



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

**EFFECTO DE LA REDUCCIÓN DE SEROTONINA
SEPTAL SOBRE AL ACTIVIDAD THETA HIPOCAMPAL
ASOCIADA A LA MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL,
EN LA RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORADO EN FÍSICA
PRESENTA:**

M. en F.B. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ VÁZQUEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
Doctor en Ciencias
JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO**



Morelia, Michocán

Diciembre de 2016

Contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3.1. Origen de las oscilaciones neuronales..... | 3 |
| 3.2. Análisis de las Señales de EEG..... | 5 |
| 3.3 La transformada discreta de Fourier y la Transformada Rápida de Fourier | 9 |
| 3.4. La función hipocampal y los procesos cognoscitivos..... | 29 |
| 4. ANTECEDENTES | 43 |
| 5. JUSTIFICACIÓN | 46 |
| 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 48 |
| 7. HIPÓTESIS | 50 |
| 7.1. HIPÓTESIS ESPECÍFICA..... | 50 |
| 8. OBJETIVO GENERAL | 51 |
| 8.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 51 |
| 9. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 52 |
| 9.2. Cirugía..... | 52 |
| 9.3. Entrenamiento en el laberinto radial..... | 54 |
| 9.4. Registro del EEG..... | 56 |
| 9.5. Neuroquímica | 57 |
| 9.6. Histología | 58 |
| 10. DISEÑO EXPERIMENTAL | 60 |
| 11. RESULTADOS | 61 |
| 11.1. Histología | 61 |
| 11.2. Neuroquímica | 61 |
| 11.3. Conducta | 62 |
| 11.4. EEG | 66 |
| 12. DISCUSIÓN | 73 |
| 13. CONCLUSIÓN | 81 |
| 14. BIBLIOGRAFÍA | 82 |
| 15. ANEXO. Publicaciones | 95 |

1. RESUMEN

La actividad theta hipocampal es modulada de forma muy importante por las neuronas del septo medial/Banda diagonal de Broca (SM/BDB) y se ha establecido que guarda una importante relación con el procesamiento de información por parte del hipocampo. La serotonina proveniente del núcleo del rafé medial desincroniza la actividad theta hipocampal, mientras que la inactivación o lesión de dicho núcleo induce actividad theta hipocampal continua y persistente en el hipocampo. La disminución de serotonina en el hipocampo incrementa la expresión de actividad theta de alta frecuencia asociada a una facilitación en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. El SM/BDB es una estructura clave en la modulación de la actividad theta dado su carácter de marcapasos de la actividad de las neuronas del hipocampo. La serotonina modula la actividad del SM/BDB, por lo que es posible que la modulación de la serotonina sobre la actividad theta hipocampal ocurra a través del SM/BDB. Por tal razón se indujo el abatimiento de serotonina del SM/BDB mediante la aplicación de un neurotóxico específico, para evaluar el efecto sobre la actividad eléctrica hipocampal generada durante el procesamiento de información dependiente en una tarea de memoria de trabajo espacial en el laberinto radial de 8 brazos. Se aplicó la microinfusión de 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) en el SM/BDB de ratas Sprague Dawley, que fueron entrenadas en la tarea estándar del laberinto radial (ganar y cambiar), una tarea de memoria de trabajo espacial. Se realizó el registro de la actividad EEG hipocampal simultáneo al entrenamiento conductual mediante la colocación de un electrodo en la región de CA1 dorsal, usando telemetría. La reducción de serotonina del SM/BDB indujo la disminución de actividad theta de baja frecuencia (4-6.5 Hz), el aumento de la actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) y concomitantemente, la facilitación de la memoria de trabajo, como lo mostró la disminución significativa del número de errores, durante el periodo de entrenamiento.

Palabras clave: hipocampo, serotonina, actividad theta, septum, memoria de trabajo.

2. ABSTRACT

Hippocampal theta activity, which is strongly modulated by the septal medial/Broca's diagonal band neurons, has been linked to information processing of the hippocampus. Serotonin from the medial raphe nuclei desynchronizes hippocampal theta activity, whereas inactivation or a lesion of this nucleus induces continuous and persistent theta activity in the hippocampus. Hippocampal serotonin depletion produces an increased expression of high-frequency theta activity concurrent with the facilitation of place learning in the Morris maze. The medial septum–diagonal band of Broca complex (MS/DBB) has been proposed as a key structure in the serotonin modulation of theta activity. We addressed whether serotonin depletion of the MS/DBB induces changes in the characteristics of hippocampal theta activity and whether the depletion is associated with learning in a working memory spatial task in the radial arm maze. Sprague Dawley rats were depleted of 5HT with the infusion of 5,7-dihydroxytryptamine (5, 7-DHT) in MS/DBB and were subsequently trained in the standard test (win-shift) in the radial arm, while the CA1 EEG activity was simultaneously recorded through telemetry. The MS/DBB serotonin depletion induced a low level of expression of low-frequency (4.5–6.5 Hz) and a higher expression of high-frequency (6.5–9.5 Hz) theta activity concomitant to a lesser number of errors committed by rats during the working memory test. Thus, the depletion of serotonin in the MS/DBB resulted in a facilitatory effect on working memory and a predominance of high-frequency theta activity.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Origen de las oscilaciones neuronales

La mayoría de las neuronas dentro de una misma estructura cerebral funcional se interconectan con otras neuronas localizadas en la cercanía. Por lo que, pueden generar señales eléctricas en forma de potenciales de acción en sincronía dando lugar a cambios eléctricos oscilatorios. La actividad de dos o más neuronas está en sincronía si generan sus potenciales de acción al mismo tiempo o casi al mismo tiempo. Esto podría deberse a que las neuronas comparten una misma entrada sináptica o a que interactúan recíprocamente. De esta forma, en una población mixta de neuronas excitadoras e inhibidoras existen tres tipos posibles de sincronización celular sináptica: excitación recurrente entre células excitadoras, inhibición recíproca entre interneuronas inhibidoras y una retroalimentación entre poblaciones de células excitadoras e inhibidoras [1].

Una característica de la sincronía neuronal es que la generación simultánea de respuestas sinápticas en un grupo de neuronas produce localmente un flujo de iones entre el espacio extracelular y el interior del grupo de células. Este flujo iónico produce un potencial de campo que es posible registrar en el espacio extracelular y refleja tanto los fenómenos eléctricos sub-umbrales sincrónicos, como el disparo coordinado de las neuronas contenidas en el campo. Además, si el sitio donde se hace el registro extracelular presenta una distribución

anatómica regular, es posible obtener información útil sobre la distribución espacial de las corrientes. Por ejemplo, el arreglo laminar de la corteza cerebral o del hipocampo, permite relacionar el patrón espacial del potencial extracelular registrado en capas consecutivas con las corrientes extracelulares que se generan en diferentes posiciones de los árboles dendríticos de las neuronas piramidales [1,2] .

De esta manera la actividad espontánea de las neuronas en una red, es una propiedad emergente que requiere de la interacción entre las propiedades intrínsecas celulares y las sinápticas.

Si bien, la sincronía dentro de una red o una población local de neuronas implica que las distancias que las separan son relativamente pequeñas y que los retardos de conducción axonal pueden ser muy pequeños, algunos axones de las neuronas contenidas en un circuito proyectan hacia otras regiones cerebrales más lejanas, lo que permite que dos sitios específicos, pero interconectados, puedan presentar actividad oscilatoria sincrónica. De esta manera, la existencia de un número reducido de proyecciones de largo alcance, muchas de ellas con alta velocidad de conducción por estar recubiertas por mielina, [1,3] permite que regiones apartadas se comuniquen de manera eficiente. Una consecuencia del retardo de propagación de señales entre dos células apartadas, es que impone un límite al periodo mínimo posible para producir un ciclo de la oscilación. En consecuencia, las oscilaciones de alta frecuencia están confinadas a un pequeño espacio neuronal, mientras que grandes redes neuronales pueden ser reclutadas durante las oscilaciones lentas [4]. La actividad sincronizada

de las neuronas corticales, dispuestas en capas, con sus dendritas apicales perpendiculares a la superficie de la corteza, produce también una corriente extracelular que da origen a un potencial eléctrico (en el orden de los μV) que se puede registrar desde la superficie del cuero cabelludo: el electroencefalograma (EEG), cuya actividad se caracteriza por su morfología, su frecuencia de oscilación, su topografía anatómica y el contexto experimental en el que es registrada [1]. Esta actividad da origen a los ritmos de actividad eléctrica cerebral los cuales son la representación a gran escala de las interacciones entre miles de neuronas. Estos ritmos se clasifican en rangos de frecuencia: delta, δ (< 3.5 Hz); theta, θ (4-7.5 Hz); alfa, α (8-13 Hz); beta, β (14-Hz); gamma, γ (30-100 Hz) y actividad de alta frecuencia (> 100 Hz). Las bandas de frecuencia vecinas se asocian típicamente con diferentes estados del funcionamiento cerebral y compiten unas con otras [5], en tanto que ritmos específicos pueden coexistir o interactuar en la misma o en diferentes estructuras [4].

3.2. Análisis de las Señales de EEG

El análisis cuantitativo del electroencefalograma es uno de los grandes avances en el campo de la electrofisiología. Desde 1929, cuando Hans Berger [6] reportó mediciones de actividad eléctrica rítmica a través del cuero cabelludo, se sugirió que estos patrones de origen bioeléctrico podrían proveer señales respecto a las bases neuronales subyacentes a conductas específicas [7]. Posteriormente, a partir del registro

intracelular se estableció que el EEG deriva de potenciales sinápticos graduados generados por las células piramidales en la corteza cerebral, los cuales son inducidos por descargas rítmicas del núcleo talámico [8]. En general el EEG contiene información con respecto a los cambios de las características del funcionamiento cerebral obtenido mediante un conjunto determinado de electrodos de registro. Estos datos incluyen las características de cada oscilación con sus variaciones en topografía, amplitud, frecuencia, y fase.

Una manera clásica de describir el EEG es en términos de bandas de frecuencia. La frecuencia es el número de veces que un proceso se repite en un periodo elegido. El problema de cuantificar la frecuencia lo resolvió inicialmente Fourier, según su teorema, toda señal periódica se puede descomponer en un conjunto de ondas seno y coseno, con su amplitud, fase y frecuencia, que sumadas entre sí reproducen la señal original. Este método, y más en concreto la transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform*, FFT), es el método más ampliamente utilizado para el análisis de frecuencia del EEG [9-11]. Todos estos métodos presuponen que el contenido de las frecuencias de la señal no varía a lo largo del periodo analizado, lo que limita su uso al análisis de señales estacionarias. Así, el análisis de Fourier consiste en la descomposición de la señal en las ondas seno, que sumadas dan la señal original; su fundamento está en la idea de que una señal sinusoidal contiene un número finito de frecuencias y, por tanto, puede descomponerse en un número finito de ondas seno. Cada onda seno se define por la frecuencia, amplitud y fase. Para agilizar el cálculo se

puede aplicar el algoritmo a un número de muestras potencia de dos (FFT). El conjunto de ondas seno de la señal forma el espectro de frecuencias de esa señal. Gracias a este análisis es posible estudiar la señal electroencefalográfica también en el dominio de frecuencia y no sólo en el dominio del tiempo [12].

Si bien la Transformada Rápida de Fourier permite separar una señal EEG en los componentes de frecuencia que la constituyen, permite también calcular la amplitud de cada uno de ellos. De esta manera es posible agrupar los componentes en bandas de frecuencia particulares. Estas amplitudes (por frecuencias individuales o agrupadas en bandas) constituyen el espectro de amplitudes de la señal en estudio. En consecuencia, el espectro de potencias absolutas (PA) de una señal es el espectro de amplitudes elevado al cuadrado. La suma de todos los valores de potencia absoluta, que forman el espectro, se llama potencia absoluta total; la cual gráficamente se puede considerar como equivalente al área comprendida entre la curva del espectro y el eje de las abscisas. Por su parte el espectro de potencia relativa (PR) se obtiene a partir del espectro de potencia absoluta (PA), y es calculada como el porcentaje de la potencia absoluta en cada frecuencia respecto a la potencia absoluta total [13].

La TFF no es más que un algoritmo para acelerar los cálculos de la transformada discreta de Fourier (TDF). Las fórmulas 1, 2 y 3 se pueden aplicar para obtener la TDF, sin emplear el algoritmo de la TFF [14,15].

$$\text{Fre}(x) = \sum_{n=0}^{N-1} F(n) \cos(2\pi nx/N) \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Fim}(x) = - \sum_{n=0}^{N-1} F(n) \text{sen}(2\pi nx/N) \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\text{Pot}(x) = \{\text{Fre}(x)\}^2 + \{\text{Fim}(x)\}^2 \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

$F(n)$, $n=0,1,2,\dots,N-1$ N puntos del segmento de señal en el tiempo

$\text{Fre}(x)$, $n=0,1,2,\dots,N-1$ Los N valores de la parte real del espectro de la señal $f(n)$

$\text{Fim}(x)$, $x=0,1,2,\dots, N-1$ Los N valores de la parte imaginaria del espectro de la señal $f(n)$

$\text{Pot}(x)$, $x=0,1,2,\dots, N-1$ Los N valores del autoespectro de potencia de la señal $f(x)$

Debido a las propiedades de la TDF se sabe que el número de frecuencias en el que es posible descomponer a una señal digital es $N/2$ más un elemento que representa el nivel promedio de los datos (conocido como nivel de corriente directa o nivel DC). Las $((N/2)-1)$ frecuencias restantes son una imagen de las primeras $((N/2)- 1)$.

3.3 La transformada discreta de Fourier y la Transformada Rápida de Fourier

Teniendo en cuenta la Transformada Discreta de Fourier (DFT):

$$X(n) = \sum_{k=0}^{N-1} x_0(k) \cdot \exp\left(\frac{-j \cdot 2 \cdot \pi \cdot n \cdot k}{N}\right) \quad n=0..N-1 \quad (1)$$

Se percibe que la ecuación (1) describe el cómputo de **N** ecuaciones. Por ejemplo, si $N = 4$ y si se hace:

$$W = \exp\left(\frac{-j \cdot 2 \cdot \pi}{N}\right) \quad (2)$$

la expresión (1) puede ser escrita como:

$$\begin{aligned} X(0) &= x_0(0) \cdot W^0 + x_0(1) \cdot W^0 + x_0(2) \cdot W^0 + x_0(3) \cdot W^0 \\ X(1) &= x_0(0) \cdot W^0 + x_0(1) \cdot W^1 + x_0(2) \cdot W^2 + x_0(3) \cdot W^3 \\ X(2) &= x_0(0) \cdot W^0 + x_0(1) \cdot W^2 + x_0(2) \cdot W^4 + x_0(3) \cdot W^6 \\ X(3) &= x_0(0) \cdot W^0 + x_0(1) \cdot W^3 + x_0(2) \cdot W^6 + x_0(3) \cdot W^9 \end{aligned} \quad (3)$$

Las ecuaciones anteriores pueden ser más fácilmente representadas en forma matricial:

$$\begin{bmatrix} X(0) \\ X(1) \\ X(2) \\ X(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} W^0 & W^0 & W^0 & W^0 \\ W^0 & W^1 & W^2 & W^3 \\ W^0 & W^2 & W^4 & W^6 \\ W^0 & W^3 & W^6 & W^9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_0(0) \\ x_0(1) \\ x_0(2) \\ x_0(3) \end{bmatrix} \quad (4)$$

De forma compacta tendremos:

$$X(n) = W^{n \cdot k} \cdot x_0(k) \quad (5)$$

El examen de (4) revela que ya que \mathbf{W} y posiblemente $\mathbf{x}_0(\mathbf{k})$ sean complejas, entonces son necesarias \mathbf{N}^2 multiplicaciones complejas y $\mathbf{N} \cdot (\mathbf{N} - 1)$ adiciones para realizar el cómputo matricial requerido. La transformada rápida de Fourier FFT debe su éxito al hecho que el algoritmo reduce el número de multiplicaciones y adiciones requeridas en el cálculo de (4) [[16] .

A nivel intuitivo, esta reducción se lleva a cabo de la siguiente manera.

Para ilustrar el algoritmo FFT, es conveniente elegir el número de puntos muestras de $\mathbf{x}_0(\mathbf{k})$ de acuerdo a la relación $\mathbf{N} = \mathbf{N} = 2^\gamma$, donde γ es un entero. Recuérdese que la ecuación (4) resulta de la elección $\mathbf{N} = 4 = 2^\gamma = 2^2$ por lo tanto, se puede aplicar la FFT al cómputo de (4).

El primer paso en el desarrollo del algoritmo FFT para este ejemplo es reescribir (4) como:

$$\begin{bmatrix} X(0) \\ X(1) \\ X(2) \\ X(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & W^1 & W^2 & W^3 \\ 1 & W^2 & W^0 & W^2 \\ 1 & W^3 & W^2 & W^1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_0(0) \\ x_0(1) \\ x_0(2) \\ x_0(3) \end{bmatrix} \quad (1)$$

La matriz de la ecuación (1) se deriva de la (4) usando la relación:

$$W^{n \cdot k} = W^{\text{mod}(n \cdot k, N)}$$

Donde **mod(n.k,N)** es el resto de la división entre **n.k** y **N**, por lo tanto si $N=4$, $n=2$ y $k=3$ entonces:

$$W^6 = W^2 \quad (2)$$

ya que

$$W^{n \cdot k} = W^6 = \exp\left[\frac{-j \cdot 2 \cdot \pi}{4} \cdot (6)\right] = \exp(-j \cdot 3 \cdot \pi) = \exp(-j \cdot \pi)$$

$$= \exp\left[\frac{-j \cdot \pi \cdot 2}{4} \cdot (2)\right] = W^2 = W^{\text{mod}(n \cdot k, N)} \quad (3)$$

El segundo paso en el desarrollo, es factorar la matriz cuadrada en (1) como sigue:

$$\begin{bmatrix} X(0) \\ X(2) \\ X(1) \\ X(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & W^0 & 0 & 0 \\ 1 & W^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & W^1 \\ 0 & 0 & 1 & W^3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 & W^0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & W^0 \\ 1 & 0 & W^2 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & W^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_0(0) \\ x_0(1) \\ x_0(2) \\ x_0(3) \end{bmatrix} \quad (4)$$

Se puede demostrar que el producto de las dos matrices cuadradas da por resultado la matriz cuadrada de (1). Con la excepción de que las filas 1 y 2 han sido intercambiadas. Note que el intercambio ha sido tomado en cuenta en (4) reescribiendo el vector columna $X(n)$, se denota el vector con la fila intercambiada por:

$$X_d(n) = \begin{bmatrix} X(0) \\ X(2) \\ X(1) \\ X(3) \end{bmatrix} \quad (5)$$

Esta factorización es la clave de la eficiencia del algoritmo FFT.

Habiendo aceptado el hecho que (4) es correcta, aunque los resultados están "revueltos", se puede observar el número de multiplicaciones requeridas para computar la ecuación. Considerando que:

$$\begin{bmatrix} x_1(0) \\ x_1(1) \\ x_1(2) \\ x_1(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & W^0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & W^0 \\ 1 & 0 & W^2 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & W^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_0(0) \\ x_0(1) \\ x_0(2) \\ x_0(3) \end{bmatrix} \quad (6)$$

Esto es, el vector columna $\mathbf{x}_1(\mathbf{k})$ es igual al producto entre el vector y la matriz a la derecha de la ecuación (4).

El elemento $\mathbf{x}_1(\mathbf{0})$ es computado por una multiplicación compleja y una adición compleja (\mathbf{w}^0 no es reducido a la unidad para desarrollar un resultado general) [16].

$$x_1(0) = x_0(0) + W^0 \cdot x_0(2) \quad (7)$$

El elemento $\mathbf{x}_1(\mathbf{1})$ está también determinado por una multiplicación compleja y una adición. Sólo una adición compleja se realiza para computar $\mathbf{x}_1(\mathbf{2})$. Esto deviene del hecho que $\mathbf{w}^0 = -\mathbf{w}^2$.

Por lo tanto

$$x_1(2) = x_0(0) + W^2 \cdot x_0(2) = x_0(0) - W^0 \cdot x_0(2) \quad (8)$$

donde la multiplicación compleja $\mathbf{w}^0 \cdot \mathbf{x}_0(2)$ ya ha sido computada en la determinación de $\mathbf{x}_1(\mathbf{0})$.

Por el mismo razonamiento, $\mathbf{x}_1(\mathbf{3})$ es computada por sólo por una adición compleja y ninguna multiplicación. El vector intermedio $\mathbf{x}_1(\mathbf{k})$ es entonces determinado por cuatro adiciones y dos multiplicaciones complejas.

$$\begin{bmatrix} X(0) \\ X(2) \\ X(1) \\ X(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_2(0) \\ x_2(1) \\ x_2(2) \\ x_2(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & W^0 & 0 & 0 \\ 1 & W^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & W^1 \\ 0 & 0 & 1 & W^3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_1(0) \\ x_1(1) \\ x_1(2) \\ x_1(3) \end{bmatrix} \quad (8)$$

El elemento $\mathbf{x}_2(0)$ está determinado por una multiplicación y una adición complejas:

$$x_2(0) = x_1(0) + W^0 \cdot x_1(1) \quad (10)$$

El elemento $\mathbf{x}_2(1)$ está determinado por una adición compleja porque

$$\mathbf{W}^0 = -\mathbf{W}^2.$$

Con un razonamiento similar $\mathbf{x}_2(2)$ está determinado por una multiplicación compleja y una adición y $\mathbf{x}_2(3)$ por sólo una adición.

Luego el cómputo de (4) requiere un total de cuatro multiplicaciones complejas y ocho sumas complejas. En cambio el cómputo de (4) requiere dieciséis multiplicaciones complejas y 12 sumas complejas.

Nótese que el proceso de factorización de la matriz introduce ceros en las matrices factoreadas y, como resultado, reduce el número requerido de multiplicaciones. Para este ejemplo, el proceso de factorización de matriz ha reducido el número requerido de multiplicaciones en un factor de dos [16].

Ya que el tiempo de cómputo es fuertemente gobernado por el número de multiplicaciones, se ve la razón de la eficiencia del algoritmo FFT.

Para $\mathbf{N} = 2^\gamma$ el algoritmo FFT es entonces simplemente un proceso de factorización de una matriz $N \times N$ en γ matrices (cada una de $N \times N$) de modo tal que cada una de las matrices factoreadas tenga una propiedad especial de minimizar el número de multiplicaciones y adiciones.

Si se extiende el resultado del ejemplo previo, se nota que la FFT requiere $\mathbf{N} \cdot \gamma / 2 = 4$ multiplicaciones complejas y $\mathbf{N} \cdot \gamma = 8$ adiciones complejas, mientras que el método directo requiere \mathbf{N}^2 multiplicaciones complejas y $\mathbf{N} \cdot (\mathbf{N} - 1)$ adiciones complejas [16].

Si se supone que el tiempo de cómputo es proporcional al número de multiplicaciones, entonces la razón aproximada de tiempo de cómputo del método directo al de la FFT está dado por:

$$\frac{N^2}{N \cdot \frac{\gamma}{2}} = \frac{2 \cdot N}{\gamma}$$

(11)

la cual para $N = 1024 = 2^{10}$ es una reducción computacional de más de 200 a 1. La Figura 1 ilustra la relación entre el número de multiplicaciones requeridas usando el algoritmo FFT comparada con el número de multiplicaciones del método directo.

$$f_{\text{dir}}(N) := N^2 \qquad f_{\text{fft}}(N) := \frac{N \ln(N)}{2 \ln(2)}$$

$N := 2..1024$

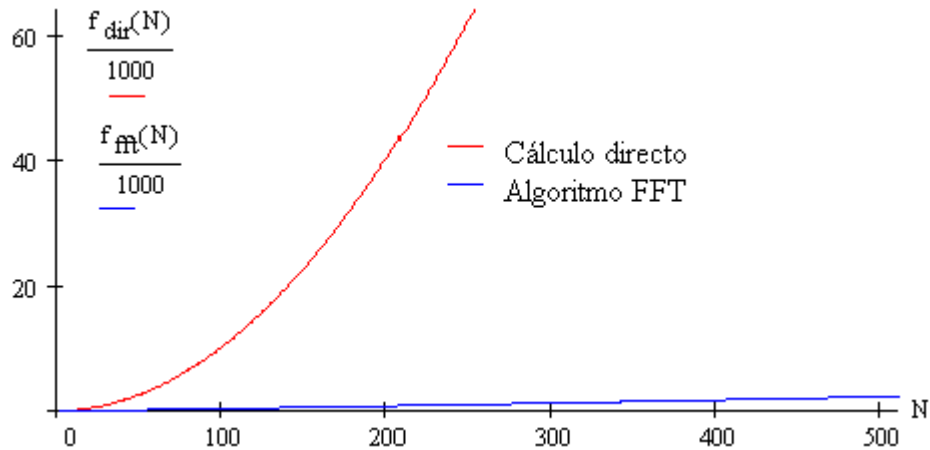


Figura 1. Variación del número de multiplicaciones para el método directo y para el algoritmo FFT

El procedimiento de factorización introduce una discrepancia. Recuérdese que el cómputo de (4) produce:

$$\mathbf{X}_d(n) \quad \text{en vez de} \quad \mathbf{X}(n)$$

este reordenamiento es inherente al proceso de factorización de la matriz y es un problema menor debido a que es sencillo generalizar una técnica de "reordenamiento" de $\mathbf{X}_d(\mathbf{n})$ para obtener $\mathbf{X}(\mathbf{n})$.

Reescribiendo $\mathbf{X}_d(\mathbf{n})$ reemplazando el argumento \mathbf{n} con sus equivalentes binarios:

$$\begin{array}{ccc}
 \left[\begin{array}{c} X(0) \\ X(2) \\ X(1) \\ X(3) \end{array} \right] & \text{se convierte en} & \left[\begin{array}{c} X(00) \\ X(10) \\ X(01) \\ X(11) \end{array} \right] \\
 (12) & &
 \end{array}$$

Obsérvese que si los argumentos binarios de (18) son "flippeados" o "bit reversed" (es decir, 10 se transforma en 01, etc.) En otras palabras, la imagen del espejo del binario.

entonces

$$X_{d(n)} = \left[\begin{array}{c} X(00) \\ X(10) \\ X(01) \\ X(11) \end{array} \right] \quad \text{"flipea a"} \quad \left[\begin{array}{c} X(00) \\ X(01) \\ X(10) \\ X(11) \end{array} \right] = X(n) \quad (13)$$

Es sencillo desarrollar un resultado generalizado para "reordenar" la FFT.

Para N mayor que 4, es voluminoso describir el proceso de factorización de la matriz análoga a (4). Por esta razón es conveniente interpretar a (4) de manera gráfica. Usando esta formulación gráfica se puede describir en forma suficientemente generalizada un diagrama de flujo para un programa de computadora. Para ello se convertirá la expresión (4) en un gráfico de flujo como el de la Figura 2.

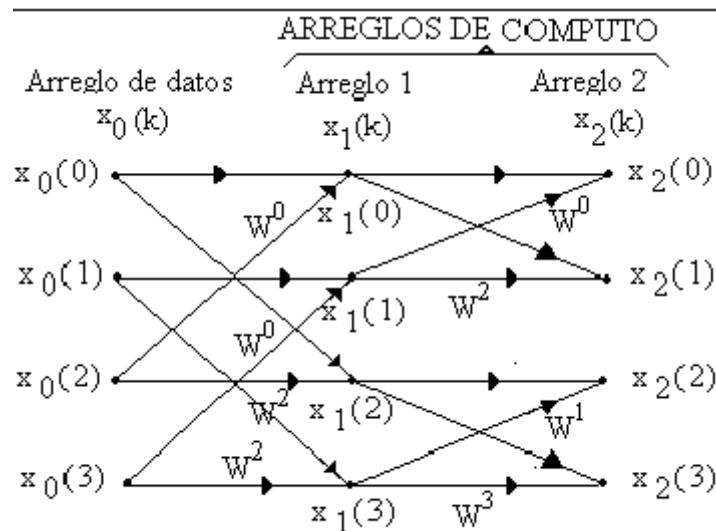


Figura 24.1 - Diagrama de flujo correspondiente a (23-4)

Figura 2. Diagrama de flujo correspondiente a (4)

Como se muestra, se representa el vector de datos o arreglo $\mathbf{x}_0(\mathbf{k})$ por una columna vertical de nodos sobre la izquierda del gráfico. El segundo arreglo vertical de nodos es el vector $\mathbf{x}_1(\mathbf{k})$ computado en la ecuación (6), y el próximo arreglo corresponde el vector $\mathbf{x}_0(\mathbf{k}) = \mathbf{X}_d(\mathbf{n})$, ecuación (9). En general, se computarán \square arreglos, donde $\mathbf{N} = 2\gamma..$

El flujo de señal se interpreta como sigue. A cada nudo ingresan dos líneas sólidas representando "sendas de transmisión" desde nudos previos. Una senda transmite o trae una cantidad desde un nodo en un arreglo, multiplica la cantidad por \mathbf{WP} , y saca el resultado por el nudo del próximo arreglo. El factor \mathbf{WP} aparece cerca de la flecha de la senda de transmisión, la ausencia de este factor implica que $\mathbf{WP} = 1$.

Los resultados entrantes en un nudo desde dos sendas de transmisión son combinados aditivamente.

Para ilustrar la interpretación del gráfico de flujo de señal, considérese el nudo $\mathbf{x}_1(2)$ de la Figura 2.

De acuerdo a las reglas para interpretar el gráfico de flujo de señal:

$$x_1(2) = x_0(0) + W^2 \cdot x_0(2) \quad (1)$$

lo cual es simplemente la ecuación (8). Cada nodo del gráfico de flujo de señal es expresado similarmente.

Este método es entonces un método conciso para representar los cálculos requeridos en la matriz factorizada del algoritmo FFT (4). Cada columna del gráfico corresponde a una matriz factorizada; se requieren \square arreglos verticales de N puntos cada uno ($N=2^Y$). La utilización de esta presentación gráfica permite fácilmente describir el proceso de factorización para N grande.

Se muestra en gráfico aparte (Figura 3) el diagrama de flujo de señal para $N=16$.

Con un diagrama de flujo de señal de este tamaño, es posible desarrollar las propiedades concernientes al proceso de factorización de la matriz y así proveer de un marco para el desarrollo de un diagrama de flujo para un programa de computadora que aplique el algoritmo FFT [16].

Nodos duales

La inspección de la Figura 3 revela que en cada arreglo siempre se pueden encontrar dos nodos cuyas entradas de senda de transmisión provienen del mismo par de nudos en el arreglo previo. Por ejemplo, los nodos $\mathbf{x}_1(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_1(\mathbf{8})$ son computados en términos de los nodos $\mathbf{x}_0(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_0(\mathbf{8})$. Note que los nodos $\mathbf{x}_0(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_0(\mathbf{8})$ no entran en el cómputo de cualquier otro nodo. Se define a tales nodos como **Par de Nodos Duales**.

Ya que el cómputo de un par de nodos duales es independiente de los otros nodos, es posible realizar cómputo "in-place". Para ilustrar, nótese de la Figura 24.2 que se pueden calcular simultáneamente $\mathbf{x}_1(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_1(\mathbf{8})$ en términos de $\mathbf{x}_0(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_0(\mathbf{8})$ y retornar el resultado a las locaciones de almacenamiento previamente ocupadas por $\mathbf{x}_0(\mathbf{0})$ y $\mathbf{x}_0(\mathbf{8})$. Los requerimientos de almacenaje están entonces limitados solamente al arreglo de datos $\mathbf{x}_0(\mathbf{k})$. A medida que cada arreglo es computado, los resultados son retornados a este arreglo [16].

Espaciamiento de nodos duales

Se investigará ahora el espaciamiento (medido verticalmente en términos del índice k) entre un par de nodos duales. La siguiente discusión se referirá a la Figura 3.

Primero, en el arreglo $l=1$, un par de nodos duales, como $\mathbf{x}_1(0)$ y $\mathbf{x}_1(8)$, están separados por $\mathbf{k} = 8 = N/2^1 = 2^1$.

En el arreglo $l=2$, un par de nodos duales, como $\mathbf{x}_2(8)$ y $\mathbf{x}_2(2)$, están separados por

$$\mathbf{k} = 4 = N/2^2 = 2^2$$

Similarmente, un par de nodos duales, como $\mathbf{x}_3(4)$ y $\mathbf{x}_3(6)$, en el arreglo $l=3$, están separados $\mathbf{k} = 2 = N/2^3 = 2^3$.

Generalizando estos resultados, se observa que el espaciamiento entre nodos duales en el arreglo l está dado por $N/2^l$. Así, si se considera un nodo en particular $\mathbf{x}_l(\mathbf{k})$, entonces su nodo dual es $\mathbf{x}_l(\mathbf{k} + N/2)$. Esta propiedad permite fácilmente identificar un par de nodos duales.

Cómputo de nodo dual

El cómputo de un par de nodos duales requiere sólo una multiplicación compleja. Para clarificar este punto, considérese el nodo $\mathbf{x}_2(8)$ y su dual $\mathbf{x}_2(12)$ ilustrados en la Figura 3. Las sendas de transmisión provenientes del nodo $\mathbf{x}_1(12)$ están multiplicadas por \mathbf{w}^4 y \mathbf{w}^{12} antes de ingresar en los nudos $\mathbf{x}_2(8)$ y $\mathbf{x}_2(12)$, respectivamente. Es importante notar que $\mathbf{w}^4 = -\mathbf{w}^{12}$ y que sólo una de las multiplicaciones requeridas desde el mismo dato $\mathbf{x}_1(12)$ está para ser multiplicada por estos factores. En general, si el factor ponderante en el nodo es $\mathbf{w}^p = -\mathbf{w}^{p-N/2}$, sólo se requiere una multiplicación en el

cómputo de un par de nodos duales. El cómputo de cualquier par de nodos duales está dado por el par de ecuaciones:

$$\begin{aligned} x_1(k) &= x_{l-1}(k) + W^p \cdot x_{l-1}\left(k + \frac{N}{2^l}\right) \\ x_1\left(k + \frac{N}{2^l}\right) &= x_{l-1}(k) - W^p \cdot x_{l-1}\left(k + \frac{N}{2^l}\right) \end{aligned} \quad (1)$$

En el cómputo de un arreglo, normalmente se comienza con el nodo $k=0$ y secuencialmente se trabaja hacia abajo del arreglo, computando el par de ecuaciones (1). Como se estableció previamente, el dual de cualquier nodo en el l -ésimo arreglo está siempre $\mathbf{N/2^l}$ abajo en el arreglo. Ya que el espaciamiento es $N/2$, entonces se deduce que se deben saltar después cada $\mathbf{N/2^l}$.

En la Figura 4., si se comienza con el nodo $k=0$, entonces de acuerdo a la discusión previa, el nodo dual está localizado en $k=N/2^1 = 4$ lo cual puede ser verificado por inspección de la figura. Procediendo hacia abajo en este arreglo, se nota que el nodo dual está siempre localizado 4 posiciones por debajo en el arreglo hasta alcanzar el nodo 4.

En este punto se ha ingresado un conjunto de nodos previamente encontrados; esto es, estos nodos son los nodos duales $k=0, 1, 2$ y 3 . Es necesario saltar sobre los nodos $k=4, 5, 6$ y 7 . Los nodos $8, 9, 10$ y 11 siguen la convención original del nodo dual localizado 4 posiciones más abajo en el arreglo [16].

En general, si se trabaja desde la cima al fondo en el arreglo **1**, entonces se computará la ecuación (1) para los primeros $\mathbf{N}/2^1$ nodos, salta a los próximos $\mathbf{N}/2^1$, etc. Se detienen los "saltos" cuando se alcanza un índice de nodo superior a $\mathbf{N}-1$.

Determinación de WP

En base a las discusiones precedentes, se han definido las propiedades de cada arreglo con la excepción de los valores de \mathbf{p} en (1). El valor \mathbf{p} se determina \mathbf{p} con el siguiente procedimiento:

- (a) Se escribe el índice \mathbf{k} en forma binaria con γ bits,
- (b) Se desliza el número binario en a) $\gamma - 1$ bits a la derecha, llenándose las nuevas posiciones de bit abiertas a la izquierda con ceros y
- (c) Finalmente, se invierte el orden de los bits.

Este número "bit-reversed" es el \mathbf{p} .

Para ilustrar el procedimiento, refiérase a la Figura 3, y considérese el nodo $\mathbf{x}_3(8)$.

Ya que $\gamma = 4$, $\mathbf{k} = 8$ y $\mathbf{l} = 3$, entonces \mathbf{k} en binario es 1000. Se desplaza este número $\gamma - 1 = 4 - 3 = 1$ lugares a la derecha llenando con ceros los lugares libres, resultando 0100. Entonces se revierte el orden de los bits produciéndose 0010 o el entero **2**. Finalmente, el valor de \mathbf{p} es **2**.

Considérese ahora el procedimiento para implementar esta operación de reversión de bits. Se sabe que un número binario, por ejemplo **$a_4a_3a_2a_1$** puede ser escrito en base 10 como $a_4 \cdot 2^3 + a_3 \cdot 2^2 + a_2 \cdot 2^1 + a_1 \cdot 2^0$. El número bit-reversed que se está intentando describir está dado entonces por $a_1 \cdot 2^3 + a_2 \cdot 2^2 + a_3 \cdot 2^1 + a_4 \cdot 2^0$. Si se encuentra una técnica para determinar los bits binarios a_4 , a_3 , a_2 , a_1 , entonces se habrá definido la operación "bit-reversing" [16].

Supóngase que M es un número binario igual a $a_4 a_3 a_2 a_1$. Divídase a M por 2, trúnquese y multiplíquese el resultado truncado por 2. Luego compútese $[a_4a_3a_2a_1 - 2(a_4a_3a_2)]$. Si el bit a_1 es cero, entonces esta diferencia será cero porque la división por 2, el truncamiento, y la subsecuente multiplicación por 2 no altera M . Sin embargo, si el bit **a_1** es 1, el truncamiento cambia el valor de M y la expresión diferencia de arriba no será cero. Se observa que con esta técnica se puede determinar si el bit **a_1** es 0 ó 1.

Se puede verificar el bit **a_2** de una forma similar. La expresión diferencia apropiada es $[a_4a_3a_2 - 2(a_4a_3)]$. Si esta diferencia es cero, entonces **a_2** es cero. Los bits **a_3** y **a_4** se determinan de la misma manera. Este procedimiento formará las bases del desarrollo de un programa de computadora para bit-reversing [16].

Reordenamiento de la FFT

El paso final en el cómputo de la FFT es "reordenar" los resultados análogos a la ecuación (13). Recuérdese que el procedimiento para reordenar el vector $\mathbf{X}_d(\mathbf{n})$ es para escribir \mathbf{n} en binario y revertir o "flipear" el número binario. Se muestra en la Figura 5 el resultado de la operación bit-reversing; los términos $\mathbf{x}_4(\mathbf{k})$ y $\mathbf{x}_4(\mathbf{i})$ han sido simplemente intercambiados donde \mathbf{i} es el entero obtenido por bit-reversing del entero \mathbf{k} . Nótese que una situación similar al concepto de nodo dual existe cuando se "reordena" el arreglo de salida. Si se procede hacia abajo en el arreglo, intercambiando $\mathbf{x}(\mathbf{k})$ con el apropiado $\mathbf{x}(\mathbf{i})$, eventualmente se encuentra un nodo el cual ha sido previamente intercambiado [16].

Por ejemplo, en la Figura 5, el nodo $k=0$ permanece en su ubicación, los nodos $k=1, 2,$ y 3 son intercambiados con los nodos $8, 4$ y 12 respectivamente. El próximo nodo a ser considerado es el 4 , pero este nodo fue previamente intercambiado con el 2 .

Para eliminar la posibilidad de considerar un nodo que ha sido previamente intercambiado, simplemente chequese para ver si \mathbf{i} (el entero obtenido por bit-reversing de \mathbf{k}) es menor que \mathbf{k} . Si es así, esto implica que el nodo ha sido intercambiado por una operación previa. Con este chequeo se puede asegurar un sencillo procedimiento de reordenamiento [16].

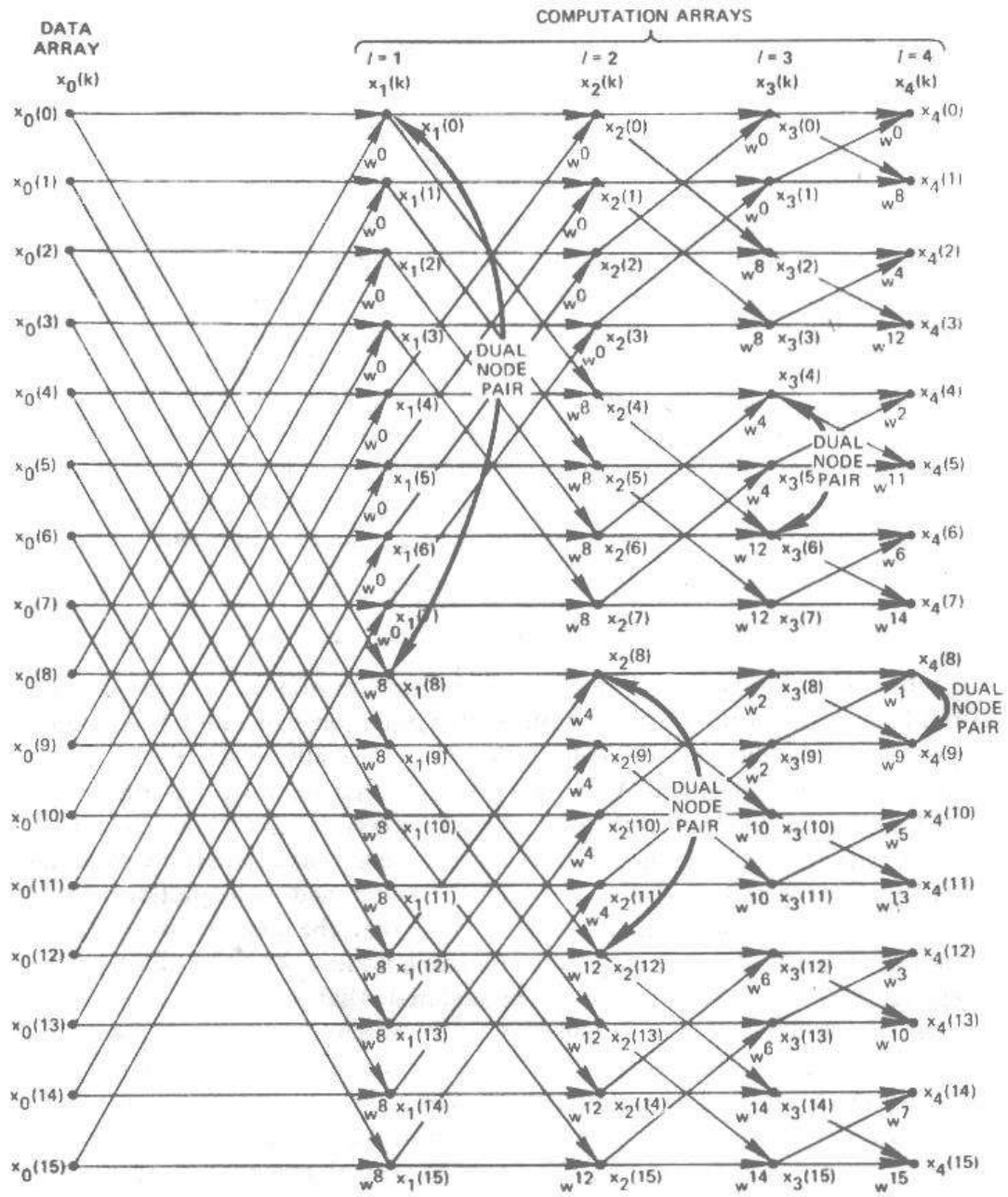


Figure 3.

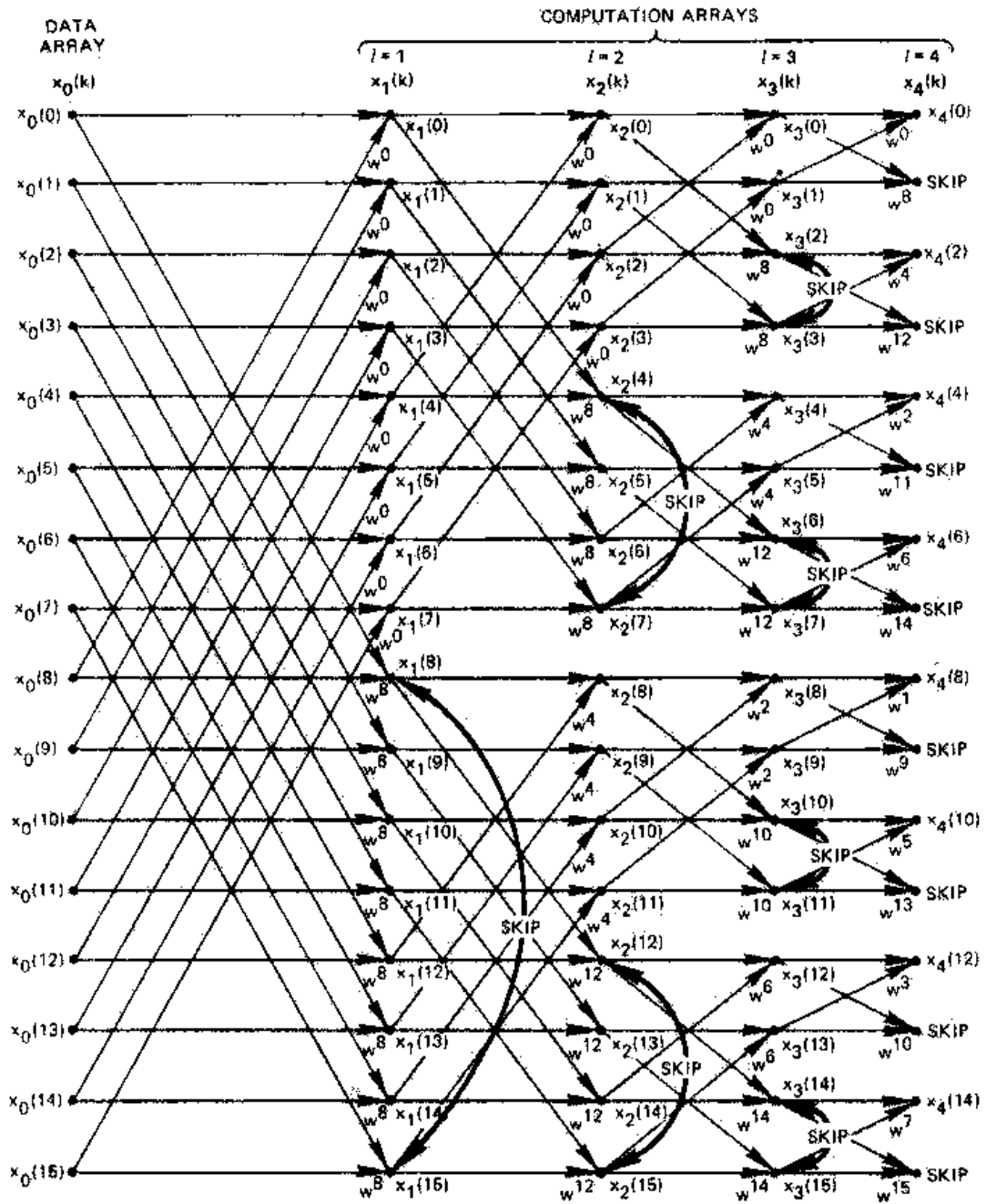


Figura 4.

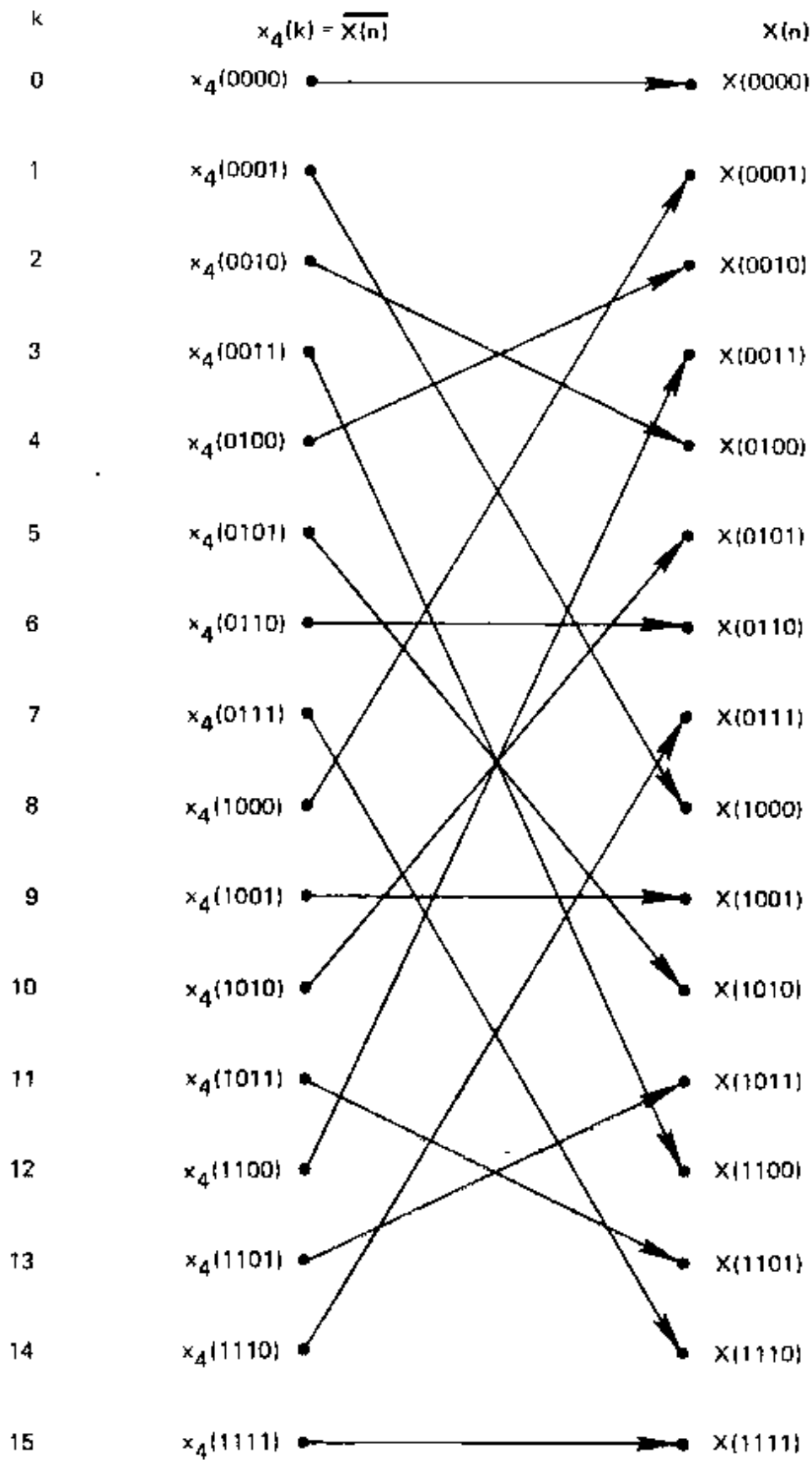


Figura 5.

3.4. La función hipocampal y los procesos cognoscitivos

La participación de los ensambles celulares como unidades funcionales del procesamiento cerebral de información, se ha estudiado con el registro del disparo en neuronas individuales en varias estructuras cerebrales, durante la ejecución de diferentes tareas conductuales. Por ejemplo, en el registro de la actividad de neuronas en la formación hipocampal (CA1, CA3, y giro dentado) y la corteza temporal auditiva, en ratas ejecutando una tarea de memoria de trabajo (MT, en la que la información en memoria es actualiza en el corto plazo) y una tarea de memoria de referencia (MR, en la que la información permanece constante), se demostró que algunas neuronas de la formación hipocampal y de la corteza temporal auditiva, se sincronizaron durante MT o durante MR, en tanto que otro grupo se sincronizó en ambas tareas. Esto sugiere que algunos ensambles procesan información específica (ensambles independientes) para cada tarea, en tanto que otros funcionan aun cuando se trate de diferentes vías de procesamiento de memoria (ensambles traslapados). También se observaron cambios en la correlación del disparo neuronal entre ambas estructuras, lo que sugiere que la conexión sináptica funcional cambia dependiendo de la tarea a ejecutar, en función de si se requiere o no la cooperación entre diferentes estructuras neurales [17,18]. Se ha establecido que el disparo de potenciales de acción en fases diferentes de la actividad theta es la correlación medible de representaciones espaciales codificadas a nivel sináptico en ensambles neurales en

roedores. Así durante el aprendizaje de nuevos ambientes, estas conexiones estarían sujetas a modificaciones. Con respecto al registro de actividad cerebral en humanos, esta presenta un aumento en la sincronización de la actividad theta hipocampal y parahipocampal durante el aprendizaje exitoso [19].

De acuerdo con el concepto “redes theta distribuidas en el cerebro”, hay varias estructuras cerebrales capaces de producir actividad theta ya sea espontáneamente o por algún evento cognitivo. Las oscilaciones theta relacionadas a eventos están altamente correlacionadas con mecanismos de aprendizaje asociativo, atención, y recuerdo [20,21]. Estudios específicos por ejemplo, sobre la actividad hipocampal humana durante tareas de memoria de trabajo, muestran que la presentación de un estímulo que será recordado induce actividad theta; inclusive, después de varias pruebas, el inicio de la actividad theta en el hipocampo derecho se anticipa a la aparición del estímulo. Además, una ráfaga de actividad theta hipocampal ocurre también cuando al sujeto es requerido para categorizar un conjunto de estímulos. Estos resultados sugieren que la actividad theta ocurre cuando el individuo se prepara para recibir información y cuando la información está siendo procesada. Ambas condiciones son consideradas como la modalidad receptiva [22].

La importancia de la función hipocampal en el aprendizaje se ha estudiado ampliamente a través de evidencias experimentales como clínicas. Los estudios experimentales muestran que la lesión hipocampal selectiva produce deficiencias en la adquisición de

información espacial tanto en la memoria de referencia como en la de trabajo, deficiencias moderadas en la retención de información espacial aprendida antes de la lesión, extinción de la información espacial y deficiencias en el aprendizaje contextual; además, animales con lesión selectiva del campo CA1 o CA3 del hipocampo muestran deficiencias en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris [23]. Por su parte, la evidencia clínica muestra que pacientes con lesiones del hipocampo derecho tienen dificultades para recordar la configuración particular de grupos de objetos y para identificar objetos nuevos entre objetos conocidos [24]. Además, el envejecimiento normal coexiste con un deterioro en la función de orientación espacial [25,26]. Por ejemplo, la ejecución de tareas de rotación espacial mental presenta deficiencias cuya severidad está en función de la edad, deficiencias más severas se observan en la ejecución de esta misma tarea en pacientes con demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer y con demencia vascular [25]. De hecho entre los signos más tempranos de la demencia se encuentran las alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial [27]. En este sentido se ha reportado que la orientación en base a señales alocéntricas (visuales, auditivas, olfativas) y el ordenamiento secuencial de lugares, al igual que la memoria asociativa espacial; se ven alterados en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer [28-30]. Así, la participación del hipocampo en el procesamiento de información espacial representa un paradigma inmejorable para el estudio de la función de esta estructura cerebral que presenta gran

vulnerabilidad durante el envejecimiento normal y que se ve alterada en la mayoría de las demencias.

En la actividad electroencefalográfica del hipocampo predomina la actividad theta, -un patrón de actividad aproximadamente sinusoidal con frecuencias en un rango de 4 a 12 Hz [31,32]. La Actividad theta hipocampal de máxima amplitud es registrada en el estrato oriens de CA1 (generador theta superficial) y en el estrato molecular de la hoja dorsal del giro dentado (generador theta profundo I), desfasados aproximadamente 180° [33,34]. Al patrón de actividad rítmica lenta (6-9 Hz) presente durante conductas como movimientos de cabeza, cambios posturales, desplazamiento, carrera, nado, salto y manipulación de objetos (conductas voluntarias o tipo 1) se le ha denominado también actividad theta de tipo 1 o de alta frecuencia.

Los movimientos voluntarios altamente correlacionados con ésta actividad theta tipo 1 participan en la extracción activa de información acerca del ambiente y establecen las condiciones óptimas para el procesamiento de estímulos nuevos y potencialmente significativos [32]. La figura 6 muestra un esquema del hipocampo de rata y la actividad theta registrada en el área CA1 durante una conducta voluntaria (nado).

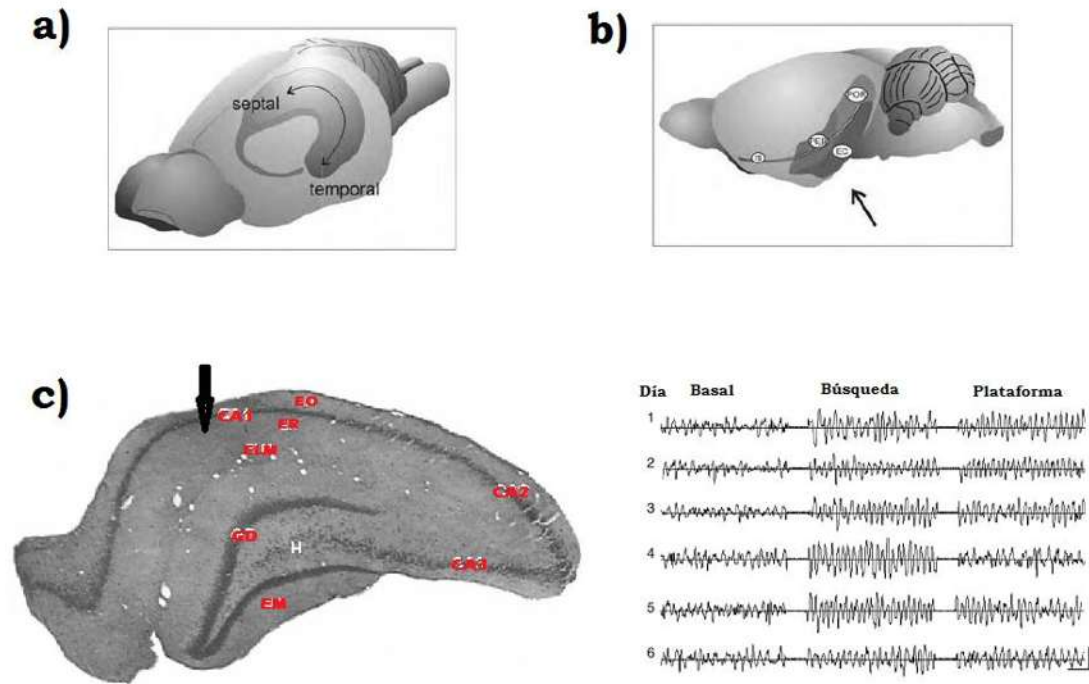


Figura 6. Arriba (a y b) Representación esquemática del hipocampo de rata. Tomado de: The rat Nervous system, capítulo 21. c) derecha: fotomicrografía de un corte coronal de rata donde se indica los estratos que componen al hipocampo. Regiones del Cuerno de Ammon CA1, CA2 y CA3. La flecha indica el sitio de registro (CA1) correspondiente a los trazos de EEG que se muestran en la figura izquierda. c) Izquierda: trazos de EEG registrados durante un periodo basal (en la jaula de mantenimiento), durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (nado) y sobre la plataforma de escape, durante los 6 días de entrenamiento. Tomado de [35].

Eichenbaum sugirió que dada la asociación de la actividad theta con la conducta exploratoria espontánea, dicha actividad podría reflejar el procesamiento de la información hipocampal [36]. De acuerdo con ello, la actividad theta aparece cuando información nueva y potencialmente significativa sobresale del fondo relativamente estable, durante la respuesta orientada de un animal o durante la exploración activa, con frecuencia en proporción al nivel y complejidad de la información aferente [32,36]. De acuerdo con esto, diversos estudios

han encontrado que la actividad theta de alta frecuencia generada en CA1 cambia en relación con el curso temporal del aprendizaje espacial independientemente de la actividad motora desplegada por los animales [35,37].

La actividad theta es producida por corrientes inducidas sinápticamente tanto en las células piramidales como en las granulares dentadas, originadas por las descargas rítmicas de sus aferentes [38]. Ha sido demostrado que el ritmo theta es controlado por una red de núcleos que se extienden del tallo cerebral al complejo septo medial/Banda diagonal de Broca (SM/BDB) y al hipocampo. Tal red sincronizadora ascendente es originada en el núcleo reticular *pontis oralis* (NRPO) y el núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP). Estos núcleos activan a su vez neuronas del diencefalo caudal como el núcleo hipotalámico posterior (NHP) y el núcleo supramamilar (NSuM), los cuales convierten esa entrada en un patrón rítmico de descarga, que es relevado a células marcapasos GABAérgicas y Colinérgicas del complejo SM/BDB para generar la ritmicidad característica de la actividad theta hipocampal [3,39,40]. Un circuito esquemático de dichas conexiones se presenta en la Figura 7.

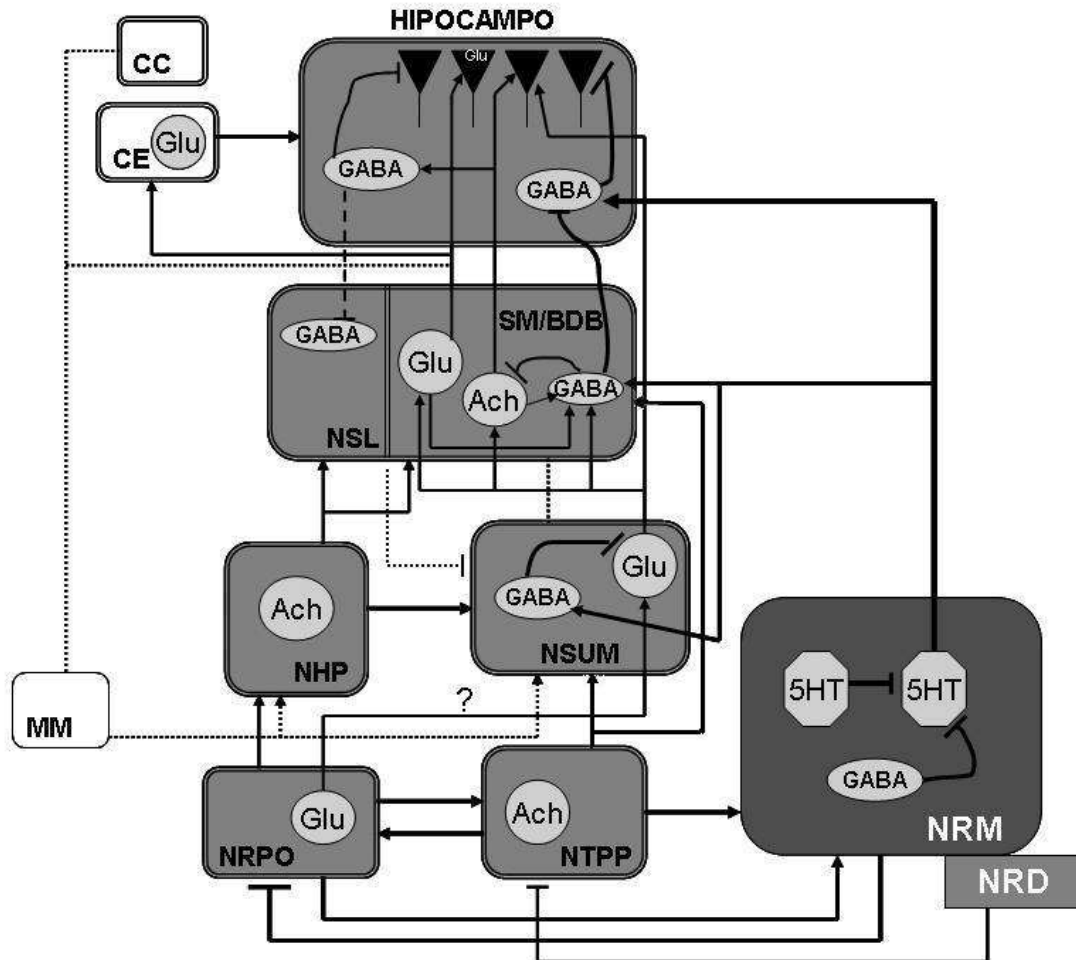


Figura 7. Representación esquemática del sistema sincronizador ascendente y las interacciones del sistema serotoninérgico con otros neurotransmisores en cada nivel de éste. Tomado de: Gutierrez Guzmán et al., 2007.

De acuerdo con la Figura 7, se representan como líneas sólidas a las vías ascendentes y en líneas punteadas las vías descendentes. Las líneas que terminan en flecha indican actividad excitadora, y las líneas que terminan en barra indican actividad inhibitoria. NRPO, núcleo reticular *Pontis oralis*; NTPP, núcleo reticular pedúnculo pontino; NHP, núcleo hipotalámico posterior; NSUM, núcleo Supramamilar; NSL, núcleo septal lateal; SM/BDB, complejo septo medial/banda diagonal de Broca; CC. Corteza del Cíngulo, CE, Corteza entorrinal; MM, cuerpos mamilares; NRM, núcleo rafé medial; NRD, núcleo rafé dorsal; Glu, glutamato; 5-HT, serotonina; AC, acetilcolina; GABA, ácido GABA-

aminobutírico **?**, No hay evidencia anatómica reciente que sustente la proyección del NRPO al NSUM.

El área septal dirige la actividad theta hipocampal a través de la inervación colinérgica y GABAérgica que envía al hipocampo y al giro dentado (Figura 8) [34,41-44]. El septum fue considerado el marcapasos de la actividad theta a partir de los estudios realizados en animales experimentales, en los que lesiones de esta área produjeron la total eliminación de la actividad theta del hipocampo [45,46]. La naturaleza colinérgica de la actividad theta fue propuesta al observar que varios agonistas colinérgicos producen actividad theta ya sea administrados sistémicamente o infundidos localmente en el septum [47]; o en el hipocampo [48,49]; en contraste, la aplicación local de antagonistas colinérgicos atenúan la actividad theta [50].

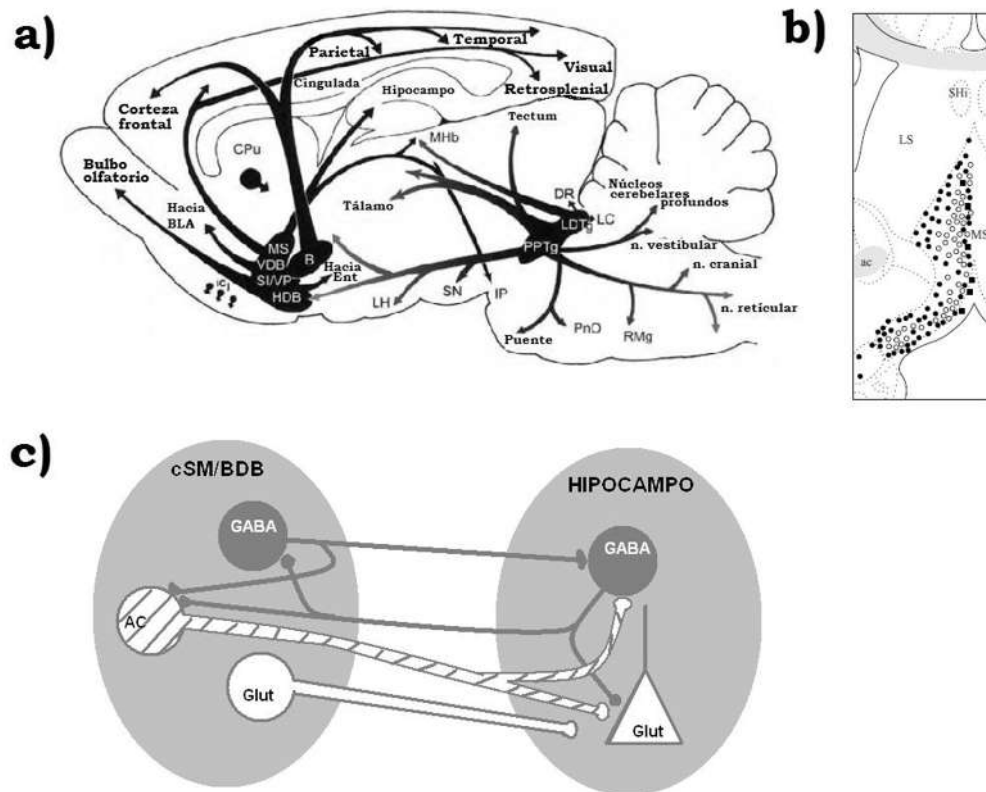


Figura 8. a) Representación esquemática de la innervación colinérgica originada en el área septal hacia el resto del cerebro en la rata. b) Diagrama representativo de la localización de las neuronas colinérgicas dentro del septo medial. Tomado de: *The rat nervous system*, capítulo 32. c) Conexiones septo-hipocámpales: El complejo septo medial/Banda diagonal de Broca (cSM/BDB) envía proyecciones GABAérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas al hipocampo. Las neuronas GABAérgicas (GABA) septales determinan el disparo rítmico de neuronas colinérgicas (AC) con las que contactan a nivel local, además, establecen contactos exclusivamente con células GABAérgicas del hipocampo. Por su parte, las células colinérgicas septales inervan principalmente a neuronas GABAérgicas y piramidales glutamatérgicas (Glut) del hipocampo. Las conexiones directas del hipocampo al septum son de naturaleza GABAérgica sobre neuronas colinérgicas y GABAérgicas. Tomado de: Gutiérrez-Guzmán et al, 2007.

Por otro lado, diversas evidencias indican que la estimulación del rafe mesencefálico suprime y desorganiza las ráfagas del ritmo theta del

área septal medial y de la banda diagonal de Broca, y que, la lesión del núcleo del raquí es suficiente para la aparición de actividad theta continua y persistente [32,34]. Se ha observado que neuronas serotoninérgicas del núcleo de raquí medial des-sincronizan el EEG hipocampal, rompiendo la descarga rítmica de las neuronas del área septal medial y el ritmo theta hipocampal, generado por la participación conjunta de las vías de sincronización ascendente [40,51,52]. Entre los estudios que han evaluado la participación de la serotonina en la modulación de la actividad theta, se ha observado que cuando se estimula al raquí mesencefálico se desorganizan las ráfagas de la actividad theta y disminuye su frecuencia paralelamente a la inhibición de theta [34], además, la estimulación eléctrica de RM o bien la aplicación de 5-HT al RM por iontoforesis inhiben el disparo de las células piramidales hipocampales [53] y desincroniza el EEG hipocampal [54]. En otros estudios, la lesión específica del RM produce la presencia de actividad theta hipocampal de manera continua y persistente [32,34], y cuando la lesión es selectiva de los aferentes serotoninérgicos al hipocampo, disminuye el umbral mínimo (7.7 Hz) que se necesita para la inducción de actividad theta hipocampal o la potenciación de larga duración (PLD), tras la estimulación septal, pues disminuye a 6.9 Hz [55]. En este sentido McKena y Vertes [56] han establecido que las colaterales serotoninérgicas de RM juegan un papel directo en la desincronización de la actividad EEG del hipocampo, pues cuando se estimula RM se altera la descarga rítmica de células marcapaso septales y se produce la desincronización del EEG

hipocampal. Además se ha sugerido una influencia inhibitoria de las proyecciones serotoninérgicas de RM sobre el control del ritmo theta, sobre todo en relación a la actividad theta de baja frecuencia [57]. Por todo lo anterior se ha propuesto que el sistema serotoninérgico tiene un papel modulador sobre el sistema colinérgico, en la generación de la actividad theta, de modo que las células serotoninérgicas del RM desincronizan o tienen un efecto supresor sobre la actividad theta hipocampal [58].

A este respecto, se ha observado que la manipulación de la neurotransmisión serotoninérgica cambia los niveles de liberación de la acetilcolina sobre la cual tiene una acción inhibitoria en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado [59], de modo que la serotonina liberada de los núcleos del rafe modula de manera inhibitoria la transmisión colinérgica al menos en el hipocampo [60]. Además se ha reportado la presencia de receptores a serotonina tanto sobre neuronas colinérgicas como GABAérgicas del complejo SM/BDB [61]. Así, la manipulación de la serotonina del complejo SM/BDB puede modificar el proceso de sincronización theta sobre neuronas hipocampales, y dado que ambos neurotransmisores interactúan en la organización de la conducta espacial, es de esperarse que la modificación de ambos sistemas tenga consecuencias sobre la función espacial.

A este respecto, se han evaluado las consecuencias de la lesión del sistema colinérgico y serotoninérgico o de ambos sobre las capacidades cognoscitivas. Así, se ha confirmado la importancia del

sistema colinérgico en los procesos de aprendizaje y memoria ya que se ha observado que la integridad del sistema colinérgico es indispensable para el aprendizaje de lugar en el laberinto acuático de Morris [59,62,63], por otro lado, no se ha llegado a una conclusión con respecto al sistema serotoninérgico [63]. Sin embargo, dado su papel como desincronizador de la actividad theta y del papel preponderante del complejo septo medial/banda diagonal de Broca en la modulación tanto del aprendizaje dependiente del hipocampo como de la actividad theta, sería importante evaluar el efecto de la denervación serotoninérgica específica a este complejo, sobre la actividad theta hipocampal concurrente al procesamiento de información espacial por parte de sujetos experimentales. Esta maniobra experimental nos proporcionaría información acerca del papel de la sincronización theta en el aprendizaje y memoria, y de la interacción serotonina acetilcolina como mecanismo regulador de las capacidades de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo, que son altamente vulnerables al envejecimiento normal y patológico.

Aunque existe una propuesta teórica que indica que la serotonina, como único neurotransmisor conocido que desincroniza el EEG hipocampal, formaría parte de un mecanismo de selectividad de información a ser procesada por el hipocampo; es decir, la 5HT podría bloquear o suspender temporalmente los procesos mnémicos sostenidos por el hipocampo [64], y aunque se ha sugerido que la serotonina interviene en la modulación del theta suprimiendo la PLD y alterando los procesos de memoria [65,66], no existen estudios que relacionen las

modificaciones del neurotransmisor con la actividad eléctrica hipocampal subyacente al procesamiento de la información espacial, y al aprendizaje mismo.

En trabajos previos encontramos que la disminución profunda de serotonina hipocampal produce una facilitación del aprendizaje espacial asociado a una mayor expresión de actividad theta de alta frecuencia [67]. Sin embargo, no se han evaluado las consecuencias de la alteración de la serotonina en el complejo SM/BDB, sobre la actividad theta hipocampal subyacente al aprendizaje espacial; lo cual sería importante para establecer la relación que guardan este neurotransmisor en el establecimiento de los procesos fisiológicos subyacentes al aprendizaje dependiente del hipocampo. Lo anterior cobra relevancia dado que, existe cada vez más evidencia de que alteraciones en el sistema serotoninérgico juegan un papel importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, la densidad de receptores 5-HT(1B/1D) y 5-HT6 se ha observado significativamente reducida en corteza temporal y frontal en análisis post-mortem de pacientes con dicha enfermedad; además la disminución se correlacionó con la severidad del declive cognoscitivo observado mediante la aplicación de la prueba mini-mental [68]. Correlaciones semejantes se han observado con respecto a los receptores 5HT1A en tejido post-mortem [69].

De esta manera, si bien es conocido que alteraciones del sistema colinérgico subyacen a la demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer (Davis y Malone, 1976), es importante estudiar la

contribución del sistema serotoninérgico a la expresión de la actividad theta en virtud del papel regulador que tiene sobre la fisiología hipocampal y sobre la influencia que pudiera tener con respecto a la actividad colinérgica y GABAérgica del complejo SM/BDB, ya que dicho complejo ejerce una función reguladora sobre las capacidades cognitivas que se ven alteradas durante los procesos demenciales.

4. ANTECEDENTES

La actividad theta hipocampal es una oscilación lenta sinusoidal en el rango de 4 a 12 Hz y es prominente en el hipocampo de rata durante la expresión de conductas voluntarias [31,38,52] y durante el despliegue de conductas relacionadas con la adquisición de información ambiental [32,38]. La expresión y las características de la actividad theta hipocampal se ha relacionado con la capacidad de aprendizaje de lugar en ratas y humanos [35,37,70,71]. Por lo tanto, una disminución en la expresión de la actividad en la frecuencia theta está relacionada con el daño en el aprendizaje de lugar.

Diversas estructuras están relacionadas con la modulación de la expresión de la actividad theta. Entre estas el complejo septo medial-banda diagonal de broca (SM/BDB) actúa como un marcapaso de la actividad theta hipocampal [34,40] a través de neuronas que proyectan terminales colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas que aparentemente son importantes en la regulación de dicha actividad [44,72-74]. Se ha observado que la lesión o inactivación del septo medial altera la actividad theta hipocampal y causa déficit en el aprendizaje de tareas de memoria de referencia y de memoria de trabajo [72,75-77]. Así, se ha establecido que el área septal es una estructura importante en el control de la actividad theta [31,45,49] y es también crucial en el procesamiento de información que es relacionada con la función hipocampal [74,77-81].

Por otro lado, se ha propuesto que diferentes sistemas de neurotransmisión pueden influir la expresión de actividad theta. Dentro de estos sistemas, se ha propuesto que la serotonina (5-HT) es el único neurotransmisor que desincroniza la actividad theta hipocampal, y una disminución de la serotonina cerebral induce por lo tanto persistente y continua actividad theta en el hipocampo un efecto que es mediado principalmente por el SM [67,82-87]. En vista del papel relevante de las oscilaciones theta en el procesamiento de información por el hipocampo, es razonable postular que la regulación de la actividad theta por la 5-HT podría suponer un papel modulador en el procesamiento de la información por el hipocampo, una premisa que ha recibido escasa atención a la fecha. La estimulación del núcleo del raquídeo medial (RM), la principal vía de entrada de serotonina al hipocampo, desincroniza la señal del EEG hipocampal en tanto que la lesión del RM resulta en la presencia de trenes persistentes y continuos de actividad theta [51,54,82,85,87,88]. La actividad neuronal septal es modulada por la serotonina actuando sobre neuronas colinérgicas, GABAérgicas y posiblemente glutamatérgicas a través de diferentes receptores, tales como 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, dichas neuronas a su vez proyectan al hipocampo [89-97].

Las fibras serotoninérgicas hacen blanco sobre neuronas GABAérgicas de SM/BDB [91] que a su vez hacen contacto con otras neuronas GABAérgicas de tipo cesta y candelero hipocampales. De acuerdo con esto, se ha propuesto que este arreglo puede generar desinhibición rítmica para dar como resultado una potente inhibición de las

interneuronas hipocampales [73,82,98,99]. La serotonina también inhibe neuronas septales tanto colinérgicas como no colinérgicas [89]. Adicionalmente, se ha propuesto que las fibras serotoninérgicas que inervan el septo medial pueden ejercer una influencia inhibitoria sobre el disparo rítmico de las células septales [90]. La serotonina también modula los procesos de aprendizaje y memoria, aunque su papel es incierto. Se ha reportado en ratas, que tanto la disminución de serotonina cerebral como hipocampal incrementan el aprendizaje de discriminación espacial [59,100]. Además se ha observado una mayor eficiencia en la ejecución de la memoria de trabajo después de la disminución de la serotonina prefrontal [101]. Recientemente, se ha reportado que la disminución de serotonina hipocampal produce una mayor eficiencia en el aprendizaje de lugar concomitantemente con un aumento en la actividad theta de alta frecuencia durante la búsqueda de una plataforma en el laberinto de Morris [67]; por otro lado, se han asociado deficiencias en el aprendizaje en ratas con una reducción en la expresión de la actividad de alta frecuencia hipocampal después de la disminución de serotonina en los núcleos supramamilar y el hipotálamo posterior (SUM/PH) [102].

Así el efecto de la serotonina sobre la actividad theta puede estar mediada a través del SM/BDB, el cual es el marcapasos de la actividad theta hipocampal, y de esta manera puede relacionarse con los procesos de aprendizaje y memoria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la reducción de serotonina del SM/BDB en la modulación de la memoria de trabajo y de la actividad theta subyacente.

5. JUSTIFICACIÓN

La evidencia clínica de pacientes con lesiones del hipocampo indica que la función espacial se ve severamente alterada. Además, el envejecimiento normal ocurre con un deterioro en la función espacial, mientras que deficiencias más severas se observan en la función espacial en pacientes con demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer y con demencia vascular; entre los signos más tempranos de la demencia se encuentran las alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial. Se ha evaluado experimentalmente las consecuencias de la lesión del sistema colinérgico y serotoninérgico o de ambos sobre las capacidades cognoscitivas. Si bien se ha confirmado la importancia del sistema colinérgico en los procesos de aprendizaje y memoria, no se ha alcanzado una conclusión con respecto al papel que juega el sistema serotoninérgico. Sin embargo, existe cada vez más evidencia de que alteraciones en el sistema serotoninérgico juegan un papel relevante en la patología de la enfermedad de Alzheimer. Por ello, es importante estudiar la contribución del sistema serotoninérgico en la modulación de la actividad theta en virtud del papel regulador que tiene tanto sobre la fisiología hipocampal como sobre la actividad colinérgica y GABAérgica del complejo SM/BDB, ya que dicho sistema regula las capacidades cognoscitivas que se ven alteradas durante los procesos demenciales. El presente trabajo contribuirá por lo tanto con conocimiento básico acerca de la función de la serotonina sobre el complejo SM/BDB y su repercusión sobre la organización del aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo, de tal manera que

pueda sustentar propuestas para a la elaboración de estrategias terapéuticas más eficientes en el tratamiento de las demencias.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad theta hipocampal se ha relacionado con el procesamiento de información por parte del hipocampo. Esta estructura cerebral participa en la organización del aprendizaje y memoria espacial, ambos procesos sufren alteraciones asociadas al envejecimiento normal y son afectados tempranamente en las demencias.

Se ha propuesto que el sistema serotoninérgico desincroniza la actividad eléctrica hipocampal como parte de un sistema que permite la selectividad del procesamiento de información por parte del hipocampo. Sin embargo, son escasos los estudios tendientes a evaluar dicha propuesta teórica que incluyan la manipulación experimental de la serotonina y el registro de cambios en la actividad eléctrica hipocampal asociados al aprendizaje. Previamente, hemos reportado cambios en la actividad theta hipocampal subyacentes al aprendizaje espacial en animales con lesión del sistema serotoninérgico hipocampal. Nuestros resultados muestran una mayor eficiencia en el aprendizaje espacial asociado al incremento en la proporción de actividad theta de alta frecuencia después de la reducción de serotonina del hipocampo dorsal, en la rata. Dado que el complejo SM/BDB se constituye como el marcapasos de la actividad theta hipocampal y que alteraciones tempranas en la función colinérgica central se presentan en enfermedades demenciales como la enfermedad de Alzheimer, es posible que la función neuromoduladora que la serotonina ejerce sobre este sistema, sea responsable al menos en parte de dicha patología. Se ha

establecido que la alteración experimental de la neurotransmisión colinérgica y GABAérgica del complejo SM/BDB produce deficiencias de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo; sin embargo, no se ha establecido la participación de la serotonina sobre este complejo. Por lo tanto, en el presente trabajo se propuso abatir la serotonina del complejo SM/BDB y evaluar las consecuencias sobre el aprendizaje espacial y sobre la actividad theta del hipocampo subyacente al aprendizaje, en la rata.

7. HIPÓTESIS

La disminución de serotonina cerebral induce actividad theta continua y persistente en el hipocampo, un efecto mediado principalmente por des-inhibición del disparo rítmico de las células del complejo SM/BDB, dicho complejo es considerado como el marcapasos de la actividad theta y es crucial en el procesamiento de información relacionada a la función hipocampal. Por lo tanto, si la mayor eficiencia en el aprendizaje espacial, observado después de la disminución de serotonina hipocampal, y que se relaciona con un aumento en la actividad de alta frecuencia theta se debe a la des-inhibición de las aferencias septales sobre el hipocampo; entonces, la disminución de la serotonina en el complejo SM/BDB también facilitará la inducción de actividad theta de alta frecuencia hipocampal subyacente al mejor desempeño en la memoria de trabajo espacial, en la rata.

7.1. HIPÓTESIS ESPECÍFICA

La disminución de la serotonina en el complejo SM/BDB alterará la actividad eléctrica hipocampal, subyacente a un mejor desempeño en la memoria de trabajo espacial, en la rata.

8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del abatimiento de la serotonina del complejo SM/BDB sobre la memoria de trabajo espacial y sobre la actividad eléctrica hipocampal subyacente a dicho aprendizaje.

8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del abatimiento de la serotonina del complejo SM/BDB sobre la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial
2. Evaluar el efecto del abatimiento de la serotonina del complejo SM/BDB, sobre la actividad theta hipocampal subyacente a la expresión de memoria de trabajo espacial.

9. DESARROLLO EXPERIMENTAL

9.1. Animales

Se utilizaron cuarenta ratas macho de la sepa Sprague Dawley con un peso entre 350 y 450 gramos. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía del National Institute of Health para el cuidado y mantenimiento de los animales de laboratorio (NIH, publicación 80-23) y con la Norma Oficial Mexicana para el uso de animales de laboratorio (NOM_062-ZOO-1999). Además, los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de bioterio, y fueron asignadas a dos grupos, un grupo considerado para la lesión farmacológica con 5,7- DHT (n = 15) y el grupo control o vehículo (n = 15).

9.2. Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/kg ip). Posteriormente, se aplicó una microinyección del neurotóxico 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) en el SM, en las coordenadas 0.6mm anterior a bregma, 1.5 mm a la derecha de la línea media, 15° de la vertical y 6.8 mm dorsoventral a partir de la superficie del cráneo. Por su parte se aplicó el neurotóxico en la región de la banda diagonal de Broca (BDB) en las coordenadas 0.6 mm anterior a bregma, 0.5 mm bilateral a la línea media y 7.8 mm dorsoventral a partir de la superficie

del cráneo. Con el propósito de proteger las terminales noradrenérgicas, se aplicaron 30 mg/Kg de desipramina (ip) 30 minutos antes de la microinyección del neurotóxico a cada sujeto. La dosis administrada de neurotóxico consistió de 1 μ g de 5-7 DHT disuelto en 0.1 μ l de solución salina al 0.1% de ácido ascórbico (solución vehículo). El volumen inyectado bilateralmente en el MS fue de 0.5 μ l, mientras que para la DBB fue 0.4 μ l. Para ambas infusiones la velocidad de administración fue de 0.1 μ l/min mediante el uso de una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 25. Después de la administración del 5,7-DHT, un subgrupo de animales fue implantado crónicamente con un electrodo monopolar en el área CA1 del hipocampo, en las coordenadas 4 mm posterior a bregma, 2.2 mm a la derecha de la línea media y 3.7 mm dorsoventral a la superficie del cráneo. Todas las coordenadas fueron referidas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson [103]. Los electrodos fueron contruidos con agujas de acero inoxidable calibre 25 aisladas con resina epóxica y presentando solo una pequeña zona de registro en la punta. Los electrodos fueron soldados a un transmisor para telemetría que fue ocultado bajo la piel en el cuello de la rata.

Por su parte el grupo considerado como control, solo recibió la solución vehículo en las mismas coordenadas que para la aplicación del neurotóxico. De este grupo, ocho ratas fueron implantadas con el electrodo de registro de igual manera a lo descrito para el grupo experimental.

Después de la cirugía, las ratas tuvieron un periodo de recuperación de dos semanas, en este tiempo, se les restringió el consumo de alimento,

al 80% del alimento correspondiente al consumo normal *ad libitum*. Al término de las dos semanas de recuperación se inició el entrenamiento de las ratas en el laberinto radial.

9.3. Entrenamiento en el laberinto radial.

El laberinto radial consiste de una zona central de 30 cm de diámetro desde la cual se extienden ocho brazos de 60 cm de largo por 10 cm de ancho (Figura 9).

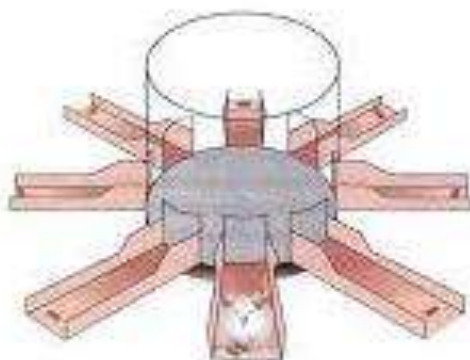


Figura 9. Laberinto radial de 8 brazos

Las ratas fueron expuestas al laberinto radial por un periodo de habituación de 10 minutos. Al día siguiente, las ratas regresaron a explorar el laberinto, el cual en esta ocasión, contenía trozos de cereal (Fruit Loops) en el piso y en un contenedor al final de cada brazo. El periodo de habituación se dio por terminado cuando el sujeto experimental consumió los trozos de cereal, de esta manera el cereal fue usado como el incentivo para la resolución de la tarea.

Al día siguiente del consumo de la recompensa en el laberinto, inició el periodo de entrenamiento. Primero se colocaron trozos de cereal en el contenedor colocado al final de cada brazo. Después, cada rata fue colocada al centro del laberinto, donde permaneció por 30 segundos, durante este periodo el acceso a los brazos fue bloqueado por un cilindro. Al final de los 30 s, el cilindro fue removido y la prueba dio inicio. Se registró entonces el número de visitas a cada brazo en un periodo de 10 min o hasta que la rata logro consumir las recompensas colocadas al final de cada brazo. Las ratas fueron entonces removidas del laberinto y colocadas en su caja de mantenimiento por un periodo de 20 min, al final del cual, regresaron al laberinto radial para ejecutar una segunda prueba. Las ratas fueron entrenadas por un periodo de 7 días. Para cada prueba se cuantifico el total de errores, clasificados a su vez como errores de omisión, considerados cuando la rata entra a un brazo pero no llega al final del brazo y además no toma el cereal; y errores por re-entrada, que consisten en la entrada a un brazo que ya fue visitado. El número de errores de re-entrada y el tiempo empleado en completar la tarea se promedio a partir de las dos pruebas por día.

Se realizaron comparaciones inter-grupales usando un ANOVA para medidas repetidas (días de entrenamiento) y prueba Tukey. Las comparaciones intra-grupales (días de entrenamiento por grupo) fueron realizadas por medio de un ANOVA para bloques y la prueba de Tukey.

9.4. Registro del EEG

Tres placas de registro para telemetría (Physiotel receiver, Mod RPC-1 DSI) fueron colocadas debajo del área central del laberinto, de esta manera se obtuvo el registro de la señal de EEG emitida por el transmisor, cada vez que la rata se movía del centro hacia un brazo determinado, de manera que solo se seleccionaron muestras de EEG correspondientes al brazo elegido en turno. Las placas receptoras fueron conectadas a un amplificador Grass (Neuro-Data Acquisition System, Model 15) por medio de una interfase (BCM-100). Los datos de EEG se obtuvieron con una frecuencia de muestreo de 1024 Hz, y en un ancho de banda comprendida entre 1 y 100 Hz. Los datos fueron almacenados y analizados posteriormente.

Un registro considerado como basal fue obtenido diariamente durante los 30 seg que la rata permaneció confinada dentro del cilindro al centro del laberinto. El registro de EEG subyacente a la prueba conductual fue realizado durante todo el entrenamiento; sin embargo, solo se obtuvieron muestra de EEG del primer día de exploración y de los primeros 4 días de entrenamiento; esto fue debido a que, en los últimos días de entrenamiento, las ratas se desplazaban lo suficientemente rápido como para permitir que las placas captaran la señal del transmisor.

Las señales de EEG obtenidas fueron analizadas por medio de la transformada rápida de Fourier (FFT) para obtener el espectro de poder. El poder de la banda theta (4-12 Hz) fue dividida en tres sub-bandas: actividad theta de baja frecuencia (4-6.5 Hz), actividad theta de alta

frecuencia (6.5-9.5 Hz) y actividad theta de máxima frecuencia (9.5 -12 Hz). El poder relativo (PR) fue obtenido como el porcentaje del poder absoluto (PA) de cada sub-banda de theta en relación al poder absoluto del total de la banda theta. Por ejemplo, la potencia relativa de la sub-banda 4-6.5 Hz se obtiene como: $(PA \text{ de la sub-banda de } 4-6.5 \text{ Hz}) * 100 / PA \text{ de la banda } 4-12 \text{ Hz}$. El valor de la potencia relativa correspondiente a cada etapa de la prueba fue transformado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$y = \ln(x/(100-x)) \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde: “x” es el valor de la potencia relativa, en tanto que “y” es el valor normalizado de la PR.

El valor promedio para cada etapa y prueba fue comparado usando un ANOVA para medidas repetidas y la prueba de Tukey como post hoc. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como significativo para todas las comparaciones.

9.5. Neuroquímica

Para la determinación a partir del tejido cerebral de las especies químicas de interés, se procedió como sigue: en la separación y cuantificación del contenido de serotonina y de Acido 5-Hidroxi-indolascético se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica utilizando el método de Ase modificado (Ase y cols., 1999). Para ello se utilizaron adicionalmente cinco ratas a las que se les practicó la lesión de MS/DBB como se describió previamente, los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos de cinco ratas

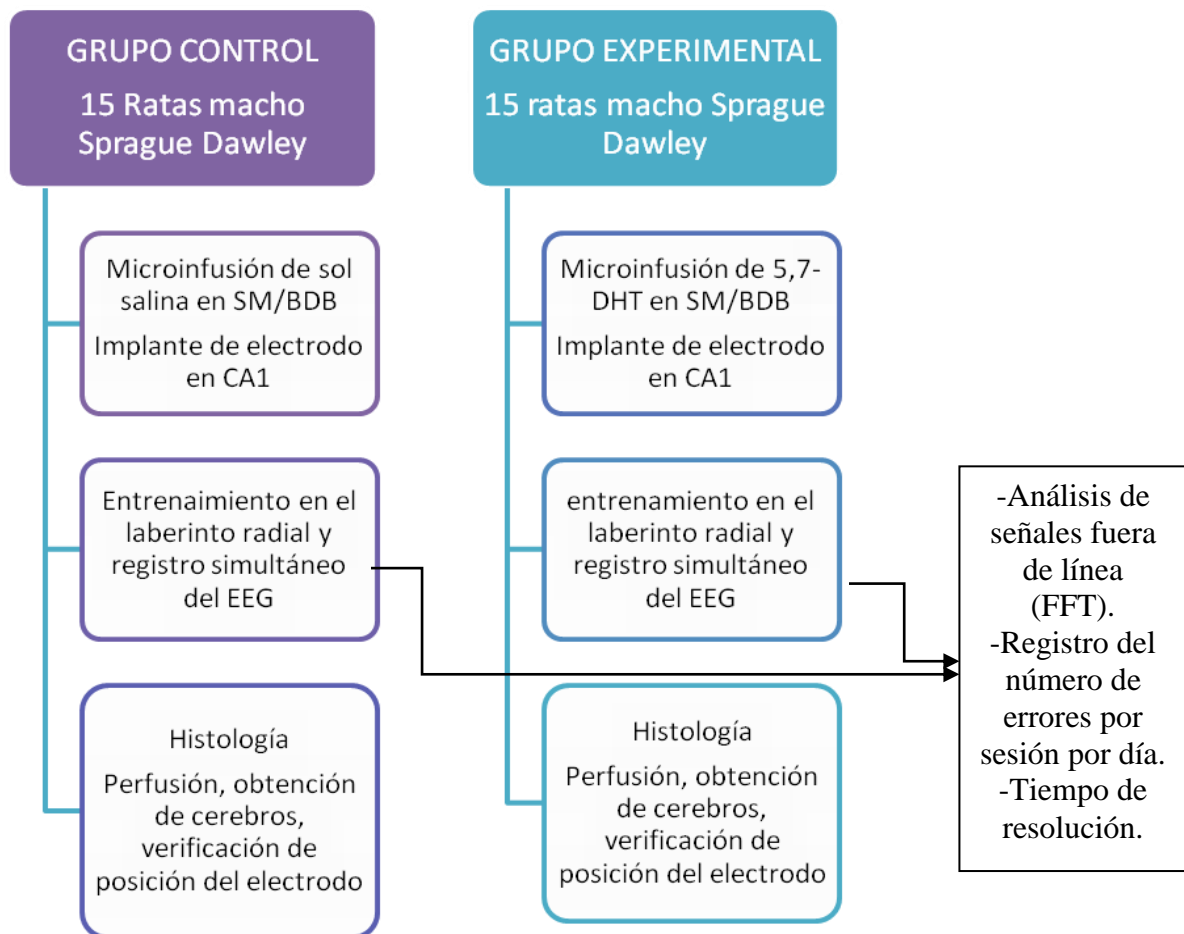
intactas. Los sobrenadantes de las muestras previamente filtrados fueron eluidos utilizando una columna analítica de 3 μm de particulado (100 X 4.6 mm, Adsorbosphere Catecholamine; Altech; Deerfield IL, U.S.A.). Se utilizó un gradiente continuo y una fase móvil formada como sigue: ácido monocloroacético 0.1 M, EDTA- Na_2 2mM, octal sulfato sódico 1.0 mM pH 3.3 y acetonitrilo 5 %. El flujo fue ajustado a 1.0 ml/m y la temperatura de la columna a 30 ± 0.04 °C. El electrodo de trabajo de la celda electroquímica (Antec Lyden VT-03) fue ajustado para que las muestras y estándares fueran oxidados a un potencial de + 680 mV en relación con un electrodo de referencia Hy-REF. Estándares externos de cada compuesto auténtico fueron inyectados para establecer el orden de elusión y llevar a cabo el cálculo de las concentraciones. Los datos fueron comparados con una t de Student.

9.6. Histología

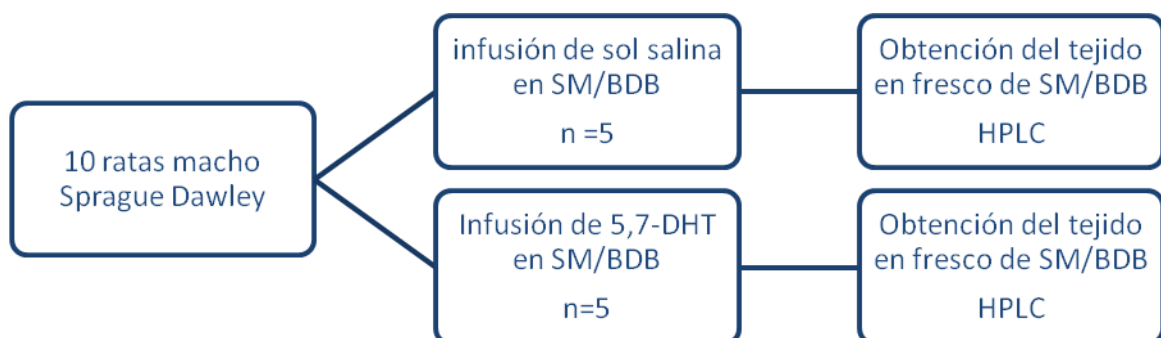
Análisis del tejido cerebral para verificación de la cánula de infusión y del electrodo de registro. Las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca con una solución buffer seguida por una solución de paraformaldehído. Los cerebros fueron entonces removidos para posteriormente obtener rebanadas de 40 μm de espesor por medio de un criostato. Por medio de violeta de cresilo se realizó la tinción del tejido para localizar la posición en la cual la punta de la cánula fue colocada durante la infusión de 5,7-DHT. Además, también se verificó la adecuada localización de la punta de los electrodos en el área de registro.

Solamente las ratas con la correcta posición del electrodo sobre el área CA1 del hipocampo y aquellas donde la punta de la cánula fue colocada correctamente sobre el MS/DBB fueron incluidas en el análisis del EEG. De acuerdo con dicha condición, el grupo control consistió de un número total de 10 ratas que completaron la prueba conductual, en tanto que los registros de EEG hipocampal se obtuvieron de cinco de estas 10 ratas. Por su parte el grupo con lesión consistió de 9 ratas para la prueba conductual, y siete de las cuales fueron consideradas para el registro de EEG.

10. DISEÑO EXPERIMENTAL



Determinación de contenido de serotonina
y ácido hidroxindolacético mediante cromatografía líquida
de alta presión
HPLC



11. RESULTADOS

11.1. Histología

La posición de la cánula fue verificada histológicamente. La infusión de la solución de 5,7-DHT y vehículo produjo daño mecánico que fue evidente a nivel cortical debido a la inserción de la aguja de infusión. Además se observó el rompimiento de fibras en el cuerpo calloso causado por la trayectoria de la aguja y finalmente una pequeña área de acumulación glial en la zona donde la punta de la cánula permaneció durante la infusión.

11.2. Neuroquímica

El procedimiento de lesión, resultó en una reducción del 60% de serotonina y en una reducción de aproximadamente 30% de 5HIAA en MS/DBB en comparación con las ratas intactas [$t=2.555$, $DF=8$, $P=0.034$ y $t=4.275$, $DF=8$, $P=0.003$, para 5-HIAA y serotonina respectivamente] (Figura 10)

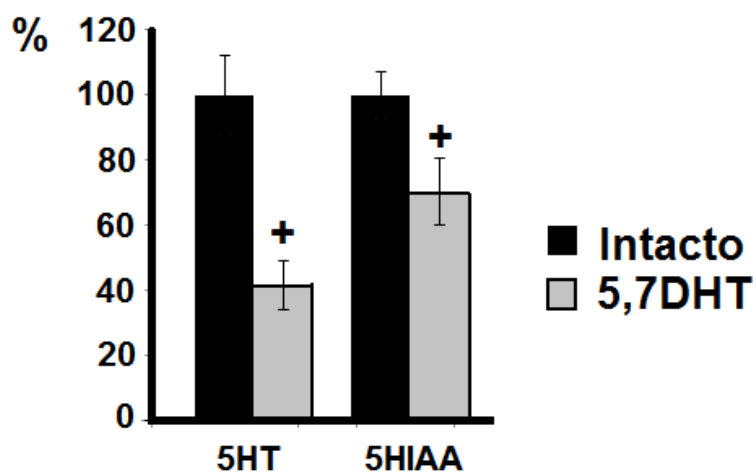


Figura 10. Comparación del contenido de serotonina y ácido 5-hidroxi-indol ascético entre los grupos intacto y lesionado (5,7-DHT), los valores se expresan como porcentaje del intacto. Media \pm EEM, +, intacto Vs. Lesionado. $p > 0.05$.

11.3. Conducta

Las comparaciones inter-grupales fueron realizadas usando ANOVA para medidas repetidas y la prueba post hoc de Tukey. En estas comparaciones, el grupo con lesión con 5,7-DHT tuvo un número total de errores menor en comparación con el grupo control [efecto de grupo; $F(1,17) = 15.114$, $P = 0.001$]. Un efecto significativo del entrenamiento por día fue también observado [$F(6,102) = 2.585$, $P = 0.0023$], en tanto que la interacción de grupo por día no fue significativa (Figura 11A). El número total de errores cometidos por los dos grupos también fue comparado considerando únicamente los cuatro días correspondientes al registro de EEG. Diferencias significativas fueron observadas por grupo [$F(1,17) = 15.892$, $P = 0.001$], pero no por día, ni por interacción de grupo por día.

Las comparaciones intra-grupales del número total de errores cometidos por las ratas correspondientes a cada día de entrenamiento (el promedio de los dos ensayos diarios) se realizó para evaluar la curva de aprendizaje mediante un diseño de bloques y la prueba de Tukey.

Con respecto a la evaluación del grupo vehículo, este exhibió un efecto significativo por día de entrenamiento [$F(6,54) = 8.342$, $P = 0.001$], de las comparaciones pareadas se obtuvo que este grupo redujo significativamente el número de errores en el día seis ($P = 0.027$) y siete ($P = 0.0024$) en comparación con el primer día de entrenamiento (Figura

11A). Por su parte el grupo lesionado presento un efecto significativo debido al entrenamiento con respecto al número total de errores cometidos por día de entrenamiento [$F(6,48) = 5.376, P < 0.001$]. Al igual que el grupo vehículo, este grupo redujo significativamente el número total de errores a partir del día seis y siete con respecto al primer día de entrenamiento ($P = 0.006$ y $P = 0.004$ respectivamente) (Figura 11A).

Del análisis del número de errores de re-entrada se obtuvo un significativo efecto de grupo cuando se consideraron tanto los siete días de entrenamiento [$F(1,17) = 13.402, P = 0.002$], como con el análisis de los primeros cuatro días cuando el registro de EEG fue obtenido [$F(1,17) = 15.642, P = 0.001$] (Figura 11B).

De la comparación intra-grupal con respecto a los errores de re-entrada, las ratas del grupo vehículo mostraron un efecto significativo con respecto al día de entrenamiento [$F(6,54) = 4.902, P = 0.001$]. De las comparaciones pareadas se obtuvo que el número de errores fue significativamente menor en los días seis y siete ($P = 0.046$) solamente cuando se comparó con el segundo día de entrenamiento, pero no con respecto al primer día de entrenamiento, cuando la mayoría de los errores por omisión ocurren (Figura 11B). Un resultado similar fue observado para el grupo con lesión, el cual exhibió un significativo efecto por el entrenamiento [$F(6,48) = 4.678, P = 0.001$] y se observó una significativa reducción en el número de errores en el séptimo día ($P = 0.048$) comparado con el segundo día de entrenamiento, pero no con respecto al primer día (Figura 11B). Estos resultados pudieron deberse

a la mayor ocurrencia de los errores por omisión en el primer día de entrenamiento.

La comparación inter-grupal del tiempo requerido para completar las pruebas mostró un efecto significativo del entrenamiento con respecto al factor grupo tanto en la comparación de los siete días de entrenamiento [$F(1,17) = 13.391, P = 0.001$], como con los primeros cuatro días [$F(1,17) = 5.061, P = 0.038$]. Sin embargo, no se observaron diferencias por día o por interacción de grupo por día.

De acuerdo con las comparaciones intra-grupales, los resultados mostraron un efecto significativo del entrenamiento con respecto al tiempo al requerido para completar la tarea por parte de las ratas vehículo [$F(6,54) = 2.835, P = 0.018$]. De la comparación pareada se obtuvo una tendencia a reducir el tiempo requerido para resolver la tarea en el quinto día de entrenamiento ($p = 0.062$) en comparación con el primer día de entrenamiento (Figura 11C). Por su parte el análisis intra-grupal del grupo con lesión también indicó un efecto significativo por día de entrenamiento con respecto al tiempo requerido para realizar la tarea [$F(6,48) = 14.108, P < 0.001$]; por su parte, las comparaciones pareadas mostraron que el tiempo para realizar la tarea se redujo del día tres al séptimo con respecto al primer día ($P \leq 0.01$), y desde el día cinco al séptimo con respecto al segundo día de entrenamiento ($P \leq .008$) (Figura 11C).

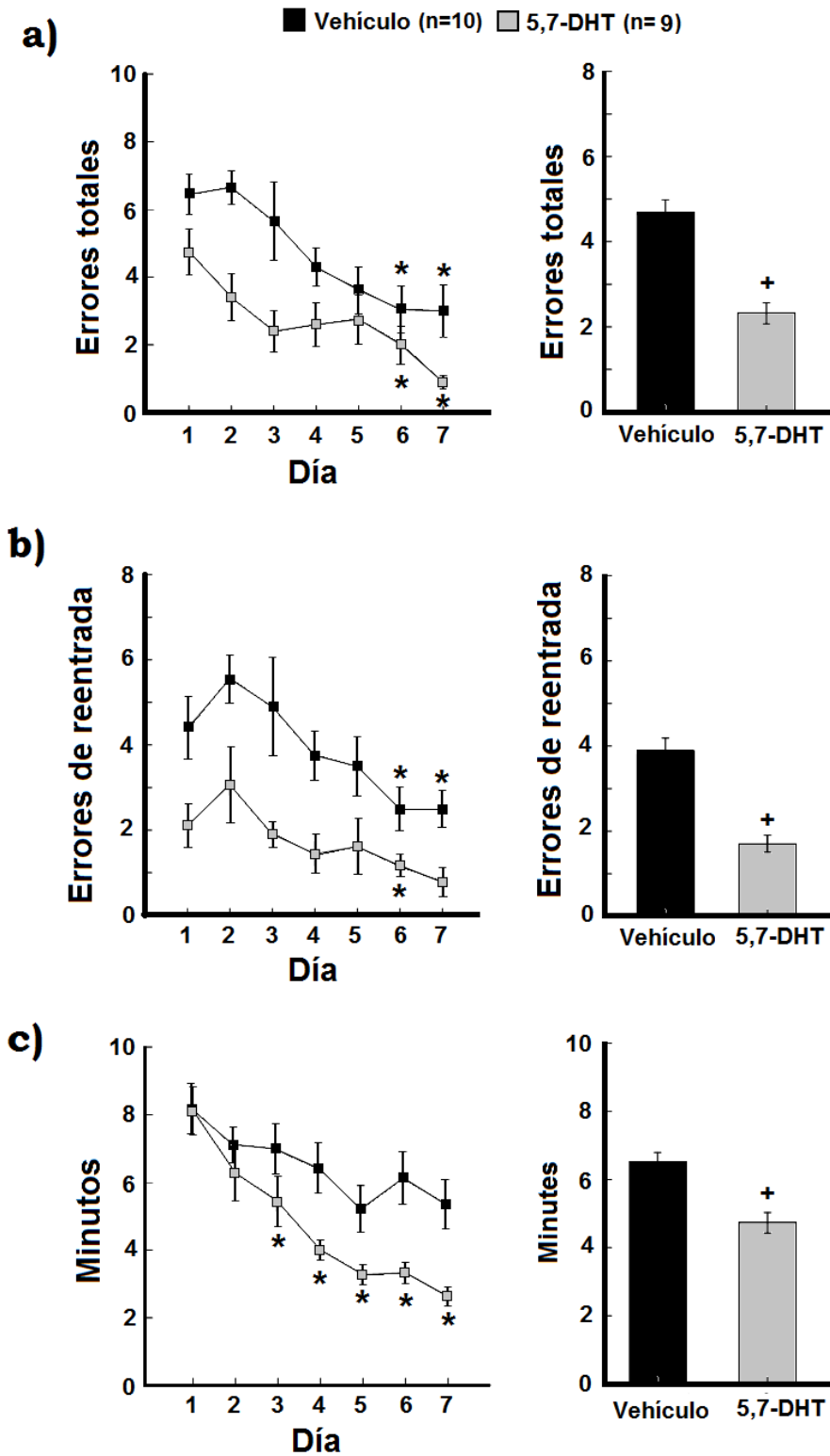


Figura 11. Comparaciones intragrupal e intergrupales de los errores totales (a), errores de re-entrada (b), y tiempo (c), obtenidos por los dos grupos (Vehículo y 5,7-DHT). Media \pm EEM, *, día 1 Vs. Días subsiguientes; +, grupo vehículo, Vs. Grupo 5,7-DHT. $P < 0.05$.

Para descartar que la conducta de las ratas implantadas fuera diferente de las ratas no implantadas, se realizó una comparación de las variables conductuales entre ratas control implantadas ($n = 5$) y ratas control no implantadas ($n = 5$). Al evaluar los siete días de entrenamiento, no hubo diferencias significativas por grupo con respecto al número total de errores [$F(1,8) = 0.258$, $P = 0.625$], los errores por omisión [$F(1,8) = 0.890$, $P = 0.373$], o con el tiempo requerido para completar la tarea [$F(1,8) = 1.088$, $P = 0.327$]. Tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a la interacción por grupo y día en ninguna de las variables.

11.4. EEG

Las comparaciones inter-grupales con respecto a la PR obtenida de los primeros cuatro días de entrenamiento, se realizó usando un ANOVA para medidas repetidas, considerando los factores: grupo, sub-banda de la frecuencia theta, la condición conductual y los días como medida repetida (el día de exploración y los 4 días de entrenamiento). Como prueba post hoc se utilizó la prueba de Tukey. Por otro lado, para las comparaciones intra-grupales, se realizó un diseño de bloques que incluyó tres factores: día de entrenamiento (día de exploración y los días del 1 al 4), condición conductual (basal y prueba, en esta última se incluyen la exploración y las cuatro sesiones de entrenamiento) y la sub-banda de la frecuencia theta (baja frecuencia entre 4-6.5 Hz y la alta frecuencia 6.5-9.5 Hz). Al final se utilizó la prueba Tukey como post

hoc. La Figura 12 muestra trazos de EEG de un animal representativo de cada grupo, durante los días 1 y 4 de entrenamiento.

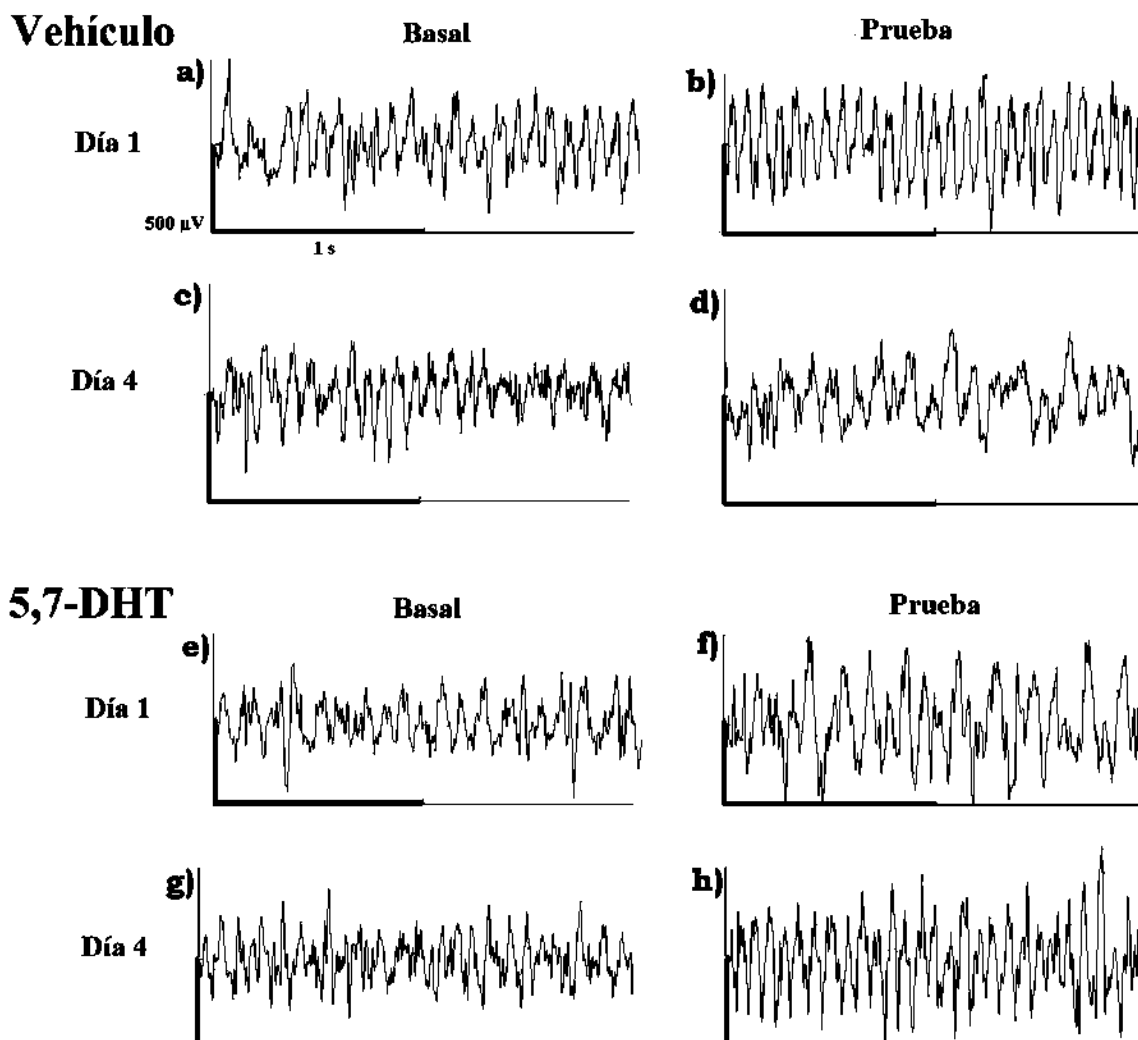


Figura 12. Trazos del EEG de dos animales representativos de los grupos, durante el día 1, para la condición basal (el animal en el cilindro) y la condición de prueba, para el grupo control (a, b) y el grupo experimental (e, f). Las mismas condiciones de registro correspondientes al día 4 se muestran para el grupo control (c, d) y el experimental (g, h). Calibración, $500\mu\text{V}/1\text{ s}$.

La comparación intra-grupal del grupo vehículo presentó diferencias significativas en la PR de theta entre las diferentes bandas y condiciones conductuales [$F(1,80) = 11.388, P = 0.001$]. De acuerdo con ello, de las comparaciones pareadas se obtuvo que este grupo presentó valores mayores de PR en la alta frecuencia en comparación con PR de la baja frecuencia tanto en la condición basal (exploración) ($p = 0.006$) como en la condición de prueba (entrenamiento) ($P < 0.001$). Con respecto a la interacción de los factores, día y sub-banda de frecuencia, este grupo no mostró efectos significativos [$F(4,80) = 2.018, P = 0.100$] (Figura 8). Tampoco hubo efectos significativos por la interacción de la sub-banda de frecuencia, días de entrenamiento y condición conductual [$F(4,80) = 0.573, P = 0.683$].

La comparación intra-grupal del grupo lesionado exhibió diferencias en la PR por etapa conductual y sub-bandas de frecuencia [$F(1,99) = 35.264, P < 0.001$], de manera similar a las diferencias obtenidas con respecto al grupo vehículo. Se tuvo entonces que la PR de la alta frecuencia fue mayor que la RP de la baja frecuencia tanto en la condición basal ($P < 0.001$) como en la condición de prueba ($P < 0.001$); además, la PR de la alta frecuencia fue mayor durante la condición de prueba que en la condición basal ($P < 0.001$). Por otro lado, este grupo mostró un efecto significativo entre la interacción día de entrenamiento por sub-banda de frecuencia [$F(4,99) = 3.214, P = 0.016$]. De las comparaciones pareadas se obtuvo que para todos los días (exploración y los cuatro días de entrenamiento), la PR de la alta frecuencia de theta fue más alta que la PR de la baja frecuencia ($P < 0.001$). Este resultado

sugiere que, en el grupo lesionado, se presenta un predominio de alta frecuencia en la banda theta que se relaciona con un mejor desempeño conductual en comparación a lo observado en el grupo control (Figura 8). Por otro lado, no se observaron efectos por interacción entre día de entrenamiento, condición conductual y sub-banda de frecuencia [$F(4,99) = 1.243, P = 0.298$].

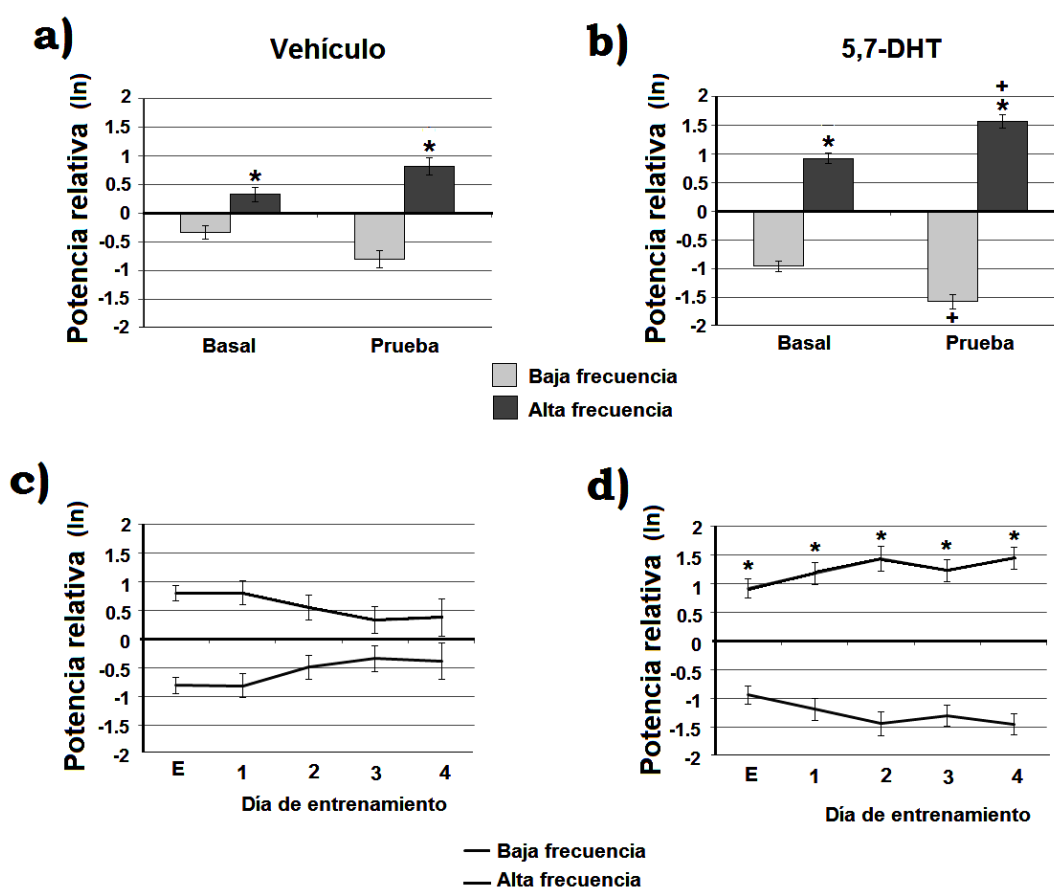


Figura 8 comparación intra-grupal de la potencia relativa considerando la etapa conductual (basal y prueba) para el grupo control (a) y el grupo experimental (b) y la potencia relativa a través de los días de entrenamiento para el grupo control (c) y el grupo experimental (d). *, Baja frecuencia Vs. Alta frecuencia; +, Basal Vs. Prueba. Media \pm EEM, $p < 0.05$).

Con respecto a la comparación inter-grupal, una diferencia significativa entre los grupos se observó con respecto a la PR de las diferentes sub-bandas de frecuencia [$F(1,38) = 4.353, P = 0.044$]. Se encontró a partir de las comparaciones pareadas que el grupo lesionado tuvo una menor PR en la sub-banda de baja frecuencia ($P < 0.001$), pero una mayor PR en la sub-banda de alta frecuencia ($P < 0.001$), en comparación con el grupo control. Adicionales diferencias inter-grupales resultaron de la interacción entre condición conductual y sub-banda de frecuencia [$F(1,38) = 6.696, P = 0.014$]. De la evaluación de las comparaciones pareadas resultó que el grupo lesionado presentó menor PR en la sub-banda de baja frecuencia ($P = 0.008$) y una mayor PR en la sub-banda de alta frecuencia ($P = 0.013$) durante la condición basal en comparación con el grupo control. Además, se observó que el grupo lesionado presentó menor PR en la sub-banda de baja frecuencia ($P < 0.001$) y una mayor PR en la sub-banda de alta frecuencia ($P < 0.001$) con respecto a la condición de prueba en comparación con el grupo control (Figura 9).

Finalmente, al analizar la interacción día y sub-banda de frecuencia se observó una diferencia significativa entre los grupos [$F(4,152) = 4.250, P = 0.003$]. El grupo lesionado tuvo una menor PR en la sub-banda de baja frecuencia en comparación con el grupo control, durante los días de entrenamiento dos ($P = 0.017$), tres ($P = 0.011$) y cuatro ($P = 0.025$). Por otro lado, el grupo lesionado presentó una mayor PR en la sub-banda de alta frecuencia en comparación a la presentada por el grupo

control en los días de entrenamiento dos ($P = 0.030$), tres ($P = 0.019$) y cuatro ($P = 0.025$) (Figura 9).

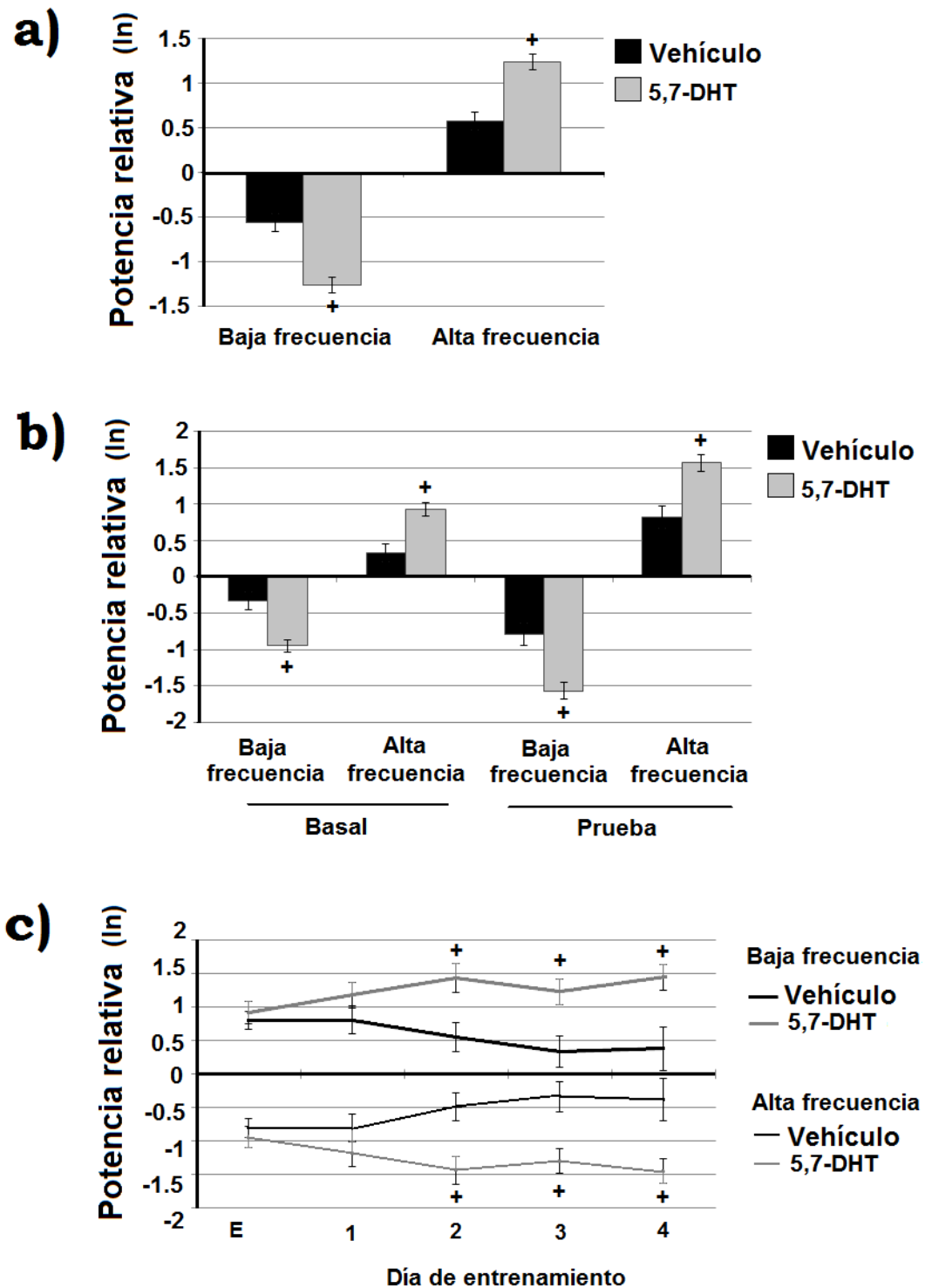


Figura 9. Comparación intergrupala de la potencia relativa en las bandas de baja y alta frecuencia, a) por grupo, b) entre etapas por grupo y c) a

través de los días de entrenamiento por grupo. Media \pm EEM. +, Vehículo Vs. 5,7-DHT; $p < 0.05$.

A partir de los resultados obtenidos se observó que el mejor desempeño, evidenciado por un menor número de errores durante el aprendizaje de la tarea de memoria de trabajo, fue asociado con una mayor expresión de la actividad theta en la sub-banda de alta frecuencia en las ratas con lesión de las terminales serotoninérgicas del SM/BDB.

12. DISCUSIÓN

La participación de la serotonina en los procesos de aprendizaje se ha estudiado con diferentes aproximaciones experimentales; sin embargo, los resultados a la fecha son complejos y dependen del tipo de tarea conductual y las condiciones de experimentación empleadas para modificar la actividad serotoninérgica. Con respecto al aprendizaje espacial, no se han observado efectos después de la reducción en la concentración de serotonina cerebral por aplicación de 5,7-DHT en ratas entrenadas en una tarea de memoria de trabajo con respuesta retrasada y de no igualación a la posición [104]. Además, la infusión intracerebral de 5,7-DHT en ratas macho, no alteró su ejecución en el laberinto de Morris o en el laberinto radial [105,106]. Por otro lado, Asin *et al* [107] evaluaron los efectos de la reducción de serotonina, a través de la infusión de 5,7-DHT directamente en el núcleo del rañé medial (RM), sobre el desempeño de una tarea de memoria de trabajo usando el laberinto radial, y compararon el resultado obtenido con un grupo de ratas a las que se les practicó lesión electrolítica del rañé medial. Los resultados mostraron solamente deficiencias en el aprendizaje de ratas con lesión electrolítica del núcleo de RM, pero no se evaluó realmente el efecto de la disminución de serotonina. Murtha y Pappas [108] no encontraron efectos sobre la ejecución conductual de ratas evaluadas en el laberinto de Morris (tarea de memoria de referencia espacial) o en el laberinto radial (tarea de memoria de trabajo espacial) después de inducir la reducción en la concentración de serotonina hipocampal a través de la infusión de 5,7-DHT sobre fimbria fornix y el haz del

cíngulo. De manera similar no se encontró efecto sobre el aprendizaje después de la reducción de serotonina específica al hipocampo [105]. Estos trabajos sustentan la idea de que la disminución de serotonina cerebral o hipocampal no afecta el aprendizaje y memoria de tareas espaciales. Sin embargo, otros autores han reportado deficiencias en memoria de trabajo después de la disminución de serotonina cerebral [109] o la potenciación del déficit en el aprendizaje inducido por lesión colinérgica al disminuir conjuntamente la concentración de serotonina [105,108,110]. Por otro lado, otras evidencias han reportado un mejor desempeño en el aprendizaje espacial después de la disminución de serotonina a nivel cerebral [84,111], del cerebro anterior [112], de la corteza prefrontal [101], o del hipocampo [59,67]. Al margen de este conocimiento, no existen estudios que evalúen la consecuencia de disminuir específicamente la concentración de serotonina en el SM/DBB sobre el aprendizaje. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT_{1A} en el septo medial o SM/DBB induce deterioro en el aprendizaje en el laberinto de Morris [113] y en la memoria de trabajo [114]. La misma estrategia farmacológica no mostró tener efectos sobre la tarea en el laberinto acuático de Morris [95].

Con respecto a nuestros resultados, se pudo observar que la memoria de trabajo espacial fue específicamente incrementada después de la disminución en la concentración de serotonina en el SM/DBB. Esto fue evidente al evaluar el desempeño de los animales del grupo lesionado en el laberinto radial; las ratas de este grupo cometieron un menor número

de errores a lo largo del entrenamiento en comparación con las ratas del grupo vehículo. Esta facilitación fue acompañada por un aumento en la PR correspondiente a la banda theta de alta frecuencia, además de la disminución en la PR en la banda theta de baja frecuencia. Los presentes resultados sustentan la idea de que la serotonina tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de la memoria de trabajo espacial al actuar sobre la función del SM/DBB. De acuerdo con esto, se ha observado que la activación de receptores 5-HT_{1A} por medio de la administración intra-septal de 8-OH-DPAT produce deficiencias en la memoria de trabajo espacial probada en el laberinto acuático de Morris [114,115]. Adicionalmente, la infusión de agonistas a nivel septal indujo daño en el aprendizaje de lugar sobre una tarea de memoria espacial en el laberinto de Morris, únicamente cuando la infusión fue administrada antes del entrenamiento [113]. Debido a que se ha observado que la lesión de neuronas colinérgicas septales por medio de la administración de 192-IGg-saporina no produce deterioro en el aprendizaje espacial [113] es posible que los efectos de 8-OH-DPAT podrían ser mediados por su acción sobre neuronas GABAérgicas [116] y glutamatérgicas. Recientemente se ha demostrado que las células GABAérgicas septales juegan un papel importante en la generación de la actividad theta hipocampal [73]. A este respecto, el papel de SM sobre la modulación serotoninérgica de la actividad theta fue estudiado en ratas anestesiadas con uretano. Se pudo observar en estas ratas que la actividad theta hipocampal persistente inducida por la aplicación de procaína en el RM, fue bloqueada por la inactivación septal con

procaína o por la administración de atropina [117]. Estos resultados sugieren que el efecto modulador del núcleo del rafé sobre la actividad theta hipocampal depende de la actividad de las neuronas del SM en las ratas anestesiadas. Por lo tanto, se estableció que el SM representa el recipiente de la influencia del rafé para modular a través de la serotonina la actividad theta que se presenta en ratas anestesiadas y conejos en estado alerta [51,88,117].

Nuestros resultados son consistentes con el papel del SM/DBB como el principal blanco de la influencia serotoninérgica para la modulación de la actividad theta hipocampal; la afirmación anterior se basa en que la disminución selectiva de serotonina en el SM/DBB induce una mayor expresión en la actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) tanto en la condición basal, como durante el procesamiento de memoria de trabajo en ratas en libre movimiento. Además, este cambio en la expresión de la actividad theta fue relacionado con una mejor ejecución en la tarea del laberinto radial, una tarea que involucra tanto la función septal [81] como la hipocampal [118].

Algunos investigadores han considerado la posibilidad de que la infusión intra-septal de 8-OH-DPAT podría inducir un disturbio en el disparo rítmico de las propias neuronas septales [115]; sin embargo esta posibilidad aún no ha sido analizada. A pesar de ello, existen algunos estudios que evalúan las consecuencias de manipular el sistema serotoninérgico del SM/DBB sobre la actividad eléctrica. Se ha determinado, que la administración sistémica de agonistas 5-HT_{2C} induce una reducción en el disparo rítmico en el SM conjuntamente con

una reducción en la actividad theta hipocampal. Por otro lado, la administración de antagonistas para este receptor, provoca el efecto contrario, aumento en el disparo rítmico de las neuronas del SM y un aumento en la ritmo theta hipocampal [119].

El aumento en la actividad theta de alta frecuencia observado en las ratas con disminución de serotonina en SM/DBB, posiblemente refleja la falta de influencia de la serotonina sobre todos los tipos neuronales y sobre todos los tipos de receptores para 5-HT en dicha área, lo cual conduce a un efecto global que ocasiona el aumento de la influencia rítmica del SM/DBB sobre el hipocampo. El presente resultado concuerda con resultados previos que muestran que la disminución de serotonina hipocampal induce facilitación del aprendizaje de lugar, concomitantemente con el predominio de la actividad theta de alta frecuencia [67]. Indirectamente se puede establecer que la serotonina actúa como un inhibidor de las oscilaciones theta, y como un modulador del procesamiento de información tanto en el septo como el hipocampo. Por otro lado, se ha demostrado que la disminución de serotonina en el complejo NSUM/NPH provoca deficiencias en el aprendizaje de lugar asociadas a una falta de cambios en la actividad theta hipocampal [102]. El NSUM/NPH se ha relacionado con la codificación de la frecuencia y/o con la amplitud de la actividad theta [120-122]. Como podemos apreciar, el papel de la serotonina como modulador de la actividad theta hipocampal es complejo y puede variar en los diferentes relevos del sistema sincronizador ascendente dependiendo de la contribución de cada relevo a la expresión de la

actividad theta. Sin embargo, el efecto derivado de la disminución de serotonina sobre el aprendizaje está relacionado consistentemente con cambios en la actividad theta hipocampal. Por ejemplo, cuando el abatimiento de serotonina resulta en una disminución en la expresión de la actividad theta de alta frecuencia, se observa una eficiencia marginal en el aprendizaje. Por el contrario, cuando la disminución de serotonina causa aumento en la actividad theta de alta frecuencia, hay una amplificación en el aprendizaje. De esta manera, la serotonina, la actividad theta y el aprendizaje parecen estar estrechamente relacionados. De acuerdo con esto, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de Jeltsch-David *et al.*, [115] la cual propone que un bajo tono serotoninérgico en el septo medial puede incrementar la influencia colinérgica y GABAérgica sobre el propio septo además del hipocampo y por lo tanto amplificar el estado de codificación/consolidación. Para explorar las consecuencias de modificar el tono serotoninérgico sobre interacción sináptica entre el hipocampo y el SM, recientemente se evaluó la conectividad funcional entre ambas estructuras por medio del análisis de coherencia entre las señales de EEG, subyacente al aprendizaje de lugar en el laberinto acuático de Morris [102]; en dicho trabajo se alteró el sistema serotoninérgico en otro relevo del sistema activador ascendente, el NSUM, el cual tiene conexiones recíprocas con el SM. De este trabajo se obtuvo que los animales vehículo, durante el aprendizaje de la tarea espacial, presentaron cambios en la PR en todas las regiones registradas (como se ha reportado previamente) y además, presentaron

aumento en la coherencia de la señal de EEG ente el SM y el hipocampo a lo largo de los días de entrenamiento, dicha aumento en la coherencia, se correlacionó con un mejor desempeño en el aprendizaje por parte del grupo control en comparación con el grupo lesionado; por su parte los animales con disminución de serotonina en el NSUM no mostraron estos cambios, es decir, no presentaron aumento en la PR de la actividad theta de alta frecuencia, ni el aumento en la coherencia entre el SM y el hipocampo, lo que hace sugerir que una reducida comunicación entre estas estructuras subyace a la ineficiente ejecución de estos animales en la tarea espacial. Queda por verificarse si la disminución de serotonina en el NSUM provoca un aumento en el tono serotoninérgico del SM, con el consecuente deterioro en el aprendizaje espacial.

A la fecha no hay estudios que evalúen los efectos de un aumento en la activación serotoninérgica sobre la actividad theta hipocampal y los procesos de aprendizaje.

Con respecto al tiempo empleado en la resolución de la tarea de memoria de trabajo, se tuvo que el grupo lesionado empleó menos tiempo en la resolución de la tarea, esto podría estar relacionado con un número menor de brazos visitados. Sin embargo, el papel del sistema septo-hipocampal y de la serotonina, con respecto la modulación de la ansiedad, origina la posibilidad de que la disminución de la serotonina en el SM/BDB, pudiera alterar el nivel de ansiedad de las ratas. De esta manera, la reducción en el tiempo empleado para completar la tarea,

podría estar relacionado con una reducción en los niveles de ansiedad lo que permitiría a las ratas con disminución de serotonina desplazarse con mayor rapidez a través del laberinto. Sin embargo, se ha reportado que las drogas ansiolíticas reducen la actividad theta evocada por estimulación de la formación reticular [123]. Debido a que no evaluamos los niveles de ansiedad, esta discrepancia permanece para ser aclarada.

Con respecto a nuestro estudio, no podemos descartar la posibilidad de que alguna reducción marginal en la concentración de serotonina hipocampal pudiera ocurrir como consecuencia de la lesión del sistema serotoninérgico de SM/BDB. Sin embargo, la magnitud de los cambios observados después de la infusión de 5,7-DHT en el SM/BDB con respecto a las variables conductuales y del EEG fue mayor comparada con la magnitud de los cambios observados después de la disminución de serotonina restringida al hipocampo [67]. Además, mientras que en las ratas con disminución de serotonina en SM/BDB los cambios en el EEG fueron expresados en todas las etapas conductuales (basal y aprendizaje), las ratas con disminución de serotonina hipocampal presentan un aumento en la actividad theta de alta frecuencia solamente durante la búsqueda de la plataforma en el laberinto de Morris. En otras palabras, la actividad theta de alta frecuencia no incrementa durante la condición de reposo. Así, la modulación serotoninérgica de la actividad theta hipocampal parece tener un peso mayor cuando actúa sobre el SM/BDB que cuando actúa directamente sobre el hipocampo.

13. CONCLUSIÓN

Debido a que la disminución en la concentración de serotonina hipocampal indujo un aumento en la expresión de actividad theta de alta frecuencia subyacente a un mejor desempeño en una tarea de aprendizaje espacial, y considerando que el complejo SM/BDB es el inductor de dicha actividad sobre el hipocampo, se propuso evaluar el efecto de la disminución de serotonina directamente sobre dicho complejo. Se ha propuesto que la serotonina ejerce un efecto inhibitor sobre la expresión de la actividad theta. De acuerdo con nuestros resultados, se comprobó que la disminución de la serotonina septal, facilitó la inducción de la actividad theta de alta frecuencia y concomitantemente, facilitó el aprendizaje de memoria de trabajo espacial. Aparentemente, la información que recibe el complejo SM/BDB es transmitida al hipocampo con menor interferencia inhibitor por parte del sistema serotoninérgico septal, lo que funcionalmente se manifiesta en una mayor actividad en la banda de alta frecuencia de theta y que subyace al mejor desempeño conductual.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Treviño, M. & Gutiérrez, R. Las bases celulares de las oscilaciones neuronales. *Salud Mental* **30**, 11-18 (2007).
2. Mitzdorf, U. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev* **65**, 37-100 (1985).
3. Bland, B.H. & Oddie, S.D. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 259-73 (1998).
4. Steriade, M. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* **86**, 1-39 (2001).
5. Engel, A.K., Fries, P. & Singer, W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci* **2**, 704-16 (2001).
6. Berger, H. Über das elektroencephalogramm des menschen. *Arch. Psychiatr Nervenkr* **87**, 527-570 (1929).
7. Bronzino, J.D. Quantitative analysis of the EEG--general concepts and animal studies. *IEEE Trans Biomed Eng* **31**, 850-6 (1984).
8. Anderson, P. & Anderson, S.A. *Physiological bases of the alpha rhythm*, (Appleton, New York, 1968).
9. Alarcon, G., Binnie, C.D., Elwes, R.D. & Polkey, C.E. Power spectrum and intracranial EEG patterns at seizure onset in partial epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **94**, 326-37 (1995).
10. Quiroga, R.Q., Garcia, H. & Rabinowicz, A. Frequency evolution during tonic-clonic seizures. *Electromyogr Clin Neurophysiol* **42**, 323-31 (2002).
11. Etevenon, P. et al. [Fourier analysis, statistical analysis of amplitude and on-line quantification of the EEG]. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* **6**, 246-54 (1976).
12. Urrestarazu, E. & Iriarte, J. [Mathematical analyses in the study of electroencephalographic signals]. *Rev Neurol* **41**, 423-34 (2005).
13. Guevara Pérez, M.A., Hernández González, M., Sanz Martín, A. & Amézcua Gutiérrez, C.d.M. *Registro y análisis automatizado de señales*

- bioeléctricas cerebrales durante la ejecución sexual*, (Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México., 2011).
14. Brigham, E.O. *The fast Fourier Transform*, (Prentice-Hall Inc, New Jersey, EEUU, 1974).
 15. Chen, C.H. *Digital signal processing*, (Oxford University Press, Oxford, 2001).
 16. www.um.edu.ar/math/cap-4.doc.
 17. Sakurai, Y. Cell-assembly coding in several memory processes. *Neurobiol Learn Mem* **70**, 212-25 (1998).
 18. Sakurai, Y. The search for cell assemblies in the working brain. *Behav Brain Res* **91**, 1-13 (1998).
 19. Fell, J. et al. Rhinal-hippocampal theta coherence during declarative memory formation: interaction with gamma synchronization? *Eur J Neurosci* **17**, 1082-8 (2003).
 20. Basar, E., Schurmann, M. & Sakowitz, O. The selectively distributed theta system: functions. *Int J Psychophysiol* **39**, 197-212 (2001).
 21. Basar, E., Basar-Eroglu, C., Karakas, S. & Schurmann, M. Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *Int J Psychophysiol* **39**, 241-8 (2001).
 22. Tesche, C.D. & Karhu, J. Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 919-24 (2000).
 23. Stubley-Weatherly, L., Harding, J.W. & Wright, J.W. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res* **716**, 29-38 (1996).
 24. Bohbot, V.D. et al. Rat spatial memory tasks adapted for humans: characterization in subjects with intact brain and subjects with selective medial temporal lobe thermal lesions. *Physiol Res* **51 Suppl 1**, S49-65 (2002).
 25. Armstrong, C.L. & Cloud, B. The emergence of spatial rotation deficits in dementia and normal aging. *Neuropsychology* **12**, 208-17 (1998).

26. Mobbs, C.V. et al. Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56 Spec No 1**, 34-44 (2001).
27. Mesulam, M.M. Aging, Alzheimer's disease and dementia. Clinical and neurobiological perspectives. in *Principles of behavioral and cognitive neurology*. (ed. Mesulam, M.M.) 439-528 (Oxford University Press, Oxford, 2000).
28. Clague, F., Dudas, R.B., Thompson, S.A., Graham, K.S. & Hodges, J.R. Multidimensional measures of person knowledge and spatial associative learning: can these be applied to the differentiation of Alzheimer's disease from frontotemporal and vascular dementia? *Neuropsychologia* **43**, 1338-50 (2005).
29. Dudas, R.B., Clague, F., Thompson, S.A., Graham, K.S. & Hodges, J.R. Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* **43**, 1266-76 (2005).
30. Kalova, E., Vlcek, K., Jarolimova, E. & Bures, J. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: corresponding results in real space tests and computer tests. *Behav Brain Res* **159**, 175-86 (2005).
31. Buzsaki, G., Leung, L.W. & Vanderwolf, C.H. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* **287**, 139-71 (1983).
32. Vinogradova, O.S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* **45**, 523-83 (1995).
33. Monmaur, P. & Thomson, M.A. Spatial distribution of hippocampal-dentate theta rhythm following colchicine injection into the hippocampal formation of the rat. *Brain Res* **365**, 269-77 (1986).
34. Vertes, R.P. Brainstem modulation of the hippocampus. Anatomy, physiology and significance. in *The Hippocampus*, Vol. 4 (eds. Isaacson, R.L. & Pribram, K.H.) 41-75 (Plenum, New York, 1986).

35. Olvera-Cortes, E., Cervantes, M. & Gonzalez-Burgos, I. Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* **58**, 261-70 (2002).
36. Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N.J. The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* **57**, 2-36 (1992).
37. Olvera-Cortes, E., Guevara, M.A. & Gonzalez-Burgos, I. Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res Bull* **62**, 379-84 (2004).
38. Vanderwolf, C.H. Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int Rev Neurobiol* **30**, 225-340 (1988).
39. Green, J.D. & Arduini, A.A. Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol* **17**, 533-57 (1954).
40. Vertes, R.P. & Kocsis, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* **81**, 893-926 (1997).
41. Buhl, H.B., Schwerdtfeger, K.W. & Germroth, P. New anatomical approaches to reveal afferent and efferent hippocampal circuitry. in *The hippocampus* (ed. Chan-Palay, V.a.K., C. H.) 71-83. (New Vistas. (eds). Alan R. Liss, Inc. USA., New York, 1989).
42. Olpe, H.R. et al. Cholinomimetics induce theta rhythm and reduce hippocampal pyramidal cell excitability. *Eur J Pharmacol* **142**, 275-83 (1987).
43. Pitler, T.A. & Alger, B.E. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* **450**, 127-42 (1992).
44. Colom, L.V., Castaneda, M.T., Reyna, T., Hernandez, S. & Garrido-Sanabria, E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* **58**, 151-64 (2005).
45. Andersen, P., Bland, H.B., Myhrer, T. & Schwartzkroin, P.A. Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res* **165**, 13-22 (1979).

46. Leung, L.S., Martin, L.A. & Stewart, D.J. Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus* **4**, 136-47 (1994).
47. Teitelbaum, H., Lee, J.F. & Johannessen, J.N. Behaviorally evoked hippocampal theta waves: a cholinergic response. *Science* **188**, 1114-6 (1975).
48. Colom, L.V., Nassif-Caudarella, S., Dickson, C.T., Smythe, J.W. & Bland, B.H. In vivo intrahippocampal microinfusion of carbachol and bicuculline induces theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus. *Hippocampus* **1**, 381-90 (1991).
49. Colom, L.V. & Bland, B.H. Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine. *Hippocampus* **1**, 15-30 (1991).
50. Kramis, R., Vanderwolf, C.H. & Bland, B.H. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* **49**, 58-85 (1975).
51. Vinogradova, O.S., Kitchigina, V.F., Kudina, T.A. & Zenchenko, K.I. Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta-rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience* **94**, 745-53 (1999).
52. Vertes, R.P., Hoover, W.B. & Viana Di Prisco, G. Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav Cogn Neurosci Rev* **3**, 173-200 (2004).
53. Segal, M. Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res* **94**, 115-131 (1975).
54. Kitchigina, V.F., Kudina, T.A., Kutyreva, E.V. & Vinogradova, O.S. Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience* **94**, 453-63 (1999).

55. McNaughton, N., Azmitia, E.C., Williams, J.H., Buchan, A. & Gray, J.A. Septal elicitation of hippocampal theta rhythm after localized deafferentation of serotonergic fibers. *Brain Res* **200**, 259-69 (1980).
56. McKenna, J.T. & Vertes, R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull* **54**, 619-30 (2001).
57. Gray, J.A., Feldon, J., Rawlins, J.N., Owen, S. & McNaughton, N. The role of the septo-hippocampal system and its noradrenergic afferents in behavioural responses to none-reward. *Ciba Found Symp*, 275-307 (1977).
58. Anchel, H. & Lindsley, D.B. Differentiation of two reticulo-hypothalamic systems regulating hippocampal activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 209-26 (1972).
59. Altman, H.J., Normile, H.J., Galloway, M.P., Ramirez, A. & Azmitia, E.C. Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT-induced serotonergic deafferentation of the hippocampus. *Brain Res* **518**, 61-6 (1990).
60. Hong, Y. & Krnjevic, K. Serotonin blocks the facilitatory action of muscarinic and nicotinic agents in the hippocampus in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* **67**, 47-53 (1989).
61. Luttgen, M., Ove Ogren, S. & Meister, B. Chemical identity of 5-HT_{2A} receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Res* **1010**, 156-65 (2004).
62. Albert, P.R., Lembo, P., Storring, J.M., Charest, A. & Saucier, C. The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. *Neuropsychopharmacology* **14**, 19-25 (1996).
63. McNamara, R.K. & Skeleton, R.W. Effects of intracranial infusions of chlordiazepoxide on spatial learning in the Morris water maze. I. Neuroanatomical specificity. *Behav Brain Res* **59**, 175-91 (1993).
64. Vertes, R.P. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus* **15**, 923-35 (2005).

65. O'keefe, J. & Nadel, L. *The hippocampus as a cognitive map*, (Clarendon Press, Oxford, 1978).
66. Staubli, U. & Otaky, N. Serotonin controls the magnitude of LTP induced by theta bursts via an action on NMDA-receptor-mediated responses. *Brain Res* **643**, 10-6 (1994).
67. Gutierrez-Guzman, B.E. et al. Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in CA1 high frequency theta activity expression in the rat. *Eur J Pharmacol* **652**, 73-81 (2011).
68. Garcia-Alloza, M. et al. Differential involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT₆ receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **29**, 410-6 (2004).
69. Lai, M.K. et al. Postmortem serotonergic correlates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **13**, 1175-8 (2002).
70. Bastiaansen, M.C., Posthuma, D., Groot, P.F. & de Geus, E.J. Event-related alpha and theta responses in a visuo-spatial working memory task. *Clin Neurophysiol* **113**, 1882-93 (2002).
71. Chauviere, L. et al. Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **29**, 5402-10 (2009).
72. Pang, K.C., Jiao, X., Sinha, S., Beck, K.D. & Servatius, R.J. Damage of GABAergic neurons in the medial septum impairs spatial working memory and extinction of active avoidance: effects on proactive interference. *Hippocampus* **21**, 835-46 (2011).
73. Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilagyi, N., Freund, T.F. & Varga, V. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci* **29**, 8094-102 (2009).
74. Givens, B. & Olton, D.S. Bidirectional modulation of scopolamine-induced working memory impairments by muscarinic activation of the medial septal area. *Neurobiol Learn Mem* **63**, 269-76 (1995).

75. Okada, K., Nishizawa, K., Kobayashi, T., Sakata, S. & Kobayashi, K. Distinct roles of basal forebrain cholinergic neurons in spatial and object recognition memory. *Sci Rep* **5**, 13158 (2015).
76. Dashiani, M.G., Kruashvili, L.B., Rusadze Kh, Z., Matatradze, S.B. & Beselia, G.V. Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats. *Georgian Med News*, 98-103 (2015).
77. Roland, J.J. et al. Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands. *J Neurosci* **34**, 506-14 (2014).
78. Becker, J.T., Walker, J.A. & Olton, D.S. Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res* **200**, 307-20 (1980).
79. Givens, B. & Olton, D.S. Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J Neurosci* **14**, 3578-87 (1994).
80. Givens, B.S. & Olton, D.S. Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci* **104**, 849-55 (1990).
81. Hepler, D.J., Wenk, G.L., Cribbs, B.L., Olton, D.S. & Coyle, J.T. Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Res* **346**, 8-14 (1985).
82. Leranth, C. & Vertes, R.P. Median raphe serotonergic innervation of medial septum/diagonal band of Broca (MSDB) parvalbumin-containing neurons: possible involvement of the MSDB in the desynchronization of the hippocampal EEG. *J Comp Neurol* **410**, 586-98 (1999).
83. Olvera-Cortes, M.E., Gutierrez-Guzman, B.E., Lopez-Loeza, E., Hernandez-Perez, J.J. & Lopez-Vazquez, M.A. Serotonergic modulation of hippocampal theta activity in relation to hippocampal information processing. *Exp Brain Res* **230**, 407-26 (2013).
84. Sarihi, A., Motamedi, F., Naghdi, N. & Rashidy-Pour, A. Lidocaine reversible inactivation of the median raphe nucleus has no effect on reference memory but enhances working memory versions of the Morris water maze task. *Behav Brain Res* **114**, 1-9 (2000).

85. Vertes, R.P., Kinney, G.G., Kocsis, B. & Fortin, W.J. Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin_{1A} agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience* **60**, 441-51 (1994).
86. Adams, W., Kusljic, S. & van den Buuse, M. Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology* **55**, 1048-55 (2008).
87. Maru, E., Takahashi, L.K. & Iwahara, S. Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Res* **163**, 223-34 (1979).
88. Kinney, G.G., Kocsis, B. & Vertes, R.P. Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)* **120**, 244-8 (1995).
89. Alreja, M. Excitatory actions of serotonin on GABAergic neurons of the medial septum and diagonal band of Broca. *Synapse* **22**, 15-27 (1996).
90. Assaf, S.Y. & Miller, J.J. The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience* **3**, 539-50 (1978).
91. Aznar, S., Qian, Z.X. & Knudsen, G.M. Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum. *Neuroscience* **124**, 573-81 (2004).
92. Bertrand, F., Lehmann, O., Lazarus, C., Jeltsch, H. & Cassel, J.C. Intraseptal infusions of 8-OH-DPAT in the rat impairs water-maze performances: effects on memory or anxiety? *Neurosci Lett* **279**, 45-8 (2000).
93. Cassel, J.C. & Jeltsch, H. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience* **69**, 1-41 (1995).

94. Cornea-Hebert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S.K. & Descarries, L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* **409**, 187-209 (1999).
95. Elvander-Tottie, E., Eriksson, T.M., Sandin, J. & Ogren, S.O. 5-HT_{1A} and NMDA receptors interact in the rat medial septum and modulate hippocampal-dependent spatial learning. *Hippocampus* **19**, 1187-98 (2009).
96. Huh, C.Y., Goutagny, R. & Williams, S. Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci* **30**, 15951-61 (2010).
97. Acsady, L., Arabadzisz, D., Katona, I. & Freund, T.F. Topographic distribution of dorsal and median raphe neurons with hippocampal, septal and dual projection. *Acta Biol Hung* **47**, 9-19 (1996).
98. Toth, K., Freund, T.F. & Miles, R. Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol* **500** (Pt 2), 463-74 (1997).
99. Freund, T.F. & Antal, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **336**, 170-3 (1988).
100. Normile, H.J., Jenden, D.J., Kuhn, D.M., Wolf, W.A. & Altman, H.J. Effects of combined serotonin depletion and lesions of the nucleus basalis magnocellularis on acquisition of a complex spatial discrimination task in the rat. *Brain Res* **536**, 245-50 (1990).
101. Perez-Vega, M.I., Feria-Velasco, A. & Gonzalez-Burgos, I. Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical pyramidal neurons, underlying a greater efficiency of short-term memory. *Brain Res Bull* **53**, 291-300 (2000).
102. Hernandez-Perez, J.J., Gutierrez-Guzman, B.E., Lopez-Vazquez, M.A. & Olvera-Cortes, M.E. Supramammillary serotonin reduction alters place learning and concomitant hippocampal, septal, and supramammillary theta activity in a Morris water maze. *Front Pharmacol* **6**, 250 (2015).

103. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Esterotaxic Coordinates.*, (Academic Press, San Diego, CA., 1998).
104. Ruotsalainen, S., Miettinen, R., MacDonald, E., Riekkinen, M. & Sirvio, J. The role of the dorsal raphe-serotonergic system and cholinergic receptors in the modulation of working memory. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 21-31 (1998).
105. Lehmann, O. et al. 5,7-DHT-induced hippocampal 5-HT depletion attenuates behavioural deficits produced by 192 IgG-saporin lesions of septal cholinergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* **15**, 1991-2006 (2002).
106. Lehmann, O. et al. Combined 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the male rat brain: a neurochemical and behavioral study. *Pharmacol Biochem Behav* **72**, 899-912 (2002).
107. Asin, K.E., Wirtshafter, D. & Fibiger, H.C. Electrolytic, but not 5,7-dihydroxytryptamine, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of a radial maze task. *Behav Neural Biol* **44**, 415-24 (1985).
108. Murtha, S.J. & Pappas, B.A. Neurochemical, histopathological and mnemonic effects of combined lesions of the medial septal and serotonin afferents to the hippocampus. *Brain Res* **651**, 16-26 (1994).
109. Cassaday, H.J., Norman, C., Shilliam, C.S., Vincent, C. & Marsden, C.A. Intraventricular 5,7-dihydroxytryptamine lesions disrupt acquisition of working memory task rules but not performance once learned. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 147-56 (2003).
110. Richter-Levin, G. & Segal, M. The effects of serotonin depletion and raphe grafts on hippocampal electrophysiology and behavior. *J Neurosci* **11**, 1585-96 (1991).
111. Altman, H.J., Ogren, S.O., Berman, R.F. & Normile, H.J. The effects of p-chloroamphetamine, a depletor of brain serotonin, on the performance of rats in two types of positively reinforced complex spatial discrimination tasks. *Behav Neural Biol* **52**, 131-44 (1989).
112. Ward, B.O., Wilkinson, L.S., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. Forebrain serotonin depletion facilitates the acquisition and performance of a

- conditional visual discrimination task in rats. *Behav Brain Res* **100**, 51-65 (1999).
113. Koenig, J., Lecourtier, L., Cosquer, B., Pereira, P.M. & Cassel, J.C. Spatial memory alterations by activation of septal 5HT 1A receptors: no implication of cholinergic septohippocampal neurons. *Psychopharmacology (Berl)* **214**, 437-54 (2011).
114. Jeltsch, H. et al. Intraseptal injection of the 5-HT1A/5-HT7 agonist 8-OH-DPAT and working memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **175**, 37-46 (2004).
115. Jeltsch-David, H., Koenig, J. & Cassel, J.C. Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT(1A) receptors of the medial septum. *Behav Brain Res* **195**, 86-97 (2008).
116. Alreja, M. et al. Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory. *J Neurosci* **20**, 8103-10 (2000).
117. Crooks, R., Jackson, J. & Bland, B.H. Dissociable pathways facilitate theta and non-theta states in the median raphe--septohippocampal circuit. *Hippocampus* **22**, 1567-76 (2012).
118. Floresco, S.B., Seamans, J.K. & Phillips, A.G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* **17**, 1880-90 (1997).
119. Hajos, M., Hoffmann, W.E. & Weaver, R.J. Regulation of septohippocampal activity by 5-hydroxytryptamine(2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 605-15 (2003).
120. Kirk, I.J. Supramammillary neural discharge patterns and hippocampal EEG. *Brain Res Bull* **42**, 23-6 (1997).
121. Kirk, I.J. & McNaughton, N. Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport* **2**, 723-5 (1991).
122. Vertes, R.P. Brain stem generation of the hippocampal EEG. *Prog Neurobiol* **19**, 159-86 (1982).

123. Zhu, X.O. & McNaughton, N. The interaction of serotonin depletion with anxiolytics and antidepressants on reticular-elicited hippocampal RSA. *Neuropharmacology* **33**, 1597-605 (1994).

15. ANEXO. Publicaciones

European Journal of Pharmacology 734 (2014) 105–113



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Behavioural pharmacology

Septal serotonin depletion in rats facilitates working memory in the radial arm maze and increases hippocampal high-frequency theta activity



Miguel Ángel López-Vázquez^{a,b}, Elisa López-Loeza^b, Naima Lajud Ávila^c, Blanca Erika Gutiérrez-Guzmán^d, J. Jesús Hernández-Pérez^d, Yoana Estrada Reyes^a, María Esther Olvera-Cortés^{d,*}

^a Laboratorio de Neuroplasticidad de los Procesos Cognitivos, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico

^b Laboratorio de Biofísica, Instituto de Física y Matemáticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico

^c Laboratorio de Neuroendocrinología, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico

^d Laboratorio de Neurofisiología Experimental, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Camino de la arboleda 300, Exhacienda de san José de la Huerta, Morelia, Mich. C.P. 58341, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2013

Received in revised form

1 April 2014

Accepted 3 April 2014

Available online 15 April 2014

Keywords:

Hippocampus

Theta activity

Serotonin

Septum

Working memory

ABSTRACT

Hippocampal theta activity, which is strongly modulated by the septal medial/Broca's diagonal band neurons, has been linked to information processing of the hippocampus. Serotonin from the medial raphe nuclei desynchronises hippocampal theta activity, whereas inactivation or a lesion of this nucleus induces continuous and persistent theta activity in the hippocampus. Hippocampal serotonin depletion produces an increased expression of high-frequency theta activity concurrent with the facilitation of place learning in the Morris maze. The medial septum–diagonal band of Broca complex (MS/DBB) has been proposed as a key structure in the serotonin modulation of theta activity. We addressed whether serotonin depletion of the MS/DBB induces changes in the characteristics of hippocampal theta activity and whether the depletion is associated with learning in a working memory spatial task in the radial arm maze. Sprague Dawley rats were depleted of 5HT with the infusion of 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) in MS/DBB and were subsequently trained in the standard test (win-shift) in the radial arm, while the CA1 EEG activity was simultaneously recorded through telemetry. The MS/DBB serotonin depletion induced a low level of expression of low-frequency (4.5–6.5 Hz) and a higher expression of high-frequency (6.5–9.5 Hz) theta activity concomitant to a minor number of errors committed by rats on the working memory test. Thus, the depletion of serotonin in the MS/DBB caused a facilitator effect on working memory and a predominance of high-frequency theta activity.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hippocampal theta activity is a sinusoidal-like slow oscillation that ranges from 4 to 12 Hz and is prominent in the rat hippocampus during voluntary behaviour (Vanderwolf, 1969; Whishaw and Vanderwolf, 1973) and during the display of behaviours related to the acquisition of environmental information (Eichenbaum et al., 1992; Vinogradova, 1995). The expression and characteristics of the hippocampal theta activity have been linked to place learning ability in humans and rats (Cornwell et al., 2008; Watrous et al., 2011; Olvera-Cortés et al., 2002, 2004). Conversely, a relationship has been observed between decreases in theta frequency and place

learning impairments (Maho et al., 1988; Pan and McNaughton, 1997).

The medial septum–diagonal band of Broca complex (MS/DBB) acts as a pacemaker for the hippocampal theta activity (Ford et al., 1989; Hangya et al., 2009; Petsche et al., 1962) as it sends projections to the hippocampus from cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons (Amaral and Kurz, 1985; Colom et al., 2005; Freund, 1989), all of which appear to be important in the regulation of hippocampal theta activity (Hangya et al., 2009; Manns et al., 2002; Monmaur et al., 1993; Sotty et al., 2003). Lesions or inactivation of the medial septum disrupts hippocampal theta activity and causes learning deficits in both reference and working memory tasks (Givens and Olton, 1994; McNaughton et al., 2006; Mitchell et al., 1982; Mizumori et al., 1990; Rawlins et al., 1979). The septal area is an important structure in the control of hippocampal theta activity (Rawlins et al., 1979; Vertes and

* Corresponding author. Tel./fax: +52 44 33 22 26 00.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.005>

0014-2999/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



Supramammillary serotonin reduction alters place learning and concomitant hippocampal, septal, and supramammillary theta activity in a Morris water maze

J. Jesús Hernández-Pérez¹, Blanca E. Gutiérrez-Guzmán¹, Miguel A. López-Vázquez^{2,3} and María E. Olvera-Cortés^{1*}

¹Laboratorio de Neurofisiología Experimental, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, México, ²Laboratorio de Neuroplasticidad de los Procesos Cognitivos, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, México, ³Instituto de Física y Matemáticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

OPEN ACCESS

Edited by:

Alfredo Martínez,
Center for Research and Advanced
Studies of the National Polytechnic
Institute, Mexico

Reviewed by:

Romain Goutagny,
Centre National de la Recherche
Scientifique, France
Timothy Michael Elinors,
The City College of New York, USA

*Correspondence:

María E. Olvera-Cortés
mescalco@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 06 August 2015

Accepted: 14 October 2015

Published: 29 October 2015

Citation:

Hernández-Pérez JJ,
Gutiérrez-Guzmán BE, López-Vázquez
MA and Olvera-Cortés ME (2015)
Supramammillary serotonin reduction
alters place learning and concomitant
hippocampal, septal, and
supramammillary theta activity in a
Morris water maze.
Front. Pharmacol. 6:250.
doi: 10.3389/fphar.2015.00250

Hippocampal theta activity is related to spatial information processing, and high-frequency theta activity, in particular, has been linked to efficient spatial memory performance. Theta activity is regulated by the synchronizing ascending system (SAS), which includes mesencephalic and diencephalic relays. The supramammillary nucleus (SUMn) is located between the *reticularis pontis oralis* and the medial septum (MS), in close relation with the posterior hypothalamic nucleus (PHn), all of which are part of this ascending system. It has been proposed that the SUMn plays a role in the modulation of hippocampal theta-frequency; this could occur through direct connections between the SUMn and the hippocampus or through the influence of the SUMn on the MS. Serotonergic raphe neurons prominently innervate the hippocampus and several components of the SAS, including the SUMn. Serotonin desynchronizes hippocampal theta activity, and it has been proposed that serotonin may regulate learning through the modulation of hippocampal synchrony. In agreement with this hypothesis, serotonin depletion in the SUMn/PHn results in deficient spatial learning and alterations in CA1 theta activity-related learning in a Morris water maze. Because it has been reported that SUMn inactivation with lidocaine impairs the consolidation of reference memory, we asked whether changes in hippocampal theta activity related to learning would occur through serotonin depletion in the SUMn, together with deficiencies in memory. We infused 5,7-DHT bilaterally into the SUMn in rats and evaluated place learning in the standard Morris water maze task. Hippocampal (CA1 and dentate gyrus), septal and SUMn EEG were recorded during training of the test. The EEG power in each region and the coherence between the different regions were evaluated. Serotonin depletion in the SUMn induced deficient spatial learning and altered the expression of hippocampal high-frequency theta activity. These results provide evidence in support of a role for serotonin as a modulator of hippocampal learning, acting through changes in the synchronicity evoked in several relays of the SAS.

Keywords: supramammillary nucleus, serotonin, septum, hippocampus, theta activity, spatial learning