



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**INTEGRACIÓN SINÁPTICA EN LA CORTEZA PREFRONTAL Y SU  
MODULACIÓN POR LA PROTEÍNA BETA AMILOIDE**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**  
**M. en C. ERNESTO FLORES MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**  
**FES IZTACALA**  
**DR. VÍCTOR HUGO DE LAFUENTE FLORES**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DEL 2023**



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.

## ARADECIMIENTOS

Agradezco a nuestra máxima casa de estudios, a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en particular al Instituto de Neurobiología (INB) por todo el apoyo brindado en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó: No. de Becario: 231675.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Al Dr. José Fernando Peña Ortega por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la orientación y apoyo durante mi formación académica.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y a el Dr. Víctor Hugo De LaFuente Flores, por su asesoría y comentarios a lo largo del desarrollo de mi doctorado.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Circuitos Neuronales

Al Bioterio del Instituto de Neurobiología, al MVZ. José Martín García Servín

A la Unidad de Videoconferencia y a la Lic. María de Lourdes Lara Ayala

Al Dr. Benito Ordaz por todo el apoyo otorgado durante mi estancia doctoral, así como su entrañable amistad.

Para el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo de los donativos de la Alzheimer's Association (NIRG-11-205443), Fundación Marcos Moshinsky y CONACyT (A1-S-7540) y DGAPA-UMAM (IG200521) otorgados al Dr. José Fernando Peña Ortega.

## DEDICATORIA

A mi familia: Elida, Sofía y Emilio, quienes me han enseñado que la ciencia puede describir todo, pero no tendría ningún sentido sin su amor ya que es la fuerza más poderosa.

## Índice

### Contenido

Abreviaturas .....	v
Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
La corteza prefrontal.....	3
Anatomía de la corteza prefrontal en la rata.....	3
Conectividad de la corteza prefrontal.....	5
Conexiones cortico-corticales en la corteza prefrontal .....	6
Conexiones eferentes de la corteza prefrontal.....	6
Conexiones aferentes a la corteza prefrontal.....	7
Las conexiones de la PFC con el prosencéfalo basal, las estructuras olfativas y las áreas límbicas.....	8
Actividad espontánea de la corteza cerebral.....	10
Vía Hipocampo- Corteza Prefrontal .....	11
Características anatómicas de la vía Hipocampo-Corteza Prefrontal .....	12
Características electrofisiológicas de la vía Hipocampo-Corteza Prefrontal.....	14
La Proteína Beta Amiloide como promotora de la Enfermedad de Alzheimer.....	16
Producción y liberación de la proteína beta amiloide .....	18
Alteraciones sinápticas y en las redes neuronales producidas por la proteína beta amiloide. 19	
Planteamiento del problema .....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos .....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES .....	23
Materiales y Métodos .....	24
Animales.....	24
Oligomerización de la proteína beta amiloide.....	24
Obtención de rebanadas de Corteza Prefrontal medial .....	25
Registros electrofisiológicos de la actividad sináptica en la CPFm inducida por la estimulación de la entrada hipocampal in vitro. ....	25

Imágenes de calcio funcionales.....	26
Análisis de datos.....	27
Registros de campo.....	27
Imágenes de calcio funcionales.....	27
Procesamiento de Imágenes.....	27
Análisis de correlación cruzada.....	28
Métricas de la Teoría de grafos.....	28
Resultados.....	30
Rebanada de la corteza prefrontal medial.....	30
Actividad espontánea de la corteza prefrontal.....	31
Plasticidad a corto plazo.....	32
Efecto de la $A\beta$ sobre la plasticidad a corto plazo.....	34
Efecto de la secuencia inversa de la $A\beta$ sobre la plasticidad a corto plazo.....	35
Reclutamiento de las neuronas de la corteza prefrontal y el efecto de la $A\beta$ sobre el reclutamiento.....	37
Dinámica del circuito de la corteza prefrontal y el efecto de la $A\beta$ . .....	39
Discusión.....	42
Conclusión.....	49
Bibliografía.....	50
Anexo.....	73
Amyloid $\beta$ Peptide-Induced changes in Prefrontal Cortex Activity and Its Response to Hippocampal Input.....	73

## Abreviaturas

A	Región anterior o rostral
A $\beta$	Proteína Beta amiloide
Ac (por sus siglas en inglés)	Comisura anterior
ACd (por sus siglas en inglés)	Área dorsal anterior del cíngulo
ACv (por sus siglas en inglés)	Área ventral anterior del cíngulo
AMPA (por sus siglas en inglés)	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
APP (por sus siglas en inglés)	Proteína precursora amiloide
APV (por sus siglas en inglés)	Ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico
BACE (por sus siglas en inglés)	$\beta$ -secretasa
°C	Grados centígrados
CA1 (por sus siglas en inglés)	Región 1 del Cuerno de Amón
CA2 (por sus siglas en inglés)	Región 2 del Cuerno de Amón
CA3 (por sus siglas en inglés)	Región 3 del Cuerno de Amón
CB (por sus siglas en inglés)	Calbindina
Cc (por sus siglas en inglés)	Cuerpo calloso
Cg1 (por sus siglas en inglés)	Región 1 de la corteza cingulada
Cg2 (por sus siglas en inglés)	Región 2 de la corteza cingulada
CNQX (por sus siglas en inglés)	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CR (por sus siglas en inglés)	Calretinina
D	Región dorsal
CdCl <sub>2</sub>	Dicloruro de cadmio
DG (por sus siglas en inglés)	Giro dentado
DG (por sus siglas en inglés)	Giro dentado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT (por sus siglas en inglés)	Tenia Tecta dorsal
DTV (por sus siglas en inglés)	Tenia Tecta ventral
AD (por sus siglas en inglés)	Enfermedad de Alzheimer
EC (por sus siglas en inglés)	Corteza entorrinal
EEG (por sus siglas en inglés)	Electroencefalograma
EPSP (por sus siglas en inglés)	Potencial postsináptico excitador

FR2 (por sus siglas en inglés)	Área frontal 2 de la corteza
HPC-PFC (por sus siglas en inglés)	hipocampo-Corteza Prefrontal
HFIP (por sus siglas en inglés)	1,1,1,3,3,-hexanofluoro-2-propanol
HPC (por sus siglas en inglés)	Hipocampo
Hz	Hertz, unidad de frecuencia
IG (por sus siglas en latín)	Indusium griseum
IL (por sus siglas en inglés)	Área infralímbica
IL (por sus siglas en inglés)	Región Infralímbica de la corteza prefrontal
IPSP (por sus siglas en inglés)	Potencial postsináptico inhibitorio
KCl	Cloruro de potasio
L	Región lateral
LCRAm (por sus siglas en inglés)	Líquido cefalorraquídeo artificial modificado
LEC (por sus siglas en inglés)	Región lateral de la corteza entorrinal
LFP (por sus siglas en inglés)	Potencial local de campo
M	Región medial
MΩ	Mega Ohm
MEC (por sus siglas en inglés)	Región medial de la corteza entorrinal
MEG (por sus siglas en inglés)	Magnetoencefalograma
MgCl <sub>2</sub>	Dicloruro de magnesio
min	minutos
mM	Milimolar
MO (por sus siglas en inglés)	Área orbital medial
mPFC (por sus siglas en inglés)	Corteza Prefrontal medial
MSDB (por sus siglas en inglés)	Banda diagonal de Broca
μM	Micromolar
Nacc (por sus siglas en inglés)	Núcleo accumbens
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NMDA (por sus siglas en inglés)	Ácido N-metil-D-aspártico
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OB (por sus siglas en inglés)	Bulbo olfatorio
P	Región posterior o caudal
PC (por sus siglas en inglés)	Células principales
PFC (por sus siglas en inglés)	Corteza Prefrontal
pH	Coeficiente de grado de acidez
PL (por sus siglas en inglés)	Área prelímbica
PLd (por sus siglas en inglés)	Parte dorsal del área prelímbica;
PLv (por sus siglas en inglés)	Parte ventral del área prelímbica

PrCm (por sus siglas en inglés)	Área precentral medial
PrL (por sus siglas en inglés)	Región Prelímbica de la corteza prefrontal
PS1 (por sus siglas en inglés)	Presenilina-1
PS2 (por sus siglas en inglés)	Presenilina-2
PV (por sus siglas en inglés)	Parvalbúmina
rpm	Revoluciones por minuto
SLM (por sus siglas en latín)	Stratum lacunosum moleculare
SO (por sus siglas en latín)	Stratum oriens
SP (por sus siglas en latín)	Stratum piramidale
SR (por sus siglas en latín)	Stratum radiatum
Sub (por sus siglas en inglés)	Subículum
SWR (por sus siglas en inglés)	Ondulación de onda aguda
μs	Microsegundo
TT (por sus siglas en latín)	Tenia tecta.
V	Región ventral
WGA-HRP (por sus siglas en inglés)	Aglutinina de trigo acoplada a peroxidasa de rábano

## Resumen

La formación del hipocampo (HPC, por sus siglas en inglés) y la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés) son fundamentales para varios procesos cognitivos. Ambas estructuras interactúan directamente a través de una proyección que se genera por axones de neuronas localizadas en la región CA1 y el subículum del HPC que arriban a diferentes dominios de la PFC. Esta conexión, denominada vía Hipocampo-Corteza Prefrontal (HPC-PFC, por sus siglas en inglés) permite la interacción de ambas estructuras a través de la generación de actividad coherente en oscilaciones que se sincronizan en frecuencias específicas. A través de estas interacciones funcionales, la vía HPC-PFC se involucra en el mantenimiento de varios procesos cognitivos, entre los que se incluyen las llamadas funciones ejecutivas, así como la regulación del estado de ánimo y el afecto. Los esfuerzos por comprender la fisiopatología de diversos trastornos psiquiátricos y neurológicos (p.e. la enfermedad del Alzheimer; AD por sus siglas en inglés) se han centrado en identificar las anomalías en regiones del HPC y/o la PFC. Cada vez está más claro que los trastornos neurológicos y de neurodesarrollo no se deben únicamente a alteraciones en el HPC y/o PFC, sino que también a un deterioro distribuido en la conectividad de la vía HPC-PFC. La AD es una patología crónica que cursa con alteraciones en la memoria, en las funciones ejecutivas y en el estado de ánimo, mismos que correlacionan con un aumento de la producción de la proteína beta amiloide ( $A\beta$ , por sus siglas en inglés) en diversas estructuras cerebrales, incluidos el HPC y la PFC. Debido a que la  $A\beta$  está comúnmente relacionada con alteraciones en la conectividad sináptica y con alteraciones en la actividad oscilatoria poblacional en varios circuitos (p.e. el hipocampo). En este trabajo estudiamos si la  $A\beta$  afecta la actividad poblacional de la Corteza Prefrontal, así como la inervación que esta corteza recibe desde el hipocampo. Con el uso de registros electrofisiológicos, en una preparación *in vitro* que preserva la vía HPC-PFC, inicialmente observamos que la integración sináptica de la vía HPC-PFC varía en función de la frecuencia de estimulación. Además, demostramos que la aplicación de la  $A\beta$ , en el baño de registro, inhibe la actividad poblacional de la Corteza Prefrontal y la entrada sináptica que esta corteza recibe del hipocampo. La depresión de la vía HPC-PFC inducida por la  $A\beta$  se observa tanto a nivel del potencial de campo, como al nivel unicelular, mientras que altera la topología de la red prefrontal. Nuestros datos sugieren que la  $A\beta$  puede contribuir al deterioro cognitivo en la AD, al menos en parte, a través de la inhibición de la actividad de la Corteza Prefrontal y sus

interacciones dinámicas de largo alcance con otros circuitos neuronales (p.e. el hipocampo).

## **Abstract**

The formation of the hippocampus (HPC) and prefrontal cortex (PFC) are critical for several cognitive processes. Both structures interact directly through a projection that is generated by axons of neurons located in the CA1 region and the subiculum of the HPC that reach different domains of the PFC. This connection, called the Hippocampus-Prefrontal Cortex (HPC-PFC) pathway, allows the interaction of both structures through the generation of coherent activity in oscillations that are synchronized at specific frequencies. Through these functional interactions, the HPC-PFC pathway is involved in the maintenance of several cognitive processes, including the so-called executive functions as well as the regulation of mood and affect. Efforts to understand the pathophysiology of various psychiatric and neurological disorders (e.g., Alzheimer's disease; AD) have focused on identifying abnormalities in regions of the HPC and/or PFC. It is increasingly clear that neurological and neurodevelopmental disorders are not only due to alterations in the HPC and/or PFC, but also to a distributed impairment in the connectivity of the HPC-PFC pathway. Alzheimer's disease is a chronic pathology. which causes alterations in memory, executive functions, and mood, which correlate with an increase in the production of amyloid beta protein ( $A\beta$ ) in various brain structures, including the hippocampus. and the Prefrontal Cortex. Because  $A\beta$  is commonly related to alterations in synaptic connectivity and alterations in population oscillatory activity in various circuits (e.g., the hippocampus). In this work we study whether  $A\beta$  affects the population activity of the Prefrontal Cortex, as well as the innervation that this cortex receives from the hippocampus. Using electrophysiological recordings, in an *in vitro* preparation that preserves the HPC-PFC pathway, we initially observed that the synaptic integration of the HPC-PFC pathway varies as a function of stimulation frequency. Furthermore, we demonstrate that the application of  $A\beta$ , in the recording bath, inhibits the population activity of the Prefrontal Cortex and the synaptic input that this cortex receives from the hippocampus. The depression of the HPC-PFC pathway induced by  $A\beta$  is observed both at the field potential level and at the single-cell level, while it alters the topology of the prefrontal network. Our data suggest that  $A\beta$  may contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease, at least in part, through inhibition of the activity of the Prefrontal Cortex and its long-range dynamic interactions with other neural circuits (e.g., the hippocampus). .

## Introducción

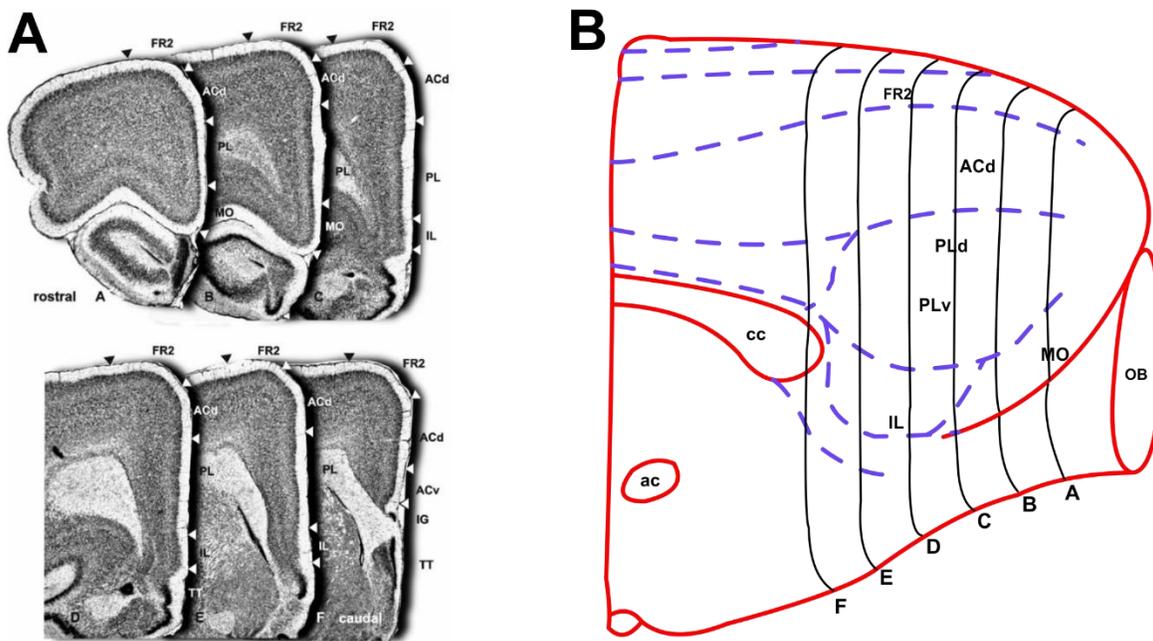
### La corteza prefrontal

El término "prefrontal" se utilizó por primera vez en 1884 (Guldin et al., 1981). La primera descripción topográfica de las regiones que hoy consideramos prefrontales se atribuye a Brodmann (Fuster, 2008) quien, basado en criterios de citoarquitectura, utilizó los términos "frontal" y "precentral" para denotar dos regiones principales del lóbulo frontal de los primates (Fuster, 2008). Brodmann encontró la presencia de una capa IV granular distintiva, como una característica prominente de la región frontal en los primates (Fuster, 2008). En sus estudios comparativos entre especies, Brodmann encontró que la región frontal (granular) está poco desarrollada o ausente en los no primates, lo que lo llevó a concluir que la región frontal granular es esencialmente exclusiva de los primates (Preuss, 1995). Este tipo de observaciones contribuyeron a retrasar los estudios de las áreas frontales en animales no primates (Guldin et al., 1981). La región cortical frontal granular, descrita por Brodmann (Fuster, 2008), con el tiempo se ha denominado indistintamente como corteza frontal granular, frontal granular o prefrontal (Preuss, 1995).

### Anatomía de la corteza prefrontal en la rata

Existe una gran homología entre la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés) entre primates y roedores (Vogt et al., 2013; Vogt y Paxinos, 2014; Laubach et al., 2018). La PFC de los roedores es agranular, muestra una citoarquitectura homóloga a la de los primates y presenta la mayoría de las aferencias y eferencias de la PFC de los primates (Vogt et al., 2013; Vogt y Paxinos, 2014; Laubach et al., 2018). La PFC de la rata está, en general, dividida en tres regiones topológicamente diferentes (Beckstead, 1979; Divac y Morgenson, 1985). Primero, una región ubicada medialmente, la PFC medial (Divac y Morgenson, 1985), que constituye la porción principal de la pared medial del hemisferio anterior y dorsal al genu del cuerpo calloso. En segundo lugar, una región ubicada ventralmente que se denomina PFC orbitaria y que se encuentra dorsal al extremo caudal del bulbo olfatorio, en el banco dorsal del surco rinal (Krettek y Price, 1977a). En tercer lugar, la PFC de la rata contiene una región ubicada lateralmente (Sarter y Markowitsch, 1983), la PFC lateral o sulcal, que también se conoce como la corteza insular agranular y, en las ratas, se encuentra en la parte anterior del surco rinal (Sarter y Markowitsch, 1984; Sesack et al., 1989). La PFC medial será el foco principal del presente trabajo. Esta

parte de la PFC en las ratas se puede dividir en al menos cuatro áreas distintas citoarquitectónicamente: el área precentral medial (PrCm, por sus siglas en inglés) o el área frontal de la corteza 2 (Fr2, por sus siglas en inglés), el área cingulada anterior, el área prelímbica y el área infralímbica (Krettek y Price, 1977a; Van Eden y Uylings, 1985). Con base en varios criterios anatómicos, se ha sugerido que existe una subdivisión principal de la PFC medial en un componente dorsal, que abarca el área FR2, las áreas cinguladas anteriores dorsales, la parte dorsal del área prelímbica y una ventral que incluye las áreas orbitales ventrales prelímbicas, infralímbicas y mediales (Fig. 1; Berendse et al., 1992; Steketee, 2003; Zahrt et al., 1997).



**Figura 1. Citoarquitectura y distribución de la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés).** ((A) Se muestran seis secciones coronales teñidas con violeta de cresilo a través del polo frontal del cerebro de la rata. Los límites de los diferentes campos citoarquitectónicos en la PFC se indican con puntas de flecha. Las secciones están igualmente espaciadas y separadas, aproximadamente 0.5 mm. El nivel rostrocaudal de las secciones también se indica en una reconstrucción de la vista medial de la parte rostral del hemisferio que se muestra en el panel B. (B) Vista medial de la parte rostral del hemisferio cerebral de la rata al nivel de la PFC. Se indican los niveles de las secciones que se muestran en panel A y los límites entre las áreas citoarquitectónicas. Abreviaturas: ACd, área dorsal anterior del cingulado; ACv, área cingulada anterior ventral; FR2, área frontal de la corteza 2; IG, indusium griseum; IL, área infralímbica; MO, área orbital medial; PL, área prelímbica; TT, tenia tecta; ac, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; ACd, área cingulada anterior dorsal; OB, bulbo olfativo; PLd, parte dorsal del área prelímbica; PLv, parte ventral del área prelímbica. Modificado de Heidbreder y Groenewegen, 2003.

La distinción entre las subdivisiones dorsales y ventrales de la PFC se remonta a un origen filogenético (Pandya y Yeterian, 1990). La PFC evolucionó a partir de un origen archicortical y paleocortical (Pandya y Yeterian, 1990). De la porción archicortical surgieron las áreas proisocorticales 24 (cingulado anterior), 25

(infralímbica) y 32 (prelímica; Pandya y Yeterian, 1990), que dieron lugar a las regiones prefrontales dorsales y dorsolaterales en los primates (Pandya y Yeterian, 1990). De hecho, la corteza prelímica de los roedores (especialmente las ratas) es el equivalente del área 32 de Brodmann en los primates (especialmente los macacos; Uylings y Van Eden, 1990). En el contexto de las tendencias evolutivas reconocidas por Pandya y colaboradores (Pandya y Yeterian, 1990), se puede afirmar que la corteza infralímbica forma el área cortical prefrontal menos desarrollada citoarquitectónicamente, mientras que existe una segregación más clara de las capas corticales en las áreas cingulada anterior y Fr2 localizadas dorsalmente (Krettek y Price, 1977a; Krettek y Price, 1977b; Van Eden y Uylings, 1985).

### Conectividad de la corteza prefrontal

Como se mencionó con antelación, la PFC medial de las ratas consta de varias subregiones citoarquitectónicamente distintas que, al menos en parte, también se pueden diferenciar sobre la base de distintos patrones de conectividad aferente y eferente con áreas corticales y con estructuras subcorticales como el cuerpo estriado, el tálamo, la amígdala, el hipotálamo y varios núcleos del tronco encefálico (Beckstead, 1979; Condé et al., 1995; Groenewegen y Uylings, 2000; Krettek y Price, 1977a; Krettek y Price, 1977b; Ray y Price, 1992; Sesack et al., 1989; Uylings y Van Eden, 1990; Van Eden et al., 1992). Aunque en la mayoría de estos estudios los patrones de conectividad diferencial dentro de la PFC medial se han relacionado con las diversas áreas citoarquitectónicamente distintas (Beckstead, 1979), los resultados de varios de los estudios de marcado indican que la distribución de fibras marcadas anterógradamente (Uylings y Van Eden, 1990) o neuronas marcadas retrógradamente (Condé et al., 1990), no respeta los límites determinados citoarquitectónicamente (Groenewegen et al., 1990; Uylings y Van Eden, 1990; Uylings et al., 2003). Por lo tanto, tanto en la dirección dorsoventral como en la caudal, los aferentes o eferentes pueden mostrar patrones de distribución que atraviesan los límites citoarquitectónicos de esta región de la PFC (Uylings et al., 2003). Dichas observaciones pueden indicar una diferenciación funcional de la PFC medial que, por un lado, une ciertas áreas distintas citoarquitectónicamente (Groenewegen et al., 1990; Uylings y Van Eden, 1990) y, por otro lado, puede "dividir" otras áreas en subcampos funcionalmente diferentes (Uylings et al., 2003). Una tendencia principal que se ha notado es que los patrones de conectividad de áreas citoarquitectónicamente localizadas dorsalmente comparten una serie de

similitudes (Groenewegen et al., 1990; Uylings y Van Eden, 1990) y que estos patrones son considerablemente diferentes de los de las áreas prefrontales mediales ubicadas ventralmente y que tienen una serie de características en común (Berendse et al., 1992; Wright y Groenewegen, 1995).

### **Conexiones cortico-corticales en la corteza prefrontal**

Parece haber interconexiones relativamente fuertes entre las áreas citoarquitectónicas ubicadas dorsalmente en la PFC medial, mientras que las interconexiones dorsoventrales son bastante limitadas. Además, las áreas ubicadas dorsalmente tienen conexiones más fuertes con las cortezas sensoriales y motoras, mientras que las áreas prefrontales mediales, ubicadas ventralmente, tienen relaciones más fuertes con cortezas de asociación y las cortezas límbicas (Heidbreder y Groenewegen, 2003).

### **Conexiones eferentes de la corteza prefrontal**

Las proyecciones eferentes de la corteza infralímbica se dirigen rostral y dorsalmente a las áreas medial orbitaria y prelímbica y, en menor grado, a la corteza cingulada anterior (Room et al., 1985). En una dirección lateral, las fibras infralimbicas proporcionan una fuerte inervación del área insular agranular (Heidbreder y Groenewegen, 2003), principalmente su subdivisión ventral (Heidbreder y Groenewegen, 2003), y una inervación moderadamente densa de la corteza piriforme y el área entorrinal (Heidbreder y Groenewegen, 2003). Existe una menor proporción de proyecciones infralímbicas que alcanzan la corteza perirrinal (Hurley et al., 1991). Las proyecciones del área prelímbica tienen la tendencia a alcanzar más áreas corticales dorsales en comparación con las del área infralimbiana (Room et al., 1985; Sesack et al., 1989). Dentro de la pared frontal medial, hay diferentes partes de la corteza prelímbica que están interconectadas a través de un fuerte sistema de asociación intrínseca (Condé et al., 1995). Las fibras prelímbicas también alcanzan la corteza infralímbica contralateral, el cíngulo anterior y, en menor grado, las áreas premotoras FR2 y cinguladas caudales (Risterucci et al., 2003). En las partes laterales del hemisferio, los objetivos prelímbicos incluyen el área insular agranular más prominentemente su subdivisión dorsal y las cortezas más caudales alrededor del surco rinal (Repa et al., 2001), es decir, las áreas agranulares posteriores, perirrinales y entorrinales (Heidbreder y Groenewegen, 2003). Una de las diferencias entre las áreas prelímbicas dorsales

y ventrales es que solo la parte ventral de la corteza prelímbica proyecta sustancialmente a la corteza piriforme (Datiche y Cattarelli, 1996). Las partes más localizadas dorsalmente del área prelímbica tienen ligeras proyecciones a las áreas sensoriomotoras en las regiones frontal y parietal (Sesack et al., 1989). Las proyecciones más sustanciales a las áreas sensoriomotoras y visuales se originan en el área cingulada anterior y, en particular, en el área frontal FR2 (Reep et al., 1990; Sesack et al., 1989). El área cingulada anterior tiene sus proyecciones más fuertes hacia partes caudales del área cingulada y la corteza retrosplenial (Ragozzino y Kesner, 1998; Ragozzino et al., 1998).

### **Conexiones aferentes a la corteza prefrontal**

La distribución de las aferentes corticales a la PFC medial cambia no solo a lo largo de las coordenadas dorsoventrales sino también en una dirección rostrocaudal, ignorando en cierta medida los límites entre los campos corticales citoarquitectónicamente distintos (Condé et al., 1995; Van Eden et al., 1992). Por lo tanto, la parte ventromedial de la PFC medial, que abarca las áreas prelímbica, infralímbica y ventral, recibe entradas corticales principalmente de las áreas insulares perirrinales y ventrales agranulares (Van Eden et al., 1992), así como de la corteza piriforme (Datiche y Cattarelli, 1996). Las partes dorsales del área prelímbica, el área cingulada anterior y el área FR2 reciben proyecciones de las cortezas visuales secundarias, agranulares posteriores y retrospleniales (Krettek y Price, 1977a; Krettek y Price, 1977b). Las partes rostrales del cingulado anterior y las áreas FR2 parecen estar inervadas principalmente por la región motora frontoparietal y somatosensorial (Mack KJ y Mack, 1992), así como por las áreas de asociación temporal y las áreas insulares agranulares posteriores (Condé et al., 1995; Reep et al., 1990; Van Eden et al., 1992). Como lo subrayan Conde y colaboradores (Condé et al., 1995), los patrones de proyección corticocortical específicos se adhieren solo hasta cierto punto a los diferentes campos citoarquitectónicos dentro de la PFC, previamente descritos. Por lo tanto, los patrones de proyección eferentes y aferentes de áreas prefrontales ubicadas dorsalmente, caracterizadas principalmente por asociaciones corticales somatosensoriales (Condé et al., 1995; Sesack et al., 1989; Van Eden et al., 1992), o áreas prefrontales ubicadas más ventralmente, están predominantemente caracterizadas por relaciones corticales con áreas límbicas y asociativas (Condé et al., 1995; Sesack et al., 1989; Van Eden et al., 1992). Además, los sistemas de

asociación cortical dentro de la PFC medial están predominantemente orientados en una dirección horizontal (Condé et al., 1995).

### **Las conexiones de la PFC con el prosencéfalo basal, las estructuras olfativas y las áreas límbicas.**

Las proyecciones de la PFC medial a las regiones del prosencéfalo septal y basal, incluyen los grupos de células colinérgicas en el núcleo septal medial (Heidbreder y Groenewegen, 2003) y las extremidades vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca (Lamour et al., 1982). Estas aferencias provenientes de la PFC están organizadas topográficamente (Naefsey, 1990). Las regiones más ventrales de la PFC, incluidas las áreas prelímbicas, infralímbicas y ventral, proyectan más densamente al septum y las áreas mediales del prosencéfalo basal (Gaykema et al., 1990). Por otra parte, las regiones dorsales del área prelímbica y el área cingulada anterior proyectan más lateralmente para alcanzar la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca (Gaykema et al., 1990; Gaykema et al., 1991; Sesack et al., 1989). Los grupos celulares no colinérgicos en el prosencéfalo basal también son alcanzados por las fibras prefrontales mediales (Mazei et al., 2002). Además, las partes ventrales de la PFC medial proyectan débilmente hacia las partes laterales del núcleo del lecho del complejo de la estría terminal (Hurley et al., 1991; Sesack et al., 1989). Las estructuras olfativas como el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme y las capas superficiales del tubérculo olfatorio son alcanzadas por aferencias provenientes de las partes infralímbicas y ventrales de las áreas prelímbicas y, en menor medida, de las regiones más dorsales de la PFC (Berendse et al., 1992; Datiche y Cattarelli, 1996). Por su parte, la extremidad horizontal de la banda diagonal de Broca da lugar a proyecciones colinérgicas a la PFC medial (Lehmann et al., 1980); en donde las regiones ventrales están invadidas por neuronas ubicadas medialmente, mientras que las regiones corticales más dorsales reciben entradas de neuronas progresivamente más laterales en este núcleo colinérgico (Saper, 1984). Aunque en su conjunto el complejo amigdaloides está conectado con toda la PFC medial, parece haber un claro predominio de las interconexiones con las áreas más localizadas ventralmente (Priot et al., 1992; Ray y Price, 1992). Las conexiones entre la PFC y el complejo amigdaloides son recíprocas y más extensas que las conexiones hipocampales-prefrontales (Jay y Witter, 1991; Swanson, 1981). El área infralímbica proyecta fuertemente hacia los núcleos amigdaloides centrales, mediales, accesorios, basales y corticales (Hurley et al., 1991; McDonald, 1998). El área prelímbica ventral tiene un patrón de

distribución muy similar de sus proyecciones al complejo amigdaloides, mientras que las regiones más dorsales del área prelímbica y el área cingulada anterior alcanzan solo regiones restringidas de los núcleos basal y lateral y, en menor grado, el núcleo central (Krettek y Price, 1977a; Van Eden et al., 1992). El área frontal Fr2 (o el área precentral medial) envía fibras a partes aún más restringidas de la amígdala, involucrando principalmente al núcleo basal (McDonald, 1998; Sesack et al., 1989). Las proyecciones amigdaloides a la PFC medial surgen predominantemente de las partes caudales del complejo amigdaloides basal y, en menor grado, del núcleo amigdaloides lateral y la corteza periamigdaloides (Krettek y Price, 1977b; McDonald, 1991). Las proyecciones del complejo amigdaloides basal a la PFC medial muestran una disposición topográfica específica (Cassell y Wright, 1986). Las partes caudales del núcleo basal parvicelular proyectan principalmente a las capas profundas de las áreas prelímbicas, infralímbicas y ventrales (Krettek y Price, 1977b; Petrovic et al., 1996). La parte caudal del núcleo basal accesorio proyecta hacia un área más grande de la pared frontal medial, que incluye, predominantemente, las áreas infralímbica y prelímbica y, en menor grado, las áreas del cíngulo anterior y el Fr2 (Krettek y Price, 1977b; Petrovic et al., 1996). Es importante tener en cuenta que partes específicas del complejo amigdaloides basal proyectan a subáreas en la PFC medial y subregiones en el cuerpo estriado ventral que, a su vez, se asocian entre sí mediante proyecciones cortico estriatales prefrontales (McDonald, 1991; Wright y Groenewegen, 1995). El hipocampo y la amígdala están predominantemente conectados con las áreas prefrontales mediales ubicadas más ventralmente, aunque partes específicas de la amígdala también alcanzan áreas dorsales (Zahm y Borg, 1992; Singewald et al., 2003). Las relaciones prefrontales con la formación del hipocampo (hipocampo propiamente dicho y subíulum) son prácticamente unidireccionales: la PFC recibe entradas del hipocampo (Carr y Sesack, 1996; Gabbott et al., 2002; Jay y Witter, 1991), pero se han descrito muy pocas fibras prefrontales que alcanzan la formación del hipocampo directamente (Hurley et al., 1991; Sesack et al., 1989). La influencia prefrontal indirecta sobre el hipocampo se lleva a cabo a través del área entorrinal (Hurley et al., 1991) o de estructuras diencefálicas subcorticales (Swanson, 1981). Las proyecciones prefrontales del hipocampo ventral, que se derivan predominantemente del subíulum y de CA1, se distribuyen principalmente a las áreas infralímbica y ventral prelímbica (Jay y Witter, 1991; Swanson, 1981). Las conexiones entre la PFC medial y la corteza parahipocámpal son bidireccionales (Delatour y Witter, 2002). La corteza perirrinal proyecta predominantemente a las áreas prelímbica, infralímbica y ventral

(Heidbreder y Groenewegen, 2003), mientras que el área entorrinal dorsolateral alcanza toda la pared frontal medial (Delatour y Witter, 2002; Van Eden et al., 1992). Las proyecciones prefrontales mediales a la corteza entorrinal (EC, por sus siglas en inglés) se originan principalmente de la corteza infralímbica, mientras que las proyecciones a la corteza perirrinal se originan, además, de áreas ubicadas más dorsalmente (Hurley et al., 1991; Sesack et al., 1989).

### Actividad espontánea de la corteza cerebral

El procesamiento, almacenamiento y recuperación de la información por las redes cerebrales requiere de la plasticidad sináptica, así como de la coordinación temporal precisa y la sincronización de múltiples conjuntos neuronales a través de la actividad rítmica de los circuitos neuronales (Dragoi y Buzsáki, 2006; Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2017). La generación de actividad rítmica poblacional es necesaria tanto para la actividad coordinada de regiones cerebrales distantes, así como de elementos dentro de subredes de microcircuitos cerebrales específicos (Hasselmo y Stern, 2014). La actividad oscilatoria puede definirse como un conjunto de fluctuaciones periódicas en la actividad unicelular o en la actividad poblacional en las redes neurales (Artieda et al., 2009; Buzsáki et al., 2012). Esta actividad involucra al patrón de disparo rítmico de los potenciales de acción y a las fluctuaciones de los potenciales postsinápticos resultantes de la interacción periódica entre las neuronas de una red neuronal local o de un área cortical (Artieda et al., 2009). Es decir, las oscilaciones cerebrales pueden interpretarse como el resultado de la interacción dinámica y rítmica entre las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas y las propiedades del circuito al que pertenecen (Buzsáki y Draguhn, 2004). Además, la actividad oscilatoria depende también de la coordinación temporal de la actividad de las neuronas (sincronización) que, en conjunto originan las fluctuaciones rítmicas en el potencial de campo (Buzsáki et al., 2012). Convencionalmente, las oscilaciones se han clasificado en rangos de frecuencia y se les designó una letra griega para su identificación (Buzsáki, 2002). A la actividad en el rango de frecuencias de 0.5 a 4 Hz se le denomina ritmo delta, al de 4 a 8 Hz se denomina ritmo theta, al rango de 8 a 12 Hz se denomina ritmo alfa, mientras que ritmo beta es el que ocurre en el rango de frecuencias de 12 a 30 Hz y el ritmo gamma se genera a las frecuencias mayores de 30 Hz (Buzsáki, 2002). Actualmente, se ha planteado que estas oscilaciones constituyen un mecanismo básico del funcionamiento del cerebro ya que proporcionan una ventana temporal donde se reclutan de manera coherente múltiples redes neuronales para la

representación, procesamiento, almacenaje y evocación de la información (Traub et al. 1999; Buzsáki y Draguhn, 2004; Artieda et al., 2009).

Una alteración en los patrones de actividad poblacional en la corteza cerebral ha sido relacionada con una variedad de condiciones patológicas (Siok et al., 2006; Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2017; Peña-Ortega et al., 2012; Peña-Ortega, 2019). Registros electroencefalográficos (EEG), que reflejan fundamentalmente la actividad cortical, de pacientes con la AD han demostrado una disminución en las oscilaciones de frecuencia rápida y un aumento de las oscilaciones de frecuencia lenta que se conoce como enlentecimiento del EEG (Balleza-Tapia et al., 2010). Más aún, se ha demostrado que la  $A\beta$  es capaz de generar un enlentecimiento en el espectro de potencia de registros electrofisiológicos del hipocampo *in vivo* (Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012). Otros trabajos han demostrado también que la  $A\beta$  puede alterar la generación de distintas oscilaciones hipocampales, como las oscilaciones beta (Adaya-Villanueva et al., 2010), gamma (Driver et al., 2007; Peña-Ortega et al., 2012), theta (Sun y Alkon, 2002; Colom et al., 2010; Villette et al., 2010) y la actividad espontánea (Balleza-Tapia et al., 2010). De esta forma, la  $A\beta$  puede provocar el deterioro cognoscitivo observado en los pacientes con la AD a través de alterar la capacidad del hipocampo de generar y/o mantener las oscilaciones (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña-Ortega, 2013, Peña-Ortega, 2019). A pesar de todo lo anterior, todavía está por determinarse cuáles son los efectos de la  $A\beta$  en la PFC.

#### Vía Hipocampo- Corteza Prefrontal

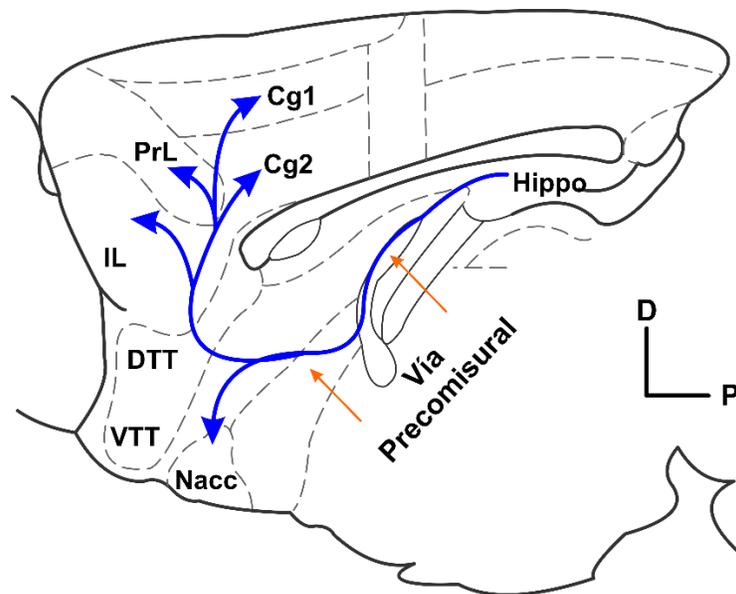
El hipocampo, la PFC y los circuitos neuronales con los que se encuentran interconectados están implicados en varios aspectos de los procesos cognitivos y de memoria (Sigurdsson et al., 2000; Godsil et al., 2012). La vía HPC-PFC se origina en los campos CA1/subículum del hipocampo e inerva las áreas prelímbica/medial de la PFC (PL/MO, por sus siglas en inglés; Parent et al., 2010). La vía HPC-PFC ejerce excitación monosináptica sobre las neuronas piramidales de la PFC (Thierry et al., 2000), seguida de una inhibición sináptica mediada por el reclutamiento de interneuronas GABAérgicas (Degenétais et al., 2003) y, en algunos casos, de una excitación tardía (Thierry et al., 2000). Es probable que esta excitación tardía se deba a la activación de la red cortical local (Thierry et al., 2000). Alternativamente, tanto las áreas PL/MO como el subículum/CA1 envían proyecciones al núcleo accumbens (Zahm y Borg, 1992), una región del estriado ventral que está

particularmente relacionada a la PFC e implicada en el comportamiento dirigido a objetivos (Zahm y Borg, 1992).

### **Características anatómicas de la vía Hipocampo-Corteza Prefrontal**

La mayoría de las conexiones de la PFC con estructuras corticales o subcorticales son recíprocas (Berendse y Groenewegen, 1991; Groenewegen et al., 1996), con la excepción del cuerpo estriado y el hipocampo (Thierry et al., 2000, Sosa et al., 2019). De hecho, la PFC no recibe aferentes del cuerpo estriado (McDonald, 1991; Wright y Groenewegen, 1995) ni envía proyecciones directas al hipocampo (Parent et al., 2010). Swanson (1981) demostró, por primera vez en la rata, una vía directa desde la región CA1 del hipocampo ventral al área infralímbica de la PFC. Además, la inyección unilateral de aglutinina de trigo acoplada a peroxidasa de rábano (WGA-HRP por sus siglas inglés), en la PFC medial, en un sitio que no incluía el área infralímbica, permitió la identificación de células marcadas retrógrada e ipsilateralmente en el estrato piramidal del área CA1 y del subículum tanto en la parte dorsal, como ventral del hipocampo (Ferino et al., 1987). Sin embargo, la mayoría de estas células marcadas se encontraron en partes ventrales del hipocampo, mientras que su número disminuyó dramáticamente hacia regiones más rostrales (Ferino et al., 1987). Así, se encontró una completa ausencia de marca en la parte más septal de CA1 y el subículum, así como en todo CA2, CA3 y el DG (Ferino et al., 1987). Adicionalmente, las inyecciones discretas de colorantes fluorescentes transportados retrógradamente (en diferentes áreas de la PFC; Condé et al., 1995), así como el marcado anterógrado después de la inyección de la leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* en el hipocampo, han revelado que la vía HPC-PFC se origina en CA1 y el subículum y que inerva una subregión de la PFC que comprende las PL/MO (Jay y Witter, 1991; Condé et al., 1995). Más recientemente, también se describió una proyección discreta del CA1/subículum a la zona insular agranular de la PFC lateral, que envía colaterales a la PFC medial (Verwer et al., 1997). Las fibras de proyección HPC-PFC primero ingresan al álveo y se extienden dorsal y rostralmente a través de la fimbria/fórnix (Jay y Witter, 1991). Luego, estas fibras continúan en una dirección rostroventral a través del septum y el núcleo accumbens (Jay y Witter, 1991), ingresan al área infralímbica de la PFC (Jay y Witter, 1991) y, finalmente, alcanzan las áreas PL/MO de la PFC (Figura 3; Jay y Witter, 1991). Aunque las aferentes del hipocampo inervan toda la extensión rostro-caudal del área prelímbica (Thierry et al., 2000), se pueden observar diferentes patrones de inervación dentro de las porciones dorsal y ventral de esta

área prelímbica (Fig. 2). De hecho, las fibras varicosas y las arborizaciones terminales están presentes en las capas II y VI de la porción ventral de esta corteza, mientras que la inervación es menos densa en capas profundas (V y VI) de la porción dorsal del área prelímbica (Jay y Witter, 1991). En el área orbital medial, la inervación del hipocampo se distribuye en todas las capas, con una ligera preferencia por las capas profundas a la capa II (Thierry et al., 2000). El glutamato es el neurotransmisor de la vía HPC-PFC (Jay y Witter, 1991; Parent et al., 2010; Godsil et al., 2012; Finlay et al., 2015). De hecho, se ha corroborado la presencia de células marcadas retrógradamente en el área CA1 y el subículo del hipocampo ventral después de la inyección de aspartato marcado en el área prelímbica de la PFC (Jay et al., 1992). Cuando se marcó la vía HPC-PFC por el transporte anterógrado de WGA-HRP desde la formación ventral del hipocampo o la degeneración anterógrada después de una lesión de la fimbria (Carr y Sesack, 1996), se descubrió que las terminales nerviosas que se originan en las neuronas del hipocampo forman sinapsis asimétricas casi exclusivamente en la PFC (Carr y Sesack, 1996). Estos contactos sinápticos asimétricos se observaron principalmente sobre las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la PFC (Thierry et al., 2000).



**Figura 2 Representación esquemática de la vía Hipocampo-Corteza Prefrontal.** Esquema de una vista sagital del encéfalo que destaca la trayectoria de las fibras aferentes del hipocampo (Flechas azules) que se proyectan dorsalmente a las cortezas Prelímbica (PrL) e Infralímbica (IL) y, ventralmente, al Núcleo accumbens (Nacc). Abreviaturas Dorsal (D); Posterior (P); Tenia Tecta Dorsal y ventral (DTT y VTT); Corteza Cigulada 1 y 2 (Cg1 y Cg2); Hipocampo (HPC). Modificada de Parent et al., 2010.

## **Características electrofisiológicas de la vía Hipocampo-Corteza Prefrontal**

Según lo determinado por la latencia de los potenciales antidrómicos evocados en las neuronas CA1/subiculares después de la estimulación de la PFC medial, el tiempo de conducción de la vía HPC-PFC es de  $15.6 \pm 3.6$  ms, lo que indica que esta vía conduce a una velocidad estimada relativamente lenta (0.6 m/segundo; Ferino et al., 1987). Según lo estimado por la prueba de doble estímulo, el período refractario de estas fibras es  $2.3 \pm 0.4$  ms (Ferino et al., 1987). Los registros extracelulares unicelulares de neuronas de la PFC, acompañados de la estimulación eléctrica del hipocampo ventral, en la subregión CA1/subículum han sido utilizados para determinar la influencia de la formación del hipocampo sobre la PFC en ratas anestesiadas (Laroche et al., 1990; Jay et al., 1992; Mulder et al., 1997). Con estos experimentos, se observó que la estimulación de pulso único del hipocampo ventral produce una respuesta excitadora en áreas del PL/MO de la PFC (Thierry et al., 2000), a menudo seguida de una inhibición prolongada en el 42% de las células registradas (Jay et al., 1992). Esta respuesta excitadora consistió en un potencial de acción único con una latencia media de 18 ms (rango de 10 a 24 ms), que es compatible con el tiempo de conducción de la vía HPC-PFC (Laroche et al., 1990). Además, la aplicación del protocolo de pulsos pareados genera una facilitación del pulso pareado en la mitad de las células que respondieron (Laroche et al., 1990). De hecho, la probabilidad de descarga en respuesta al segundo pulso aumentó mientras el intervalo inter-estímulos fue de 40 a 200 ms (Thierry et al., 2000). Todas las células prefrontales que responden a la estimulación del hipocampo podrían también activarse mediante la aplicación iontoforética de los agonistas selectivos de los receptores de glutamato de los subtipos AMPA y NMDA (Jay et al., 1992), que son antagonizados selectivamente por CNQX y APV, respectivamente (Jay et al., 1992). Así, las respuestas excitadoras evocadas en las neuronas de la PFC por estimulación del hipocampo ventral con pulso único o pulsos pareados fueron siempre antagonizadas por CNQX, pero solo excepcionalmente por APV, lo que indica que estas respuestas se deben principalmente a la activación de los receptores AMPA (Jay et al., 1992). Los registros intracelulares de células prefrontales en ratas anestesiadas permitieron caracterizar los sinápticos provocados en la vía HPC-PFC (Thierry et al., 2000). Con estos registros se determinó que la mayoría de las neuronas de la PFC (89%) responden a la estimulación de pulso único del hipocampo con una secuencia compleja de potenciales sinápticos excitadores e inhibidores (Thierry et al., 2000).

Específicamente, la respuesta sináptica de la vía HPC-PFC consistió en un potencial postsináptico excitador (EPSP, por sus siglas en inglés) temprano, con una latencia media de  $17.4 \pm 7.5$  ms (Jay et al., 1992), seguido de una fase prolongada de hiperpolarización de una duración media de  $266 \pm 139$  ms (Jay et al., 1992). El EPSP temprano evocó, en el 33% de los casos, un potencial de acción (Jay et al., 1992). Este EPSP temprano parece ser monosináptico, ya que su latencia no se modificó al aumentar la intensidad de la estimulación del hipocampo y es compatible con el tiempo de conducción de la vía HPC-PFC (Jay et al., 1992). Además de este EPSP inicial, también se observó un segundo EPSP con una latencia media de  $34.2 \pm 8.5$  ms en el 35% de los casos (Jay et al., 1992). Este EPSP tardío podría ser el resultado de la activación de colaterales recurrentes de neuronas piramidales dentro de la PFC que reciben una entrada excitadora directa del hipocampo (Thierry et al., 2000). La hiperpolarización prolongada, previamente mencionada, consistió en un potencial postsináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés) que tiene un componente rápido y uno lento potencial postsináptico excitador (EPSP, por sus siglas en inglés; Jay et al., 1995). El IPSP rápido, es probablemente debido a la activación de interneuronas locales GABAérgicas de manera directa por la vía HPC-PFC. (Jay et al., 1995). El IPSP lento, es probablemente debido a la activación de interneuronas locales GABAérgicas por las colaterales recurrentes de las mismas neuronas piramidales de la PFC o por la activación directa de estas interneuronas por la entrada hipocámpal (Thierry et al., 2000).

A pesar de lo descrito en el párrafo anterior, uno de los aspectos relevantes en la función cortical que no han sido descritos para la PFC, y mucho menos para la vía HPC-PFC, es la integración sináptica dependiente de la frecuencia (Stone et al., 2011), que es capaz de generar dinámicas complejas no lineales que implican que la sumación sináptica no aumenta en función de la frecuencia, sino depende del reclutamiento diferencial, dependiente de la frecuencia, de los componentes excitadores e inhibidores (tanto mono- como poli-sinápticos; Stone et al., 2011). Lo anterior es relevante para esta tesis pues se ha demostrado, como se verá más adelante, que la  $A\beta$  no sólo altera la transmisión sináptica cuando ésta se prueba con estímulo único (Kurudenkandy et al., 2014; Pourbadie et al., 2015; Wang et al., 2013), sino que afecta la plasticidad sináptica de corto plazo, como la que se induce al aplicar estímulos pareados (Kurudenkandy et al., 2014; Pourbadie et al., 2015; Wang et al., 2013), aunque falta por determinar su efecto en la integración sináptica inducida por trenes de estimulación a distintas frecuencias (Stone et al., 2011), una

vez que se caracterice la dinámica de integración sináptica-dependiente de la frecuencia de estimulación en la vía HPC-PFC.

Como ya se mencionó, varias observaciones clínicas y experimentales indican que tanto la PFC como el hipocampo están implicados en varios procesos cognitivos (Goldman-Rakic, 1994; Goldman-Rakic, 1995; Jay et al., 1992; Fuster, 1997; Peña-Ortega, 2019). La PFC está involucrada en funciones cognitivas superiores, como la memoria de trabajo, que se define como la capacidad de mantener y utilizar la representación mental para el comportamiento dirigido a objetivos en el corto plazo (Fuster, 1997). Esta estructura también contribuye al ordenamiento temporal de eventos espaciales y no espaciales y a la organización y planificación de respuestas (Fuster, 1997). Por su parte, el hipocampo está implicado en la memoria declarativa, en la codificación del espacio y juega un papel crucial en la codificación y formación de recuerdos (Goldman-Rakic, 1994, Goldman-Rakic, 1995). Según Squire (1992), la participación de la formación del hipocampo en el procesamiento mnemónico es solo temporal, mientras que los recuerdos multimodales a largo plazo se almacenan en sitios no hipocampales, probablemente en áreas neocorticales, a través del proceso de consolidación de la memoria. Debido a sus relaciones anatómicas y su activación durante las tareas de memoria de trabajo, la PFC y la formación del hipocampo están funcionalmente asociadas (Goldman-Rakic, 1994, Goldman-Rakic, 1995; Jay et al., 1992; Fuster, 1997). Además, a través de sus conexiones recíprocas con las áreas de asociación parietales y temporales de la corteza cerebral, la PFC puede servir como un enlace intermedio entre el hipocampo y estos sitios neocorticales (Ming et al., 2015). Todas estas estructuras se encuentran comprometidas tanto anatómicamente, como funcionalmente en la AD (Mattson, 2004), misma que se origina en gran medida por la acumulación patológica de la proteína beta amiloide (Mattson, 2004). Lo que se revisará a continuación.

### La Proteína Beta Amiloide como promotora de la Enfermedad de Alzheimer

La demencia se define como un síndrome en donde la cognición, la memoria, la conducta y la habilidad de ejecutar actividades de la vida diaria se deterioran de manera irreversible (Prince et al., 2015). La Enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés) es la forma más común de demencia (Alzheimer's Association, 2014; Prince et al., 2015) y, actualmente, no existe cura para la misma (Alzheimer Association, 2014). La AD es un trastorno neurodegenerativo que actualmente afecta a casi el 2% de la población en los países industrializados (Alzheimer's

Association, 2014). El riesgo de AD aumenta dramáticamente en personas mayores de 70 años y se predice que su incidencia AD se triplicará en los próximos 50 años (Alzheimer's Association, 2014). El diagnóstico definitivo de la AD requiere un examen post mortem del cerebro (Dickson, 1997; Braak H y Braak, 1998), con la finalidad de identificar la presencia de un número suficiente de "placas seniles" y de "ovillos neurofibrilares" como confirmación histopatológica del diagnóstico probable de AD (Dickson, 1997). Los ovillos neurofibrilares son agregados fibrilares intracelulares de la proteína asociada a microtúbulos tau (Braak H y Braak, 1998), misma que en este estado patológico exhibe hiperfosforilación y modificaciones oxidativas (Jin et al., 2011). Las placas seniles son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos de la  $A\beta$  (Teplow, 1998). Las placas seniles y los ovillos neurofibrilares están presentes, principalmente, en las regiones del cerebro involucradas en el aprendizaje y la memoria y en los comportamientos emocionales (Lesné et al., 2006), como la corteza entorrinal (Mattson, 2014), el hipocampo (West et al., 1994), la PFC (Ming et al., 2015), el prosencéfalo basal (Mattson, 2014) y la amígdala (Mucke, 2009). Las regiones del cerebro con placas seniles exhiben típicamente un número reducido de sinapsis (Snyder et al., 2005), y las neuritas asociadas con las placas seniles a menudo están dañadas (distróficas; Mattson, 2014), lo que sugiere que la  $A\beta$  daña las sinapsis y las neuritas (Mattson, 2014). Las neuronas que emplean glutamato o acetilcolina como neurotransmisores parecen ser las más afectadas en presencia de la  $A\beta$  (Mattson, 1997), pero las neuronas que producen serotonina y noradrenalina también están dañadas tanto en la AD (Mattson, 2014), como en presencia la  $A\beta$  (Mattson, 2014). Interesantemente, de manera fisiológica la  $A\beta$  está involucrada en la modulación de la probabilidad de liberación de neurotransmisores (Abramov et al., 2009), la transmisión sináptica (Cirrito et al., 2005).

Se propone que uno los eventos más relevantes para la aparición de la AD es el procesamiento proteolítico alterado de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés; Selkoe, 1993; Hardy, 1997; Sherrington et al., 1995) que resulta en la producción y agregación de formas neurotóxicas de la  $A\beta$  (Selkoe, 1993; Hardy, 1997; Sherrington et al., 1995). De hecho, las neuronas que degeneran en la AD presentan un daño oxidativo (Butterfield et al., 2001), un metabolismo energético alterado (Gabuzda et al., 1994) y una homeostasis de calcio celular perturbada (LaFerla, 2002), lo que parece ser inducido por las acciones neurotóxicas de la  $A\beta$  (LaFerla, 2002). Varios factores genéticos y ambientales

pueden incrementar el riesgo para la aparición de la AD (Dickson, 1997). La comprensión de estos factores de riesgo y cómo desencadenan y/o modifican la cascada patológica inducida por la  $A\beta$  (Braak H y Braak, 1998), conducirá al desarrollo de intervenciones terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la AD (Gabuzda et al., 1994; Mattson y Chan, 2003), que incluirán desde cambios en la dieta y el estilo de vida (Mattson y Chan, 2003), hasta vacunas y medicamentos (Mattson y Chan, 2003).

### Producción y liberación de la proteína beta amiloide

Como ya se mencionó, el procesamiento proteolítico alterado de la APP es un factor fundamental para la disfunción y la muerte de las neuronas en la AD (Yu et al., 1998), a través de una mayor producción y acumulación en el cerebro de formas neurotóxicas de la  $A\beta$  (Yu et al., 1998). La "hipótesis amiloide" de la AD indica que la  $A\beta$  es el factor principal para la inducción y progresión de esta enfermedad (Selkoe, 2011; Haass y Selkoe, 2007; Hardy y Selkoe, 2007; Hardy, 1997). Coincidentemente, todos los casos de AD de origen genético familiar se asocia con mutaciones en genes (p.e. APP, PS1 y PS2) que favorecen la sobreproducción de la forma larga de 42 aminoácidos de la  $A\beta$  (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). La expresión de estos genes mutados en células cultivadas y en ratones transgénicos también lleva a la sobreproducción de la forma larga de 42 aminoácidos de la  $A\beta$  y a la inducción de alteraciones celulares de diverso tipo, así como de deterioro cognitivo (Scheuner et al., 1996; Peña-Ortega, 2019). Se han identificado tres actividades enzimáticas diferentes que determinan la producción de la  $A\beta$  (Scheuner et al., 1996). La producción de la  $A\beta$  requiere de la proteólisis secuencial de la APP por la  $\beta$ -secretasa (BACE, por sus siglas en inglés John et al., 2003), que libera el extremo N-terminal de la  $A\beta$  (John et al., 2003), y por la  $\gamma$ -secretasa (de la que forman parte las proteínas PS1 y PS2) que libera el extremo C-terminal de la  $A\beta$  (John et al., 2003). Alternativamente, una enzima llamada  $\alpha$ -secretasa escinde la APP dentro de la secuencia de la  $A\beta$ , lo que impide la producción de la misma (Scheuner et al., 1996). Las mutaciones en la APP que causan AD familiar resultan en uno o dos cambios de aminoácidos dentro o inmediatamente adyacentes a la  $A\beta$  que mejoran su escisión por la BACE y la  $\gamma$ -secretasa (Hardy, 1997), mientras que las mutaciones de presenilina alteran la actividad de la  $\gamma$ -secretasa (Hardy, 1997). En los casos de esporádicos (no-genéticos) de la AD se desconocen las causas del metabolismo de alterado la APP y la deposición de la  $A\beta$  (Lazarov et al., 2002), pero se sugiere que éstas pueden

incluir alteraciones en el estrés oxidativo (Mattson et al., 1997), en el metabolismo energético (Gabuzda et al., 1994; Mattson y Chan, 2003) y en la homeostasis iónica (LaFerla, 2002). Otro factor que favorece los casos esporádicos de la AD es la presencia de enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, los niveles de colesterol altos, la obesidad, el infarto del miocardio y la diabetes, que pueden aumentar las probabilidades de padecer AD hasta en un 34% (de Toledo Ferraz Alves et al. 2010; Hölscher, 2011).

Además de las evidencias histopatológicas y genéticas que respaldan el papel central de las alteraciones del metabolismo de la APP y de la acumulación de la  $A\beta$  en la patogénesis de la AD (Mattson, 2014); los hallazgos experimentales, en cultivos celulares y en modelos animales han, relacionado las alteraciones del metabolismo de la APP y la acumulación de la  $A\beta$  con la disfunción sináptica y la muerte de células nerviosas en la AD (Dickson, 1997). El aumento de la deposición de la  $A\beta$ , que ocurre en la AD, probablemente contribuye a la muerte de las neuronas porque la  $A\beta$  puede ser directamente tóxica para las neuronas y también aumenta su vulnerabilidad al estrés oxidativo y metabólico, así como a la excitotoxicidad (Mattson, 1997).

Si bien, diversos trabajos se han enfocado en determinar la densidad de las placas seniles en el tejido cerebral de los pacientes con la AD, la muerte neuronal asociada a estas lesiones y su relación con el deterioro cognoscitivo observado en pacientes con la enfermedad (Deshpande et al., 2006); actualmente se sabe que la densidad de placas, así como la muerte neuronal asociada, no correlaciona con el nivel de demencia, sobre todo en las etapas tempranas de la AD (Lue et al., 1999). Más aún, se ha demostrado la presencia de placas amiloideas en individuos completamente sanos (Naslund et al., 2000). Estudios posteriores demostraron que la concentración de agregados pequeños y solubles de la  $A\beta$  (oligómeros) si correlaciona con los niveles de demencia en los pacientes con la AD y que parecen ser éstos los responsables del deterioro cognoscitivo en las etapas tempranas de la enfermedad (Lue et al., 1999; Naslund et al., 2000; Walsh et al., 2002; Gong et al., 2003; Selkoe, 2003).

### **Alteraciones sinápticas y en las redes neuronales producidas por la proteína beta amiloide**

Las evidencias actuales indican que los agregados solubles oligoméricos de la  $A\beta$  son capaces de alterar la funcionalidad de las redes neuronales a nivel de la excitabilidad neuronal (Wang et al., 2009; Hazra et al., 2013), la transmisión sináptica (Giacchino et al., 2000; Brown et al., 2005a; Nimmrich et al., 2008) la plasticidad sináptica (Rowan et al., 2004; Nomura et al., 2005) y las oscilaciones o ritmos cerebrales (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña-Ortega, 2019). Por lo tanto, de acuerdo con la evidencia mencionada, se ha propuesto que la  $A\beta$  en estado soluble (oligomérico) estaría provocando el deterioro cognoscitivo observado en los pacientes con la AD en etapas tempranas a través de la alteración, a nivel funcional, de las redes neuronales más que a un mecanismo relacionado con la muerte celular (Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2019).

La hipótesis de que una alteración en las oscilaciones cerebrales puede ser la base del deterioro cognoscitivo en la AD se ve apoyada en observaciones directas en pacientes con AD en los que se ha reportado un "enlentecimiento" en registros cerebrales medidos a través de EEG y MEG (Kowalski et al., 2001). Dicho enlentecimiento correlaciona, además, con el nivel de la demencia en etapas tempranas de la AD (Kowalski et al., 2001), y también está reportado en modelos animales de la AD (Wang et al., 2002; Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2019).

Diversos estudios que han demostrado que la  $A\beta$  es capaz de alterar las oscilaciones poblacionales, principalmente, en el hipocampo (Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2019). Por ejemplo, se ha reportado que la inyección intracerebroventricular de la  $A\beta$  produce deterioro cognoscitivo que correlaciona con una reducción en la generación del ritmo theta en el hipocampo ex vivo (Sun y Alkon, 2002). La microinyección de la  $A\beta$  en el septum medial también es capaz de inducir una disminución del 49% de la potencia del ritmo theta del hipocampo (Colom et al., 2010). Este efecto sobre el ritmo theta hipocampal se debe a que la microinyección de la  $A\beta$  provoca una disminución de la actividad de las neuronas colinérgicas del septum medial que inervan el hipocampo y son importantes para la generación del ritmo theta (Lee et al., 1994; Bland et al., 1999). Datos publicados del laboratorio demostraron que la inyección intracisternal de la  $A\beta$  es capaz de alterar la evocación del ritmo theta a través de un estímulo sensorial (Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012). Es importante mencionar que la microinyección de la  $A\beta$  provoca un aumento de las frecuencias lentas en el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal *in vivo* que se manifiesta como un desplazamiento hacia la izquierda en el espectro de potencia (Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012), de manera muy similar a lo

observado en el EEG de los pacientes con la AD (Babiloni et al., 2006; Ponomareva et al., 2008). Más aún, Villette y colaboradores (2010) demostraron que la microinyección de la  $A\beta$  directamente en el hipocampo es capaz de crear una disminución en la potencia y la frecuencia del ritmo theta asociado a una prueba de reconocimiento visuoespacial en ratas (Villette et al., 2010). Estas alteraciones inducidas por la  $A\beta$  están asociadas con una disminución en la tasa de disparo de las neuronas GABAérgicas que se encuentran en el septum medial y que son responsables de la propagación del ritmo theta al hipocampo (Villette et al., 2010). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que la inducción del ritmo gamma con la aplicación de kainato se inhibe en rebanadas de hipocampo de ratones que sobreexpresan una mutante de la APP (Driver et al., 2007). De hecho, se ha demostrado que la aplicación aguda de la  $A\beta$  inhibe el ritmo theta (Gutiérrez-Lerma et al., 2013) y el ritmo gamma (Pena-Ortega et al., 2012) en rebanadas que contienen al hipocampo (Pena-Ortega et al., 2012). Finalmente, se ha reportado que la aplicación de la  $A\beta$  es capaz de disminuir también las oscilaciones de tipo beta en rebanadas de hipocampo (Adaya-Villanueva et al., 2010).

A pesar de que la evidencia en la alteración de la funcionalidad de las redes neuronales en la AD está ampliamente documentada (Gomez et al., 2009), a la fecha, los mecanismos responsables de las alteraciones sobre la función y la dinámica de las redes neuronales producida por la  $A\beta$  aún no está bien descrita (Gomez et al., 2009). Una de las estrategias que se ha utilizado para poder estudiar de forma sistemática el desarrollo y progresión de la AD, así como el papel fisiopatológico de la  $A\beta$  en este proceso, es el uso de modelos animales en los que se eleva el contenido cerebral de la  $A\beta$  (Gomez et al., 2009). Por ejemplo, Brown y colaboradores (2005b) estudiaron la transmisión sináptica en rebanadas de hipocampo de los ratones transgénicos TAS10. Estos ratones sobreexpresan la APP humana con una mutación denominada sueca (hAPP<sup>swe</sup>). En este estudio se encontró una disminución en la relación entrada-salida de las sinapsis glutamatérgicas de las colaterales de Schaffer en los ratones TAS10. Utilizando imágenes de calcio en rebanadas de septum medial, se ha observado que la aplicación de la  $A\beta$  altera la actividad de tres poblaciones distintas de neuronas (Leão et al., 2012). En la población de neuronas glutamatérgicas la  $A\beta$  incrementa la frecuencia de los disparos de potenciales de acción y, además, bloquea las corrientes de potasio tipo A y M. Por otro lado, se encontró que aplicación de la  $A\beta$  provoca la disminución en la coherencia del disparo de las neuronas GABAérgicas

y colinérgicas, con la pérdida en la ritmicidad de la frecuencia theta (Leão et al., 2012).

Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la  $A\beta$  afecta la actividad oscilatoria y, en consecuencia, la formación de la memoria es a través de la modulación de la excitabilidad celular y de la transmisión sináptica (Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). En este sentido, la  $A\beta$  puede modular la excitabilidad celular a través de la modulación de la actividad de diversos canales iónicos (p.e. canales de  $Ca^{2+}$  y de  $K^+$ ) y de varios receptores de membrana (p.e. el receptor nicotínico  $\alpha 7$ ; Peña et al., 2006; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). Además, la  $A\beta$  puede inducir la activación de cinasas asociadas a la modulación de canales iónicos que modulan la transmisión sináptica como la cinasa de serinas/treoninas glucógeno sintasa cinasa-3 beta (GSK-3 $\beta$ , por sus siglas en inglés; Zhu et al., 2010; Wildburger y Leazza, 2012). El otro efecto más común de la  $A\beta$  es una reducción de la transmisión sináptica que tiene un efecto tanto presináptico (Balleza-Tapia et al., 2010; Cuevas et al., 2011; Peña et al., 2010; Ting et al., 2007), como postsináptico (Dinamarca et al., 2012; Ting et al., 2007). En resumen, los mecanismos celulares implicados en la alteración de la actividad de las redes neuronales inducida por la  $A\beta$  comprenden cambios en la transmisión sináptica (Balleza-Tapia et al., 2010; Mura et al., 2012; Peña et al., 2010) y en la propiedades neuronales intrínsecas (Hou et al., 2009; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Peña et al., 2010; Shankar y Walsh, 2009; Ye et al., 2003), que implican acciones directas de la  $A\beta$  en los canales iónicos (Balleza-Tapia et al., 2018; Hou et al., 2009; Shankar y Walsh, 2009; Ye et al., 2003) y/o su modulación a través de la activación de las vías de transducción intracelular (Wildburger y Laezza, 2012; Zhu et al., 2010). Está por determinarse, si esto ocurre en la CPF y en la vía directa que esta corteza recibe del hipocampo.

## **Planteamiento del problema**

La vía HPC-PFC juega un papel esencial en las funciones cognitivas como las memorias a corto y largo plazos, la atención y la toma de decisiones (Kovner et al., 2019), las cuales son afectadas por diversas enfermedades neurológicas y diferentes desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Godsil et al., 2013), depresión, ansiedad (Padilla-Coreano et al., 2016) y la AD (Sampath et al., 2017). La AD es un tipo de demencia que causa problemas con la memoria, el pensamiento y el comportamiento. A nivel mundial, la OMS reportó en el 2021 que más de 55 millones de personas viven con esta enfermedad y se calcula que la cifra aumentará a 78 millones para el 2030 y a 139 millones para el 2050 (OMS, 2021). Si bien se

ha demostrado que la  $A\beta$  es una de las marcas histopatológicas de la AD y es la causante del mal funcionamiento de HPC (Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega, 2019) y de la PFC (Eslamizade et al., 2012; Torres-Flores y Peña-Ortega, 2022), alterando la funcionalidad de las redes neuronales a nivel de la excitabilidad neuronal (Wang et al., 2009; Hazra et al., 2013), la transmisión sináptica (Giacchino et al., 2000; Brown et al., 2005a; Nimmrich et al., 2008), la plasticidad sináptica (Rowan et al., 2004; Nomura et al., 2005) y las oscilaciones o ritmos cerebrales (Kowalski et al., 2001; Balleza-Tapia et al., 2010; Peña-Ortega, 2019). Sin embargo, no queda claro el efecto de la  $A\beta$  sobre la integración sináptica, la actividad poblacional y la plasticidad en la vía HPC-PFC. Es importante estudiar los efectos de la  $A\beta$  sobre la transmisión sináptica y la dinámica de la red de la CPF para entender mejor la fisiopatología de la AD.

## Hipótesis

- La proteína beta amiloide inhibirá la actividad espontánea poblacional de la corteza prefrontal.
- La corteza prefrontal integrará diferencialmente la entrada sináptica proveniente del hipocampo, dependiendo de la frecuencia de estimulación.
- La proteína beta amiloide inhibirá la entrada sináptica a la corteza prefrontal proveniente del hipocampo.

## Objetivos

### OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la actividad poblacional y la integración sináptica en la vía hipocampo-CPF *in vitro*, así como el efecto de la proteína beta amiloide sobre las mismas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la actividad espontánea poblacional en la CPF y los efectos de la  $A\beta$  sobre la misma.

- Determinar la dinámica de la integración sináptica en la CPF de entradas provenientes del hipocampo estimuladas a diferentes frecuencias, tanto a nivel poblacional, como en los distintos tipos neuronales que componen a la CPF (neuronas piramidales e interneuronas)
- Evaluar el efecto de la  $A\beta$  tanto en la integración sináptica en la CPF como en el reclutamiento de los diferentes tipos neuronales durante la estimulación de entradas provenientes del hipocampo estimuladas a diferentes frecuencias.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de 8-12 semanas de edad de la cepa Wistar para los experimentos de electrofisiología. Para los experimentos de imágenes de calcio funcionales se ocuparon ratas macho de 15 días de edad de la misma cepa. El manejo de los animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología, siguiendo las regulaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **Oligomerización de la proteína beta amiloide.**

Las proteínas  $A\beta_{1-42}$  y  $A\beta_{42-1}$  se obtuvieron de Bachem (Heidelberg, Germany) o American Peptide Company (California, USA). La oligomerización se realizó, para ambas proteínas, como describe Lambert (Lambert et al., 1998). Brevemente, se agregó 1,1,1,3,3,3-hexanofluoro-2-propanol 4 (HFIP; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) frío, a las proteínas  $A\beta_{1-42}$  o  $A\beta_{42-1}$  para solubilizarlas y obtener una concentración final de 1mM. La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente, manteniendo el vial cerrado. Posteriormente, se realizaron alícuotas de 0.45mg de la  $A\beta$  a las cuales se les evaporó el HFIP durante 16-18h a temperatura ambiente. Cada una de las alícuotas de la  $A\beta$  se disolvió en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) para obtener una concentración de 5mM y, posteriormente, se diluyó en medio F12 sin rojo fenol hasta obtener una concentración final de 100  $\mu$ M. Esta solución de la  $A\beta$  se incubó durante 24h a 5°C y, pasado el tiempo de incubación,

se centrifugó en frío (5°C) a 14000 rpm durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante con los oligómeros de la A $\beta$  para ser utilizado en los experimentos.

#### Obtención de rebanadas de Corteza Prefrontal medial

Cortes coronales que contienen a la PFC medial (PFCm, por sus siglas en inglés) se obtuvieron de las ratas macho Wistar anteriormente descritas. Los animales se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron transcardialmente con líquido cefalorraquídeo artificial modificado (LCRAm) con un pH de 7.4 a una temperatura de 2-4°C. El LCRAm contiene (en mM): 238 sacarosa, 3 KCl, 2.5 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> y 30 D-glucosa (todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gaseado con un burbujeo constante de carbógeno (Grupo INFRA, Edo de México, México; 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Finalizada la perfusión, los animales se decapitaron, los cerebros se removieron y se disecaron en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) a una temperatura de 2-4°C. El LCRA contiene (en mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> and 30 D-glucosa (todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gaseado con un burbujeo constante de carbógeno (Grupo INFRA, Edo de México, México; 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). El cerebelo se removió y ambos hemisferios se montaron en un bloque de agar con una inclinación de 10-12° (Parent et al., 2010). Se cortaron rebanadas coronales (con la inclinación mencionada) de 400  $\mu$ m de grosor con un vibrátomo (Vibratome 1000 Plus Sectioning Systems, Warner Instruments, Connecticut, USA) que contenían las regiones prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la CPFm, así como las fibras provenientes del hipocampo (Parent et al., 2010; Fig. 4A). Las rebanadas para los registros de campo se colocaron en una cámara de recuperación con LCRA a temperatura ambiente y con burbujeo constante de carbógeno durante 1 h. Las rebanadas para los registros de imágenes funcionales de calcio se sometieron a un proceso de cargado antes de colocarlas en la cámara de recuperación (descrito más adelante).

#### Registros electrofisiológicos de la actividad sináptica en la CPFm inducida por la estimulación de la entrada hipocampal in vitro.

Para los registros poblacionales extracelulares, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro perfundida con LCRA normal a una temperatura de 30°-32°C y una velocidad de perfusión de 17 a 20 mL/min. El pH (7.4) y la oxigenación se mantuvo constante por gaseo con carbógeno. Los registros se llevaron a cabo en la capa VI de la región PrL de la CPFm (Fig. 3B). Para ello, se utilizaron

electrodos de borosilicato (150FT, Warner Instruments, Connecticut, USA), con una resistencia de 0.4 a 0.6 M $\Omega$ , llenados con LCRA, los cuales se colocaron sobre la capa VI de la región PrL con ayuda de un microscopio estereoscópico y un micro manipulador (Fig. 4B). Los axones de la entrada hipocampal contenidos en la rebanada se estimularon eléctricamente con un microelectrodo bipolar concéntrico (25 $\mu$ m de diámetro; FHC Inc., Bowdoin ME, USA) (Fig. 3B). La actividad sináptica se evocó con trenes de 5 pulsos cuadrados de magnitud y frecuencia variable (100  $\mu$ s de duración; con una frecuencia de 5, 10, 20 y 50 Hz). Las respuestas sinápticas fueron amplificadas y filtradas (pasa-altas 2.5 Hz; pasa-bajas 1.5 KHz) utilizando un amplificador AC de banda ancha (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). La actividad sináptica evocada de la CPFm se registró inicialmente en condiciones control. Terminado el registro control se agregaron oligómeros de la A $\beta$  a una concentración final de 30 nM y, después de 30 minutos, se aplicó el mismo protocolo de estimulación. Finalmente, se agregaron los siguientes fármacos de manera secuencial (todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): a) 10  $\mu$ M de APV y 10  $\mu$ M de CNQX, b) 1 mM de CdCl<sub>2</sub> y, finalmente, c) 1 mM de lidocaína, con la finalidad de conocer la naturaleza glutamatérgica, sináptica y neuronal de los componentes del registro, respectivamente (Balleza-Tapia et al., 2010). Después de 10-15 min de la aplicación de cada una de estas condiciones farmacológicas se aplicó el mismo protocolo de estimulación.

#### Imágenes de calcio funcionales.

Una vez obtenidas las rebanadas coronales que contienen la CPFm y la entrada hipocampal, se colocaron en una solución de LCRA modificado con manitol 100 mM a temperatura ambiente. A las rebanadas se les adicionó la mezcla de carga que contiene 20  $\mu$ L Fluo 8 AM (1  $\mu$ g/ $\mu$ L; AAT Bioquest, California, USA.), disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 5  $\mu$ L de ácido plurónico al 20% en DMSO (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) y 5  $\mu$ L de Cremóforo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). El tejido se dejó incubar durante 2 h en ausencia de luz. Posteriormente, las rebanadas se traspasaron a una cámara de recuperación con LCRA normal donde se les dejó recuperar por al menos 2 h.

Para medir la epifluorescencia del tejido cargado con Fluo-8 se utilizó un microscopio Eclipse E600FN (Nikon, Melville, NY), adicionado con una cámara tipo CCD Cool Snap ES (Photometrics) y alimentado con luz proveniente de una lámpara de Xenón (Sutter Instrument Company) y filtrada con espejo dicroico (Nikon,

Melville, NY). La excitación del fluoróforo fue controlada con un disparador Lambda 10B/Smart Shutter (Sutter Instrument Company). El disparador se conectó a una computadora personal que controló y tomó las imágenes con el programa RS Image (Roper Scientific). Se tomaron videos de epifluorescencia con una duración de 3 minutos, tomando 4 cuadros por segundo, en a) condiciones control, b) 1h posterior a la aplicación de la A $\beta$  30 nM y b) 30 min después de la aplicación de APV 20  $\mu$ M y CNQX 20  $\mu$ M. Los videos se guardaron con una resolución de 16 bits, para su posterior análisis.

## **Análisis de datos**

### **Registros de campo**

Los registros se digitalizaron a 3-4 KHz y se guardaron en una computadora personal con un sistema de adquisición de National Instruments (AxoTape 2.0.2 pre-9.0; Austin TX, USA.). Posteriormente, los registros obtenidos de cada experimento fueron analizados “*Off-line*” en una computadora personal. Para analizar los registros de la actividad sináptica poblacional evocada, se utilizó el programa Clampfit (Versión 9.2.09, Axon Instruments, California, USA.). La amplitud del sináptico poblacional evocado se midió desde el inicio del artefacto de estimulación hasta la amplitud máxima del sináptico evocado. Para analizar los registros poblacionales se llevó a cabo un análisis de potencia espectral mediante el uso de la Transformada Rápida de Fourier. Para ello se tomaron 5 segmentos de 5 segundos cada uno, espaciados 40 segundos entre cada toma. Los datos se analizaron con una ventana Hamming en el programa Clampfit (Molecular Devices). El espectro de potencia de 1 a 120 Hz resultante fue integrado y graficado para cuantificar la potencia total del registro.

### **Imágenes de calcio funcionales**

## **Procesamiento de Imágenes**

Los videos de fluorescencia se procesaron con el programa Image J para, inicialmente, quitar el ruido de fondo. Posteriormente, se utilizó un programa escrito en LabView (Pérez-Ortega et al., 2016), para procesar las secuencias de imágenes y obtener los cambios en las señales de fluorescencia, originadas por las células (Carrillo-Reid et al., 2008; Carrillo-Reid et al., 2009). Las células activas se identificaron de manera semiautomática (Carrillo-Reid et al., 2008; Carrillo-Reid et

al., 2009). A cada célula se le asignó una coordenada en dos dimensiones y los transitorios de calcio se midieron en función del tiempo. Los transitorios de calcio se cuantificaron con la siguiente fórmula  $\frac{F_i - F_0}{F_0}$  donde  $F_i$  representa la intensidad de fluorescencia en cualquier instante de tiempo y  $F_0$  denota la fluorescencia basal de cada célula (Miller et al., 2014). La primera derivada de los transitorios de calcio fue usada como correlato de la actividad eléctrica de las células, colocando un umbral a 2.5 veces la desviación estándar del ruido para identificar cambios en la fluorescencia significativos (Carrillo-Reid et al., 2008; Peña et al., 2010; Carrillo-Reid et al., 2015; Pérez-Ortega et al., 2016).

A partir de los transitorios de calcio significativos se construyeron matrices binarias  $C \times F$ , donde cada renglón (C) representa las células activas y cada columna (F) denota cada cuadro del video (*rasters plots*). Los registros se inspeccionaron manualmente para remover artefactos y los transitorios de calcio lentos, pues éstos corresponden a actividad de células gliales (Ikegaya et al., 2004; Sasaki et al., 2007; Carrillo-Reid et al., 2008; Peña et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016).

### **Análisis de correlación cruzada**

Para el análisis de relaciones funcionales entre las células, se realizó una correlación cruzada entre todos los pares de neuronas presentes en todos los ensambles (Carrillo-Reid et al., 2008; Carrillo-Reid et al., 2015). utilizando la función *crosscorr* de Matlab (Nieto-Posadas et al., 2014). Asumimos que dos células tuvieron una relación funcional si presentan valores altos de correlación cruzada en un tiempo cero de retraso (Ikegaya et al., 2004; Sasaki et al., 2007; Carrillo-Reid et al., 2008; Peña et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016),

### **Métricas de la Teoría de grafos**

La teoría de grafos es una construcción matemática que permite estudiar las relaciones de la actividad y topología de una red, además de detectar anomalías de conectividad (Rubinov y Sporns, 2010). El primer paso del análisis es la construcción de un gráfico a partir de las matrices de correlación (Nieto-Posadas et al., 2014). Los gráficos se pueden definir tomando a cada neurona con actividad como nodo ( $n$ ) y a la población de neuronas activas como "N". Las conexiones presentes entre dos nodos se definieron como "l" y al total de conexiones en la red se definió como "L". Por lo tanto  $(i,j)$  representa la conexión

entre el nodo  $i$  y el nodo  $j$ , ( $i, j \in N$ ). Entonces una conexión entre los nodos  $i$  y el nodo  $j$  se representa como  $a_{ij}$  donde  $a_{ij}=1$  si la conexión existe y en el caso contrario  $a_{ij}=0$ , esto produjo un gráfico no ponderado (binario), no dirigido, representado como una matriz de adyacencia. Como ya se mencionó, para este conjunto de datos, utilizamos la correlación cruzada para estimar la conectividad. Se utilizaron métodos de gráficos binarios, ya que son computacionalmente sencillos (Rubinov y Sporns, 2010) y proporcionan una interpretación más simple (Kaiser, 2011). Los gráficos se construyeron a partir de la matriz de correlación de cada rebanada. Del gráfico se calculó el número de conexiones con la siguiente fórmula:  $l = \sum_{i,j \in N} a_{ij}$  (Rubinov y Sporns, 2010). Para evitar ambigüedades en la dirección de la conexión, se contó dos veces cada conexión una como  $a_{ij}$  y otra como  $a_{ji}$ . El grado de conexión de un nodo  $i$ , representa el número total de conexiones que tiene un nodo y se calculó con la siguiente fórmula:  $k_i = \sum_{j \in N} a_{ij}$ . El camino más corto entre dos nodos (Distancia) se calculó con la siguiente fórmula:  $d_{ij} = \sum_{a_{uv} \in g_{i \leftrightarrow j}} a_{uv}$  donde  $g_{i \leftrightarrow j}$  es el camino más corto entre los nodos  $i$  y  $j$ , considerando como  $d_{ij}=\infty$  si ambos nodos están desconectados (Rubinov y Sporns, 2010). La distancia característica de la red se calculó con la siguiente fórmula:  $L = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} L_i = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{\sum_{j \in N, j \neq i} d_{ij}}{n-1}$  en donde  $L_i$  es el promedio de las distancias entre el nodo  $i$  y todos los demás nodos (Watts y Strogats, 1998). Finalmente, el coeficiente de agrupamiento de la red se calculó con la siguiente fórmula:  $C = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} C_i = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{2t_i}{k_i(k_i-1)}$ , donde  $C_i$  es el coeficiente de agrupamiento del  $i$ ésimo nodo ( $C_i = 0$  para  $K_i < 2$ ),  $t_i$  es número de triángulos alrededor del nodo  $i$   $t_i = \frac{1}{2} \sum_{j,h \in N} a_{ij} a_{ih} a_{jh}$  (Watts y Strogats, 1998; Rubinov y Sporns, 2010). Este valor se normaliza por el grado  $k$  en cada nodo o colectivamente por grado medio  $K$ . Este último se refiere a veces a como transitividad, que se calcula con la siguiente fórmula:  $I = \frac{\sum_i 2t_i}{\sum_i k_i(k_i-1)}$  (Newman, 2003). Las variables  $L$  y  $C$  son medidas de integración y segregación, respectivamente, y proporcionan buenos resúmenes del

comportamiento de los gráficos. Sin embargo, no capturan cómo los gráficos se integran dentro de los módulos (o subredes) y se segregan entre los módulos. Para ello, la modularidad captura esta característica y se define como la capacidad de un gráfico para subdividirse en módulos que están conectados al máximo dentro de un módulo y escasamente conectados entre módulos (Newman y Girvan, 2004).

Computacionalmente, se calcula con la siguiente fórmula:  $Q = \sum_{i \in M} \left[ c_{ii} - \left( \sum_{j \in M} c_{ij} \right)^2 \right]$ , donde  $i$  y  $j$  son módulos individuales en el conjunto de todos los

módulos  $M$ , y  $c$  es la proporción de conexiones existentes entre 2 módulos (Dosenbach et al., 2010). Además de las métricas descritas anteriormente, una propiedad gráfica adicionalmente interesante es la tendencia de un pequeño número de nodos a servir como "Hub". Un hub se puede definir como un nodo que tiene muchas conexiones importantes que lo atraviesan (es decir, es un miembro de la ruta más corta entre muchos nodos) denominada intermediación (Betweenness;

B) La intermediación se calcula con la siguiente fórmula:  $B_i = \frac{1}{(n-1)(n-2)} \sum_{h \neq j, h \neq i, j \neq i, h} \frac{\rho_{hj}(i)}{\rho_{hj}}$ , donde  $\rho_{hj}$  es el número de caminos más

cortos entre  $h$  y  $j$  y  $\rho_{hj}(i)$  es el número de esos caminos que pasan por  $i$ . Los valores grandes de  $B_i$  indican que una gran cantidad de rutas más cortas atraviesan el nodo  $i$ , que lo identifica como un hub (van den Heuvel et al., 2008; Bonifazi et al., 2009; Hojjati et al., 2019). Todas las métricas se calcularon usando la caja de herramientas de conectividad cerebral (Rubinov y Sporns, 2010)

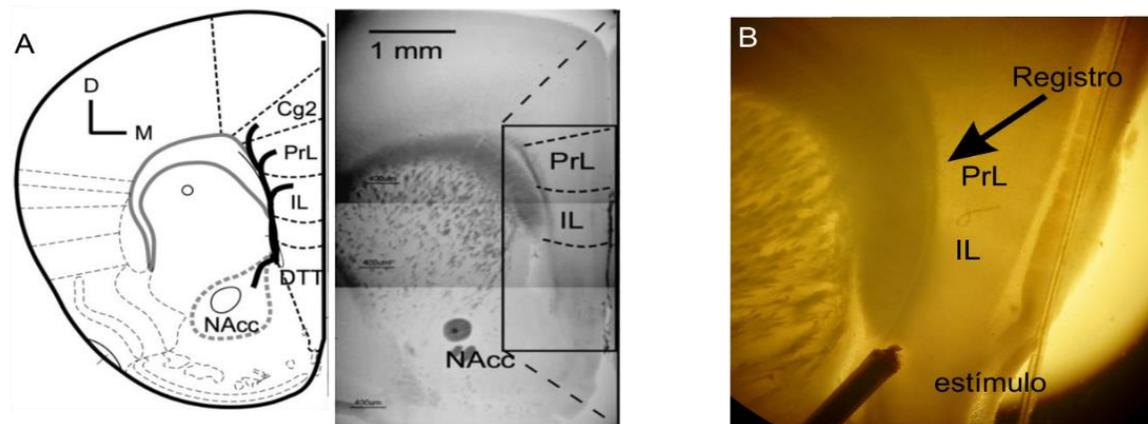
En todos los casos se muestran los datos como el promedio y el error estándar. Las diferencias entre los grupos se evaluaron con la prueba t de student pareada para los datos crudos y la prueba de Wilcoxon para los datos normalizados, se consideró como significativa una diferencia con una  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Rebanada de la corteza prefrontal medial

Para estudiar la integración sináptica de la vía HPC-PFC, se estandarizó la obtención de la rebanada de CPF descrita por Parent y colaboradores, en donde se encuentran las fibras provenientes del hipocampo ventral en una rebanada semicoronal que contiene a la PFC (Fig. 3). En esta preparación se puede identificar

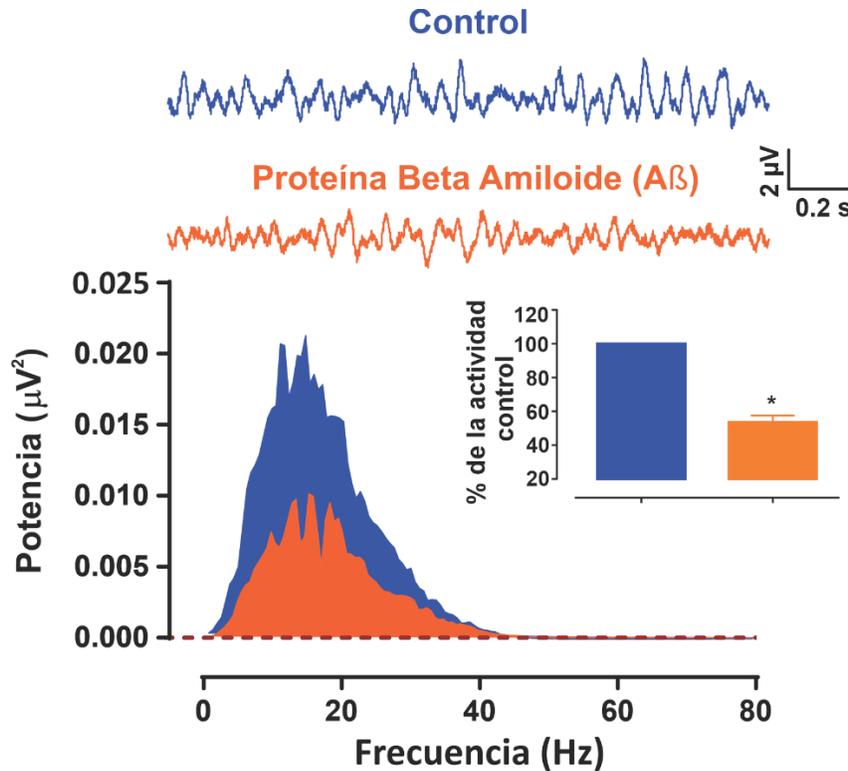
un paquete de axones que contienen fibras extra-neocorticales que proyectan a la PFC en la región prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) (Fig. 3A), que previamente se ha demostrado provienen del hipocampo (Parent et al., 2010). Como ya se mencionó, esta vía entre el Hipocampo ventral y la mPFC es de importancia crítica para la integración de información mPFC necesaria para una amplia variedad de procesos cognitivos (Seamans et al., 1995; Goto y O'Donnell, 2003; Goto y Grace, 2008).



**Figura 3 Preparación de la rebanada de corteza prefrontal que mantiene su entrada hipocampal.** (A) Representación esquemática (izquierda) del corte de cerebro de rata correspondiente a la sección de la corteza prefrontal contenida en la rebanada obtenida con la técnica desarrollada por Parent et al., 2010. Imagen de campo brillante (derecha) del corte coronal modificado por Parent et al., 2010, que contiene las cortezas prelímbica (PrL) e infralímbica (IL). (B) Fotografía de la misma rebanada obtenida en nuestro laboratorio que, además muestra las ubicaciones de los electrodos de estimulación y de registro (indicado con una flecha).

### Actividad espontánea de la corteza prefrontal

Una vez estandarizada la preparación del corte coronal que contuviera la PFC y su entrada hipocampal, procedimos a registrar la actividad espontánea poblacional de la PFC en esta preparación y probamos el efecto de la  $A\beta$  sobre la misma (Fig. 4). Los registros de la actividad espontánea poblacional de la PFC muestran componentes en una gran diversidad de frecuencias (Fig. 4;  $n=10$ ). Además, tal y como ocurre en otros circuitos neuronales (Gabbott et al., 2002; Tierney et al., 2004; Hyman et al., 2010; Wang et al., 2006; Goveas et al., 2011; Zarei et al., 2013; Maingret et al., 2016; Balleza-Tapia et al., 2010; Adaya-Villanueva et al., 2010; Peña et al., 2002; Peña et al., 2010), la actividad poblacional de la PFC se reduce con la aplicación de 30 nM de la  $A\beta$  (Fig. 4). El análisis de la potencia (de 1 a 120 Hz) mostró una reducción significativa de la actividad espontánea de la PFC de  $53.6 \pm 1.8\%$  de la actividad basal (considerada como 100%;  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ), 60 min después de la presencia continua de la  $A\beta$  en el baño de registro (Fig. 4).

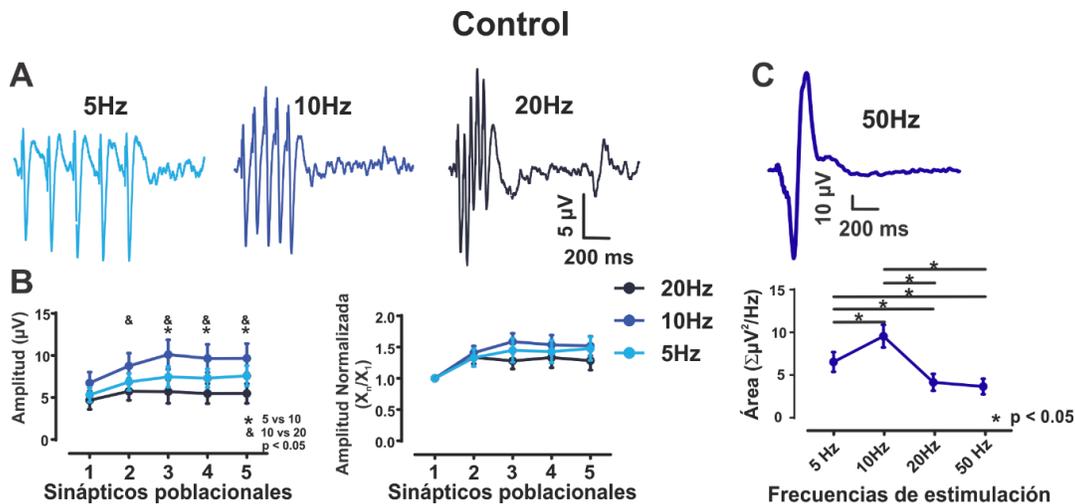


**Figura 4. La A $\beta$  inhibe la actividad espontánea poblacional de la corteza prefrontal.** En la parte superior, se muestran los trazos representativos de la actividad espontánea de la PFC registrada en condiciones basales (trazos azules) y después de 60 min de la presencia continua de la A $\beta$  (30 nM; trazo naranja). Los correspondientes espectros de potencia se muestran en la parte inferior, y el poder integrado y normalizado (como porcentaje de la actividad control) se muestra como una inserción. Es evidente que la aplicación la A $\beta$  reduce significativamente la potencia de la actividad espontánea poblacional de la PFC. Los datos se presentan como el promedio y el error estándar de una n=5. \* denota una diferencia significativa comparada con la actividad de control ( $p < 0.05$ ).

### Plasticidad a corto plazo

Después de la caracterización de la actividad espontánea de la PFC en la rebanada de cerebro desarrollada por Parent y colaboradores (2010) y de evaluar el efecto de la A $\beta$  sobre la misma se procedió al registro de las respuestas sinápticas poblacionales provocadas en la PFC por la activación de la entrada hipocampal a diferentes frecuencias de estimulación. La estimulación repetitiva de las fibras del hipocampo induce trenes de potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP, por sus siglas en inglés) en la PFC que muestran diferentes grados de facilitación dependiendo de la frecuencia de estimulación (Figura 5A; Stone et al., 2011). Por ejemplo, la amplitud del quinto fEPSP aumenta a  $148.56 \pm 20.87\%$  en proporción del primer fEPSP cuando la estimulación se aplica a 5 Hz (Figura 5B). Cuando la estimulación se aplica a 10 Hz, la amplitud del quinto fEPSP aumenta a  $162.7 \pm 14.8\%$  en proporción del primer fEPSP (Figura 5B). Cuando la estimulación

se aplica a 20 Hz, la amplitud del quinto fEPSP aumenta solo hasta  $128.45 \pm 15.3\%$  en proporción del primer fEPSP (Figura 5B). Además, cuando se aplicó la estimulación a 50 Hz, los fEPSP individuales se mezclaron en un fEPSP "compuesto" que no permite que los fEPSP individuales se evalúen con precisión. Así, en este caso, cuantificamos la amplitud máxima del fEPSP compuesto ( $21.07 \pm 7.12 \mu\text{V}$ ; Figura 5C).



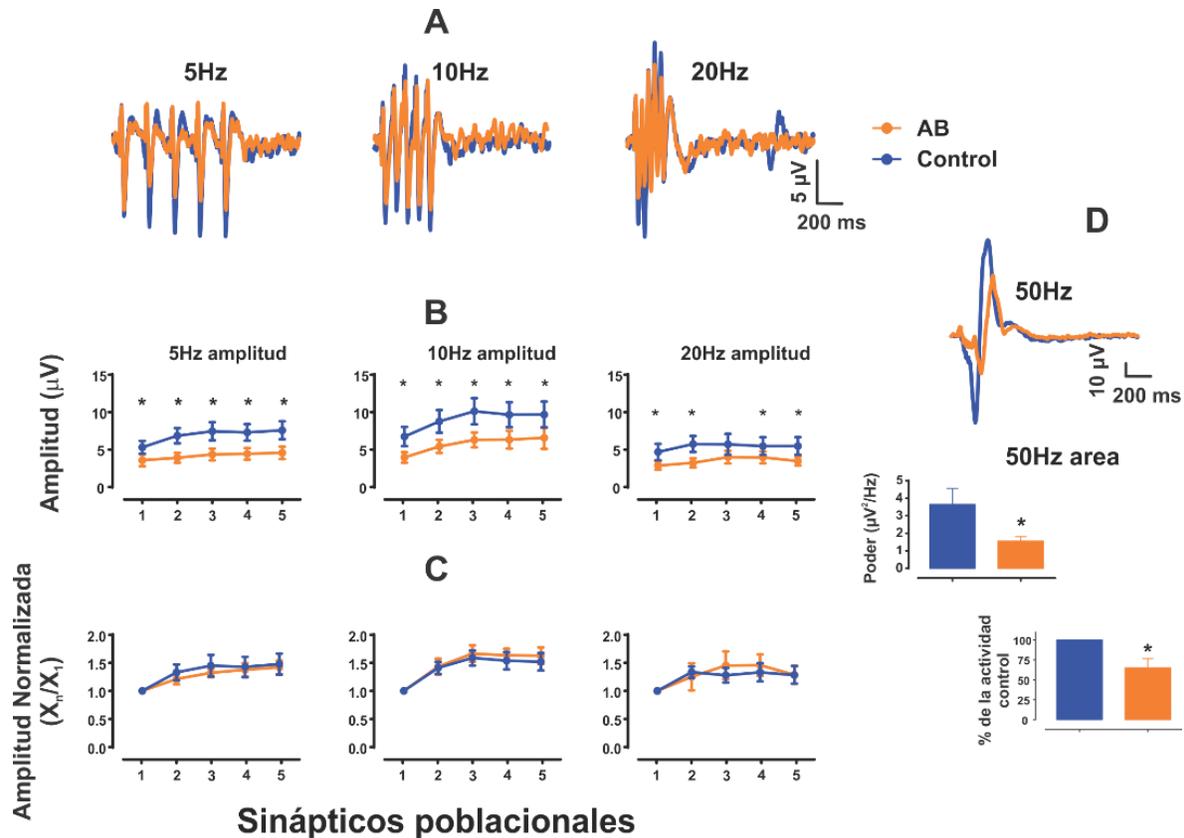
**Figura 5. Integración de la respuesta sináptica poblacional de las fibras del hipocampo en la corteza prefrontal.** En el panel A, se muestran los trazos representativos de la respuesta poblacional a un tren de 5 pulsos. En el panel B (izquierdo), se compara la cuantificación de la amplitud de las respuestas sinápticas en respuesta a trenes de 5, 10 y 20 Hz, en la gráfica de la derecha se comparan las respuestas normalizadas de la amplitud (con respecto a la del primer sináptico del tren). En el panel C superior se muestra la respuesta poblacional a la estimulación de 50 Hz. Note que se genera una respuesta sináptica compuesta en la que los elementos individuales no se pueden distinguir. En la parte inferior del panel C se muestra la cuantificación del área de las respuestas sinápticas provocadas por cada frecuencia de estimulación. Los gráficos representan el promedio y el error estándar de una  $n=8$  y los \* representan una diferencia estadística, se utilizó la prueba t de student pareada para los gráficos de la cuantificación de la amplitud y del área y una prueba de Wilcoxon para los datos normalizados, ambas con una  $p < 0.05$ .

Al comparar las áreas bajo la curva de los 5 fEPSPs encontramos que la mayor área total se encuentra a los 10 Hz ( $6.53 \pm 1.15 \mu\text{V}^2$ ; Figura 5C) y la menor a los 50 Hz ( $3.65 \pm 0.90 \mu\text{V}^2$ ; Figura 6C). Al comparar las diferentes frecuencias de estimulación encontramos un incremento del doble en el área de los 5 Hz a los 10 Hz ( $9.55 \pm 1.32 \mu\text{V}^2$ ; Figura 5C), después de los 10 Hz a los 20 Hz ( $4.15 \pm 0.98 \mu\text{V}^2$ ; Figura 5C) cae el área aproximadamente al mismo valor que observamos con la estimulación a los 5Hz y, finalmente, la estimulación a los 50 Hz tiene la menor área de todas las frecuencias de estimulación (Fig. 5 panel C). Estos resultados nos indican que, probablemente, durante la estimulación a altas frecuencias los fEPSPs son disminuidos por la aparición de una inhibición proveniente del reclutamiento de

interneuronas GABAérgicas que responden preferencialmente a la estimulación a altas frecuencias (Stone et al., 2011).

### Efecto de la $A\beta$ sobre la plasticidad a corto plazo

Después de caracterizar las respuestas sinápticas, dependientes de la frecuencia de estimulación (Stone et al., 2011), en la entrada del hipocampo a la PFC, procedimos a evaluar el efecto de la  $A\beta$  sobre las mismas. La aplicación de la  $A\beta$  30 nM, en el baño de registro, reduce la amplitud de los fEPSP inducidos por todas las frecuencias de estimulación (Fig. 6A-B), así como la del fEPSP compuesto inducido por la estimulación de la entrada hipocampal a 50 Hz (Fig. 6D). La inhibición inducida por la  $A\beta$  sobre los fEPSPs ocurre independientemente de la frecuencia de estimulación o del orden de los fEPSPs dentro del tren (1 a 5 pulsos; Figura 6B;  $p < 0.05$ ). Por ejemplo, la amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 5 Hz tuvo una amplitud de  $7.31 \pm 1.30 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 6B) y se redujo a  $3.87 \pm 0.48 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la  $A\beta$  (Fig. 6B). La amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 10 Hz tuvo una amplitud de  $9.06 \pm 1.83 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 6B) y se redujo a  $5.32 \pm 0.86 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la  $A\beta$  (Fig. 6B). La amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 20 Hz tuvo una amplitud de  $5.48 \pm 1.17 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 6B) y se redujo a  $3.47 \pm 0.60 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la  $A\beta$  (Fig. 6B). La única excepción a esta inhibición generalizada de la transmisión sináptica de la entrada hipocampal en la PFC inducida por la  $A\beta$  ocurrió en el tercer fEPSP de la estimulación aplicada a 20 Hz ( $81.75 \pm 12.95$  % del control, Figura 6B;  $p > 0.05$ ). La reducción generalizada en la transmisión sináptica producida por la aplicación de la  $A\beta$  en el baño no correlacionó con cambio alguno en la facilitación sináptica para ninguno de los trenes de fEPSP evocados a 5, 10 o 20 Hz (Fig. 6B  $p < 0.05$ ). Esto se puede ver más claramente cuando la amplitud de cada fEPSP en el tren se normaliza con respecto a la amplitud del primer fEPSP (Fig. 6C). Las curvas normalizadas de los fEPSP en presencia y ausencia de la  $A\beta$  se sobrepusieron por completo (Fig. 6C). En el caso del fEPSP compuesto inducido por la estimulación a 50 Hz, la aplicación de la  $A\beta$  redujo significativamente la amplitud máxima a  $62.49 \pm 14.12$ % de la que tenía en condiciones control (Fig. 6D;  $p < 0.05$ ). Por lo tanto, estos resultados indican que la aplicación de la  $A\beta$ , en el baño de registro, produce una reducción generalizada de la transmisión sináptica proporcionada por el hipocampo a la PFC.

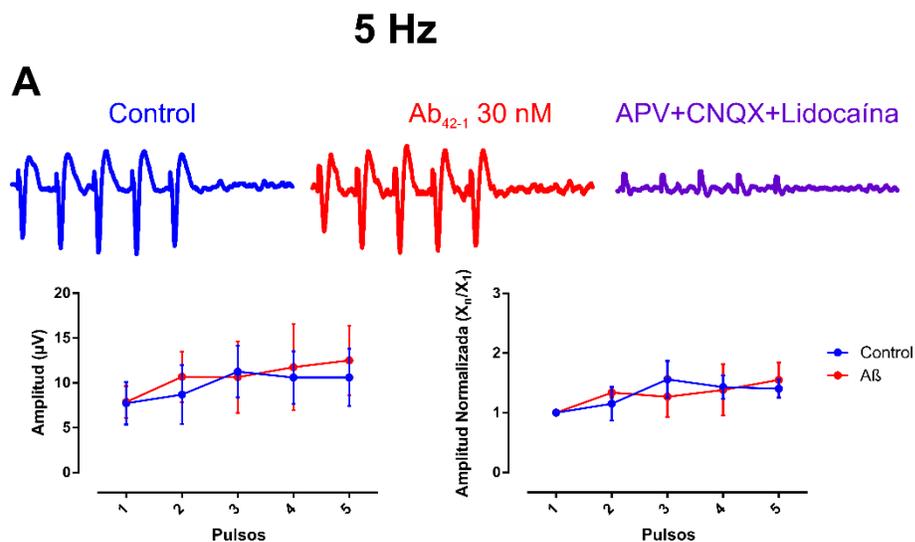


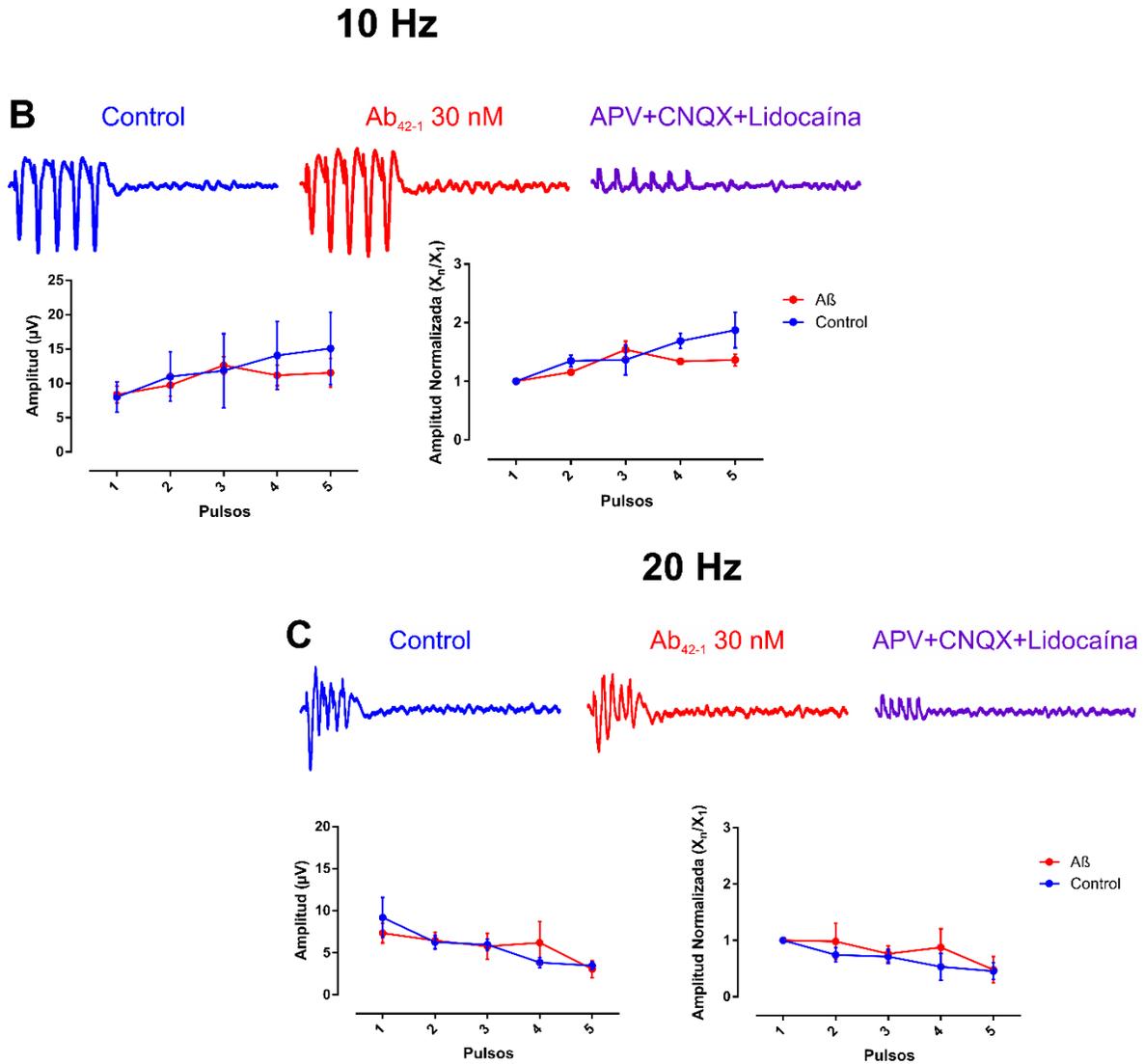
**Figura 6. Efecto de la  $A\beta$  sobre la integración sináptica poblacional de la vía HPC-PFC.** En el panel A, se muestran los trazos representativos de la respuesta poblacional en la PFC a un tren de 5 pulsos de estimulación a frecuencias de 5, 10 y 20 Hz. Los trazos azules corresponden a las condiciones control y los trazos naranjas corresponden a la presencia de la  $A\beta$ . En el panel B se muestra la cuantificación de la amplitud de las respuestas sinápticas (mismo código de colores). En el panel C se presenta la normalización de la amplitud de cada sináptico poblacional con respecto a la primera respuesta sináptica (mismo código de colores). En los paneles B y C se muestra la respuesta con una estimulación a 5 Hz a la izquierda, la respuesta a 10 Hz en el centro y la respuesta con una estimulación a 20 Hz a la derecha. En el panel D se muestra, en la parte superior, el trazo representativo de la respuesta sináptica compuesta con la estimulación a 50 Hz. El trazo azul corresponde a las condiciones control y el trazo naranja corresponde a la presencia de la  $A\beta$ . En la parte inferior se muestra la cuantificación del área bajo la curva (en valores absolutos y normalizados) de la respuesta sináptica compuesta (mismo código de colores). Los gráficos representan el promedio y el error estándar, de una  $n=10$ , y los \* representan una diferencia estadísticamente significativa comparados contra el control ( $p<0.05$ ).

### Efecto de la secuencia inversa de la $A\beta$ sobre la plasticidad a corto plazo

Para evaluar la especificidad del efecto de la secuencia patológica de la  $A\beta$  sobre la transmisión sináptica, se aplicó la secuencia inversa de la  $A\beta$  ( $A\beta_{42-1}$ ;  $n=3$ ) para observar su efecto y cuantificar si afectada la respuesta sináptica, dependiente de la frecuencia de estimulación (Stone et al., 2011), de la entrada del hipocampo a la PFC. Tal y como se ha demostrado en trabajos previos (Balleza-Tapia et al., 2010; Hernández-Soto et al., 2019; Peña-Ortega, 2019), la aplicación de 30 nM en el baño de la  $A\beta_{42-1}$ , no modificó la amplitud de los fEPSP inducidos por estimulación de la

entrada hipocampal (Fig. 7, Test de Wilcoxon). Por ejemplo, la amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 5 Hz tuvo una amplitud de  $11.91 \pm 4.17 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 7) y se mantuvo en  $11.21 \pm 2.92 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la secuencia inversa de la  $A\beta_{42-1}$  (Fig. 7). La amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 10 Hz tuvo una amplitud de  $12.02 \pm 1.64 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 7) y se mantuvo en  $14.60 \pm 5.58 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la secuencia inversa de la  $A\beta_{42-1}$  (Fig. 7). La amplitud del quinto fEPSP cuando se estimuló a 20 Hz tuvo una amplitud de  $2.82 \pm 0.81 \mu V^2$  en condiciones control (Fig. 7) y se mantuvo en  $3.70 \pm 0.66 \mu V^2$  después de 60 min de la presencia continua de la secuencia inversa de la  $A\beta_{42-1}$  (Fig. 7). En el caso del fEPSP compuesto inducido por la estimulación a 50 Hz, la aplicación de la  $A\beta$  no redujo significativamente su amplitud máxima (Fig. 7;  $p < 0.05$ ). Como era de esperarse, tampoco existió cambio en la facilitación de la respuesta sináptica para los trenes de fEPSP evocados a 5, 10 o 20 Hz (Fig. 7). Al evaluar la actividad normalizada con respecto a la amplitud del primer fEPSP (Fig. 7) no se encontró cambio al comparar la respuesta control con la respuesta en presencia de la  $A\beta_{42-1}$ . Por lo tanto, estos resultados indican que los efectos de la  $A\beta$  sobre la transmisión sináptica entre el hipocampo y la PFC son específicos de la secuencia acumulada en la AD y no pueden ser reproducidos por su secuencia inversa.





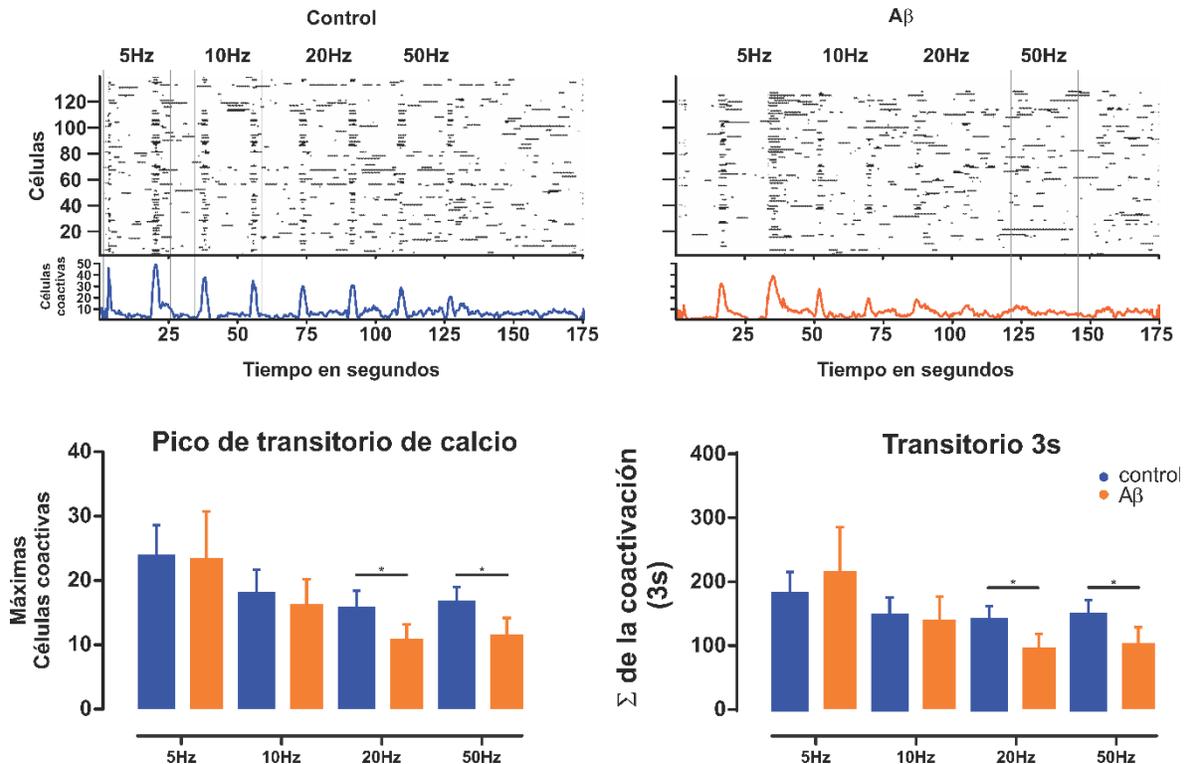
**Figura 7. Efecto de la secuencia inversa de la  $A\beta$  sobre la integración sináptica poblacional de la vía HPC-PFC.** En la parte superior de cada panel, se muestran los trazos representativos de la respuesta sináptica poblacional a un tren de 5 pulsos a las diferentes frecuencias indicadas. Los trazos azules corresponden a las condiciones control y los trazos rojos corresponden a la presencia de la secuencia inversa de la  $A\beta$  30 nM y los trazos lilas corresponden a la presencia de lidocaína 1 mM. En las gráficas de cada panel se muestra la cuantificación de la amplitud de las respuestas sinápticas a la derecha y la normalización de la amplitud de cada espiga poblacional, con respecto a la primera poblacional, a la izquierda sináptica (mismo código de colores). En el panel A se muestra la respuesta con una estimulación a 5 Hz, en el panel B, se presenta la actividad provocada con una estimulación a 10 Hz, en el panel C, se observa la actividad generada bajo una estimulación a 20 Hz. Los gráficos representan el promedio y el error estándar de una  $n=3$  y los \* representan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p<0.05$ ).

### Reclutamiento de las neuronas de la corteza prefrontal y el efecto de la $A\beta$ sobre el reclutamiento.

Se evaluó a nivel poblacional, pero con resolución unicelular la activación de la PFC por la estimulación de la entrada hipocámpal y el efecto de la  $A\beta$  sobre la misma (Fig. 9). Para ello, se cuantificaron los transitorios de calcio simultáneos

(coactivaciones) generados por las neuronas de la PFC y su respuesta a la aplicación de la estimulación de la entrada del hipocampo a diferentes frecuencias. Se define como una coactivación a la presencia de un transitorio de calcio en un par de neuronas (o más) en el mismo instante de tiempo (250 ms; Carrillo-Rei et al., 2008; Peña et al., 2010). Primero, se evaluó el pico máximo de coactivación y encontramos que la estimulación de las fibras del hipocampo recluta y sincroniza a las neuronas de la PFC, aumentando sus transitorios de calcio y coactivaciones durante varios segundos (Fig. 8). Coincidentemente, encontramos una respuesta similar, pero no idéntica, a la mostrada por los potenciales sinápticos poblacionales, que exhibieron un reclutamiento que dependió de la frecuencia de estimulación (Stone et al., 2011; Fig. 8 panel superior). En condiciones de control, se reclutó simultáneamente un número máximo de neuronas de la PFC cuando las fibras del hipocampo se estimularon a 5 Hz ( $23.5 \pm 4.9$  neuronas;  $n = 5$  rebanadas; Figura 8). Este reclutamiento de células se reduce significativamente cuando la estimulación se aplica a 10 Hz ( $17.6 \pm 3.8$  neuronas), a 20 Hz ( $15.4 \pm 2.2$  neuronas) y, finalmente, a 50 Hz ( $16.3 \pm 2.4$  neuronas) (Fig. 8). De manera similar, pero no idéntica, a lo que ocurrió con las respuestas sinápticas poblacionales, el número de neuronas de la PFC reclutadas por la estimulación de las fibras del hipocampo se reduce en presencia de la  $A\beta$  (Fig. 8), en comparación con las condiciones de control. Cuando se estimuló la entrada hipocampal a baja frecuencia, la disminución de las respuestas unicelulares no fue significativa (Wilcoxon test  $p > 0.05$ ) ni cuando se estimuló a 5 Hz ( $9.46 \pm 4.49\%$ ), ni a 10 Hz ( $7.62 \pm 2.40\%$ ). Sin embargo, la reducción del número de neuronas de la PFC reclutadas en presencia de la  $A\beta$  fue significativa cuando estimuló la entrada hipocampal a 20 Hz ( $22.2 \pm 2.55\%$ ) y a 50 Hz ( $14.4 \pm 2.91\%$ ), presentaron diferencia significativa. También se evaluaron la cantidad de coactivaciones en un periodo de 3s (12 bins de 250 ms) inmediatamente después del estímulo de la entrada hipocampal encontrando que para la estimulación a 5 Hz generó un número similar de coactivaciones en condiciones control y en presencia de la  $A\beta$  ( $180.60 \pm 3.32$  y  $216.50 \pm 4.68$ , respectivamente; Fig. 8). La estimulación a 10 Hz generó un número similar de coactivaciones en condiciones control y en presencia de la  $A\beta$  ( $146.90 \pm 3.01$  y  $141.30 \pm 3.44$ , respectivamente; Fig. 8). En contraste, cuando la estimulación de la entrada hipocampal se realizó a 20 Hz el número de coactivaciones se redujo significativamente en presencia de la  $A\beta$  en comparación a las condiciones control ( $97.00 \pm 2.58$  y  $140.00 \pm 2.64$ , respectivamente; Fig. 8). Cuando la estimulación de la entrada hipocampal se realizó a 50 Hz el número de coactivaciones se redujo significativamente en

presencia de la  $A\beta$  en comparación a las condiciones control ( $104.70 \pm 2.76$  y  $148.40 \pm 2.66$ , respectivamente; Fig. 8).

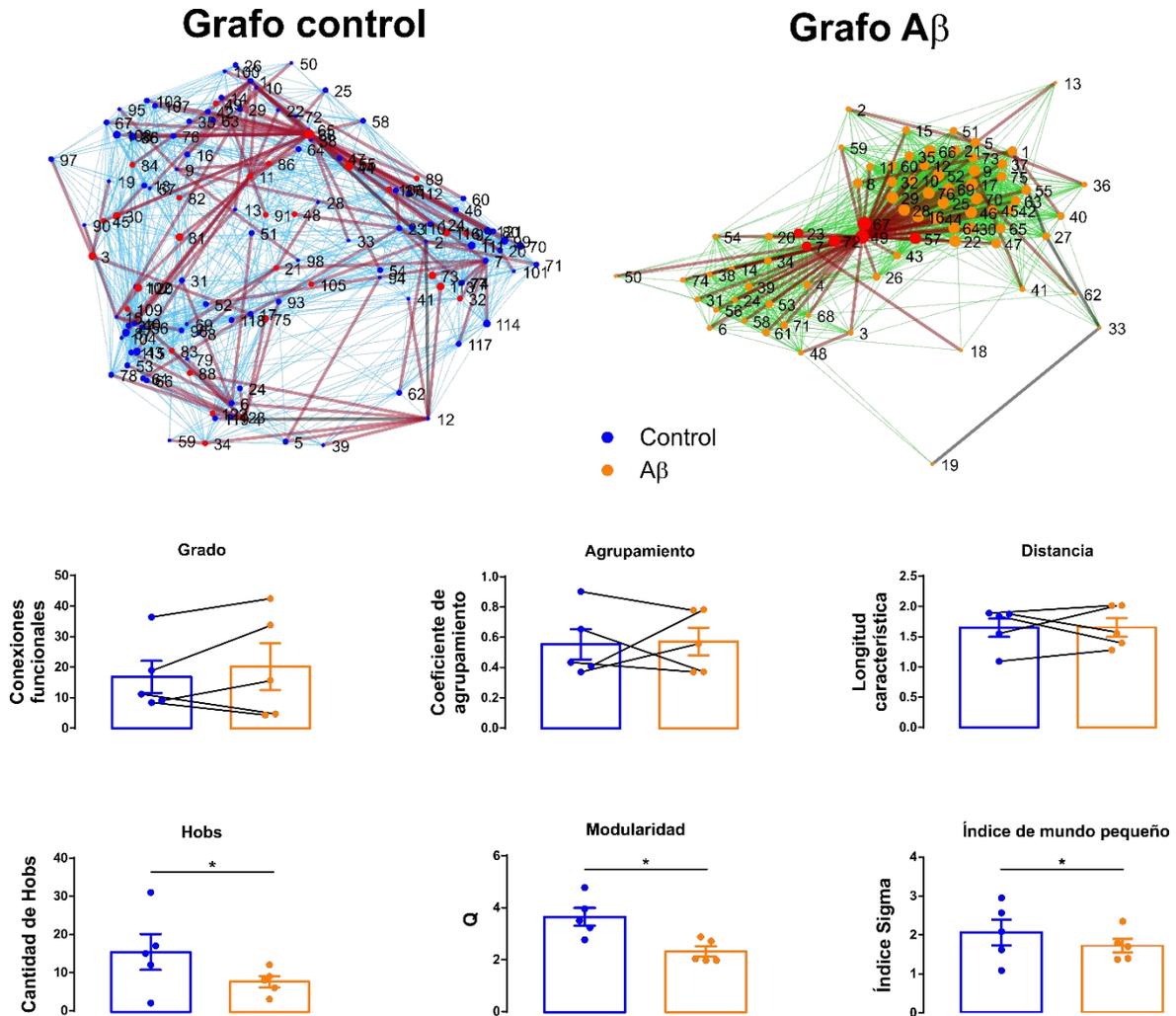


**Figura 8. La proteína  $A\beta$  inhibe el reclutamiento y sincronización de las neuronas del PFC por la estimulación de la entrada del hipocampo.** Panel superior, rasters plots representativos de la actividad de las neuronas de la PFC y su respuesta a la estimulación de las fibras provenientes del hipocampo antes (Control, izquierda) y después de la aplicación de la  $A\beta$  (derecha). En los rasters plots, cada fila representa la actividad de una sola célula y cada marca representa una activación celular (p.e. un transitorio de calcio). En la parte inferior, se muestra el número máximo de neuronas coactivas en el pico del transitorio, la sumatoria de la actividad para la condición control se muestra en azul y la sumatoria de la actividad en presencia de la  $A\beta$  se muestra en naranja. Las gráficas representan los promedios del reclutamiento del número de máximo neuronas coactivas (izquierda) y la sumatoria de coactivaciones en 3 s (derecha) para cada frecuencia de estimulación en la condición control (azul) y en presencia de la  $A\beta$  (naranja). Note que la aplicación de la  $A\beta$  reduce significativamente el reclutamiento sincronizado de las neuronas de la PFC cuando se estimuló la entrada hipocámpal a altas frecuencias. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. \* representan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ) ( $n = 5$  rebanadas)

### Dinámica del circuito de la corteza prefrontal y el efecto de la $A\beta$ .

Finalmente, con base en la evaluación de la correlación cruzada de los transitorios de calcio entre pares de neuronas, se evaluó la organización del circuito de la PFC a través de la teoría de grafos, con la finalidad de evaluar los posibles cambios en la configuración de la red de la PFC debido a la aplicación de la proteína  $A\beta$  (Fig. 9 panel superior). Lo primero que observamos es que la PFC muestra un número similar de conexiones funcionales para cada uno de sus nodos (neuronas) en condiciones control, lo que se refleja en una distribución homogénea en el tamaño

de los nodos (Fig. 9 panel superior izquierdo). También se observa que la red funcional de la PFC muestra un número considerable de nodos que se consideran hubs (Fig. 9 panel superior izquierdo: nodos rojos). Sin embargo, al observar el grafo representativo en presencia de la proteína  $A\beta$  (Fig. 9 panel superior derecha), se observa la concentración de la red en un bloque con algunos nodos hiperconectados y el agrupamiento de los nodos tipo hubs, mismos que se encuentran en una menor proporción que en el grafo control (Fig. 9 panel superior derecha). Al cuantificar la cantidad de conexiones promedio por nodo, encontramos que es similar entre los grafos en condiciones encontramos y aquellos en presencia de la proteína  $A\beta$  ( $16.79 \pm 5.25$  y  $16.79 \pm 5.25$ , respectivamente; Fig. 9). Sin embargo, como muestran las líneas negras que unen los resultados de cada experimento, 3 de los 5 experimentos presentan un incremento en la cantidad de conexiones promedio en presencia de la proteína  $A\beta$ . Al cuantificar la cantidad de hubs en los grafos control y en los grafos en presencia de la proteína  $A\beta$ , observamos una disminución significativa en la cantidad de los mismos ( $15.40 \pm 4.68$  vs  $7.60 \pm 1.50$ ; Wilcoxon test  $p < 0.05$ ). Al cuantificar las métricas de integración (distancia) y segregación (coeficiente de agrupamiento) de la red, esperábamos un incremento en la distancia característica y una disminución en el coeficiente de agrupamiento en los grafos en presencia de la proteína  $A\beta$ , sin embargo, en ambos casos encontramos que ninguno cambió entre los grafos control (distancia=  $1.87 \pm 0.18$ ; coeficiente de agrupamiento=  $0.56 \pm 0.10$ ) y los grafos en presencia de la proteína  $A\beta$  (distancia=  $1.96 \pm 0.22$ ; coeficiente de agrupamiento=  $0.57 \pm 0.09$ ). Finalmente, se cuantificó la modularidad y el comportamiento de mundo pequeño de la red de la PFC antes y después de la aplicación de la proteína  $A\beta$ . Estas métricas se utilizaron debido a que, si bien la longitud característica es una medida de integración de la red y el coeficiente de agrupamiento es una medida de segregación de la red y ambas proporcionan buenos resúmenes del comportamiento de los gráficos, ambas mediciones no capturan de manera precisa cómo los gráficos se integran dentro



**Figura 9. Efecto de la proteína A $\beta$  sobre la topología de la red de la PFC.** Panel superior, grafos representativos del circuito de la PFC, los círculos representan los nodos de la red, el tamaño de cada círculo representa la cantidad de conexiones funcionales de cada nodo, los círculos rojos son los nodos con mayor importancia de la red (hubs), las líneas rojas son la conexión entre los nodos de mayor importancia y todos los nodos de la red, las líneas negras representan la conexiones entre los nodos más alejados de la red, los números representan la posición de la célula en el raster (Fig. 9). En la parte inferior, se muestra la cuantificación de las diferentes métricas para la determinación de la topología de la red de la PFC. Las gráficas representan los promedios y el error estándar para cada métrica cuantificada (grado promedio, coeficiente de agrupamiento, longitud característica, modularidad y cantidad de hubs e índice de mundo pequeño), los puntos representan el valor promedio para cada experimento y las líneas negras (graficas grado promedio, coeficiente de agrupamiento, longitud característica) indican el cambio entre condiciones experimentales. Las cuantificaciones de la red en condición control se muestran en azul y aquellas en presencia de la A $\beta$  en color naranja. Note que la aplicación de la A $\beta$  reduce significativamente la cantidad de hubs, la modularidad y el índice de mundo pequeño del circuito de la PFC. Los \* representan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ;  $n = 5$  rebanadas)

de los módulos (o subredes) y se segregan entre los módulos. La modularidad captura la característica de un gráfico para subdividirse en subredes que están conectadas al máximo dentro de un módulo (Newman y Girvan, 2004). La cuantificación de la modularidad de la red de la PFC en presencia de la proteína A $\beta$

muestra una disminución significativa en comparación con la red control ( $2.32 \pm 0.20$  y  $3.65 \pm 0.34$ , respectivamente), la cual correlaciona con lo observado en los grafos representativos en donde se observa, como ya se mencionó al inicio de este párrafo, dos grandes grupos en el grafo en presencia de la proteína  $A\beta$  (Fig. 9 panel superior derecho) a diferencia del grafo control en donde se pueden observar más de dos módulos (Fig. 9 panel superior izquierdo). El índice de mundo pequeño representa el balance entre la integración y la segmentación, maximizando tanto la eficiencia global como nodal (Dennis y Thompson, 2014). Se ha sugerido que una arquitectura de red similar a un mundo pequeño puede ser óptima para sincronizar la actividad neuronal entre diferentes regiones del cerebro (Latora y Marchiori, 2001; Masuda y Aihara, 2004). Al cuantificar el índice de mundo pequeño encontramos un valor de sigma mayor a 1 tanto en los grafos en condiciones control, como en aquellos en presencia de la proteína  $A\beta$ , con lo cual corroboramos que en ambas condiciones experimentales las correlaciones entre las neuronas prefrontales forman una red de mundo pequeño. Este tipo de comportamiento optimiza el funcionamiento de la red. Por el contrario, el índice de mundo pequeño se encuentra disminuido significativamente en presencia de la proteína  $A\beta$  en comparación a las condiciones control ( $1.72 \pm 0.17$  y  $2.06 \pm 0.33$ , respectivamente). Este resultado confirma lo descrito en diversos estudios en el que se analizan las redes neuronales de los pacientes con la AD (Stam et al., 2007; de Haan et al., 2009; Xiang et al., 2013; Toussaint et al., 2014; Wang et al., 2016; Miraglia et al., 2016).

## Discusión

El hipocampo es una de las regiones del cerebro más estudiadas y se sabe que ejerce un papel fundamental en la formación de la memoria semántica y el aprendizaje espacial (Strange et al., 2014). La PFC es una región del cerebro que tiene un papel central en la regulación de los procesos cognitivos, tanto en humanos como en otros mamíferos (Carlén, 2017). La mPFC está involucrada en la cognición, las emociones y los procesos sensoriales (Ruggiero et al., 2021), el miedo y la ansiedad (Bannerman et al., 2004), la toma de decisiones (Rushworth et al., 2004), la atención selectiva (Olton, 1988), la inhibición del comportamiento (Dalley et al., 2004; Chudasama et al. 2012) y la memoria de trabajo (Seamans et al. 1995; Wang y Cai, 2006). La evidencia destaca la importancia de la comunicación entre el HPC y la mPFC durante los procesos de aprendizaje y memoria (Dickson, et al., 2022; Morici et al., 2022). La vía Hip-PFC comprende la principal conexión anatómica eferente desde la formación del hipocampo, a través de proyecciones

monosinápticas y/o polisinápticas (Jin y Maren, 2015). La vía Hip-PFC tiene un papel crítico en el acoplamiento anatómico y funcional de las dos regiones por mecanismos de sincronización y plasticidad neuronal en circuitos locales y entre circuitos distantes (Benchenane et al., 2010; Fell y Axmacher, 2011). En este estudio, nos centramos en describir la plasticidad sináptica de corto plazo en la vía HPC-PFC y su respuesta a la estimulación a diferentes frecuencias (Stone et al., 2011). Realizamos estimulaciones con trenes de 5 pulsos en frecuencias theta (4 y 10 Hz) y gamma (20 y 50 Hz). En la frecuencia theta, observamos que ante cada tren de estimulación la amplitud de los potenciales sinápticos presentó un incremento de por lo menos un 30% en el segundo pulso de cada tren, lo que nos indica una facilitación de la respuesta sináptica (Takita et al., 2013) que se asemeja a la facilitación por pulsos pareados (Kawashima et al., 2016) y la encontrada en la potenciación a largo plazo (Izaki et al., 2003), esta plasticidad a corto plazo ha sido relacionada en cambios conductuales transitorios, como en la memoria a corto plazo y las adaptaciones en las vías sensoriales (Citri y Malenka, 2008, Ruggiero et al., 2021) . El mayor incremento en la amplitud y la magnitud del área bajo la curva se observó bajo la estimulación a una frecuencia de 10 Hz. Lo anterior es muy relevante para la fisiología y acoplamiento funcional de la PFC, pues el incremento encontrado tanto en la amplitud de los sinápticos, como en el área bajo la curva ante la estimulación de la entrada hipocampal a 10 Hz, tiene explicación por el reclutamiento preferente de sinapsis excitadoras en la mCPF (Stone et al., 2011). Cabe mencionar que la frecuencia theta baja (~4–7 Hz) se observa durante la inmovilidad y está relacionadas con la ansiedad y las conductas motivadas (Mikulovic et al., 2018). Alternativamente, las frecuencias en theta alto (~7–12 Hz) se observan durante la locomoción y se correlacionan con la velocidad del movimiento (Buzsáki, 2002). Se ha planteado la hipótesis de que la sincronía de oscilaciones lentas, como delta y theta, proporciona un mecanismo para coordinar la actividad de la red (Ruggiero et al., 2021). Estas oscilaciones se transmiten con retrasos de fase mínimos entre regiones cerebrales distantes, lo que permite la coordinación de picos neuronales y una actividad local oscilatoria rápida (Roy et al., 2017). Es probable que el reclutamiento preferencial de la PFC a 10 Hz contribuya a la sincronización entre las actividades theta de la red HPC-PFC (Buzsáki, 2002; Young, 2011). Esta posibilidad se respalda por el hallazgo de que la vía HPC-PFC utiliza al neurotransmisor excitador glutamato (Thierry et al., 2000), que se encontró que modula el ritmo theta tanto en la PFC, como en el hipocampo, a través de su receptor NMDA (Kiss et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia

clara de si la actividad theta es una oscilación de neuronas prefrontales locales reclutadas por el HPC o es una medida de la conducción de volumen del HPC (Ruggiero et al., 2021). La coherencia theta se atenúa monotónicamente en función de la distancia desde el hipocampo y no se detecta una estimación precisa de la densidad de la fuente de corriente en la banda theta en el área parietal que recubre el hipocampo, lo que sugiere que theta puede ser conducido en volumen a áreas corticales (Sirota et al., 2008). A pesar de la controversia, la oscilación theta es esencial para la comunicación de la vía HPC-PFC (Ruggiero et al., 2021). La sincronía entre el HPC y la PFC se modula dinámicamente mostrando un aumento en el seguimiento de fase de las células de la PFC con las oscilaciones theta y gamma del hipocampo cuando se realizan elecciones correctas en una tarea de memoria de trabajo espacial (Benchenane et al., 2010). Aunque la mayoría de los estudios de sincronía theta entre el HPC y la PFC se han realizado registrando el HPC dorsal, la sincronía theta es más sólida al registrar el HPC ventral, lo que es consistente con las vías anatómicas descritas (Adhikari et al., 2010; O'Neill et al., 2013) y se ha relacionado con conductas de miedo y ansiedad (Ruggiero et al., 2021).

Otro hallazgo relevante de esta tesis fue que al estimular la entrada hipocampal a la PFC a altas frecuencias (20 y 50 Hz), la magnitud de los potenciales sinápticos provocados disminuye significativamente, siendo la estimulación a 50 Hz la que menos área presenta. Se cree que una de las funciones principales de las oscilaciones gamma es la organización temporal de conjuntos celulares (Buzsáki y Wang, 2012). Los conjuntos de células tienden a organizarse dentro del ritmo gamma de modo que los miembros individuales del conjunto están sincronizados con una fase preferencial de estos ritmos (Harris et al., 2003). Nuestro resultado se puede explicar por el reclutamiento de interneuronas ante la estimulación a altas frecuencias (Stone et al., 2011). Es decir, la disminución observada al estimular a 20 y 50 Hz es debido a que en la PFC existen diferentes subtipos de interneuronas GABAérgicas, que se reclutan a esta frecuencia y que median la inhibición local [34]. Las interneuronas GABAérgicas expresan al menos una de las siguientes tres proteínas de unión al calcio, que las distinguen: parvalbúmina (PV), calbindina (CB) y calretinina (CR) (Caballero et al., 2014). Las interneuronas GABAérgicas que expresan la PV, y que disparan a alta frecuencia, inervan preferencialmente el soma y el cono axónico de las células piramidales (Merchant et al., 2012), por lo que regulan la generación y salida de sus potenciales de acción (Merchant et al., 2012) y regulan también la sincronía de disparo de las células principales, incluidas

aquellas de la PFC (Merchant et al., 2012). Las entradas de información que transmiten señales relacionadas con la acción, la cognición, la recompensa y la emoción llegan a todas las capas corticales, desde la capa L1 hasta la capa L6 (Anastasiades y Carter, 2021). Estas entradas reclutan neuronas de proyección e interneuronas que introducen inhibición local (Anastasiades y Carter, 2021). Por lo tanto, comprender los cálculos de los elementos celulares de la mPFC requiere un conocimiento detallado de los tipos de células, la activación mediante entradas de largo alcance y el procesamiento a través de circuitos locales (Anastasiades y Carter, 2021).

Como ya se mencionó en la Introducción, el circuito HPC-PFC juega un papel fundamental en las funciones cognitivas, como la memoria a corto y largo plazo, la atención y la toma de decisiones (Sigurdsson et al., 2000; Godsil et al., 2012). Las interrupciones en la conectividad funcional en la vía HPC-PFC pueden contribuir a los síntomas neuropsiquiátricos observados en enfermedades mentales y afecciones neurológicas, como esquizofrenia, depresión, trastornos de ansiedad y AD (Godsil et al., 2013). La AD es un trastorno neurodegenerativo de progresión lenta, que comienza con una pérdida leve de memoria y culmina con un deterioro grave de funciones ejecutivas y cognitivas amplias (Masters et al., 2015, Isla et al., 2021).

La  $A\beta$  tiene una amplia variedad de funciones fisiológicas cuando se encuentra en concentraciones bajas en el líquido cefalorraquídeo (Seubert et al., 1992; Mattson, 1997). Por ejemplo, la secreción neuronal de la  $A\beta$  depende de la actividad neuronal y funciona como un regulador de retroalimentación negativa de la transmisión sináptica excitadora (Cirrito et al., 2005; Venkitaramani et al., 2007). Así, la  $A\beta$  en condiciones fisiológicas (519 pg/mL) no solo tiene una función inhibidora, sino también de retroalimentación que mantiene la homeostasis de las redes neuronales, al regular la liberación de neurotransmisores (Venkitaramani et al., 2007). La  $A\beta$  en condiciones fisiológicas también modifica la estructura y la función de las sinapsis químicas promoviendo la endocitosis de los receptores AMPA y NMDA sinápticos (Venkitaramani et al., 2007). En contraste, los resultados de esta investigación muestran que la  $A\beta$ , a una concentración de 30 nM, inhibe la actividad espontánea del circuito de la PFC, así como la activación de la PFC inducida la vía HPC-PFC tanto a nivel poblacional como a nivel de célula única, sugiriendo que la  $A\beta$  podría contribuir a la disfunción de la PFC, por un efecto directo en este circuito, así como por una reducción en su inervación sináptica. Este hallazgo podría constituir la base

celular de varios deterioros cognitivos que pueden producirse por la disfunción de la PFC y/o el desacoplamiento de la vía hipocampo-PFC que se observan tanto en pacientes con AD como en modelos transgénicos de la AD (BazzigaLuppi et al., 2018).

Si bien existe un acuerdo general en el que la AD se considera una enfermedad que inicialmente afecta la transmisión sináptica y produce una desconexión neuronal generalizada (Stam et al., 2007), este fenómeno podría investigarse utilizando un enfoque de red (Pérez-Ortega et al., 2016; Carrillo-Reid et al., 2009; Carrillo-Reid et al., 2015). Lo anterior, es posible debido a que los elementos estructurales del cerebro forman una red intrincada en diferentes escalas espaciales (que van desde las neuronas a las regiones anatómicas; Peña-Ortega, 2017; Peña-Ortega, 2019). De esta manera, el enfoque de la teoría de gráficos, utilizado en esta tesis, podría proporcionar un lenguaje general que permita comprender la asociación de los diversos procesos patológicos que interactúan entre sí en la AD, así como los patrones espaciales de atrofia cortical y las interrupciones funcionales que parecen determina cómo la enfermedad se propaga a lo largo de rutas específicas (Tijms et al., 2013). Stam y sus colegas (2007) aplicaron la teoría de grafos al análisis de la actividad cortical de pacientes con la AD y pacientes sanos para mostrar que hay una disminución en las características de red de mundo pequeño en la AD; dato que correlaciona con lo encontrado en este estudio. De hecho, en las redes de pacientes con la AD, el coeficiente de agrupamiento (C) no cambió significativamente, dato que también correlaciona con los resultados de esta tesis, mientras que la longitud de la ruta característica L, aumentó resultado que también observamos en este trabajo. Estos datos sugieren una pérdida de complejidad y una organización menos óptima (Stam et al., 2007). Estos resultados muestran que el circuito de la PFC en presencia de la  $A\beta$  presenta un aumento en el recorrido de la información dentro del circuito lo que sugiere una interrupción en las interacciones efectivas sugiriendo que la AD es un síndrome de desconexión. Por su parte, De Haan y sus colegas (2009) también demostraron una reducción tanto en el coeficiente de agrupamiento, como en la longitud de la ruta característica en las redes neuronales de pacientes con AD reafirmando los datos que se encontraron en este trabajo. Con base en ello se propone que, debido a la disminución de los parámetros de conectividad local y global, la organización funcional de la red cerebral en la AD se desvía de la estructura óptima de la red de mundo pequeño hacia un tipo más aleatorio mostrando en una pérdida general de la conectividad y la estructura de la red. Las alteraciones descritas previamente se asocian con un intercambio de información

menos eficiente entre las áreas del cerebro, lo que respalda la hipótesis de la desconexión durante la AD (de Haan et al., 2009). Es importante mencionar que estos estudios correlacionan, casi en su totalidad, con los datos mostrados en los grafos de la PFC, en esta tesis.

La PFC no es el único circuito que es inhibido por la actividad de la  $A\beta$ . Diversos grupos han mostrado que la aplicación directa de la  $A\beta$  inhibe la actividad espontánea en los circuitos del bulbo olfatorio (Alvarado-Martínez et al., 2013), la corteza entorrinal (Pena-Ortega et al., 2012), la corteza piriforme (Martínez-García et al., 2021) y del hipocampo (Peña et al., 2010; Kurudenkandy et al., 2014). En lo que respecta a la PFC, en un estudio previo, Wang y colaboradores (2009), mostraron que la aplicación directa de la  $A\beta$  en el circuito de la PFC se relacionó con la inhibición de la actividad de la red de la PFC. En este caso, la inhibición de la actividad de la red inducida por la  $A\beta$  se relacionó con cambios en la excitabilidad celular y no con cambios en la transmisión sináptica (Wang et al., 2009). Es importante mencionar que el cambio en la excitabilidad de las células piramidales de la PFC cambia con la concentración de la  $A\beta$  ya que concentraciones altas presenta una hiperexcitación e hipersincronización (Torres-Flores y Peña-Ortega, 2022) que se observa en animales envejecidos con deterioro cognitivo (Luebke y Amatrudo, 2012) y en pacientes con AD (Josep et al., 2009). Sin embargo, a una baja concentración se observa una Es relevante mencionar que la inhibición inducida por la  $A\beta$  sobre la excitabilidad celular es más prominente en las interneuronas de la PFC (Chen et al., 2013). Este hallazgo se correlaciona con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, que muestran que, a pesar de la falta de efecto de la  $A\beta$  en el disparo de las células piramidales del hipocampo, la presencia de la  $A\beta$  induce una reducción en la resonancia de las neuronas principales hipocámpales (Peña et al., 2010). Este último efecto podría contribuir a la desincronización de los potenciales de acción entre diferentes neuronas principales inducido por la  $A\beta$  en el hipocampo que contribuye a la inhibición de su actividad de la red neuronal (Kurudenkandy et al., 2014). Aparte de los cambios en la excitabilidad celular, la inhibición de la actividad de la red neuronal inducida por la  $A\beta$  también se ha relacionado con una reducción en la transmisión sináptica tanto excitadora (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña et al., 2010; Nimmrich et al., 2008; Xing et al., 2005) como inhibidora (Nimmrich et al., 2008; Xing et al., 2005). De hecho, estos hallazgos son consistentes con la observación de que la  $A\beta$  redujo la modulación colinérgica de la transmisión inhibitoria en el PFC (Chen et al.,

2013). En conjunto, los cambios en la excitación celular y la transmisión sináptica podrían contribuir a la inhibición inducida por la  $A\beta$  de la actividad de la red de PFC (Chen et al., 2013). Es importante señalar que nuestro hallazgo de que la  $A\beta$  inhibe la actividad de la red espontánea de la PFC coincide con los estudios que muestran cambios en la función de la red de la PFC en modelos animales con AD (Bai et al., 2014; Wei et al., 2015) y pacientes con la AD (Wang et al., 2006; Goveas et al., 2011; Zarei et al., 2013), lo que sugiere que el proceso patológico, mediado por la  $A\beta$ , puede contribuir a la disfunción de la PFC durante la AD.

La disfunción de la PFC asociada a la AD también parece ser el resultado de la reducción del acoplamiento de la PFC a otras áreas del cerebro (Bai et al., 2014; Wei et al., 2015; Faucher et al., 2016, Wang et al., 2006; Goveas et al., 2011; Zarei et al., 2013). Una conexión de la PFC que se altera en la AD es el acoplamiento PFC-hipocampo (Wang et al., 2006; Goveas et al., 2011; Zarei et al., 2013). Como ya se mencionó, la inyección intra-hipocámpal de la  $A\beta$  puede inducir alteraciones en los comportamientos controlados por la PFC (Bai et al., 2014; Wei et al., 2015; Faucher et al., 2016), de manera paralela a generar alteraciones en la función de esta corteza (Bai et al., 2014; Wei et al., 2015; Faucher et al., 2016). Por supuesto, es bien sabido que la  $A\beta$  afecta la función del hipocampo tanto *in vivo* (Peña et al., 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012) como *in vitro* (Kurudenkandy et al., 2014; Gutiérrez-Lerma et al., 2013) y, aquí, mostramos que la  $A\beta$  puede afectar la entrada del hipocampo en la PFC.

Como la conexión HPC-PFC es necesaria para la sincronización adecuada entre estas dos estructuras y para la función normal de la PFC (Bai et al., 2014; Wei et al., 2015; Hyman et al., 2010; Maingret et al., 2016), es probable que el desacoplamiento de PFC-hipocampo pueda contribuir a la patología inducida por la  $A\beta$  y, tal vez, a la AD. Teniendo en cuenta que el acoplamiento PFC-hipocampo se produce en diferentes frecuencias oscilatorias (Maingret et al., 2016; Bitzenhofer et al., 2015) en esta tesis probamos si la  $A\beta$  afecta la entrada del hipocampo a la PFC cuando se estimula a diferentes frecuencias. Si bien observamos una reducción generalizada en la activación de la PFC por el hipocampo, en presencia de la  $A\beta$ , en todas las frecuencias probadas, la inhibición fue más prominente, al menos a nivel unicelular, cuando la estimulación se administró a altas frecuencias. Una posible explicación es que la HPC-PFC está sintonizada para sincronizar los dos circuitos a bajas frecuencias (Adaya-Villanueva et al., 2010; Stone et al., 2011) y, por lo tanto, la entrada del hipocampo no solo es más eficiente para reclutar el PFC

a bajas frecuencias (Adaya-Villanueva et al., 2010; Stone et al., 2011), sino que también hace que la conexión sea menos vulnerable a los efectos de la  $A\beta$  cuando se estimula a bajas frecuencias. Es bien sabido que los componentes sinápticos reclutados por diferentes frecuencias de estimulación varían (Stone et al., 2011) y que la estimulación a frecuencias más altas favorece el reclutamiento de componentes inhibitorios (Stone et al., 2011). Las neuronas inhibitorias y las sinapsis que producen parecen ser más sensibles a los efectos de la  $A\beta$  (Chen et al., 2013; Verret et al., 2012), lo que podría explicar por qué la  $A\beta$  tuvo un efecto más prominente en la entrada del hipocampo a la PFC cuando se le estimuló con alta frecuencia. De hecho, este hallazgo es consistente con la observación de que la actividad oscilatoria rápida, que depende en gran medida de las redes inhibitorias (Verret et al., 2012; Peña-Ortega, 2013), es más sensible a los efectos de la  $A\beta$  (Adaya-Villanueva et al., 2010; Peña-Ortega et al., 2012; Kurudenkandy et al., 2014; Verret et al., 2012) en comparación con la actividad oscilatoria lenta. Además, la actividad oscilatoria rápida está más alterada tanto en pacientes con AD (Van Straaten et al., 2014; Engels et al., 2016), como en modelos animales con AD (Verret et al., 2012; Driver et al., 2007; Goutagny et al., 2013). Por lo tanto, comprender la base celular de los cambios en la actividad de la red neuronal y la alteración en el acoplamiento de la red neuronal inducida por la  $A\beta$  ayudaría a explicar la base celular de la fisiopatología de la AD y también revelaría estrategias terapéuticas para reactivar dichas redes o restablecer sus conexiones con el fin de paliar los síntomas de la AD (Balleza-Tapia y Peña, 2009; Salgado-Puga et al., 2015; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015).

## **Conclusión**

El presente estudio muestra que la PFC puede integrar la información a diferentes frecuencias, como lo hacen otras áreas corticales, encontrando que a bajas frecuencias se presenta un reclutamiento más eficiente de las neuronas piramidales, a través de sinápticos excitatorios, mientras que a altas frecuencias un reclutamiento de interneuronas produce una disminución de la amplitud de los sinápticos poblacionales. Por otra parte, a nivel de circuito, encontramos que la red de la PFC presenta un comportamiento de mundo pequeño (Luongo et al., 2016). Sin embargo, esta actividad y dinámica de red se ve alterada por la presencia de la proteína beta amiloide, la cual genera no solo una disminución en la amplitud de los sinápticos poblacionales, sino en la actividad de la red, modificando su amplitud y cambiando su configuración hacia un comportamiento que tiende a una red

aleatoria. Otro aspecto importante para destacar en esta tesis es que la acción de la proteína beta amiloide se da de manera post sináptica, ya que al normalizar la actividad de los sinápticos poblacionales, la proporción de los sinápticos no cambia, durante los distintos trenes provocados, en ausencia y presencia de la proteína beta amiloide.

## Bibliografía

1. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* 12(12): 1567-76.
2. Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F. (2010). Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides.* 31(9): 1761-66.
3. Adhikari A., Topiwala M. A., Gordon J. A. (2010). Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron.* 65 257–269.
4. Alvarado-Martínez R, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One.* 8(9): e75745
5. Anastasiades PG, Carter AG. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends Neurosci.* 44(7):550-563.
6. Artieda J, Alegre M, Valencia M, Urrestarazu E, Pérez Alcázar M, Nicolás MJ, Azcárate JL, Iriarte J. (2009). Brain oscillations: pathophysiological and potentially therapeutic role in some neurological and psychiatric diseases. *An Sist Sanit Navar.* 32 Suppl 3: 45-60.
7. Babiloni C, Frisoni G, Steriade M, Bresciani L, Binetti G, Del Percio C, Geroldi C, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Zappasodi F, Carfagna T, Rossini PM. (2006). Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol.* 117(5): 1113-29.
8. Bai W, Yi H, Liu T, Wei J, Tian X. (2014). Incoordination between spikes and LFP in  $A\beta$ 1-42-mediated memory deficits in rats. *Front Behav Neurosci.* 8: 411.
9. Balleza-Tapia H, Peña F. (2009). Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. *Mini-s in Medicinal Chemistry.* 9(6): 724–40.

10. Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F. (2010). Amyloid  $\beta$  oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Curr Alzheimer Res.* 7(5): 453-62.
11. Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 28(3): 273-83.
12. Bazzigaluppi, P., Beckett, T. L., Koletar, M. M., Lai, A. Y., Joo, I. L., Brown, M. E., Carlen P. L., McLaurin J., Stefanovic B. (2018). Early-stage attenuation of phase-amplitude coupling in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 144, 669–679
13. Beckstead RM. (1979). An autoradiographic examination of cortico-cortical and subcortical projections of the medio dorsal projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 184: 43–62.
14. 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(6): 921–36.
15. Berendse HW, Groenewegen HJ. (1991). Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience.* 42(1): 73-102
16. Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol.* 316: 314–47.
17. Bitzenhofer SH, Sieben K, Siebert KD, Spehr M, Hanganu-Opatz IL. (2015). Oscillatory activity in developing prefrontal networks results from theta-gamma-modulated synaptic inputs. *Cell Reports.* 11(3): 486–497.
18. Bland BH, Oddie SD, Colom LV. (1999). Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *J Neurosci.* 19(8): 3223-37.
19. Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. (2009). GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science.* 326(5958): 1419-24.
20. Braak H, Braak E. (1998). Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 53: 127-40.

21. Brown ER, Nishino A, Bone Q, Meinertzhagen IA, Okamura Y. (2005a). GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva. *Eur J Neurosci.* 22(10): 2541-8.
22. Brown JT, Richardson JC, Collingridge GL, Randall AD, Davies CH. (2005b). Synaptic transmission and synchronous activity is disrupted in hippocampal slices taken from aged TAS10 mice. *Hippocampus.* 15(1): 110-7.
23. Butterfield DA, HowardBJ, LaFontaine MA. (2001). Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and huntington's disease. *Curr Med Chem.* 8(7): 815-28.
24. Buzsáki G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 33(3): 325-40.
25. Buzsáki G, Draguhn A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science.* 304(5679): 1926-9.
26. Buzsáki, G., Wang, X. J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annual Review of Neuroscience,* 35, 203–225.
27. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. (2012). The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci.* 13(6):407-20.
28. Caballero A, Flores-Barrera E, Cass DK, Tseng KY. (2014). Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct.* 219(1): 395-406.
29. Carlén M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358 478–482.
30. Carr DB, Sesack SR. (1996). Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol.* 369: 1–15.
31. Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol.* 99(3): 1435-50.
32. Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Bargas J. (2009). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol.* 101(2): 737-49.
33. Carrillo-Reid L, Lopez-Huerta VG, Garcia-Munoz M, Theiss S, Arbutnott GW. (2015). Cell Assembly Signatures Defined by Short-Term Synaptic Plasticity in Cortical Networks. *Int J Neural Syst.* 25(7): 1550026.

34. Cassell MD, Wright DJ. (1986). Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. *Brain Res Bull.* 17: 321–33.
35. Chen GJ, Xiong Z, Yan Z. (2013). A $\beta$  impairs nicotinic regulation of inhibitory synaptic transmission and interneuron excitability in prefrontal cortex. *Molecular Neurodegeneration.* 8: 3.
36. Chudasama Y, Doobay VM, Liu Y. (2012). Hippocampal-prefrontal cortical circuit mediates inhibitory response control in the rat. *J Neurosci.* 32(32): 10915-24.
37. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron.* 48: 913–22.
38. Citri A., Malenka R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33 18–41.
39. Colom LV, Castañeda MT, Bañuelos C, Puras G, García-Hernández A, Hernandez S, Mounsey S, Benavidez J, Lehker C. (2010). Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function. *Neurobiol Aging.* 31(1): 46-57.
40. Condé F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crépel F. (1990). Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain Res Bull.* 24(3): 341-54.
41. Condé F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crépel F. (1995). Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 352: 567-93.
42. Cuevas ME, Haensgen H, Sepúlveda FJ, Zegers G, Roa J, Opazo C, Aguayo LG. (2011). Soluble A $\beta$ (1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.* 23(4): 673-87.
43. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 28(7): 771-84.
44. Datiche F, Cattarelli M. (1996). Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Res Bull.* 41: 391–8.
45. Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y. (2003). Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *J Neurosci.* 23(7): 782-92.

46. Delatour B, Witter MP. (2002). Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence for multiple pathways. *Eur J Neurosci.* 15: 1400–7.
47. Dennis EL, Thompson PM. (2014). Functional brain connectivity using fMRI in aging and Alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev* 24: 49–62.
48. Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci.* 26(22): 6011-8
49. Dickson DW. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging.* 18: 21-26.
50. Dinamarca MC, Ríos JA, Inestrosa NC. (2012). Postsynaptic Receptors for Amyloid- $\beta$  Oligomers as Mediators of Neuronal Damage in Alzheimer's Disease. *Front Physiol.* 3: 464
51. Divac I, Mogenson J. (1985). The prefrontal cortex in the pigeon. Catecholamine histofluorescence. *Neuroscience.* 15: 677–82
52. Dosenbach NU, Nardos B, Cohen AL, Fair DA, Power JD, Church JA, Nelson SM, Wig GS, Vogel AC, Lessov-Schlaggar CN, Barnes KA, Dubis JW, Feczko E, Coalson RS, Pruett JR Jr, Barch DM, Petersen SE, Schlaggar BL. (2010). Prediction of individual brain maturity using fMRI. *Science.* 329(5997): 1358-61.
53. Dragoi G, Buzsáki G. (2006). Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron.* 50(1): 145-57.
54. Driver JE, Racca C, Cunningham MO, Towers SK, Davies CH, Whittington MA, LeBeau FE. (2007). Impairment of hippocampal gamma ( $\gamma$ )-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP). *European Journal of Neuroscience.* 26(5): 1280–88.
55. Engels MM, Hillebrand A, van der Flier WM, Stam CJ, Scheltens P, van Straaten EC. (2016). Slowing of hippocampal activity correlates with cognitive decline in early onset Alzheimer's disease. And MEG study with virtual electrodes. *Frontiers in Human Neuroscience.* 10(238).
56. Faucher P, Mons N, Micheau J, Louis C, Beracochea DJ. (2016). Hippocampal injections of oligomeric amyloid $\beta$ -peptide (1–42) induce selective working memory deficits and long-lasting alterations of ERK signaling pathway. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 7(245).

57. Fell J, Axmacher N. (2011). The role of phase synchronization in memory processes. *Nat Rev Neurosci.*;12(2): 105-18.
58. Ferino F, Thierry AM, Glowinski J. (1987). Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp Brain Res.* 65(2): 421-6.
59. Finlay JM, Dunham GA, Isherwood AM, Newton CJ, Nguyen TV, Reppar PC, Snitkovski I, Paschall SA, Greene RW. (2015). Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. *Brain Res.* 1600: 70-83.
60. Fuster JM. (1997). Network memory. *Trends Neurosci.* 20(10): 451-9.
61. Fuster JM. (2008). *The prefrontal cortex.* London: Academic Press/ Elsevier.
62. Gabbott P, Headlam A, Busby S. (2002). Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain Res.* 946: 314-22.
63. Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. (1994). Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem.* 269: 13623-28.
64. Gaykema RPA, Luiten PGM, Nyakas C, Traber J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol.* 293: 103–24.
65. Gaykema RPA, Van Weeghel B, Hersh LB, Luiten PGM. (1991). Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain. *J Comp Neurol.* 303: 563–83.
66. Giacchino J, Criado JR, Games D, Henriksen S. (2000). In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res.* 876(1-2): 185-90.
67. Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM. (2013). The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders?. *Eur Neuropsychopharmacol.*23(10): 1165-81.
68. Goldman-Rakic PS. (1994). Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 6(4): 348-57.
69. Goldman-Rakic PS. (1995). Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Ann N Y Acad Sci.* 769: 71-83.

70. Gómez C, Mediavilla A, Hornero R, Abásolo D, Fernández A. (2009). Use of the Higuchi's fractal dimension for the analysis of MEG recordings from Alzheimer's disease patients. *Med Eng Phys.* 31(3): 306-13.
71. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Kraft GA, Klein WL. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(18): 10417-22.
72. Goto Y, O'Donnell P. (2003). Altered prefrontal cortex-nucleus accumbens information processing in a developmental animal model of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.* 1003: 398-401.
73. Goto Y, Grace AA. (2008). Dopamine modulation of hippocampal-prefrontal cortical interaction drives memory-guided behavior. *Cereb Cortex.* 18(6): 1407-14.
74. Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot JG, Quirion R, Krantic S, Williams S. (2013). Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience.* 37(12): 1896-902.
75. Goveas JS, Xie C, Ward BD, Wu Z, Li W, Franczak M, Jones JL, Antuono PG, Li SJ. (2011). Recovery of hippocampal network connectivity correlates with cognitive improvement in mild Alzheimer's disease patients treated with donepezil assessed by resting-state fMRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 34(4): 764-73.
76. Groenewegen HJ, Uylings HBM. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. In: Uylings HBM, van Eden CG, de Bruin JPC, Feenstra MPG, Pennartz CMA, editors. *Cognition, emotion, and autonomic responses. The integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures. Progress in Brain Research.* Amsterdam: Elsevier. 126: 3-28.
77. Groenewegen HJ, Berendse HW, Wolters JG, Lohman AH. (1990). The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Prog Brain Res.* 85:95-116; discussion 116-8.
78. Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system?. *Prog Brain Res.* 107: 485-511.

79. Guldin WO, Pritzel M, Markowitsch HJ. (1981). Prefrontal cortex of the mouse defined as cortical projection area of the thalamic mediodorsal nucleus. *Brain Behav Evol.* 19(3-4): 93-107.
80. Gutiérrez-Lerma AI, Ordaz B, Peña-Ortega F. (2013). Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro. *Int J Pept.* 328140: 11.
81. de Haan W, Pijnenburg YA, Strijers RL, van der Made Y, van der Flier WM, Scheltens P, Stam CJ. (2009). Functional neural network analysis in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease using EEG and graph theory. *BMC Neurosci.* 10: 101.
82. Haass C, Selkoe DJ. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(2): 101-12.
83. Hardy J, (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20: 154-59.
84. Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
85. Harris K. D., Csicsvari J., Hirase H., Dragoi G., Buzsáki G. (2003). Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424 552–556.
86. Hasselmo ME, Stern CE. (2014). Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. *Neuroimage.* 85 Pt 2: 656-66.
87. Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J. (2013). Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 8(5): e64318.
88. Heidbreder CA, Groenewegen HJ. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorsoventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci biobehav rev.* 27(6): 555-79.
89. Hojjati SH, Ebrahimzadeh A, Babajani-Feremi A. (2019). Identification of the Early Stage of Alzheimer's Disease Using Structural MRI and Resting-State fMRI. *Front Neurol.* 10: 904.
90. Hölscher C. (2011). Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 39(4): 891-7.
91. Hou JF, Cui J, Yu LC, Zhang Y. (2009). Intracellular amyloid induces impairments on electrophysiological properties of cultured human neurons. *Neurosci Lett.* 462(3): 294-9.

92. Hurley K, Herbert H, Moga MM, Saper CB. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 308: 249–76.
93. Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME. (2010). Working memory performance correlates with prefrontal-hippocampal theta interactions but not with prefrontal neuron firing rates. *Frontiers in Integrative Neuroscience.* 4: 2.
94. Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. (2004). Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science.* 304(5670): 559-64.
95. Isla, A. G., Balleza-Tapia, H., Fisahn, A. (2021). Efficacy of preclinical pharmacological interventions against alterations of neuronal network oscillations in Alzheimer's disease: A systematic review. *Experimental Neurology*, 343,
96. Izaki Y., Takita M., Nomura M., Akema T. (2003). Differences between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the dorsal and ventral hippocampal CA1-prefrontal pathways of rats. *Brain Res.* 992 142–145.
97. Jay TM, Witter MP. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 313: 574–86.
98. Jay TM, Thierry AM, Wiklund L, Glowinski J. (1992). Excitatory Amino Acid Pathway from the Hippocampus to the Prefrontal Cortex. Contribution of AMPA Receptors in Hippocampo-prefrontal Cortex Transmission. *Eur J Neurosci.* 4(12): 1285-95.
99. Jay TM, Glowinski J, Thierry AM. (1995). Inhibition of hippocampoprefrontal cortex excitatory responses by the mesocortical DA system. *Neuroreport.* 6(14): 1845-8.
100. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. (2011). Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(14): 5819-24.
101. Jin J., Maren S. (2015). Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion. *Front. Syst. Neurosci.* 9:170.
102. John V, Beck JP, Bienkowski MJ, Shina S, Heinrikson RL. (2003). Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J Med Chem.* 46(22): 4625-30.

103. Joseph S, Knezevic D, Zomorodi R, Blumberger D. M., Daskalakis Z. J., Mulsant B. H., Pollock B. G., Voineskos A., Wang W., Rajji T. K., Kumar S. (2021) Dorsolateral prefrontal cortex excitability abnormalities in Alzheimer's Dementia: Findings from transcranial magnetic stimulation and electroencephalography study. *Int. J. Psychol. physiol.* 169:55–62
104. Kaiser M. (2011). A tutorial in connectome analysis: topological and spatial features of brain networks. *Neuroimage.* 57(3): 892-907.
105. Kawashima H., Izaki Y., Grace A. A., Takita M. (2006). Cooperativity between hippocampal-prefrontal short-term plasticity through associative long-term potentiation. *Brain Res.* 1109 37–44.
106. Kiss T, Feng J, Hoffmann WE, Shaffer CL, Hajós M. (2013). Rhythmic theta and delta activity of cortical and hippocampal neuronal networks in genetically or pharmacologically induced N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction under urethane anesthesia. *Neuroscience.* 237: 255-67.
107. Kovner R., Oler J. A., Kalin N. H. (2019). Cortico-limbic interactions mediate adaptive and maladaptive responses relevant to psychopathology. *Am. J. Psychiatry.* 176: 987–999.
108. Kowalski JW, Gawel M, Pfeffer A, Barcikowska M. (2001). The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: correlation with the severity of mental impairment. *J Clin Neurophysiol.* 18(6): 570-5
109. Krettek JE, Price JL. (1977a). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 171: 157–92.
110. Krettek JE, Price JL. (1977b). Projection from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 172: 687–722.
111. Kurudenkandy FR, Zilberter M, Biverstal H, Presto J, Honcharenko D, Strömberg R, Johansson J, Winblad B, Fisahn A. (2014). Amyloid  $\beta$ -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *The Journal of Neuroscience.* 34(34): 11416–25.
112. LaFerla FM. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 3:862-72.
113. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosantos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from

- abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceeding of the national academy of science of the united states of America*. 95(11), 6448-53.
114. Lamour Y, Dutar P, Jobert A. (1982). Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 34(2): 117-22.
  115. Laroche S, Jay MT, Thierry AM. (1990). Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neurosci Lett*. 114(2): 184-90
  116. Latora V, Marchiori M. (2001). Efficient behavior of small-world networks. *Phys Rev Lett*. 87(19): 198701.
  117. Laubach M, Amarante LM, Swanson K, White SR. (2018). What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro*. 5(5). pii: Eneuro.0315-18.2018
  118. Lazarov O, Lee M, Peterson DA, Sisodia SS. (2002). Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci*. 22(22): 9785-93.
  119. Leão RN, Colom LV, Borgius L, Kiehn O, Fisahn A. (2012). Medial septal dysfunction by A $\beta$ -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons. *Neurobiol Aging*. 33(9): 2046-61.
  120. Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsáki G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*. 62(4): 1033-47.
  121. Lehmann J, Nagy JI, Atmadia S, Fibiger HC. (1980). The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience*. 5(7): 1161-74.
  122. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Neuron*. 440(7082): 352-7.
  123. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu Y, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269(5226): 973-7.
  124. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. (1999). Soluble amyloid beta peptide

- concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 155(3): 853-62.
125. Luebke JI, Amatrudo JM (2012) Age-related increase of sI(AHP) in prefrontal pyramidal cells of monkeys: relationship to cognition. *Neurobiol Aging.* 33(6):1085–1095
  126. Luongo FJ, Zimmerman CA, Horn ME, Sohal VS. (2016). Correlations between prefrontal neurons form a small-world network that optimizes the generation of multineuron sequences of activity. *J Neurophysiol.* 115(5): 2359-75.
  127. Mack KJ, Mack PA. (1992). Induction of transcription factor in somatosensory cortex after tactile stimulation. *Brain Res Mol Brain Res.* 12(1-3): 141-7.
  128. Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutier M, Zugaro M. (2016). Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience.* 19(7): 959-64.
  129. Martínez-García, I., Hernández-Soto, R., Villasana-Salazar, B., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2021). Alterations in Piriform and Bulbar Activity/Excitability/Coupling Upon Amyloid- $\beta$  Administration in vivo Related to Olfactory Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(s1), S19–S35
  130. Masters C. L., Bateman R., Blennow K., Rowe C. C., Sperling R. A., Cummings J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15056
  131. Masuda N, Aihara K. (2004). Global and local synchrony of coupled neurons in small-world networks. *Biol Cybern.* 90(4): 302-9.
  132. Mattson MP, (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77: 1081-132.
  133. Mattson MP. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430(7000): 631-9.
  134. Mattson MP. (2014). Superior pattern processing is the essence of the evolved human brain. *Front Neurosci.* 8: 265.
  135. Mattson MP, Chan SL. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 34: 385-97.
  136. Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K, (1997). Activation of NK-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res.* 49(6): 681-97.

137. Mazei MS, Pluto CP, Kirkbride B, Pehek EA. (2002). Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res.* 936(1-2): 58-67
138. McDonald AJ. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience.* 44: 1–14.
139. McDonald AJ. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 55: 257–332.
140. Merchant H, de LaFuente V, Peña-Ortega F, Larriva-Sahd J. (2012). Functional impact of interneuronal inhibition in the cerebral cortex of behaving animals. *Prog Neurobiol.*99(2): 163-78
141. Morici, J. F., Weisstaub, N. V., Zold, C. L. (2022). Hippocampal-medial prefrontal cortex network dynamics predict performance during retrieval in a context-guided object memory task. *PNAS*, 119
142. Miller JE, Ayzenshtat I, Carrillo-Reid L, Yuste R. (2014). Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(38): E4053-61.
143. Ming D, Chen Q, Yang W, Chen R, Wei D, Li W Qiu J, Xu Z, Zhang Q. (2015). Examining brain structures associated with the motive to achieve success and the motive to avoid failure: a voxel-based morphometry study. *Soc Neurosci.* 11(1): 38-48
144. Mondragón-Rodríguez S, Salas Gallardo A, González-Pereyra P, Macías M, Ordaz B, Peña-Ortega F, Aguilar-Vázquez A, Orta-Salazar E, Días-Cintra S, Perry G, Williams S. (2018). Phosphorylation of Tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer’s model. *J Biol Chem.* 293(22): 8462-72.
145. Mucke L. 2009. Neuroscience: Alzheimer’s disease. *Nature.* 461(7266): 895-7.
146. Miraglia F, Vecchio F, Bramanti P, Rossini PM. (2016). EEG characteristics in “eyes-open” versus “eyes-closed” conditions: small-world network architecture in healthy aging and age-related brain degeneration. *Clin Neurophysiol* 127: 1261-8.
147. Mikulovic S., Restrepo C. E., Siwani S., Bauer P., Pupe S., Tort A. B. L., Kullander K., Leao N. R. (2018). Ventral hippocampal OLM cells control type 2 theta oscillations and response to predator odor. *Nat Commun* 7;9(1):3638

148. Mulder AB, Arts MP, Lopez da Silva FH. (1997). Short- and long- term plasticity of the hippocampus to nucleus accumbens and prefrontal cortex pathways in the rat, in vivo. *Eur J Neurosci.* 9(8): 1603-11.
149. Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M. (2012). Dual effect of beta-amyloid on  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One.* 7(1): e29661.
150. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davis KL, Greengard P, Buxbaum JD. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 283(12)
151. Newman ME. (2003). Properties of highly clustered networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 68(2 Pt 2): 026121.
152. Newman ME, Girvan M. (2004). Finding and evaluating community structure in networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 69(2 Pt 2): 026113.
153. Nieto-Posadas A, Flores-Martínez E, Lorea-Hernández JJ, Rivera-Angulo AJ, Pérez-Ortega JE, Bargas J, Peña-Ortega F. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Front Physiol.* 5:265
154. Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C. (2008). Amyloid  $\beta$  oligomers ( $A\beta 1-42$  globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *Journal of Neuroscience.* 28(4): 788–97.
155. Nomura I, Kato N, Kita T, Takechi H. (2005). Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett.* 391(1-2): 1-6.
156. Olton DS. (1988). Aging and spatial cognition. *Neurobiol Aging.* 9(5-6): 569-70.
157. O'Neill P. K., Gordon J. A., Sigurdsson T. (2013). Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion. *J. Neurosci.* 33 14211–14224.

158. Padilla-Coreano N., Bolkan S. S., Pierce G. M., Blackman D. R., Hardin W. D., Garcia-Garcia A. L., Spellman T. J., Gordon J.A. (2016). Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. *Neuron* 89 857–866.
159. Pandya DN, Yeterian EH. (1990). Prefrontal cortex in relation to other cortical areas in the rhesus monkey: architecture and connections. *Prog Brain Res.* 85: 63–94.
160. Parent MA, Wang L, Su J, Netoff T, Yuan LL. (2010). Identification of the hippocampal input to medial prefrontal cortex in vitro. *Cereb Cortex.* 20(2): 393-403.
161. Pena-Ortega F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Lopez-Guerrero JJ. (2012). Amyloid beta 1–42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3. *Current Alzheimer Research.* 9(7): 857-63.
162. Peña-Ortega F. (2013). Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J Neurodegener Dis.* 657470:8.
163. Peña-Ortega F. (2017). Neural Network Reconfigurations: Changes of the Respiratory Network by Hypoxia as an Example. *Adv Exp Med Biol.* 1015: 217-37.
164. Peña-Ortega F. (2019). Clinical and experimental aspects of breathing modulation by inflammation. *Auton Neurosci.* 2016: 72-86
165. Peña-Ortega F, Bernal-Pedraza R. (2012). Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *International Journal of Peptides.* 236289: 8.
166. Peña F, Bargas J, Tapia R. (2002). Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology.* 42(6): 807-12.
167. Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. (2006). The role of beta-amyloid protein in synaptic function: Implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol.* 4(2): 149-63.
168. Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. (2010). Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus.* 20(1): 78–96.
169. Pérez-Ortega J, Duhne M, Lara-González E, Plata V, Gasca D, Galarraga E, Hernández-Cruz A, Bargas J. (2016). Pathophysiological

- signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol Dis.* 91: 347-61.
170. Petrovic GD, Risold PY, Swanson LW. (1996). Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 374: 387–420.
171. Ponomareva NV, Korovaitseva GI, Rogaev EI. (2008). EEG alterations in non-demented individuals related to apolipoprotein E genotype and to risk of Alzheimer disease *Neurobiol Aging.* 29(6): 819-27.
172. Pourbadie HG, Naderi N, Mehranfard N, Janahmadi M, Khodaghohi F, Motamedi F. (2015). Preventing effect of L-type calcium channel blockade on electrophysiological alterations in dentate gyrus granule cells induced by entorhinal amyloid pathology. *PLoS One.* 10(2): e0117555.
173. Preuss TM. (1995). Do rats have prefrontal cortex? The rose-woolsey-akert program reconsidered. *J Cogn Neurosci.* 7(1): 1-24.
174. Prince MJ, Wu F, Guo Y, Gutierrez Robledo LM, O'Donnell M, Sullivan R, Yusuf S. (2015). The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet.* 385(9967): 549-62.
175. Priot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM. (1992). Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience.* 49(4): 857-65.
176. Ragozzino ME, Kesner RP. (1998). The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prelimbic/infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiol learn Mem.* 69(3): 241-57.
177. Ragozzino ME, Adams S, Kesner RP. (1998). Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behav Neurosci.* 112(2): 293-303.
178. Ray JP, Price DL. (1992). The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol.* 323: 167–97.
179. Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV. (1990). Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. *J Comp Neurol.* 294: 262–80.

180. Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE. (2001). Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat Neurosci.* 4(7): 724-31.
181. Risterucci C, Terramorsi D, Nieoullon A, Amalric M. (2003). Exitotoxic lesions of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex disrupt motor preparatory processes. *Eur J Neurosci.* 17(7): 1498-508
182. Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH. (1985). Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J Comp Neurol.* 242:40–55.
183. Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. (2004). Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. *Exp Gerontol.* 39(11-12): 1661-7
184. Roy A., Svensson F. P., Mazeh A., Kocsis B. (2017). Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2–5 Hz oscillation in the delta band: the role of the nucleus reuniens of the thalamus. *Brain Struct. Funct.* 222 2819–2830
185. Rubinov M, Sporns O. (2010). Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage.* 52(3):1059-69.
186. Ruggiero R. N., Rossignoli M. T., Marques D. B., de Sousa B. M., Romcy-Pereira R. N., Lopes-Aguiar C., Leite J. P. (2021) Neuromodulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Functional Connectivity: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci.* 15:732360.
187. Rushworth MF, Walton ME, Kennerley SW, Bannerman DM. (2004). Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends Cogn Sci.* 8(9): 410-7.
188. Salgado-Puga K, Pena-Ortega F. (2015). Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid  $\beta$  protein. *Protein Pept Lett.* 22(4): 303-21.
189. Salgado-Puga K, Prado-Alcalá RA, Peña-Ortega F. (2015). Amyloid  $\beta$  enhances typical rodent behavior while it impairs contextual memory consolidation. *Behavioural Neurology.* 526912(12).
190. Sampath D., Sathyanesan M., Newton S. S. (2017). Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer’s disease is associated with hippocampal-prefrontal cortex dysconnectivity. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 13 1509–1519.

191. Saper CB. (1984). Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. I. Magnocellular basal nucleus. *J Comp Neurol.* 222: 313–42
192. Sarter M, Markowitsch HJ. (1983). Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat. *Brain Res Bull.* 10: 607–22.
193. Sarter M, Markowitsch HJ. (1984). Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. *J Comp Neurol.* 224: 445–60.
194. Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y. (2007). Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci.* 27(3): 517-28.
195. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2: 864-70.
196. Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG. (1995). Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci.* 109(6): 1063-73.
197. Selkoe DJ. (1993). Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends neurosci.* 1993. 16(10): 403-9.
198. Selkoe DJ. (2003). Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res.* 28(11): 1705-13.
199. Selkoe DJ. (2011). Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(7): a004457.
200. Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 290: 213–42.
201. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, McCormack R, Wolfert R, Selkoe DJ, Lieberburg I, Schenk D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature.* 359: 325–27.

202. Shankar GM, Walsh DM. (2009). Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Aβ. *Mol Neurodegener.* 4:48.
203. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375(6534): 754-60.
204. Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T, Frangione B. (2000). In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J Neuropathol Neurol.* 59(1): 11-7.
205. Singewald N, Salchner P, Sharp T. (2003). Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol. Psychiatry.* 53(4): 275-83.
206. Siok CJ, Rogers JA, Kocsis B, Hajós M. (2006). Activation of alpha7 acetylcholine receptors augments stimulation-induced hippocampal theta oscillation. *Eur J Neurosci.* 23(2): 570-4.
207. Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G. (2003). Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(4): 2065-69.
208. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 8(8): 1051-8.
209. Sosa M, Joo HR, Frank LM. (2019). Dorsal and ventral hippocampal sharp-wave ripples activate distinct nucleus accumbens networks. *Neuron.* 105(4): 725-41
210. Squire LR. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 99(2):195-231.
211. Stam CJ, Jones BF, Nolte G, Breakspear M, Scheltens P. (2007). Small-world networks and functional connectivity in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 17(1): 92-9.
212. Steketee JD. (2003). Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulant drugs. *Brain Res Brain Res Rev.* 41: 203-28.

213. Stone ME, Maffei A, Fontanini A. (2011). Amygdala stimulation evokes time-varying synaptic responses in the gustatory cortex of anesthetized rats. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 5(3).
214. Strange B. A., Witter M. P., Lein E. S., Moser E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 15 655–669.
215. Sun MK, Alkon DL. (2002). Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid (25-35). *J Neurophysiol.* 87(5): 2441-9.
216. Swanson LW. (1981). A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 217: 150–4.
217. Takita M., Izaki Y., Jay T. M., Kaneko H., Suzuki S. S. (1999). Induction of stable long-term depression *in vivo* in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *Eur. J. Neurosci.* 11(11):4145–4148.
218. Teplow DB. (1998). Structural and kinetic features of amyloid beta protein fibrillogenesis. *Amyloid.* 5(2): 121-42.
219. Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J. (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus.* 10(4): 411-9.
220. Tierney PL, Dégénétais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y. (2004). Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 20(2): 514-24.
221. Tijms BM, Wink AM, de Haan W, van der Flier WM, Stam CJ, Scheltens P, Barkhof F. (2013). Alzheimer's disease: connecting findings from graph theoretical studies of brain networks. *Neurobiol Aging.* 34(8): 2023-36.
222. Ting JT, Kelley BG, Lambert TJ, Cook DG, Sullivan JM. (2007). Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(1): 353-8.
223. de Toledo Ferraz Alves TC, Ferreira LK, Busatto GF. (2010). Vascular diseases and old age mental disorders: an update of neuroimaging findings. *Curr Opin Psychiatry.* 23(6): 491-7
224. Torres-Flores, M., Peña-Ortega, F. (2022). Amyloid Beta Alters Prefrontal-dependent Functions Along with its Excitability and Synaptic Plasticity in Male Rats. *Neuroscience*, 498, 260–279.

225. Toussaint PJ, Maiz S, Coynel D, Doyon J, Messé A, de Souza LC, Sarazin M, Perlberg V, Habert MO, Benali H. (2014). Characteristics of the default mode functional connectivity in normal ageing and Alzheimer's disease using resting state fMRI with a combined approach of entropy-based and graph theoretical measurements. *Neuroimage*. 101: 778-86.
226. Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, Jefferys JG, Faulkner HJ. (1999). On the mechanism of the gamma --> beta frequency shift in neuronal oscillations induced in rat hippocampal slices by tetanic stimulation. *J Neurosci*. 19(3): 1088-105.
227. Uylings HMB, Van Eden CG. (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in the rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res*. 85: 31–62.
228. Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex?. *Behav Brain Res*. 146(1-2): 3-17.
229. van den Heuvel MP, Stam CJ, Boersma M, Hulshoff Pol HE. (2008). Small-world and scale-free organization of voxel-based resting-state functional connectivity in the human brain. *Neuroimage*. 43(3): 528-39.
230. Van Eden CG, Uylings HBM. (1985). Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol*. 241: 253–67.
231. Van Eden CG, Lamme VAF, Uylings HBM. (1992). Heterotopic cortical afferents to the medial prefrontal cortex in the rat. A combined retrograde and anterograde tracer study. *Eur J Neurosci*. 4:77–97.
232. Van Straaten EC, Scheltens P, Gouw AA, Stam CJ. (2014). Eyes-closed task-free electroencephalography in clinical trials for Alzheimer's disease: an emerging method based upon brain dynamics. *Alzheimer's Research and Therapy*. 6(9): 86.
233. Venkitaramani DV, Chin J, Netzer WJ, Gouras GK, Lesne S, Malinow R, Lombroso PJ. (2007). Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci*. 27(44): 11832–37.
234. Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model. *Cell*. 149(3): 708–721.
235. Verwer RW, Meijer RJ, Van Uum HF, Witter MP. (1997). Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*. 7(4): 397-402.

236. Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roullot E, Bellessort B, Epelbaum J, Dutar P, Stéphan A. (2010). Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci.* 30(33): 10991-1003
237. Vogt BA, Paxinos G. (2014). Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Struct Funct.* ;219(1): 185-92
238. Vogt BA, Hof PR, Zilles K, Vogt LJ, Herold C, Palomero-Gallagher N. (2013). Cingulate area 32 homologies in mouse, rat, macaque and human: cytoarchitecture and receptor architecture. *J Comp Neurol.* 521(18):4189-204.
239. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416(6880): 535-9.
240. Wang GW, Cai JX. (2006). Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. *Behav Brain Res.* 175(2):329-36.
241. Wang L, Zang Y, He Y, Liang M, Zhang X, Tian L, Wu T, Jiang T, Li K. (2006). Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: evidence from resting state fMRI. *Neuro Image.* 31(2):496–504.
242. Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL. (2002). Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 924(2):133-40.
243. Wang Y, Zhang G, Zhou H, Barakat A, Querfurth H. (2009). Opposite effects of low and high doses of A $\beta$ 42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex. *PLoS ONE.* 4(12).
244. Wang X, Yang Y, Jia M, Ma C, Wang M, Che L, Yang Y, Wu J. (2013). The novel amyloid-beta peptide aptamer inhibits intracellular amyloid-beta peptide toxicity. *Neural Regen Res.* 8(1):39-48.
245. Wang XN, Zeng Y, Chen GQ, Zhang YH, Li XY, Hao XY, Yu Y, Zhang M, Sheng C, Li YX, Sun Y, Li HY, Song Y, Li KC, Yan TY, Tang XY, Han Y. (2016). Abnormal organization of white matter networks in patients with subjective cognitive decline and mild cognitive impairment. *Oncotarget.* 7(31):48953-48962.

246. Watts DJ, Strogatz SH. (1998). Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature*. 393(6684):440-2.
247. Wei J, Yi H, Zhang D, Bai W, Tian X. (2015). Aberrant neuronal activity and dysfunctional connectivity in A $\beta$ 1-42 mediated memory deficits in rats. *Current Alzheimer Research*. 12(10):964–973.
248. West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. (2004). Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 25(9):1205-12.
249. Wildburger NC, Laezza F. (2012). Control of neuronal ion channel function by glycogen synthase kinase-3: new prospective for an old kinase. *Front Mol Neurosci*. 5:80.
250. Wright CI, Groenewegen HJ. (1995). Patterns of convergence and segregation in the medial nucleus accumbens of the rat: relationships of prefrontal cortical, midline thalamic and basal amygdaloid afferents. *J Comp Neurol*. 361:383–403.
251. Xiang J, Guo H, Cao R, Liang H, Chen J. (2013). An abnormal resting-state functional brain network indicates progression towards Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 8(30):2789-99.
252. Xing C, Yin Y, Chang R, He X, Xie Z. (2005). A role of insulinlike growth factor 1 in  $\beta$  amyloid-induced disinhibition of hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*. 384(1-2):93–97.
253. Ye CP, Selkoe DJ, Hartley DM. (2003). Protofibrils of amyloid beta-protein inhibit specific K<sup>+</sup> currents in neocortical cultures. *Neurobiol Dis*. 13(3):177-90.
254. Young CK. (2011). Behavioral significance of hippocampal  $\theta$  oscillations: looking elsewhere to find the right answers. *J Neurophysiol*. 106(2):497-9
255. Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW. (1998). Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis*. 5:81–88.
256. Zahm DS, Brog JS. (1992). On the significance of subterritories in the "Accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*. 50(4):751-67.
257. Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF. (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci*. 17: 8528–35.

258. Zarei M, Beckmann CF, Binnewijzend MA, Schoonheim MM, Oghabian MA, Sanz-Arigita EJ, Scheltens P, Matthews PM, Barkhof F. (2013). Functional segmentation of the hippocampus in the healthy human brain and in Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 66:28–35.
259. Zhu LQ, Liu D, Hu J, Cheng J, Wang SH, Wang Q, Wang F, Chen JG, Wang JZ. (2010). GSK-3 beta inhibits presynaptic vesicle exocytosis by phosphorylating P/Q-type calcium channel and interrupting SNARE complex formation. *J Neurosci*. 30(10):3624-33.

## **Anexo**

Amyloid  $\beta$  Peptide-Induced changes in Prefrontal Cortex Activity and Its Response to Hippocampal Input

## Research Article

# Amyloid $\beta$ Peptide-Induced Changes in Prefrontal Cortex Activity and Its Response to Hippocampal Input

**Ernesto Flores-Martínez and Fernando Peña-Ortega**

*Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, 76230 Querétaro, QRO, Mexico*

Correspondence should be addressed to Fernando Peña-Ortega; [jfpena@unam.mx](mailto:jfpena@unam.mx)

Received 18 June 2016; Accepted 2 November 2016; Published 3 January 2017

Academic Editor: Per Hellström

Copyright © 2017 E. Flores-Martínez and F. Peña-Ortega. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Alterations in prefrontal cortex (PFC) function and abnormalities in its interactions with other brain areas (i.e., the hippocampus) have been related to Alzheimer Disease (AD). Considering that these malfunctions correlate with the increase in the brain's amyloid beta ( $A\beta$ ) peptide production, here we looked for a causal relationship between these pathognomonic signs of AD. Thus, we tested whether or not  $A\beta$  affects the activity of the PFC network and the activation of this cortex by hippocampal input stimulation *in vitro*. We found that  $A\beta$  application to brain slices inhibits PFC spontaneous network activity as well as PFC activation, both at the population and at the single-cell level, when the hippocampal input is stimulated. Our data suggest that  $A\beta$  can contribute to AD by disrupting PFC activity and its long-range interactions throughout the brain.

## 1. Introduction

The prefrontal cortex (PFC) is implicated in cognitive processes including working memory, temporal processing, decision making, flexibility, and goal-oriented behavior [1–4]. Alterations in some of these processes are observed in Alzheimer's Disease (AD) patients [5, 6], and they correlate with amyloid beta ( $A\beta$ ) peptide accumulation in the PFC and other related brain areas [7, 8]. Similar alterations in PFC function are observed in AD transgenic mice [9–11], which also correlate with increased  $A\beta$  levels in the PFC and other connected brain areas [9, 11]. These findings suggest that  $A\beta$  can alter PFC functionality [11]. In fact, alterations in PFC synaptic transmission [12] and plasticity [11], as well as in cell excitability [13] and in network activity [14], have been reported in AD transgenic mice. Some data indicate that these deleterious effects might be produced directly by the presence of  $A\beta$  in the PFC [15–17].

Alterations in PFC-controlled behaviors [18–20] and function [18, 19] can also be induced by intrahippocampal application of  $A\beta$ , which indicates that altered PFC function can also be induced by dysfunctional connectivity with other

brain areas [18–20]. The hippocampal connection with the PFC consists of excitatory glutamatergic fibers that synapse on both PFC pyramidal neurons [21–23] and interneurons [23–25]. This connection allows the synchronization between these two structures, in different frequency patterns, which correlates with animals' behavioral performance in PFC functions mentioned above [18, 19, 26–28]. Moreover, AD patients exhibit alterations in PFC coupling with the hippocampus and in the functions that rely on this reciprocal connection [29–32]. The possibility that alterations in the synaptic interactions between the hippocampus and the PFC also contribute to  $A\beta$ -induced pathology prompted us to test the effects of  $A\beta$  on the PFC activity isolated in a brain slice [23] as well as on the PFC activation induced by the stimulation of the hippocampal fibers preserved in a PFC slice preparation developed by Parent et al. [23]. We found that  $A\beta$  inhibits both PFC spontaneous network activity and PFC activation, both at the population and at the single-cell level, induced by hippocampal fiber-activation. Our data suggest that  $A\beta$  contributes to PFC dysfunction by a direct effect on its network activity as well as by a reduction in its synaptic innervation from the hippocampus.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Ethics Statement.** Approval of the Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología at Universidad Nacional Autónoma de México was granted for all the experimental procedures (protocol number 91.A), which were carried out according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80-23, Bethesda, MD, USA, 1996).

**2.2. Subjects.** Specific pathogen-free Wistar rats (8–12 weeks old) were obtained from our breeding colony located in the facility of the Instituto de Neurobiología. All animals were housed in groups of four animals, in transparent acrylic cages located in ventilated racks (12 to 15 complete air changes per hour) at constant temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ) and maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle with free access to food (Irradiated Picolab Rodent Diet 20, PMI) and water *ad libitum*.

**2.3. Amyloid Beta Preparation.**  $A\beta_{42}$  peptide was obtained from BACHEM (Heidelberg, Germany). The oligomerization procedure was performed as previously described [33, 34]. Briefly, solid  $A\beta_{1-42}$  peptide was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a final concentration of 1 mM. This solution was incubated for 60 min at room temperature, the HFIP was evaporated overnight, and DMSO was added to prepare a 5 mM solution. Then, by adding F12 medium (MF12), a new solution of  $A\beta_{42}$  was obtained with a final concentration of 100  $\mu\text{M}$  (100 pmoles/ $\mu\text{L}$ ). This solution was incubated for 24 h at  $5^\circ\text{C}$  and then centrifuged at  $14,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min.  $A\beta$  oligomers found in the supernatant were collected and maintained at  $4^\circ\text{C}$  until being used for experiments. Previous characterization of our solution indicates that it contains a mixture of  $A\beta$  aggregates, with hexamers as the main  $A\beta$  oligomeric form present [34].

**2.4. Prefrontal Cortex Slice Preparation.** Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (62 mg/Kg) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid containing (in mM) 238 sucrose, 3 KCl, 2.5  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , and 30 D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ ). Then, the brain was removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) 119 NaCl, 3 KCl, 1.5  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , and 30 D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen. The cerebellum was removed, both hemispheres were mounted onto an agar block with a  $10\text{--}12^\circ$  inclination [23], and coronal slices containing both the PFC (400  $\mu\text{m}$  thick) and the hippocampal bundle were obtained using a vibratome (Microm HM 650 V, Thermo Scientific, USA). Only one slice was obtained per animal. The slices were left to recover at room temperature for at least 60 min before any further experimental manipulation.

**2.5. Electrophysiological Recordings.** For extracellular field population recordings, PFC slices were transferred to a

submerged recording chamber continuously perfused at 15–17 ml/min with oxygenated aCSF maintained at  $30\text{--}32^\circ\text{C}$ . The field recordings were obtained using borosilicate electrodes (0.5–1  $\text{M}\Omega$ ) filled with aCSF and positioned on layer 5–6 of the prelimbic region of the PFC [23]. PFC spontaneous activity was recorded for 20 min to obtain the basal network activity. Thereafter,  $A\beta$  was added to the bath, and its effects were recorded for 1 h. Finally, 1 mM lidocaine was added to the bath to block neural activity, as a control for the viability of the slice [35]. Alternatively, the hippocampal axonal bundle was stimulated electrically with a concentric bipolar microelectrode (FHC Inc., Bowdoin, ME, USA) [36–38]. The synaptic potentials were evoked by trains of 5 pulses at different frequencies (5, 10, 20, and 50 Hz). Each stimulus in the train had a duration of 100- $\mu\text{s}$  and was delivered at 0.04 Hz. The stimulus intensity was adjusted in each experiment and for each preparation to evoke a response of 50% maximal amplitude [36–38]. After recording control potentials, 30 nM  $A\beta$  was added to the bath, and its effects on the synaptic transmission were monitored for 60 min. Then 10  $\mu\text{M}$  APV and 10  $\mu\text{M}$  CNQX were added to the bath to block all glutamatergic transmission. Finally, 1 mM lidocaine was added to the bath to block any neuronal activity.

**2.6. Calcium Imaging.** PFC slices were incubated at room temperature, in the dark, for 2 h in the presence of 10  $\mu\text{M}$  Fluo-8 AM (Invitrogen) and 0.3% pluronic acid in aCSF equilibrated with carbogen [37, 39–41]. Then, after a recovery period of 2 h, the slices were transferred and immobilized, with a nylon mesh, into a perfusion chamber on a microscope adapted to an epifluorescence system (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY). Slices were continuously perfused with aCSF equilibrated with carbogen at  $30\text{--}32^\circ\text{C}$ . Excitation at 488 nm was performed with a Lambda LS illuminator (Sutter Instrument, Novato, CA), and images were acquired with a cooled digital camera (CoolSNAP-ES, Roper Scientific, Tucson, AZ). The imaging software used was RS Image (Photometrics; Roper Scientific, Tucson, AZ), and the imaged field was  $800 \times 600 \mu\text{m}$ . Short movies (175 s, 40- $\mu\text{s}$  exposure, four images per second) were taken. Cells active during the experiment were analyzed. The hippocampal axonal bundle was stimulated electrically as described above in control conditions and in the presence of  $A\beta$ .

**2.7. Data Analysis.** For all electrophysiological experiments, the signal was amplified and filtered (highpass, 0.5 Hz; lowpass, 1.5 KHz) with a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). All recordings were digitized at 9 KHz and stored on a personal computer with an acquisition system from National Instruments (Austin, TX, USA) using custom-made software designed for the LabView environment. The recordings obtained were analyzed off-line. All evoked synaptic responses were measured from the start of the stimulation artifact to the valley of the synaptic response in Clampfit (Molecular Devices). Three 10-sec segments of each condition were analyzed using a Fast Fourier Transform Algorithm with a Hamming window also in Clampfit. The power spectra of all segments were averaged

and normalized to the basal spontaneous activity of each individual experiment.

For calcium imaging, image processing was carried out with ImageJ (v.1.36, National Institutes of Health) and custom-made programs in LabView and MATLAB [40, 41]. All active neurons in a field were semiautomatically identified, and their mean fluorescence was measured as a function of time. Single pixel noise was discarded using a 5-pixel ratio mean filter. Calcium-dependent fluorescence signals were computed as  $(F_i - F_o)/F_o$ , where  $F_i$  is the fluorescence intensity at any frame and  $F_o$  is the resting fluorescence, that is, average fluorescence of the first four frames of the movie. Calcium signals were detected based on a threshold value given by their first time derivative (2.5 times the standard deviation (SD) of the noise value). Thus, we obtained a  $C \times F$  binary matrix, where  $C$  represents the number of active cells and  $F$  the number of frames for each movie. Recordings were inspected manually to remove artifacts and slow calcium transients which are likely to correspond to glial cells [37, 40]. After defining all neuronal-like calcium transients, we built raster plots and quantified both the number of active neurons per bin (250 ms) and the number of neuronal-like calcium transients per neuron (cell-activation instances).

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). In most cases the data distribution was markedly skewed, and hence we used a Mann–Whitney Rank Sum Test or a Kruskal–Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks followed by Dunn’s Method for multiple comparisons. Differences with statistical significance are denoted by  $p < 0.05$ .

### 3. Results

To evaluate the effect of  $A\beta$  on the general activity of the prefrontal region of the PFC, we measured its spontaneous population activity *in vitro* (Figure 1). Spontaneous prefrontal network recordings in slices showed low-voltage neuronal activity that includes a broad range of frequency components (Figure 1;  $n = 10$ ; meaning 10 slices obtained from 10 animals, with only one slice per animal). As previously shown for other neuronal networks [34–37], this activity is reduced by the application of 30 nM  $A\beta$  (Figure 1, representative traces and power spectra). Analysis of the integrated power (from 1 to 120 Hz) showed a significant reduction of the prefrontal spontaneous network activity 60 min after  $A\beta$  application (to  $63.2 \pm 8.5\%$  of basal activity,  $p < 0.05$ ;  $n = 10$ ) (Figure 1, inset bar graph).

To evaluate the effect of  $A\beta$  on the hippocampal input into the PFC, we initially measured the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in the PFC induced by the stimulation of the hippocampal input at different frequencies [42]. The repetitive stimulation of the hippocampal fibers induces fEPSPs in the PFC that exhibit different degrees of facilitation depending of the stimulation frequency [42] (Figure 2(a)). For instance, the amplitude of the fifth fEPSP increases to  $141.9 \pm 12.0\%$  of the first fEPSP when the stimulation is applied at 5 Hz (Figure 2(b)). When the stimulation is applied at 10 Hz, the amplitude of the fifth fEPSP increases to

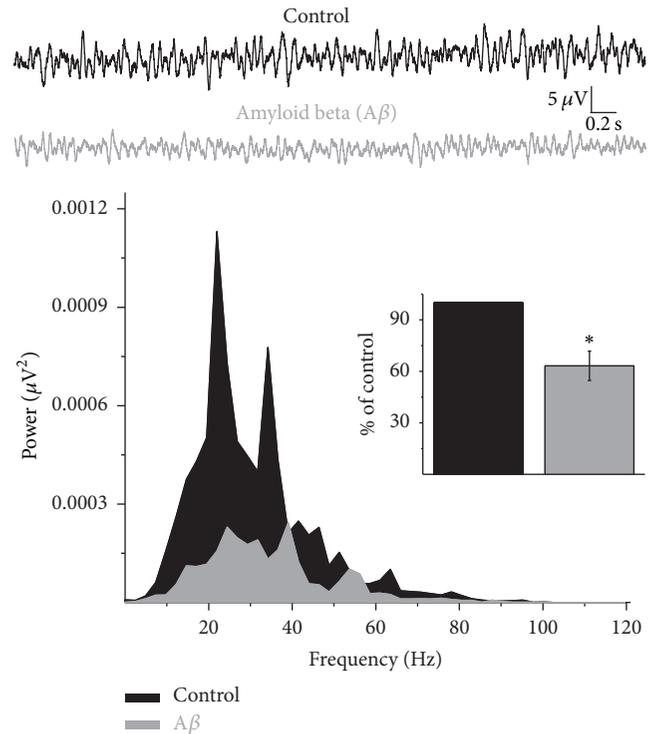


FIGURE 1:  $A\beta$  inhibits PFC spontaneous population activity. At the top, representative traces of PFC spontaneous activity are shown recorded in basal conditions (black traces) and after 60 min of continuous application of  $A\beta$  (30 nM; gray traces). Their corresponding power spectra are shown at the bottom, and the integrated power for each condition (basal power set as 100%) is shown as an inset. Note that  $A\beta$  application significantly reduces the power of the PFC spontaneous population activity. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control activity ( $n = 10$  slices).

$162.7 \pm 14.8\%$  of the first fEPSP (Figure 2(b)). When the stimulation is applied at 20 Hz, the amplitude of the fifth fEPSP increases only to  $128.7 \pm 15.0\%$  of the first fEPSP (Figure 2(b)). When the stimulation was applied at 50 Hz the individual fEPSPs get mixed into a “compound” fEPSP that does not allow individual fEPSPs to be evaluated accurately. Thus, in this case, we quantified the maximal amplitude of the compound fEPSP ( $20.3 \pm 6.8 \mu\text{V}$ ; (Figure 2(c)). Bath application of  $A\beta$  reduces the amplitude of the fEPSPs, as well as that of the compound fEPSP (Figure 2(a)), regardless of the stimulation frequency or the fEPSP number (1 to 5; Figure 2(b);  $p < 0.05$ ), except for the third fEPSP of the stimulation applied at 20 Hz, for which no significant reduction was observed after  $A\beta$  application ( $81.1 \pm 13.2\%$  of control, Figure 2(c);  $p = 0.07$ ). In spite of this generalized reduction in synaptic coupling produced by bath application of  $A\beta$ , no change in the synaptic facilitation was observed for any of the fEPSP trains evoked at 5, 10, or 20 Hz (Figure 2(b);  $p < 0.05$ ). This can be seen more clearly when the amplitude of each fEPSP in the train is normalized to the amplitude of the first fEPSP (set as 1; Figure 2(b)). In the case of the compound fEPSP,  $A\beta$  application significantly reduced the maximal amplitude to  $78.6 \pm 2.8\%$  of control (Figure 2(c);

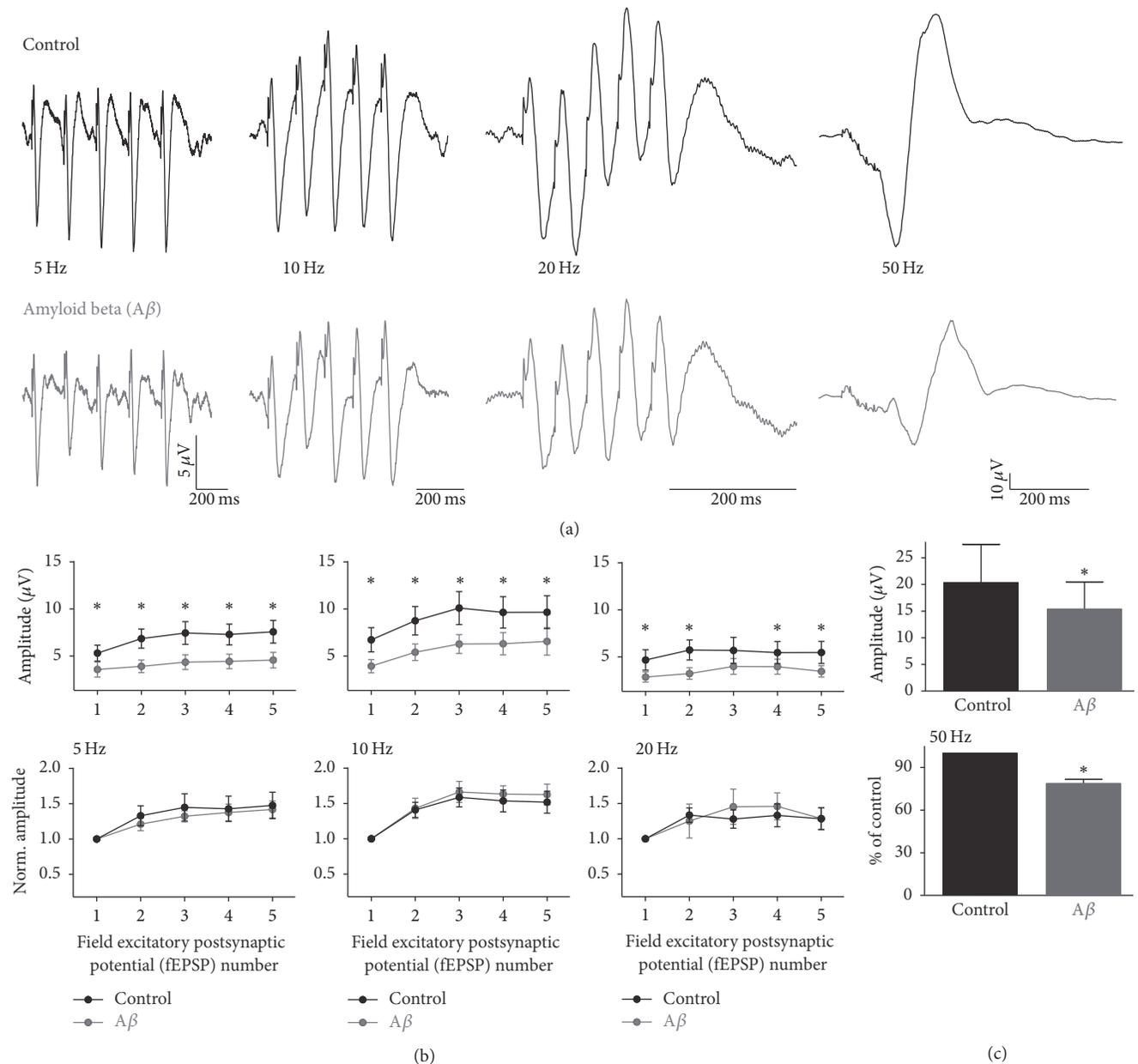


FIGURE 2:  $A\beta$  inhibits hippocampal input into PFC. (a) Representative traces of EPSPs recorded in the PFC and evoked by stimulation of the hippocampal bundle at different frequencies (5–50 Hz) are shown. The EPSPs are represented both under basal conditions (black traces) and after 60 min of continuous application of  $A\beta$  (30 nM; gray traces). (b) The amplitude of each EPSP during the different trains is plotted as the absolute value and also as the value normalized to the first EPSP ( $EPSP_n/EPSP_1 = \text{Norm. Amplitude}$ ). The mean amplitudes of the EPSPs are represented under basal conditions (black dots/lines) and after 60 min of continuous application of  $A\beta$  (30 nM; gray dots/lines). (c) The amplitudes of the “compound” EPSPs are represented in the bar graphs quantified as absolute values (upper graph) and also after normalizing to the control (set at 100%; lower graph). Note that  $A\beta$  application significantly reduces the synaptic input from the hippocampal fibers into the PFC. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  versus control activity ( $n = 10$  slices).

$p < 0.05$ ). Thus, these results indicate that bath application of  $A\beta$  produces a generalized reduction in the synaptic neurotransmission provided by the hippocampus into the PFC.

To evaluate the effect of  $A\beta$  on the hippocampal input into the PFC at the cellular level, we measured the calcium transients induced in single neurons by the stimulation of the

hippocampal input. First, we found that the stimulation of the hippocampal fibers recruits PFC neurons, increasing their calcium transients (cell-activation instances) for several seconds (Figure 3). Then, we observed that there is a differential recruitment of PFC neurons depending on the stimulation frequency [42] (Figure 3). In control conditions, a maximal number of PFC neurons are recruited when hippocampal

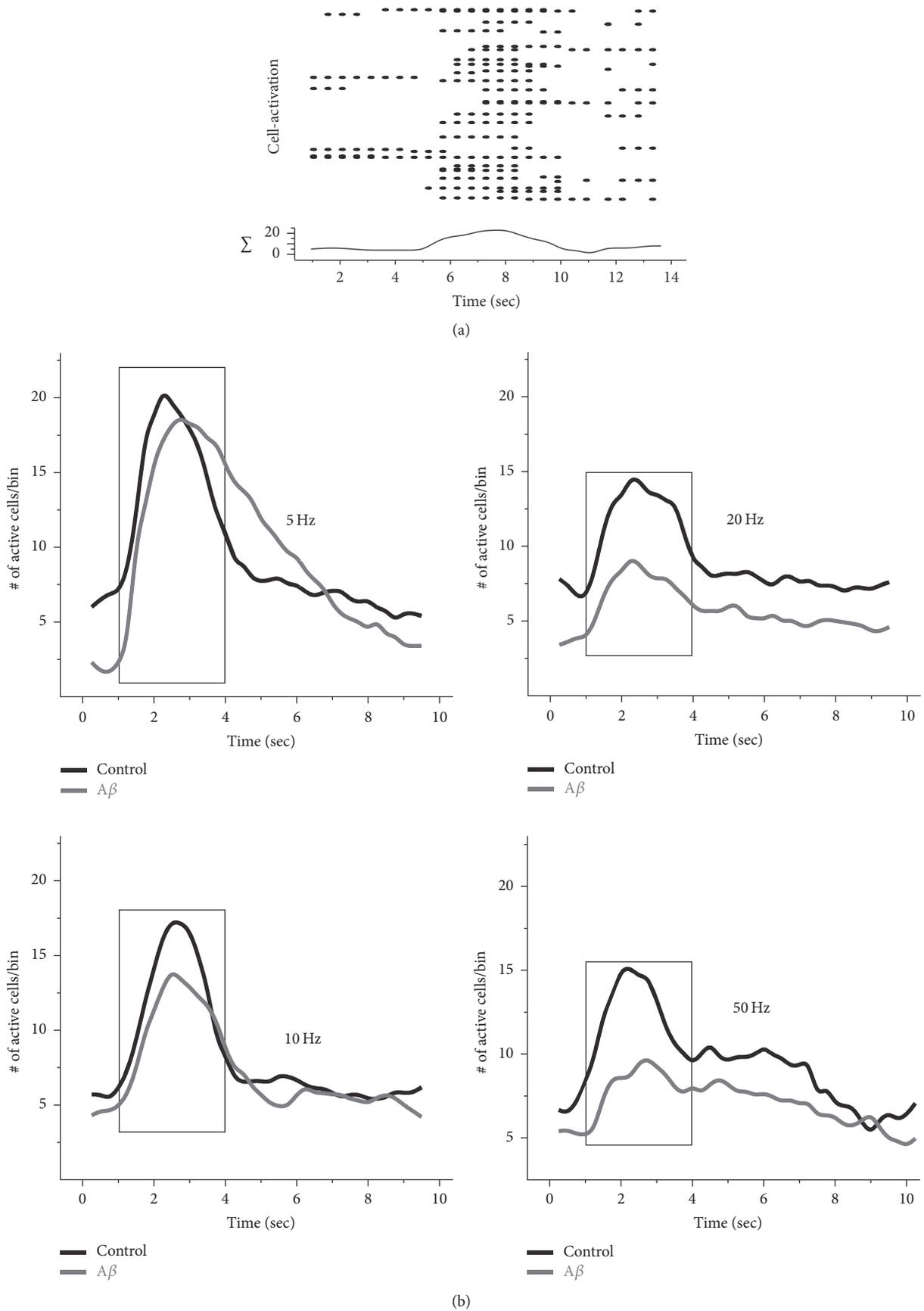


FIGURE 3: Continued.

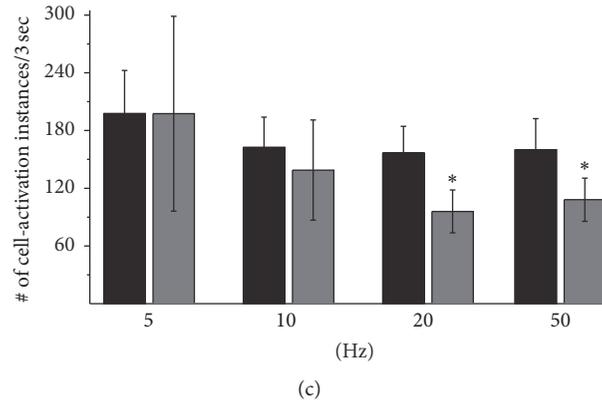


FIGURE 3:  $A\beta$  inhibits PFC-neuron recruitment by hippocampal input stimulation. (a) A representative raster plot shows the activity of PFC neurons and its response to the stimulation of the hippocampal bundle (delivered at second five). Each row represents the activity of a single cell, and each dot represents a cell-activation (i.e., calcium transient). At the bottom, the sum of all the cell-activation instances per bin (bin = 250 ms) is quantified. (b) The graphs represent the mean sums of cell-activation instances per bin for all the frequencies tested. The mean sums are represented both under basal conditions (black lines) and after 60 min of continuous application of  $A\beta$  (30 nM; gray lines). (c) Quantification of the number of cell-activation instances in 3 sec (represented by the rectangle) after the different stimulation trains is presented. Note that  $A\beta$  application significantly reduces PFC-neuron recruitment when the hippocampal bundle stimulation is applied at high frequencies. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  versus control activity ( $n = 5$  slices).

fibers are stimulated at 5 Hz ( $21.2 \pm 5.4$  neurons;  $n = 5$  slices; Figure 3(b)). This cell recruitment is significantly reduced when stimulation is applied both at 10 Hz ( $17.4 \pm 5.44$  neurons;  $p < 0.05$ ) and at 20 Hz ( $15.4 \pm 3.7$  neurons;  $p < 0.05$ ), whereas it tends to be reduced when stimulation is applied at 50 Hz ( $15.7 \pm 2.8$  neurons;  $p < 0.09$ ). The maximal number of PFC neurons recruited after hippocampal stimulation is reduced in the presence of  $A\beta$ , compared to control conditions, when the hippocampal fibers are stimulated at 20 Hz (to  $66.4 \pm 13.7\%$  of control;  $p < 0.05$ ; Figure 3(b) right upper part) and 50 Hz (to  $71.0 \pm 13.2\%$  of control;  $p < 0.05$ ; Figure 3(b) right lower part). No significant differences versus control conditions were observed in the maximal number of PFC neurons recruited after hippocampal stimulation in the presence of  $A\beta$  when the stimulation was applied at 5 and 10 Hz (Figure 3(b) left upper and lower part). The result was similar when the total number of cell-activation instances in 3 seconds was quantified (Figure 3(c)). Compared to control conditions, the total number of cell-activation instances was significantly reduced in the presence of  $A\beta$  when the hippocampal fibers were stimulated at 20 Hz (to  $59.2 \pm 8.4\%$  of control;  $p < 0.05$ ; Figure 3(c)) and 50 Hz (to  $68.6 \pm 11.1\%$  of control;  $p < 0.05$ ; Figure 3(c)), but there were no significant differences when the hippocampal fiber stimulation was applied at 5 and 10 Hz (Figure 3(c)).

#### 4. Discussion

Here, we found that  $A\beta$  inhibits PFC spontaneous network activity as well as the PFC activation induced by hippocampal fiber-activation both at the population and at the single-cell level, suggesting that  $A\beta$  might contribute to PFC dysfunction by a direct effect on this network as well as by a reduction in its synaptic innervation. This finding might

constitute the cellular basis of several cognitive deficits that can be produced by PFC dysfunction and/or disrupted PFC-hippocampal coupling and are observed in both AD patients and AD transgenic models.

Our finding that  $A\beta$  inhibits PFC spontaneous network activity is very similar to observations by our group and others that direct application of  $A\beta$  inhibits spontaneous network activity in a variety of networks including the olfactory bulb [43], the entorhinal cortex [44], and the hippocampus [37, 45]. In fact, a previous finding already indicated that direct application of  $A\beta$  inhibits synchronized activity induced by calcium depletion in PFC slices [46]. In this case, inhibition of  $A\beta$ -induced network activity was related to changes in cell excitability [46]. This  $A\beta$ -induced inhibition of cell excitability was found to be more prominent in PFC interneurons [17]. This finding correlates with those obtained previously in our laboratory, which show that, despite the lack of effect of  $A\beta$  on action potential firing in hippocampal pyramidal cells, the presence of  $A\beta$  does induce a reduction in subthreshold membrane potential oscillation [37]. This latter effect might contribute to the  $A\beta$ -induced action potential desynchronization in the hippocampus that contributes to the inhibition of its neural network activity [45]. Aside from the changes in cell excitability, the inhibition of neural network activity induced by  $A\beta$  has also been related to a reduction in both excitatory [34, 37, 47, 48] and inhibitory [47, 48] synaptic transmission. In fact, these findings are consistent with the observation that  $A\beta$  reduced cholinergic modulation of the inhibitory transmission in the PFC [17]. Altogether, the changes in cell excitability and synaptic transmission might contribute to the  $A\beta$ -induced inhibition of PFC network activity [15–17]. It is important to point out that our finding that  $A\beta$  inhibits PFC spontaneous network activity coincides with studies showing changes in

PFC network function in AD animal models [14, 18, 19] and AD patients [29–31, 49], suggesting that this pathological process can contribute to PFC dysfunction in AD.

AD-associated PFC dysfunction also seems to be the result of reduced PFC coupling to other brain areas [18–20, 29–31, 49]. One PFC connection that is disturbed in AD is the PFC-hippocampal coupling [29–31]. As was already mentioned, alterations in PFC-controlled behaviors [18–20] and function [18–20] can be induced by intrahippocampal injection of  $A\beta$ . It is well known that  $A\beta$  affects hippocampal function both *in vivo* [37, 50] and *in vitro* [33, 45, 51] and, here, we show that  $A\beta$  can affect hippocampal input into the PFC. As this connection is required for the proper synchronization between these two structures and for normal PFC function [18, 19, 26, 27, 32], it is likely that PFC-hippocampal uncoupling could contribute to  $A\beta$ -induced pathology and, perhaps, to AD. Considering that PFC-hippocampal coupling occurs at a variety of different oscillatory frequencies [32, 52, 53], we tested whether  $A\beta$  affects hippocampal input when it is stimulated at different frequencies. Whereas we observed a generalized reduction in PFC activation at all frequencies tested, the inhibition was more prominent, at least at the unicellular level, when the stimulation was delivered at high frequencies (Figure 3). One possible explanation is that this connection is tuned to synchronize the two circuits at low frequencies [26, 35, 42] and, thus, not only is the hippocampal input more efficient in recruiting the PFC at low frequencies [26, 35, 42] but it also renders the connection less vulnerable to  $A\beta$  effects when stimulated at low frequencies. It is well known that the synaptic components recruited by different stimulation frequencies vary [42] and that stimulation at higher frequencies favors the recruitment of inhibitory components [42]. Inhibitory neurons and synapses seem to be more sensitive to the effects of  $A\beta$  [17, 54], which might explain why  $A\beta$  had a major effect on hippocampal input to the PFC when tested at high-frequency stimulation. In fact, this finding is consistent with the observation that fast oscillatory activity, which relies heavily on inhibitory networks [54, 55], is more sensitive to the effects of  $A\beta$  [35, 44, 45, 54] compared to slow oscillatory activity. Moreover, fast oscillatory activity is more disrupted both in AD patients [56, 57] and in AD animal models [54, 58, 59]. Thus, understanding the cellular basis of the changes in neural network activity and the alteration in neural network coupling induced by  $A\beta$  would help to explain the cellular basis of AD pathophysiology and also would reveal therapeutic strategies to reactivate such networks or reestablish their connections in order to palliate AD symptoms [60–62].

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Dorothy Pless and Jessica González for editorial comments. They thank Dr. Benito Ordaz for

technical support. Ernesto Flores-Martínez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received Fellowship 231675 from CONACYT. This study was supported by Alzheimer's Association Grant NIRG-11-205443, Fundación Marcos Moshinsky, and CONACyT Grants 117, 235789, 237570, 246888, and 181323 and by DGAPA-UNAM Grant IN200715.

## References

- [1] J. W. Dalley, R. N. Cardinal, and T. W. Robbins, "Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 28, no. 7, pp. 771–784, 2004.
- [2] P. S. Goldman-Rakic, "Cellular basis of working memory," *Neuron*, vol. 14, no. 3, pp. 477–485, 1995.
- [3] R. P. Kesner and J. C. Churchwell, "An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 96, no. 3, pp. 417–431, 2011.
- [4] B. P. Godsil, J. P. Kiss, M. Spedding, and T. M. Jay, "The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders?" *European Neuropsychopharmacology*, vol. 23, no. 10, pp. 1165–1181, 2013.
- [5] A. D. Baddeley, S. Bressi, S. Della Sala, R. Logie, and H. Spinnler, "The decline of working memory in Alzheimer's disease: A Longitudinal Study," *Brain*, vol. 114, no. 6, pp. 2521–2542, 1991.
- [6] E. A. Kensinger, D. K. Shearer, J. J. Locascio, J. H. Growdon, and S. Corkin, "Working memory in mild Alzheimer's disease and early Parkinson's disease," *Neuropsychology*, vol. 17, no. 2, pp. 230–239, 2003.
- [7] C. R. Jack Jr., V. J. Lowe, M. L. Senjem et al., "11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment," *Brain*, vol. 131, no. 3, pp. 665–680, 2008.
- [8] T. Mori, H. Shimada, H. Shinotoh et al., "Apathy correlates with prefrontal amyloid  $\beta$  deposition in Alzheimer's disease," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 85, no. 4, pp. 449–455, 2014.
- [9] J.-M. Zhuo, A. Prakasam, M. E. Murray et al., "An increase in  $A\beta$ 42 in the prefrontal cortex is associated with a reversal-learning impairment in Alzheimer's disease model Tg2576 APPsw mice," *Current Alzheimer Research*, vol. 5, no. 4, pp. 385–391, 2008.
- [10] J. Blanchard, G. Martel, L. Brayda-Bruno, X. Noguès, and J. Micheau, "Detection of age-dependent working memory deterioration in APP751SL mice," *Behavioural Brain Research*, vol. 218, no. 1, pp. 129–137, 2011.
- [11] A. C. Lo, E. Iscru, D. Blum et al., "Amyloid and tau neuropathology differentially affect prefrontal synaptic plasticity and cognitive performance in mouse models of Alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 37, no. 1, pp. 109–125, 2013.
- [12] C. Bories, M. J. Guitton, C. Julien et al., "Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, article e46111, 2012.
- [13] É. Proulx, P. Fraser, J. McLaurin, and E. K. Lambe, "Impaired cholinergic excitation of prefrontal attention circuitry in the TgCRND8 model of Alzheimer's disease," *Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 37, pp. 12779–12791, 2015.

- [14] B. Platt, B. Drever, D. Koss et al., "Abnormal cognition, sleep, eeg and brain metabolism in a novel knock-in alzheimer mouse, plb1," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, article e27068, 2011.
- [15] P. Zhong, Z. Gu, X. Wang, H. Jiang, J. Feng, and Z. Yan, "Impaired modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 29, pp. 26888–26896, 2003.
- [16] W. Liu, F. Dou, J. Feng, and Z. Yan, "RACK1 is involved in  $\beta$ -amyloid impairment of muscarinic regulation of GABAergic transmission," *Neurobiology of Aging*, vol. 32, no. 10, pp. 1818–1826, 2011.
- [17] G.-J. Chen, Z. Xiong, and Z. Yan, " $A\beta$  impairs nicotinic regulation of inhibitory synaptic transmission and interneuron excitability in prefrontal cortex," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 8, no. 1, article 3, 2013.
- [18] W. Bai, H. Yi, T. Liu, J. Wei, and X. Tian, "Incoordination between spikes and LFPs in  $A\beta$ 1-42-mediated memory deficits in rats," *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 8, article 411, 2014.
- [19] J. Wei, H. Yi, D. Zhang, W. Bai, and X. Tian, "Aberrant neuronal activity and dysfunctional connectivity in  $A\beta$ 1-42 mediated memory deficits in rats," *Current Alzheimer Research*, vol. 12, no. 10, pp. 964–973, 2015.
- [20] P. Faucher, N. Mons, J. Micheau, C. Louis, and D. J. Beracochea, "Hippocampal injections of oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide (1–42) induce selective working memory deficits and long-lasting alterations of ERK signaling pathway," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 7, article 245, 2016.
- [21] D. B. Carr and S. R. Sesack, "Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 369, no. 1, pp. 1–15, 1996.
- [22] T. M. Jay, A.-M. Thierry, L. Wiklung, and J. Glowinski, "Excitatory amino acid pathway from the hippocampus to the prefrontal cortex. Contribution of AMPA receptors in hippocampo-prefrontal cortex transmission," *European Journal of Neuroscience*, vol. 4, no. 12, pp. 1285–1295, 1992.
- [23] M. A. Parent, L. Wang, J. Su, T. Netoff, and L.-L. Yuan, "Identification of the hippocampal input to medial prefrontal cortex in vitro," *Cerebral Cortex*, vol. 20, no. 2, pp. 393–403, 2010.
- [24] P. Gabbott, A. Headlam, and S. Busby, "Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat," *Brain Research*, vol. 946, no. 2, pp. 314–322, 2002.
- [25] P. L. Tierney, E. Dégenétais, A.-M. Thierry, J. Glowinski, and Y. Gioanni, "Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex," *European Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 2, pp. 514–524, 2004.
- [26] M. W. Jones and M. A. Wilson, "Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task," *PLoS Biology*, vol. 3, no. 12, article e402, 2005.
- [27] J. M. Hyman, E. A. Zilli, A. M. Paley, and M. E. Hasselmo, "Working memory performance correlates with prefrontal-hippocampal theta interactions but not with prefrontal neuron firing rates," *Frontiers in Integrative Neuroscience*, vol. 4, p. 2, 2010.
- [28] T. Sigurdsson, K. L. Stark, M. Karayiorgou, J. A. Gogos, and J. A. Gordon, "Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia," *Nature*, vol. 464, no. 7289, pp. 763–767, 2010.
- [29] L. Wang, Y. Zang, Y. He et al., "Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: evidence from resting state fMRI," *NeuroImage*, vol. 31, no. 2, pp. 496–504, 2006.
- [30] J. S. Goveas, C. Xie, B. D. Ward et al., "Recovery of hippocampal network connectivity correlates with cognitive improvement in mild Alzheimer's disease patients treated with donepezil assessed by resting-state fMRI," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 34, no. 4, pp. 764–773, 2011.
- [31] M. Zarei, C. F. Beckmann, M. A. Binnewijzend et al., "Functional segmentation of the hippocampus in the healthy human brain and in Alzheimer's disease," *NeuroImage*, vol. 66, pp. 28–35, 2013.
- [32] N. Maingret, G. Girardeau, R. Todorova, M. Goutierre, and M. Zugaro, "Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep," *Nature Neuroscience*, vol. 19, no. 7, pp. 959–964, 2016.
- [33] A. G. Isla, F. G. Vázquez-Cuevas, F. Peña-Ortega, and S. Krantic, "Exercise prevents amyloid- $\beta$ -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 $\beta$  activation," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 52, no. 1, pp. 333–343, 2016.
- [34] H. Balleza-Tapia, A. Huanosta-Gutiérrez, A. Márquez-Ramos, N. Arias, and F. Peña, "Amyloid  $\beta$  oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner," *Current Alzheimer Research*, vol. 7, no. 5, pp. 453–462, 2010.
- [35] A. Adaya-Villanueva, B. Ordaz, H. Balleza-Tapia, A. Márquez-Ramos, and F. Peña-Ortega, "Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides," *Peptides*, vol. 31, no. 9, pp. 1761–1766, 2010.
- [36] F. Peña, J. Bargas, and R. Tapia, "Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo," *Neuropharmacology*, vol. 42, no. 6, pp. 807–812, 2002.
- [37] F. Peña, B. Ordaz, H. Balleza-Tapia et al., "Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase," *Hippocampus*, vol. 20, no. 1, pp. 78–96, 2010.
- [38] V. Vargas-Barroso, B. Ordaz-Sánchez, F. Peña-Ortega, and J. A. Larriva-Sahd, "Electrophysiological evidence for a direct link between the main and accessory olfactory bulbs in the adult rat," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 9, article 518, 2016.
- [39] M. Ramírez, J. Hernández-Montoya, S. L. Sánchez-Serrano et al., "GABA-mediated induction of early neuronal markers expression in postnatal rat progenitor cells in culture," *Neuroscience*, vol. 224, pp. 210–222, 2012.
- [40] L. Carrillo-Reid, F. Tecuapetla, D. Tapia et al., "Encoding network states by striatal cell assemblies," *Journal of Neurophysiology*, vol. 99, no. 3, pp. 1435–1450, 2008.
- [41] J. Pérez-Ortega, M. Duhne, E. Lara-González et al., "Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits," *Neurobiology of Disease*, vol. 91, pp. 347–361, 2016.
- [42] M. E. Stone, A. Maffei, and A. Fontanini, "Amygdala stimulation evokes time-varying synaptic responses in the gustatory cortex of anesthetized rats," *Frontiers in Integrative Neuroscience*, vol. 5, article 3, 2011.
- [43] R. Alvarado-Martínez, K. Salgado-Puga, and F. Peña-Ortega, "Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e75745, 2013.
- [44] F. Peña-Ortega, Á. Solís-Cisneros, B. Ordaz, H. Balleza-Tapia, and J. J. López-Guerrero, "Amyloid beta 1–42 inhibits entorhinal

- cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3,” *Current Alzheimer Research*, vol. 9, no. 7, pp. 857–863, 2012.
- [45] F. R. Kurudenkandy, M. Zilberter, H. Biverstål et al., “Amyloid- $\beta$ -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 34, pp. 11416–11425, 2014.
- [46] Y. Wang, G. Zhang, H. Zhou, A. Barakat, and H. Querfurth, “Opposite effects of low and high doses of A $\beta$ 42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, article e8366, 2009.
- [47] V. Nimrich, C. Grimm, A. Draguhn et al., “Amyloid  $\beta$  oligomers (A $\beta$ 1–42 globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents,” *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 4, pp. 788–797, 2008.
- [48] C. Xing, Y. Yin, R. Chang, X. He, and Z. Xie, “A role of insulin-like growth factor 1 in  $\beta$  amyloid-induced disinhibition of hippocampal neurons,” *Neuroscience Letters*, vol. 384, no. 1–2, pp. 93–97, 2005.
- [49] T. Montez, S.-S. Poil, B. F. Jones et al., “Altered temporal correlations in parietal alpha and prefrontal theta oscillations in early-stage Alzheimer disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 5, pp. 1614–1619, 2009.
- [50] F. Peña-Ortega and R. Bernal-Pedraza, “Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations,” *International Journal of Peptides*, vol. 2012, Article ID 236289, 8 pages, 2012.
- [51] A. I. Gutiérrez-Lerma, B. Ordaz, and F. Peña-Ortega, “Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro,” *International Journal of Peptides*, vol. 2013, Article ID 328140, 11 pages, 2013.
- [52] S. H. Bitzenhofer, K. Sieben, K. D. Siebert, M. Spehr, and I. L. Hanganu-Opatz, “Oscillatory activity in developing prefrontal networks results from theta-gamma-modulated synaptic inputs,” *Cell Reports*, vol. 11, no. 3, pp. 486–497, 2015.
- [53] K. M. Igarashi, “Plasticity in oscillatory coupling between hippocampus and cortex,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 35, pp. 163–168, 2015.
- [54] L. Verret, E. O. Mann, G. B. Hang et al., “Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model,” *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 708–721, 2012.
- [55] F. Peña-Ortega, “Amyloid beta-protein and neural network dysfunction,” *Journal of Neurodegenerative Diseases*, vol. 2013, Article ID 657470, 8 pages, 2013.
- [56] E. C. W. Van Straaten, P. Scheltens, A. A. Gouw, and C. J. Stam, “Eyes-closed task-free electroencephalography in clinical trials for Alzheimer’s disease: an emerging method based upon brain dynamics,” *Alzheimer’s Research and Therapy*, vol. 6, no. 9, article 86, 2014.
- [57] M. M. Engels, A. Hillebrand, W. M. van der Flier, C. J. Stam, P. Scheltens, and E. C. van Straaten, “Slowing of hippocampal activity correlates with cognitive decline in early onset Alzheimer’s disease. An MEG study with virtual electrodes,” *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 10, article 238, 2016.
- [58] J. E. Driver, C. Racca, M. O. Cunningham et al., “Impairment of hippocampal gamma ( $\gamma$ )-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP),” *European Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 5, pp. 1280–1288, 2007.
- [59] R. Goutagny, N. Gu, C. Cavanagh et al., “Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 37, no. 12, pp. 1896–1902, 2013.
- [60] H. Balleza-Tapia and F. Peña, “Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein,” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 6, pp. 724–740, 2009.
- [61] K. Salgado-Puga, R. A. Prado-Alcalá, and F. Peña-Ortega, “Amyloid  $\beta$  enhances typical rodent behavior while it impairs contextual memory consolidation,” *Behavioural Neurology*, vol. 2015, Article ID 526912, 12 pages, 2015.
- [62] K. Salgado-Puga and F. Peña-Ortega, “Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid  $\beta$  protein,” *Protein and Peptide Letters*, vol. 22, no. 4, pp. 303–321, 2015.