad espacial (Barry et al., 2012a). La reducción en la frecuencia intrínseca es un factor que puede estar involucrado en la reducción en frecuencia de la actividad oscilatoria a nivel de la red (Barry et al., 2012b). Por lo tanto, es factible sugerir que la reducción en la frecuencia theta establecida durante el aprendizaje puede reflejar un estado propicio de la red para codificar, organizar y manejar información nueva que aún no ha sido consolidada.

Adicionalmente, otros factores no cognoscitivos asociados con la ejecución del laberinto acuático de Morris, tales como el estado de alerta, el estrés, y el contenido emocional (Vorhees y Williams, 2014), que acompaña el proceso de aprendizaje pueden influenciar la actividad theta (Sainsbury y Montoya, 1984; Sainsbury et al., 1987; Bland et al., 2006; Tendler y Wagner, 2015). Por ejemplo, se ha observado que estados de alerta negativos (Sainsbury y Montoya, 1984; Sainsbury et al., 1987) asociados con actividad theta sensitiva a atropina, evocan oscilaciones theta de baja frecuencia durante periodos de movimiento en la rata (Tendler y Wagner, 2015). Por lo cual, no se descarta la posibilidad que cambios en el tono neuromodulador relacionados a la expresión de aspectos no cognoscitivos que acompañan el aprendizaje espacial puedan ajustar la dinámica oscilatoria de la red para proveer un estado propicio para el procesamiento de información. En este sentido, la alta actividad colinérgica expresada en el día uno de entrenamiento en el laberinto de Morris (Hosseini-Sharifabad et al., 2011) (probablemente asociada con elevados

niveles de alerta y con la codificación de información novedosa) pueden contribuir a la actividad theta expresada en el día uno.

La adquisición y la recuperación de la información espacial son codificadas diferencialmente por las oscilaciones theta en los circuitos intrahipocampales

El aprendizaje espacial puede ser alcanzado a través de dos mecanismos interrelacionados conocidos como navegación a través de la vía integradora y navegación aloclétrica basada en mapas. La primera estrategia integra información lineal y angular del propio movimiento, permitiendo al animal regresar a su hogar usando rutas cortas (Mittelstaedt y Mittelstaedt, 1980), mientras que la segunda requiere de señales espaciales, así como de su relación para determinar la posición en un ambiente (O'Keefe y Nadel, 1978). Se ha encontrado que cuando las señales externas son escasas, la navegación espacial puede ser alcanzada por medio de la vía integradora. Sin embargo, si las señales del ambiente están disponibles, la navegación puede integrar señales externas para actualizar la posición (Etienne et al., 1985) y ambos sistemas trabajan juntos. Se ha propuesto que algunos aspectos de las dos estrategias de navegación son codificados en el hipocampo y la corteza entorrinal (McNaughton et al., 2006a; Barry y Burgess, 2014). En este sentido, Buzsáki y Moser (2013) han sugerido, de acuerdo con datos experimentales de patrones de disparo en relación con actividad theta y a las dinámicas oscilatorias de la red en frecuencia theta, que los mismos algoritmos en la corteza entorrinal e hipocampo pueden sustentar tanto la navegación espacial a través de la vía integradora como a la memoria episódica.

Para navegar exitosamente en el laberinto, los animales tienen que formar un mapa espacial interno con base en la relación de señales extra-laberinto (Vorhees y Williams, 2014), adicionalmente, la información del propio movimiento codificada en la corteza entorrinal e hipocampo durante las conductas espaciales (Etienne et al., 1985; Buzsáki y Moser, 2013; Barry y Burgess, 2014) puede ayudar continuamente a actualizar la posición durante el desplazamiento en el laberinto. Debido a la

complejidad de la tarea, el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris requiere de un proceso gradual de consolidación a través de los días de entrenamiento. Por lo cual, si relacionamos el proceso de consolidación con los cambios en la frecuencia, encontramos que el día uno está caracterizado por frecuencias lentas que van desapareciendo en los días posteriores a la par con el incremento gradual de frecuencias rápidas, lo cual puede ser interpretado como un cambio de las operaciones computacionales desde la fase de adquisición a la fase recuperación. En este sentido, la información requerida para resolver la tarea es gradualmente consolidada a través de los días, por lo que, en los últimos días de entrenamiento, las redes del hipocampo no requieren de oscilaciones lentas asociadas a la adquisición, en cambio, un estado de recuperación puede predominar, siendo las frecuencias rápidas un estado propicio para la recuperación y el manejo de información previamente consolidada. En otras palabras, las oscilaciones lentas pueden representar un estado favorable para la codificación de información, mientras que las frecuencias rápidas pueden sustentar la recuperación de información previamente consolidada en el sistema cortico-hipocampal.

Posibles implicaciones funcionales de los cambios en la frecuencia theta del hipocampo sobre el código neural.

¿Qué información es contenida en el ritmo theta?, ¿Cada ciclo theta puede codificar información espacial?, ¿Ciclos theta cortos o largos impactan operacionalmente en el hipocampo? Para contestar estas interrogantes, reciente evidencia ha conducido a la generación de nuevas ideas acerca de la función del ritmo theta. Desde 1993, O'Keefe describió el fenómeno de precesión de fase que se caracteriza por el disparo neuronal de células de lugar en fases tempranas del ciclo theta conforme el animal avanza a través del campo de lugar, de tal manera que cuando el animal atraviesa completamente el campo de lugar, los disparos de la célula recorren los 360 grados del ciclo theta. Este hallazgo llevo a sugerir un papel del ritmo theta en la organización del código temporal del hipocampo, posteriormente en el 2006, Dragio y Buzsaki, encontraron que las células de lugar del hipocampo se coordinan

temporalmente entre ellas a través del ritmo theta, permitiendo predecir la distancia entre picos de actividad de células de lugar por la diferencia temporal de disparo entre ambas neuronas en la escala de un ciclo theta (110-120 ms). La información espacial puede estar empaquetada en ciclos theta, en este sentido, un fenómeno denominado como secuencias theta permite la reactivación secuencial dentro de un ciclo theta de actividad neuronal que representa la información espacial de un laberinto lineal (Skaggs et al., 1996; Dragoi y Buzaki, 2006; Foster y Wilson, 2007). Adicionalmente, se demostró que la longitud de la representación espacial codificada por las secuencias theta estaba determinada por la distancia hacia la meta en una tarea de aprendizaje espacial o por señales prominentes que pueden segmentar una experiencia espacial por variables conductuales relacionadas a la tarea, sugiriendo que las secuencias theta pueden contener información relacionada a la meta o intención de ruta (Gupta et al., 2012; Wikenheiser y Redish 20015). Por lo cual, si la información espacial puede ser empaquetada u organizada en secuencias theta, es posible sugerir que la reducción en frecuencia theta generada durante la fase de adquisición de información espacial del laberinto acuático de Morris, puede impactar en la organización de información espacial contenida en los ciclos theta. En este sentido, nosotros especulamos, que las secuencia theta pueden no estar presentes en el día uno de entrenamiento en el laberinto de Morris debido a que la información espacial se está codificando y es probable que no existan secuencias de actividad neuronal establecidas, lo cual concuerda con un reporte reciente que demuestra la ausencia de secuencias theta durante la exploración de un ambiente novedoso (Feng et al., 2015). De manera especulativa, se puede que las secuencias theta pueden estar presentes en el día cuatro del entrenamiento en el laberinto de Morris, ya que las representaciones predictivas de las rutas hacia la meta pueden ser codificadas en las secuencias theta (Gupta et al., 2012; Wikenheiser y Redish 20015; Feng et al., 2015) que son acompañadas de una restauración o probablemente un incremento de la frecuencia theta y de una fuerte sincronización de los circuitos intra-hipocampales.

Acoplamiento diferencial de las redes intrahipocampales durante las diferentes fases de aprendizaje espacial.

Es ampliamente aceptado que las áreas de CA1, CA3 y GD contribuyen diferencialmente en diferentes aspectos del aprendizaje espacial, por lo cual, las oscilaciones theta de cada estrato, así como su acoplamiento, pueden reflejar patrones de interacción asociados a diferentes fases del aprendizaje en una forma dependiente de las redes involucradas. Los análisis de coherencia en los estratos del hipocampo revelaron que los valores de coherencia de la banda theta no cambiaron entre los propios estratos de área de CA1, ni con respecto al sm del GD. Sin embargo, un análisis detallado mostró un acoplamiento preferencial para frecuencia lentas o rápidas durante el aprendizaje espacial: spca1-sm, sr-slm, y sr-sm expresaron alta coherencia para frecuencias de entre 5 a 6.5 Hz en el día uno, con respecto a los días tres y/o cuatro, mientras que las frecuencias rápidas de 8 a 9 Hz expresaron alta coherencia en los días tres y cuatro en comparación con el día uno. El alto acoplamiento entre estratos dendríticos (sr-slm, sr-sm) en frecuencias lentas durante la fase de adquisición temprana y en frecuencias rápidas en los últimos días sugiere un acoplamiento dinámico entre los elementos de los circuitos hipocampales. Sin embargo, no hay conexiones directas entre algunos elementos, por lo cual, este acoplamiento puede ser originado por una fuente diferente que permita a los estratos dendríticos trabajar en una forma coordinada con frecuencias lentas o rápidas dependiendo de la fase del aprendizaje.

Las entradas corticales y subcorticales, así como las conexiones intrínsecas son posibles candidatos que pueden promover tal coordinación. En este sentido, las oscilaciones theta son observadas a través del sistema entorrino-hipocampal (Buzsáki et al., 1983; Schomburg et al., 2014), por ejemplo, la actividad neuronal la corteza entorrinal (regulada por la actividad theta) predice el tiempo de los sumideros de corriente theta generados en los estratos hipocampales en los sitios en donde arriba tal actividad sináptica (Mizuseki et al., 2009), por lo cual, regiones rio arriba como la corteza entorrinal pueden están participando en los cambios

observados en la actividad oscilatoria hipocampal. En este sentido, diferentes aspectos de la información espacial pueden ser codificados por los diferentes tipos de células de la corteza entorrinal, tales como, las células en malla, de dirección de cabeza, de borde y conjuntivas, las cuales en conjunto proveen la métrica espacial para codificar la posición de un animal dentro de un ambiente. Adicionalmente, la organización próximo-distal del sistema entorrino-hipocampal determina las propiedades espaciales de las células de CA1 (Henriksen et al., 2010), en tanto que, también se ha observado una fuerte coordinación de las entradas corticales sobre la región proximal del área de CA1 (cerca de CA3) (Laurent et al., 2015), esto sugiere que el sistema entorrino-hipocampal posee un patrón de actividad exquisitamente organizado en el eje próximo-distal (Inostroza et al., 2013). Por lo cual, los cambios en el acopamiento encontrados en el presente trabajo pueden requerir de la participación de vías específicas a través del sistema entorrino-hipocampal que permitan la coordinación de distintos estratos hipocampales.

Adicionalmente, la actividad theta es influenciada por un grupo de núcleos subcorticales del diencefalo y mesencefalo que forman parte del sistema sincronizador ascendente (SSA) que alcanzan al septo medial y al hipocampo, por lo cual, otra posibilidad es que el SSA puede coordinar redes neuronales ampliamente distribuidas, incluyendo los estratos del hipocampo (Bland et al., 1990; Kirk et al., 1996). En este sentido, también es conocido que el septo medial es un relevo necesario para la generación de la actividad theta hipocampal (Petsche et al., 1962; Mitchell et al., 1982), así como para el establecimiento del aprendizaje dependiente del hipocampo (Winson, 1978; Mizumori et al., 1990), además de que ha sido observado un incremento en la coherencia entre el septo y el hipocampo durante el aprendizaje espacial (Hernández-Pérez et al., 2015). Por otra parte, una reducción en la coherencia entre hipocampo y septo ocasionada por la reducción de serotonina de núcleo supramamilar se asoció con deficiencias en el aprendizaje espacial (Hernández-Pérez et al., 2015). Por lo tanto, el septo medial puede ser una estructura clave para la coordinación de los estratos hipocampales, trabajando como un marcapasos que encarrila coherentemente las redes del hipocampo.

Debido a que, las oscilaciones coherentes reflejan o permiten una comunicación efectiva, el estado coordinado de los circuitos del hipocampo puede favorecer la integración y organización de información durante diferentes operaciones computacionales tales como la codificación y la recuperación. Interesantemente, la coherencia del spCA3 incrementó en las frecuencias rápidas con respecto a todos los estratos en los últimos días de entrenamiento, con cambios prominente entre sr y spCA3. Este incremento coincide con una mejora en la ejecución de la tarea; por lo cual, se sugiere que el incremento en la sincronización de las redes CA3-CA1 puede estar relacionado al proceso de recuperación de información previamente consolidada, ya que estos estratos presentan una comunicación directa. De acuerdo con esta propuesta, varios estudios han encontrado que la interrupción de tal vía produce serias deficiencias en la recuperación de la información espacial (Brun et al., 2002; Nakazawa et al., 2002; Florian y Roullet, 2004; Rolls y Kesner, 2006). Adicionalmente, se ha reportado que la ejecución de una tarea de alternancia en el laberinto "T" genera un incremento en la potencia y la coherencia de la banda gama en la red CA3-CA1 cuando la rata transita por la porción del laberinto asociado con la recuperación de la información de una previa experiencia (Montgomery y Buzsáki, 2007). Adicionalmente, debido a que el ritmo gama se anida en fases específicas de la banda theta (Bragin et al., 1995; Canolty et al., 2006; Colgin et al., 2009), es posible que la relación entre ritmos theta y gama pueda participar en los procesos de recuperación de información.

CONCLUSIÓN

La actividad de red de los circuitos hipocampales oscila en frecuencias theta lentas durante la fase de adquisición temprana del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, mientras que el aprendizaje a través de los días produce un incremento paulatino en la frecuencia, lo cual permite al sistema oscilar en frecuencias rápidas en etapas tardías del aprendizaje expresadas en los últimos días del entrenamiento. Por lo cual, el cambio en la frecuencia puede favorecer el cambio en la forma de procesar información, de la fase de codificación a la fase de recuperación. Adicionalmente, se observó un cambio en el acoplamiento de los circuitos internos del hipocampo en una forma dependiente de la fase de aprendizaje, siendo la fase de recuperación asociada con un fuerte acoplamiento entre las áreas hipocampales de CA3 y CA1. Lo cual concuerda con previos estudios que sugieren que el área de CA3 participa en la recuperación de información previamente almacenada. Los resultados de este trabajo sugieren que modificaciones en la frecuencia y en el acoplamiento pueden ser en medio por el cual el hipocampo opera diferencialmente durante las fases de adquisición y recuperación de la información espacial.

BIBLIOGRAFÍA

Aggleton JP, and Brown MW. (1999) Episodic Memory, Amnesia, and the Hippocampal–Anterior Thalamic Axis. *Behav Brain Sci* 22 (3):425-444.

Amaral DG, and Witter MP. (1995) Hippocampus formation: In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 443-490. New York: Academic.

Barry C, Burgess N (2014) Neural mechanisms of self-location. *Curr Biol* 24:330–339.

Barry C, Ginzberg LL, O'Keefe J, Burgess N (2012a) Grid cell firing patterns signal environmental novelty by expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17687–17692.

Barry C, Heys JG, Hasselmo ME (2012b) Possible role of acetylcholine in regulating spatial novelty effects on theta rhythm and grid cells. *Front Neural Circuits* 6:5.

Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I, Miles R (2010) Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *J Physiol* 588:2077–2090.

Belchior H, Lopes-Dos-Santos V, Tort AB, Ribeiro S (2014) Increase in hippocampal theta oscillations during spatial decision making. *Hippocampus* 24:693–702.

Benchenane K, Peyrache A, Khamassi M, Tierney PL, Gioanni Y, Battaglia FP, Wiener SI (2010) Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal–prefrontal network upon learning. *Neuron* 66:921–936.

Bird CM, and Burgess N. (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* 9:182-194.

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

Bland BH, Colom LV, Ford RD (1990) Responses of septal theta-on and theta-off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Res Bull* 24:71–79.

Bland BH, Oddie SD and Colom LV. (1999) Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *J Neurosci* 19(8):3223-37.

Bland BH, Jesse Jackson J, Donna Derrie-Gillespie D, Azad T, Rickhi A, Abriam J (2006) Amplitude, frequency, and phase analysis of hippocampal theta during sensorimotor processing in a jump avoidance task. *Hippocampus* 16:673–681.

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

Brown MW, Aggleton JP. (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?. *Nat Rev Neurosci* 2(1):51-61.

Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal–hippocampal circuitry. *Science* 296:2243–2246.

Burgess N (2008) Grid cells and theta as oscillatory interference: theory and predictions. *Hippocampus* 18:1157–1174.

Burgess N, Barry C, O’Keefe J (2007) An oscillatory interference model of grid cell firing. *Hippocampus* 17:801–812.

Burwell, R. D. & Agster, K. L. (2008). Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. In H. E. Eichenbaum (Ed.), *Sys and Neurosci* (Vol. 3, pp. 47-66). Oxford: Elsevier

Buzsáki G. (2006) *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, Oxford.

Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325–340.

Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16:130–138.

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

Canolty RT, Edwards E, Dalal SS, Soltani M, Nagarajan SS, Kirsch HE, Berger MS, Barbaro NM, Knight RT (2006) High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science* 313:1626–1628.

Cohen N. J., Poldrack R. A., Eichenbaum H. (1997). Memory for items and memory for relations in the procedural/declarative memory framework. *Memory* 5, 131–178. [10.1080/741941149](https://doi.org/10.1080/741941149).

Colom LV. (2005) Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 96:609-623.

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462:353–357.

DeCoteau WE, Thorn C, Gibson DJ, Courtemanche R, Mitra P, Kubota Y, Graybiel AM (2007) Learning-related coordination of striatal and hippocampal theta rhythms

during acquisition of a procedural maze task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5644–5649.

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

Dragoi G, Buzsáki G. (2006). Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron* 50:145-57.

Etienne AS, Teroni E, Maurer R, Portenier V, Saucy F (1985) Short distance homing in a small mammal: the role of exteroceptive cues and path integration. *Experientia* 41:122–125.

Feng T, Silva D, Foster DJ. (2015). Dissociation between the experience-dependent development of hippocampal theta sequences and single-trial phase precession. *J Neurosci* 35:4890-4902

Florian C, Rouillet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154:365–374.

Foster DJ, Wilson MA. (2007). Hippocampal theta sequences. *Hippocampus* 17:1093-1099.

Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.

Freund TF, and Katona I. (2007) Perisomatic Inhibition. *Neuron* 56:33-42.

Freund T and Kali S. (2008), *Scholarpedia*, 3(9):4720.

Fuster JM. (1997) Network memory. *Trends in Neurosci* 20:451-459.

Glickfeld LL, Roberts JD, Somogyi P and Scanziani M. (2009) Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along the entire somatodendritic axis. *Nat Neurosci* 12:21-23.

Gold, E., Kesner, R. P. (2005). The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus*, 15, 808-814.

Goutagny R, Jackson J, Williams S. (2009) Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12:1491–1493.

Green JD, and Arduini AA. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol* 17:533-557

Gupta AS, van der Meer MA, Touretzky DS, Redish AD. (2012). Segmentation of spatial experience by hippocampal θ sequences. *Nat Neurosci* 15:1032-9.

Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, González-Burgos I, Feria-Velásco A, Medina R, Guevara MÁ, López-Vázquez MÁ, Olvera-Cortés ME (2011) Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in CA1 high frequency theta activity expression in the rat. *Eur J Pharmacol* 652:73–81.

Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, López-Vázquez MA, Fregozo CS, Guevara MA, Olvera-Cortés ME (2012) Serotonin depletion of supramammillary/posterior hypothalamus nuclei produces place learning deficiencies and alters the concomitant hippocampal theta activity in rats. *Eur J Pharmacol* 682:99–109.

Henriksen EJ, Colgin LL, Barnes CA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2010) Spatial representation along the proximodistal axis of CA1. *Neuron* 68:127–137.

Hernández-Pérez JJ, Gutiérrez-Guzmán BE, López-Vázquez MÁ, Olvera-Cortés ME (2015) Supramammillary serotonin reduction alters place learning and concomitant hippocampal, septal, and supramammillary theta activity in a Morris water maze. *Front Pharmacol* 6:250.

Heys JG, Giocomo LM, Hasselmo ME (2010) Cholinergic modulation of the resonance properties of stellate cells in layer II of medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 104:258–270.

Hinman JR, Penley SC, Long LL, Escabí MA, Chrobak JJ (2011) Septotemporal variation in dynamics of theta: speed and habituation. *J Neurophysiol* 105:2675–2686.

Hosseini-Sharifabad A, Mohammadi-Eraghi S, Tabrizian K, Soodi M, Khorshidahmad T, Naghdi N, Abdollahi M, Beyer C, Roghani A, Sharifzadeh M (2011) Effects of training in the Morris water maze on the spatial learning acquisition and VAcHt expression in male rats. *Daru* 19:166–172.

Hunsaker MR, Rosenberg JS, Kesner RP. (2008) The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus* 18: 1064-1073.

Inostroza M, Brotons-Mas JR, Laurent F, Cid E, de la Prida LM (2013) Specific impairment of “what-where-when” episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 33:17749–17762.

Jeewajee A, Lever C, Burton S, O’Keefe J, Burgess N (2008) Environmental novelty is signaled by reduction of the hippocampal theta frequency. *Hippocampus* 18:340–348.

Jones MW, Wilson MA (2005) Phase precession of medial prefrontal cortical activity relative to the hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 15:867–873.

Kamodi A, Acsády L, and Buzsáki G. (1998) Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus*. 8:244-261.

Kesner RP, Lee I, Gilbert P (2004) A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci* 15:333–351.

Kirk IJ, Oddie SD, Konopacki J, Bland BH (1996) Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci* 16:5547–5554.

Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53–57.

Koenig J, Linder AN, Leutgeb JK, Leutgeb S. (2011) The spatial periodicity of grid cells is not sustained during reduced theta oscillations. *Science* 332:592–595

Kramis RC, Vanderwolf CH, Bland BH (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. *Expl Neurol* 49:58–85.

Laurent F, Brotons-Mas JR, Cid E, Lopez-Pigozzi D, Valero M, Gal B, de la Prida LM (2015) Proximodistal structure of theta coordination in the dorsal hippocampus of epileptic rats. *J Neurosci* 35:4760–4775.

Lawson VH, Bland BH. (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* 120:132-144.

Lee I, Kesner RP (2004) Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus* 14:66–76.

López-Vázquez MÁ, López-Loeza E, Lajud Ávila N, Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, Reyes YE, Olvera-Cortés ME (2014) Septal serotonin depletion in rats facilitates working memory in the radial arm maze and increases hippocampal high frequency theta activity. *Eur J Pharmacol* 734:105–113.

M'Harzi M, and Monmaur P. (1985) Selective lesions of the fimbria and the fornix in the rat: differential effects on CA1 and dentate theta. *Experimental Neurology* 89 (2):361–371.

McFarland WL, Teitelbaum H, Hedges EK (1975) Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:324–328.

McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB (2006a) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci* 7:663–678.

Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS (1982) Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci* 2:292–302.

Mittelstaedt ML, Mittelstaedt H (1980) Homing by path integration in a mammal. *Naturwissenschaften* 67:566–567.

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

Mizumori SJ, Perez GM, Alvarado MC, Barnes CA, McNaughton BL (1990) Reversible inactivation of the medial septum differentially affects two forms of learning in rats. *Brain Res* 528:12–20.

Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsáki G (2009) Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64:267–280.

Monmaur P, Breton P. (1990) Elicitation of hippocampal theta by intraseptal carbachol injection in freely moving rats. *Brain Res* 528:12-20.

Monmaur P, Ayadi K, and Breton O. (1993) Hippocampal EEG responses induced by carbachol and atropine infusions into the septum and hippocampus in the urethane-anaesthetized rat. *Brain Res* 631:317-324

Montgomery SM, Buzsáki G (2007) Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14495–14500.

Montgomery SM, Betancur MI, Buzsáki G (2009) Behavior dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J Neurosci* 29:1381–1394.

Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP and O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681 – 683.

Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady CL, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, and Nadel L. (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207:35–66.

Nadel L, and Moscovitch M. (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227.

Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, et al. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297:211–218.

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

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

O'Keefe J, and Recce ML. (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3:317-330.

Olvera-Cortés E, Cervantes M, González-Burgos I (2002) Place learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* 58:261–270.

Olvera-Cortés E, Guevara MA, González-Burgos I (2004) Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res Bull* 62:379–384.

Olvera-Cortés ME, Garcia-Alcantar I, Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, López-Vázquez MÁ, Cervantes M (2012) Differential learning-related changes in theta activity during place learning in young and old rats. *Behav Brain Res* 226:555–562.

Oren I, Mann EO, Paulsen O, and Hájos N. (2006) Synaptic currents in anatomically identified CA3 neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci* 26 (39):9923-9934.

Pan WX, McNaughton N (1997) The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. *Brain Res* 764:101–108.

Penley SC, Hinman JR, Long LL, Markus EJ, Escabé MA, Chrobak JJ (2013) Novel space alters theta and gamma synchrony across the longitudinal axis of the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7:20.

Petsche H, Stumpf C, Gogolak G (1962) The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14:202–211.

Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, and Amaral DA. (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* 16:5233-5255.

Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsáki G. (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neuroscience* 9:1526–1533

Robinson TE (1980) Hippocampal rhythmic slow activity (RSA; theta): a critical analysis of selected studies and discussion of possible species-differences. *Brain Res* 203:69–101.

Rolls, E.T. (1996) A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 6: 601-620.

Rolls ET, Kesner RP (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol* 79:1–48.

Sabolek HR, Penley SC, Hinman JR, Bunce JG, Markus EJ, Escabi M, Chrobak JJ (2009) Theta and gamma coherence along the septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurophysiol* 101:1192–1200.

Sainsbury RS, Montoya CP (1984) The relationship between type 2 theta and behavior. *Physiol Behav* 33:621–626.

Sainsbury RS, Heynen A, Montoya CP (1987) Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav* 39:513–519.

Skaggs, W.E., McNaughton, B.L., Wilson, M.A., and Barnes, C.A. (1996). Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus* 6:149–172

Sasaki T., Leutgeb S., Leutgeb J. K. (2014). Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. *Curr. Opin. Neurobiol* 32:16–23.

Schlesiger MI, Cannova CC, Boublil BL, Hales JB, Mankin EA, Brandon MP, Leutgeb JK, Leibold C, Leutgeb S. (2015). The medial entorhinal cortex is necessary for temporal organization of hippocampal neuronal activity. *Nat Neurosci* 18:1123-32

Schmidt B, Hinman JR, Jacobson TK, Szkudlarek E, Argraves M, Escabi MA, Markus EJ (2013) Dissociation between dorsal and ventral hippocampal theta oscillations during decision-making. *J Neurosci* 33:6212–6224.

Schomburg EW, Fernández-Ruiz A, Mizuseki K, Berényi A, Anastassiou CA, Koch C, Buzsáki G (2014) Theta phase segregation of input-specific gamma patterns in entorhinal hippocampal networks. *Neuron* 84:470–485.

Scoville WB, Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. *J Neurol Neurosurg Psych.* 20:11-21.

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

Spruston N. (2009), *Scholarpedia*, 4(5):6130

Squire LR. (1986) Mechanisms of memory. *Science* 232:1612-1619.

Squire LR, and Zola-Morgan S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.

Squire LR, and Zola SM. (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(24):13515-13522.

Squire LR, Stark CEL, and Clark RE. (2004) The medial temporal lobe. *Ann. Rev. Neurosci.* 27:279-306.

Squire LR, and Kandel ER. (2009) *Memory: From mind to molecules*. 2nd. Ed. Roberts and company.

Steffenach HA, Witter M, Moser MB, and Moser EI. (2005) Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45(2):301-13.

Tendler A, Wagner S (2015) Different types of theta rhythmicity are induced by social and fearful stimuli in a network associated with social memory. *Elife* 03614.

Vandecasteele M, Royer S, Belluscio M, Berényi A, Diba K, Fujisawa S, Grosmark A, Mao D, Mizuseki K, et al. (2012) Large-scale recording of neurons by movable silicon probes in behaving rodents. *J Vis Exp* 61:e3568. MS.

Vanderwolf CH, and Leung LS. (1983) Hippocampal rhythmical slow activity: a brief history and effects entorhinal lesion and phencyclidine. *The neurobiology of the hippocampus*, W. Seifert, ed. (London: Acaemic Press), pp. 275-302.

Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *EEG Clin Neurophysiol* 26:407–418.

Vorhees CV, Williams MT (2014) Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicol Teratol* 45:75–90.

Wells CE, Amos DP, Jeewajee A, Douchamps V, Rodgers J, O’Keefe J, Burgess N, Lever C (2013) Novelty and anxiolytic drugs dissociate two components of hippocampal theta in behaving rats. *J Neurosci* 33:8650–8667.

Whishaw IQ, Vanderwolf CH (1971) Hippocampal EEG, behaviour: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movements, swimming, and shivering. *Physiol Behav* 6:391–397.

Wikenheiser AM, Redish AD. (2015). Hippocampal theta sequences reflect current goals. *Nat Neurosci* 18:289-294.

Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261:1055–1058.

Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160–163.

Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 637–703.

Yassa MA, Stark CE (2011) Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci* 34:515–525.

Yoder RM, Pang KC (2005) Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 15:381–392.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950 –2967.