



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

EFFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE SEROTONINA DE LOS NÚCLEOS SUPRAMAMILAR E HIPOTALÁMICO POSTERIOR SOBRE LA ACTIVIDAD THETA HIPOCAMPAL, SUBYACENTE AL APRENDIZAJE ESPACIAL, EN LA RATA.

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIA)**

presenta

Blanca Erika Gutiérrez Guzmán

Comité tutorial

Dra. María Esther Olvera Cortés (Directora)

Dr. Jorge Juárez González

Dr. Miguel Ángel Guevara Pérez

Dra. Marisela Hernández González

Dr. Félix Héctor Martínez Sánchez

DEDICATORIA

A mis padres, Micaela Guzmán y Austreberto Gutiérrez (donde quiera que estés), por darme la vida.

A mis hermanas y hermanos, con cariño.

A mi novio, por acompañarme una vez más en este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Esther Olvera que siempre está dispuesta a compartir sus conocimientos y a resolver las dudas así como el gran apoyo otorgado en todo.

Al mi co-tutor, el Dr. Guevara, por otorgarme todo el apoyo dentro del instituto, compartir parte de su conocimiento en el análisis de señales y darme oportunidad de crecimiento. Así también a la Dra. Marisela Hernández, ya que también me dio un espacio dentro de su laboratorio.

A la valiosa revisión de los Drs. Jorge Juárez González, Miguel Ángel Guevara y Dra. Marisela Hernández, cuyas acertadas correcciones sirvieron para mejorar esta tesis.

Al Dr. Cesar Soria y a la Dra. Isabel Pérez Vega del Centro Universitario de los Lagos, U de G, por todo el apoyo otorgado para aprender la técnica de inmunohistoquímica de fibras SHT.

A la Dra. Luz Torner del laboratorio de Neuroendocrinología, por proporcionarme el material y equipo necesario para las inmunos.

A Mike, por las facilidades otorgadas para los experimentos.

A mis compañeros del laboratorio en el CIBIMI, Jesús, Lore, Fidel, que siempre permitieron tener un buen ambiente de trabajo.

A los compañeros del laboratorio en Neurociencias, Mayra Linné, Ricardo, Marina, Lucy, Rosy y Claudia que hicieron muy agradable mi estancia.

A los compañeros del laboratorio de Neuroendocrinología del CIBIMI.

A las instituciones que hicieron posible el desarrollo y culminación de la tesis: la Universidad de Guadalajara, el CONACYT, el COECYT-Michoacán y el IMSS.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Esther Olvera Cortés, en el laboratorio de Neurofisiología Experimental del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Morelia Michoacán.

Este proyecto fue financiado por el *Fideicomiso para la Investigación en Salud*, del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/G09/766).

Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Michoacán (COECYT).

Tesis apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ABREVIATURAS | |
| RESUMEN | |
| ABSTRAC | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| APRENDIZAJE Y MEMORIA | 4 |
| EL HIPOCAMPO | 11 |
| Actividad theta y aprendizaje | 20 |
| VIAS DE SINCRONIZACION ASCENDENTE | 23 |
| Formación reticular | 24 |
| Núcleo Supramamilar | 26 |
| Núcleo o área del hipotálamo posterior | 30 |
| Región septal | 35 |
| LA SEROTONINA | 37 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 47 |
| IV. OBJETIVOS | 49 |
| V. HIPOTESIS | 50 |
| VI. METODOLOGÍA | 51 |
| Procedimiento de Lesión Estereotáxica. | 51 |
| Evaluación conductual | 53 |
| Registro del EEG hipocampal | 55 |
| Preparación de animales para la Inmunohistoquímica | 57 |
| Inmunohistoquímica para fibras serotoninérgicas | 57 |
| Estadística | 58 |
| VII. RESULTADOS | 62 |
| Análisis inmunohistoquímico. | 62 |
| EVALUACIONES CONDUCTUALES | 63 |
| <i>Latencia de escape.</i> | 63 |
| <i>Distancia</i> | 63 |
| <i>Velocidad</i> | 67 |
| <i>Día 7, sin plataforma (ensayo de prueba)</i> | 67 |
| REGISTRO DEL EEG. | 70 |
| · REGIÓN DEL CUERNO DE AMMON (CA1) | 70 |
| · REGIÓN DEL GIRO DENTADO (GD) | 75 |
| · NÚCLEO SUPRAMAMILAR (nSUM) | 79 |
| VIII. DISCUSIÓN | 83 |
| IX. CONCLUSIÓN | 92 |
| X. REFERENCIAS | 93 |
| XI. ANEXOS | 108 |
| Acción de 5,7-Dihidroxitriptamina | 108 |

ABREVIATURAS

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|----------------|---|
| Ntp | Núcleo tegmental pedunculopontino |
| nRPO | Núcleo reticular <i>pontis oralis</i> |
| nSUM | Núcleo supramamilar |
| nHP | Núcleo hipotalámico posterior |
| SM/BDBv | Complejo septo medial/asa de la banda diagonal de Broca |
| SM | Septo medial |
| GD | Giro dentado |
| CA1 | Cuerno de Ammon del hipocampo |
| CE | Corteza entorrinal |
| RM | Rafe medial |
| 5HT | Serotonina |
| 5,7DHT | 5,7-Dihidroxitriptamina (neurotóxico) |
| PLD | Potenciación de larga duración |

Resumen.

La actividad theta se ha relacionado con funciones de procesamiento de la información espacial y con la formación de memoria dependiente del hipocampo. Ésta actividad está controlada por un sistema de conexiones que se originan en el tallo cerebral, con relevos en el núcleo supramamilar (nSUM) y núcleo hipotalámico posterior (nHP) del diencefalo caudal (para la codificación de la frecuencia y amplitud), y por el área septal (que actúa como marcapaso). Se ha reportado que el aumento de la serotonina cerebral (5-HT) puede desincronizar la actividad theta y que su disminución produce actividad theta continua y persistente. Además, se ha observado una facilitación sobre la memoria que depende del hipocampo asociada a un aumento en la actividad theta, luego del abatimiento hipocampal de serotonina. Sin embargo, se conoce que la serotonina llega a varios niveles del sistema de sincronización ascendente de la actividad theta, entre los cuales se encuentra el nSUM y el nHP, que actúan sinérgicamente para la codificación de la amplitud y/o frecuencia de la actividad theta, por lo cual es posible que en estas regiones la serotonina ejerza su influencia sobre la actividad theta hipocampal relacionada con el aprendizaje.

Se registró la actividad eléctrica de la región CA1 y GD del hipocampo dorsal derecho y el nSUM del diencefalo, durante la ejecución de una prueba de aprendizaje espacial, a 26 ratas de la cepa SpragueDawley divididas en dos grupos: control (n=15) y experimental (n=11). A este último se lesionó selectivamente las fibras serotoninérgicas del nHP y del nSUM, mediante la aplicación de 5,7-Dihidroxitriptamina.

La disminución selectiva de la serotonina de nHP-nSUM dio como resultado una menor eficiencia en la resolución de la prueba de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo. El grupo experimental logró aprender la tarea, pero con un marcado retraso y menor eficiencia que un animal normal. Asociado a la ejecución conductual, se observó que la potencia relativa (PR) de la actividad theta de alta frecuencia (7-9.5 Hz) registrada en CA1 no sufrió cambios a través de los días, mientras que en el grupo control si se observaron cambios relacionados con el aprendizaje. Nuestros resultados, apoyan la participación del sistema serotoninérgico como un modulador de la conducta y sugieren que los núcleos HP y SUM en conjunto son importantes para el procesamiento de la información necesaria para el aprendizaje y memoria espacial que depende del hipocampo.

Abstract.

Theta activity has been associated with functions of spatial information processing and formation of hippocampus-dependent memory.

This activity is controlled by a system of connections that originate in the brainstem, with relays in the nucleus supramammillary (nSUM) and posterior hypothalamic nucleus (NHP) of the caudal diencephalon (for encoding the frequency and amplitude), and the septal area (which acts as a pacemaker). It has been reported that increased serotonin (5-HT) can desynchronize theta activity and theta activity occurs its decline continued and persistent. It has also been observed that facilitation occurs on hippocampus-dependent memory associated with an increase in theta activity. However, serotonin is known to reach various levels of upstream synchronization system theta activity, among which is the nSUM and the NHP, which act synergistically for encoding the amplitude and / or frequency of theta activity, so it is possible that serotonin in these regions may be exerting influence on hippocampal theta activity related to learning.

We recorded the electrical activity in the CA1 region and DG of dorsal hippocampus right, and nSUM the diencephalon, during the execution of a spatial learning test, 26 rats of the Sprague Dawley rats were divided into two groups: control (n = 15) and experimental (n = 11). The latter is selectively injured serotonergic fibers nSUM and nHP, by applying 5,7-Dihydroxytryptamine.

The selective reduction of serotonin NHP-nSUM helped the animals had a lower efficiency in solving the test of learning and hippocampal-dependent memory. That is, the experimental group learned the task, but with a marked delay and reduced efficiency to meet the test that a normal animal. Associated with behavioral performance, it was observed that the relative potency (RP) of the high frequency theta activity (7-9.5 Hz) recorded in CA1 did not change throughout the day, while in the control group if changes were observed related to learning. Our results reinforce that the serotonergic system is acting as a modulator of behavior and that the participation of HP and SUM nuclei together is important for the processing of information necessary for spatial learning and memory depends on the hippocampus.

I. INTRODUCCIÓN

El aprendizaje y la memoria son procesos íntimamente relacionados y esenciales para la vida, ya que frente a cada situación novedosa, o ante cada modificación que se presenta en el medio, se llevan a cabo normalmente dichos procesos dando como resultado, en los individuos, la capacidad de modificar sus patrones de comportamiento y permitir la adaptación a su medio (Morgado, 2005).

Entre las estrategias que los individuos utilizan para orientarse en el espacio y navegar en él, se encuentra el aprendizaje de lugar, que consiste en localizar un sitio con respecto a la configuración de señales disponibles en el entorno circundante (Okeefe & Nadel, 1978). Este aprendizaje es dependiente del hipocampo, pues estudios clínicos y experimentales indican que las lesiones del hipocampo o de las estructuras asociadas (fimbria fórnix, séptum, corteza entorrinal, y complejo subicular), provocan deficiencias graves y permanentes en el aprendizaje de lugar tanto en ratas como en humanos (Sutherland & Rudy, 1989).

El término hipocampo, se refiere al cuerno de amon (CA1, CA2, CA3), mientras que el término formación hipocampal, además del hipocampo, incluye al giro dentado, corteza entorrinal, subiculum y presubiculum. Este conjunto de estructuras son funcionalmente diferentes y en conjunto participan para la codificación de información espacial.

Estudios electrofisiológicos y de EEG han mostrado que en el hipocampo se origina y predomina la actividad theta, un patrón sinusoidal de actividad rítmica lenta que oscila entre 4 y 12 Hz, que ocurre predominantemente durante la ejecución de movimientos voluntarios (Vanderwolf, 1988) y ha sido relacionado con el procesamiento de información para la memoria espacial (Olvera-Cortés, Cervantes & González-Burgos, 2002; Olvera-Cortés, Guevara & González-Burgos, 2004).

Se ha propuesto que la actividad theta hipocampal está controlada por un sistema de conexiones que se originan en el tallo cerebral con relevos en el diencéfalo (núcleos hipotalámico posterior y supramamilar) y de allí, al área septal e hipocampo, conformando las vías multisinápticas de sincronización ascendente de la actividad theta (Vertes, Hoover & Viana Di Prisco, 2004).

Por otro lado, se ha sugerido que existe un sistema que participa como desincronizador de la actividad theta sincrónica. Este es el sistema serotoninérgico, originado en el núcleo de rafe medial, que inerva densamente al hipocampo y las regiones que conforman las vías de sincronización ascendente. A través de sus diferentes receptores, la serotonina ejerce una influencia directa e indirecta sobre los procesos fisiológicos y neuroquímicos del hipocampo; y esto puede modificar la funcionalidad del hipocampo.

Los principales resultados, que han llevado a proponer que las células serotoninérgicas desincronizan o tienen un efecto supresor sobre la actividad theta hipocampal se han basado en estudios de estimulación del rafe, en la aplicación de serotonina, o sus agonistas (Segal, 1975; Kitchigina, Kudina, Kuttyreva & Vinogradova, 1999; Buhot, 1997). También se ha observado que se obtiene un efecto contrario, es decir ocurre la aparición de actividad theta hipocampal continua y persistente, si se lesiona al rafe, o se aplican antagonistas a la serotonina y a sus receptores específicos (Vertes, 1986; Vinogradova, Kitchigina, Kudina & Zenchenco, 1999; Yamamoto, Watanabe, Oishi & Ueki, 1979; Vertes, Kinney, Kocsis & Fortin, 1994; Kocsis, 1997). Se ha propuesto que existe una relación entre el procesamiento de información y la actividad theta, de manera que la información que llega al hipocampo durante estados en que predomina la actividad theta (estado sincronizado sin/o con menor influencia serotoninérgica) es guardada por lo menos temporalmente en el hipocampo, mientras que aquella información que llega en ausencia de theta (actividad asincrónica generada por la acción serotoninérgica) no es

codificada, por lo cual la influencia del sistema serotoninérgico sobre el hipocampo sería hasta cierto punto el mecanismo encargado de la capacidad de ignorar eventos ambientales no significativos (Vertes, 2005), como un mecanismo de selectividad de información, codificando solo la información relevante.

Sin embargo, existen estudios en los que se ha evaluado de forma simultánea el EEG hipocampal y conducta en el laberinto acuático de Morris después del abatimiento parcial de serotonina del hipocampo, en los que no se observaron modificaciones de la actividad theta ni del aprendizaje, sin embargo cuando se incrementa la actividad serotoninérgica se produce una disminución de la actividad theta de alta frecuencia y concurrente a ello, menor eficiencia en el aprendizaje de lugar. Así mismo, al eliminarla casi totalmente se ve facilitado el aprendizaje, y ocurren cambios significativos en la actividad theta (Gutiérrez-Guzmán et al., en prensa).

Entonces, estas últimas evidencias indican que aparentemente en animales en libre movimiento particularmente durante conductas que demandan el procesamiento de información para resolver una tarea en que están en juego modificaciones de la actividad theta relacionadas con el aprendizaje, la serotonina no tiene un claro efecto en la desincoordinación del EEG hipocampal, o bien, no al menos directamente en el hipocampo. Por lo anterior resulta interesante determinar el papel que está ejerciendo la serotonina en los diferentes niveles de las vías de sincronización ascendente, ya que es muy probable que si estas vías están participando para la codificación de frecuencia, amplitud y como marca pasos de la ritmicidad de la actividad theta en el hipocampo, un efecto modulador de la serotonina sobre la funcionalidad de la actividad theta y el aprendizaje, sea más visible en estos relevos.

II. ANTECEDENTES

APRENDIZAJE Y MEMORIA

De acuerdo a Squirre (1978), el aprendizaje es el proceso por el cual los organismos adquieren nueva información acerca del mundo externo, en tanto que la memoria es el proceso mediante el cual se retiene y evoca dicha información. El aprendizaje también puede ser definido como la adquisición de un comportamiento nuevo a través de la experiencia, y la memoria como la capacidad de codificar, almacenar y recordar la información (Tulving, 2002; Sweatt, 2003).

De acuerdo a Squirre y Zola-Morgan (1991) la memoria está comprendida en dos categorías generales, que incluyen a la memoria declarativa y a la memoria no declarativa o de procedimiento (implícita); el criterio de esta división es si la forma de adquisición es consciente.

La memoria declarativa incluye la recolección explícita de eventos. Esta se expresa conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito, son los recuerdos sobre el conocimiento del mundo o sobre experiencias personales, que pueden ser recordadas de manera deliberada y consciente, por ejemplo al almacenamiento de hechos (memoria semántica) y eventos autobiográficos (memoria episódica). Es la memoria correspondiente al llamado aprendizaje relacional, una forma evolucionada de aprendizaje que nos permite comparar y adquirir información sobre personas, lugares, cosas y circunstancias complejas, utilizando más de una modalidad sensorial. Requiere de la neocorteza y lóbulo temporal medial del cerebro dentro del cual se localiza el hipocampo (Morgado, 2005; Squirre & Zola-Morgan, 1991). Recientemente se ha mostrado que el hipocampo es una estructura crítica para que los individuos puedan relacionar e integrar información de memoria sobre “Qué”, “Dónde” y “Cuándo” tuvo lugar un evento, lo cual es una característica relevante de la memoria explícita o declarativa (Ergorul & Eichenbaum, 2004).

Otra clasificación de la memoria está basada en el tiempo que la información permanece almacenada e incluye al menos dos clases: 1) la memoria de corto plazo (MCP) que es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo (minutos, segundos u horas), es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos (Morgado, 2005, Etchepareborda & Abad-Mas, 2005); 2). La memoria de largo plazo (MLP) o diferida que consiste en la capacidad de almacenar una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido que puede ser desde semanas hasta años. Este tipo de memoria requiere de la integridad de regiones diencefálicas y temporales mediales (Squire, 1987). A diferencia de la MCP, la MLP es una memoria estable y duradera, además de muy poco vulnerable a las interferencias (Morgado, 2005; Etchepareborda & Abad-Mas 2005).

Actualmente se considera que existen distintas formas y sistemas de memoria que pueden asociarse al funcionamiento de diferentes regiones cerebrales. En relación a esto McDonald y White (1993), proponen una triple disociación en los sistemas de memoria: un primer sistema incluye al hipocampo, éste adquiere información acerca de la relación entre estímulos y eventos; otro sistema incluye al estriado dorsal (principalmente el núcleo caudado), el cual media la formación de asociaciones para una respuesta a un estímulo reforzado; el tercer sistema incluye a la amígdala que participa en la adquisición rápida de conductas basadas sobre eventos biológicos significantes con propiedades afectivas (McDonald & White 1993).

A pesar de la existencia de memorias diferentes en cuanto a contenido y a los sistemas cerebrales subyacentes a su integración, estas se construyen y emplean mediante los mismos procesos generales: codificación, almacenamiento y recuperación de la información (Santín, Rubio, Begega, Miranda & Arias, 2000).

Kesner (2007) sugirió que durante la formación de un trazo de memoria existen procesos directos o básicos (intrínsecos) y moduladores (extrínsecos) que determinan e influyen el nivel del procesamiento directo para la memoria. Así, por ejemplo Rosenzweig y Bennett (2007), mencionan que la síntesis de proteínas es requerida para la formación de memoria a largo plazo, y este proceso directo puede ser modulado por diversos tratamientos, incluyendo el nivel de alerta, agentes depresivos y drogas que afectan el sistema colinérgico.

También se ha propuesto que una actividad sincrónica de poblaciones de neuronas que ocurren durante un periodo, pueden asociarse con el fortalecimiento de las sinapsis que ocurre durante y después de que el animal adquirió un trazo de memoria.

Hebb propuso que la formación de memoria se produce porque la actividad que se genera en el ensamble neuronal (subgrupo de neuronas que están participando en la representación de un evento mediante patrones de actividad coordinada) induce cambios estructurales que traen consigo el fortalecimiento de sus conexiones, la cual hace más probable la respuesta de las neuronas para así representar un trazo de memoria. La reactivación de las neuronas que participaron en la experiencia puede producir el recuerdo del trazo de memoria (Hebb, 1949).

Otro modelo que se ha propuesto para la formación de la memoria es la denominada “potenciación de larga duración” (PLD), una forma de plasticidad sináptica, caracterizada por un aumento en la eficacia sináptica desencadenado por la estimulación coordinada y repetitiva de la neurona presináptica hacia una postsináptica (Lynch, 2004).

De esta forma una experiencia conductual produce la activación de un grupo de neuronas específicas (ensamble neuronal), cada neurona es activada por las entradas excitadoras de carácter glutamatergico que

actúan principalmente a través de receptores AMPA Y NMDA, para desencadenar cascadas de señalización intracelular inducidas por el influjo de calcio, producido por la apertura del receptor NMDA. Estos cambios en la fisiología celular producen modificaciones morfológicas que aumentan la eficiencia de la conectividad sináptica, los cuales son responsables del cambio temprano en la eficacia sináptica (Lynch, 2004).

Memoria y navegación espacial

La mayoría de los animales, incluyendo a los humanos son capaces de recordar, entre otras muchas cosas, los lugares donde han estado anteriormente. La memoria espacial es parte de la memoria que sirve para que recordemos como es el mundo que nos rodea y el punto en el espacio donde nos encontramos. En este tipo de memoria es importante el conocimiento del entorno para que los animales puedan realizar numerosas conductas básicas de alimentación, reproducción y de migración (Santín et al., 2000). En este sentido la navegación espacial se define como el proceso conducente a la determinación y mantenimiento de un curso o trayectoria de un lugar a otro para estimar una posición con respecto al mundo nuevo o conocido (Gallistel, 1990). Por su lado, Tolman (1948) postuló que los individuos forman una representación cognoscitiva del ambiente o mapa cognoscitivo, para lo cual realizan una organización interna de la información para localizar un lugar mediante la relación que guarda con otras señales del ambiente.

Por otro lado Alyan y Jander (1994) consideran a la navegación espacial como una conducta compleja, que se caracteriza por el desarrollo de movimientos auto-controlados en el espacio, dirigidos a localizar un lugar no visible para los individuos.

En 1978, O'Keefe y Nadel propusieron una clasificación de las formas de navegación espacial, considerando dos tipos de estrategias; por un lado el llamado taxico que puede desarrollarse a través de dos mecanismos,

aprendizaje de orientación y aprendizaje de guía, y por otro lado el cartográfico.

Estrategias táxicas:

- *Aprendizaje de orientación o egocéntrico*. Los animales aprenden a emplear programas motores estereotipados y localizan el camino hacia un lugar aprendiendo series de movimiento de orientación. Esta estrategia es dependiente del estriado.
- *Aprendizaje de guía o señal (AS)*. Los animales tienden a aproximarse a una señal directamente sobre o en dirección de la meta. Emplean estímulos como señales hacia las que los animales aprenderán a aproximarse por hallarse asociadas a la meta. Es dependiente del estriado.

Estrategia cartográfica:

- *Aprendizaje de lugar (AL)*. Estrategia cartográfica, se basa en localizar un lugar con respecto a la configuración de señales disponibles en el entorno circundante. En esta se forma un mapa del entorno en el cual se encuentra la meta. Implica el aprendizaje de relaciones entre objetos, y no son los objetos en sí mismos los que actúan como estímulo discriminativo, sino la relación que estos mantienen entre sí, por esto, es asociativo. Es dependiente del hipocampo, pues el daño al sistema hipocampal produce deficiencias en el aprendizaje de lugar tanto en ratas como en humanos (Wiener, Paul & Eichnbaum, 1989; Eichnbaum, 1999).

Laberinto acuático de Morris.

El laberinto acuático de Morris es uno de los paradigmas más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores. En este laberinto los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta (Morris, 1984).

Este paradigma resulta de especial interés, puesto que no necesita de la privación de agua o comida ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta. Además, se requieren relativamente pocos ensayos, ya que los animales aprenden rápido, guiándose por claves extra-laberinto (Myhrer, 2003). En este laberinto también se evita que los animales utilicen claves no espaciales, como el olor para resolver la tarea, y, además, las estrategias de aprendizaje son más fáciles de detectar y cuantificar que en otros laberintos (Hodges, 1996; D'Hooge & De Deyn, 2001).

El laberinto acuático fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984). Consiste en una tina circular llena de agua (27-30°C) en la que se sitúa una plataforma que debe ser localizada por el animal. En el procedimiento tradicional, el agua se vuelve opaca con leche o alguna sustancia no tóxica para impedir que se vea la plataforma. Las medidas del laberinto adaptadas para ratas son diámetro 120-200 cm, altura de las paredes 56-75 cm, la plataforma de escape 19 x 22 cm. La versión tradicional del laberinto es una tarea espacial en la que los animales nadan desde diferentes puntos de salida situados al azar en el perímetro de la piscina hasta encontrar la plataforma sumergida en el agua. Es posible evaluar la memoria de referencia si la plataforma permanece en el mismo lugar durante los ensayos; y la memoria de trabajo, cuando se cambia la plataforma de posición en cada ensayo. La memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender el procedimiento general para la ejecución de la tarea. En cambio, la memoria de trabajo es una memoria temporal que depende de cada ensayo. Mediante variaciones metodológicas, el laberinto acuático también se utiliza como tarea no espacial. El laberinto acuático también puede ser utilizado para evaluar tareas con estrategia de señal, si se coloca la plataforma de una forma visible (puede llevar acoplada alguna señal) por lo que los animales resuelven la tarea sin hacer uso, necesariamente, de la

información espacial (esencial para la versión estándar con la plataforma sumergida).

La forma general de evaluar la tarea es como sigue: en la fase de adquisición y consolidación de información se introduce al animal de frente a las paredes del laberinto para la búsqueda de la plataforma durante 60 segundos. En caso de no encontrarla se coloca al animal 15-20 segundos en la plataforma. Después se retira al animal de la plataforma y se le deja descansar (aproximadamente 2 minutos) antes de iniciar el siguiente ensayo. Este procedimiento se repite en los distintos ensayos y a lo largo del entrenamiento.

Después de esta fase de adquisición o aprendizaje, que puede durar varios días, se realiza una prueba final de retención o «ensayo de prueba» sin plataforma durante 60 seg. Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que si el animal ha aprendido, nadará más tiempo en el cuadrante meta y cruzara constantemente el sitio donde previamente se encontraba la plataforma. Figura 1.

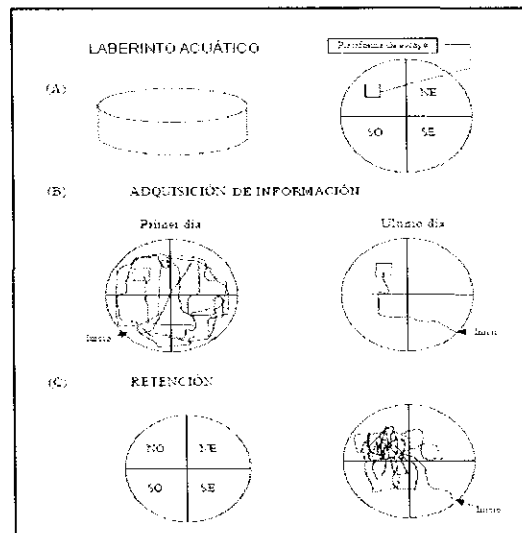


Figura 1. A. Representación esquemática de laberinto acuático de Morris. B. Representación de la ejecución del primer y último día de prueba. C. ensayo de prueba. Tomado de: Paloma Vicens et al, 2003.

Las medidas conductuales más utilizadas son la latencia de escape, distancia recorrida y velocidad de nado. Durante el ensayo prueba se considera el porcentaje de recorrido en el cuadrante de la plataforma y el número de cruces sobre el sitio donde se localizaba la plataforma.

El aprendizaje se refleja en una menor latencia de escape y distancia a lo largo de los días y la retención en el mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante meta y cruce en el sitio de la plataforma.

Se ha sustentado fuertemente que el hipocampo juega un papel crítico en la memoria declarativa en humanos y la espacial en roedores. Ante lesión selectiva del hipocampo, los animales son incapaces de resolver una prueba en el laberinto acuático de Morris (Morris, Schenk, Tweedie & Jarrad, 1990).

EL HIPOCAMPO

Anatomía

En los mamíferos el hipocampo se extiende dorsalmente desde el septum hasta la parte caudal de la amígdala ventral (Noback & Demarest, 1975). Es una estructura enrollada sobre sí misma en los dos extremos, en forma de C. El hipocampo ha sido dividido en una parte dorsal o septal y una parte ventral o temporal. El eje longitudinal es curvo y corre del polo septal al polo temporal del hipocampo. El eje transversal es definido como el plano perpendicular al eje longitudinal (Amaral & Witter, 1989; Johnston & Amaral, 1998). En un corte perpendicular al eje septotemporal (eje largo) del hipocampo se observan varios campos de la formación hipocámpal y varias de las conexiones intrínsecas. Figura 2.

El término formación hipocámpal es muy utilizado para denominar al hipocampo junto con un grupo de estructuras del sistema límbico con las que mantiene relación morfológica y funcional estrecha: Giro dentado, Subiculum, Presubiculum, Parasubiculum y Corteza entorrinal (Amaral & Witter, 1995). El término hipocampo propiamente dicho se refiere al

cuerno de Ammon (*cornu Ammonis*, CA) que incluye a tres principales subregiones CA1, CA2 y CA3, distinguibles por el tamaño y apariencia de sus neuronas, por su patrón de conexiones y por su posición con respecto al giro dentado (Amaral & Witter, 1995).

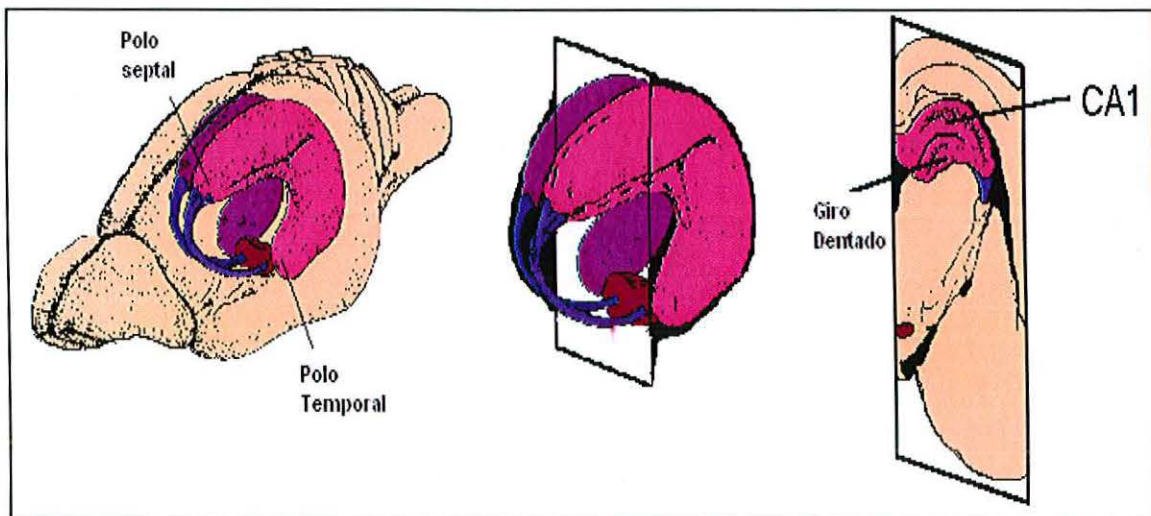


Figura 2. Representación esquemática de la localización del hipocampo (color rosa) en el cerebro de la rata. Modificado de una página de: Eric Hargreaves'Page O'Neuroplasticity. homepages.nyu.edu/~eh597/seahorse.htm. (Basado en Amaral y Witer, 1995).

En el hipocampo (CA1-CA3), la capa de células principales está formada por células piramidales (multipolares) de carácter glutamatérgico, y a su vez se divide en diferentes estratos según el arreglo de las células. Las capas del CA, empezando por la zona cerca a la superficie ventricular, son: *alveus*, una hoja delgada de fibras entrantes y de salida; *estrato oriens*, ocupado por dendritas basales de las células piramidales; *estrato piramidal*, constituido por los cuerpos de las células piramidales; *estrato radiado*, superficial a la capa de células piramidales, y el *estrato lacunosomolecular*, dentro del cual se localizan las dendritas apicales de las células piramidales (Amaral & Witter 1995). Figura 3.

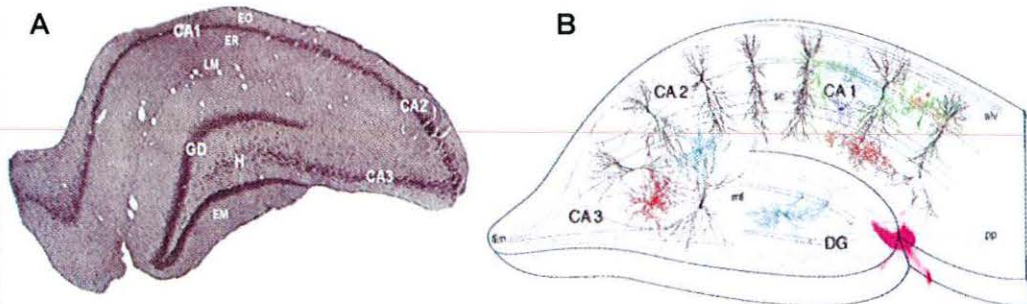


Figura 3. A. Fotomicrografía de las regiones topográficas de la formación hipocampal de la rata en un corte coronal con respecto a su eje transversal. CA1, CA2 y CA3, regiones del cuerno de amon; GD, giro dentado; H, Hilus; EO, estrato oriens; LM, estrato lacunoso molecular; M, estrato molecular del giro dentado. Magnificación, 4X; tinción con violeta de cresilo. Tomado de: Gutiérrez-Guzmán, et al., Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. 2007. B. Figura representativa de las regiones topográficas de la formación hipocampal de la rata. Muestra el acomodo de las células. pp, vía perforante, mf, fibras musgosas. sc, colaterales de Shaffer. alv, alveus. A. Tomado de: Gutiérrez-Guzmán, et al., Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. 2007. B. Tomado de pagina internet.

En todos los campos o regiones del Cuerno de Ammon también existen interneuronas de naturaleza GABAérgica (todas inhibitorias) como parte de los circuitos locales, aunque actualmente se sabe que aquellas interneuronas con inmunoreactividad positiva a Calbindina también envían proyecciones hacia el septo medial (Freund & Buzsaki, 1996). Las interneuronas de CA1 reciben conexiones sinápticas de células noradrenérgicas y serotoninérgicas (Ropert, Miles & Korn, 1990). El giro dentado consiste en tres capas: la capa de células granulares (principalmente monopolares), una gran capa molecular acelular localizada sobre la capa de células granulares y una capa difusa de células polimórficas (algunos la llaman región hilar o hilus) que se localiza debajo de la capa de células granulares. Todas las células son de naturaleza glutamatérgica. También existen tipos de interneuronas análogos a los de CA1, están localizadas entre la capa de células granulares y la capa de células polimórficas (Johnston & Amaral 1998).

En el circuito básico de la formación hipocampal, la corteza entorrinal (CE) es la principal entrada de información al hipocampo, a través de la vía perforante (Glutamatergica) que envía información a las células granulares del giro dentado (GD) y a las células piramidales de CA3. A su vez las células del GD hacen contacto con las células de la región de CA3 por medio de las fibras musgosas (tiene entrada recurrente), que envían información a la región de CA1 por medio de las colaterales de Schaffer, de manera que se conforma lo que se denomina como circuito trisináptico. La región de CA1 recibe aferentes de la CE como parte de la vía directa (monosináptica). Esta región a su vez proyecta a CE y subiculum, siendo esta la vía de salida de información procesada en el hipocampo (Witter, 1989; Johnston & Amaral 1998). Figura 4.

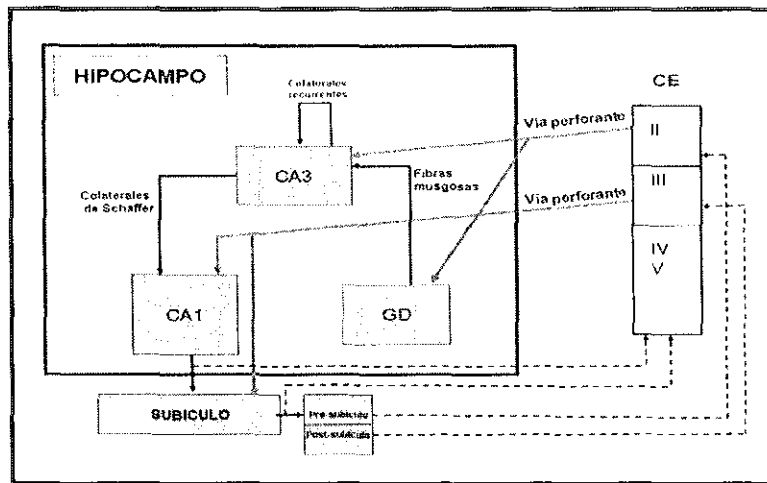


Figura 4. Representación esquemática del circuito trisináptico del hipocampo. CA1, CA3, regiones del Cuerno de Ammón; GD, giro dentado; CE, Corteza entorrinal; II, III, IV, y V, capas de la corteza entorrinal. Tomado de: Gutiérrez-Guzmán, et al., Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. 2007.

La funcionalidad hipocampal se ve influenciada por sistemas de neurotransmisión locales y por sistemas de neurotransmisión extrínsecos. Dentro del circuito local el principal neurotransmisor inhibitorio es el GABA (Lacaille, 1989; Freund & Buzsaki, 1996) y el principal neurotransmisor excitador es el Glutamato (Johnston & Amaral, 1998). La

Acetilcolina originada en el complejo del núcleo septo medial y asa de la banda diagonal de Broca (SM/BDBv) arriba al hipocampo a través de fimbria-fórnix (ff) y tiene una fuerte influencia sobre las células del hipocampo. Entre otros sistemas de neurotransmisión que actúan indirectamente e influyen sobre el hipocampo a través de ff y haz del cíngulo, se encuentra la inervación noradrenérgica procedente del *locus coeruleus*, la inervación dopaminérgica procedente de la sustancia negra y la inervación serotoninérgica procedente del núcleo de rafe (Frotscher & Gähwiler, 1988). También existen péptidos neuroactivos como la somatostatina que coexiste con el transmisor GABA y la sustancia P que coexiste con Acetilcolina (Cooper, Bloom & Roth, 2003).

El Hipocampo y memoria.

Evidencias que indican que el hipocampo tiene una diversa participación en los procesos de aprendizaje y memoria, el *procesamiento espacial*, aprendizaje relacional, memoria episódica, memoria declarativa y la codificación de experiencias en general (O'Keefe & Nadel, 1978; Long & Kesner, 1996; Sutherland & Rudy, 1984; Eichenbaum, 1999; Eichenbaum & Cohen 2001; Tulving, 2002; Squire, Stark & Clark, 2004; Moscovitch et al., 2005).

Existen estudios clínicos, en los cuales se observó que pacientes con lesiones en el lóbulo temporal (paciente HM), pierden la habilidad para generar nueva memoria a largo plazo, es decir presentan deficiencias en tareas de aprendizaje y memoria (amnesia anterograda) (Corkin, Amaral, Gonzalez, Johnson & Hyman, 1997). Se ha demostrado un papel esencial del hipocampo en la formación de memoria explícita pero no en la implícita pues los pacientes no pueden recordar nuevas caras y lugares, pero pueden aprender nuevas destrezas motoras (Milner, Squire & Kandel, 1998).

Diferentes autores sugieren que el hipocampo no es el almacén de la memoria en el largo plazo, si no que parece ayudar a procesar información para ser almacenada en el cerebro a largo plazo (Kim & Fanselow, 1992; Winocur, 1990). De tal manera que funciona como un almacén de memoria temporal (Rawlins, 1985) o como un almacén de plazo intermedio (Treves & Rolls, 1994).

Por otro lado hay estudios experimentales que indican que las lesiones del hipocampo o de las estructuras asociadas (fimbria fórnix, septum, corteza entorrinal, y complejo subicular), provocan deficiencias graves y permanentes en numerosas habilidades espaciales como la navegación en un ambiente que demanda la asociación de las señales que se encuentran en el, para llegar a una meta, es decir en el aprendizaje y memoria espaciales (Morris, Schenk, Tweedie & Jarrad, 1990; Brandeis, 1989; Sutherland & Rodríguez 1989; O'Keefe & Nadel, 1978).

Con respecto a la participación del hipocampo en funciones espaciales O'Keefe y Dostrovsky (1971) descubrieron que existen neuronas del hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada del ambiente, denominadas células de lugar, que forman un mapa cognitivo en el hipocampo, y se les ha considerado como elementos de una representación cartesiana (o de lugar) del ambiente (Nadel & Eichenbaum, 1999) y anatómicamente son células piramidales de la región CA1 y CA3 (Muller, 1996).

Entre las otras teorías de la participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria, Sutherland y Rudy (1989) sugieren que el sistema hipocampal combina la representación de eventos para formar representaciones únicas (teoría de la asociación configuracional).

Alkon et al (1991), proponen que el sistema hipocampal es la base de la memoria declarativa, caracterizada fundamentalmente por representaciones relacionales en la que las memorias están fuertemente

interconectadas, pueden activarse por todas las entradas previamente asociadas y se expresan de manera flexible en contextos nuevos.

Eichenbaum (1999) propone una teoría relacional, en la que la representación del espacio se desarrolla mediante una amplia colección de codificaciones en las que se superponen rasgos determinados de las representaciones episódicas, determinando y restringiendo la representación global de las relaciones espaciales entre las señales del ambiente (pistas). Se basa en el procesamiento de estímulos visuales. Establece que el hipocampo no es necesario para codificar ni expresar memorias independientes, pero si resulta crucial en la codificación y expresión de memorias que requiere relaciones entre eventos o unidades de información, tanto relaciones temporales como configuracionales (Wiener, Paul & Eichenbaum, 1989; Eichenbaum, 1999; Eichenbaum & Cohen, 2001).

Hasselmo y McClelland (1999), realizaron un modelo computacional sobre memoria episódica que se acerca a la hipótesis de Eichenbaum. En este modelo se entiende que una subpoblación de neuronas entorrinales representa la memoria de los sujetos para los contextos, mientras que otra subpoblación neuronal representa ítems individuales. Esta información se transfiere, a través de la vía perforante, a las células granulares del giro dentado, y a través de las fibras musgosas, a la región CA3. Durante la codificación, se fortalecen las conexiones entre las neuronas de CA3 que representan contextos, entre las neuronas que representan ítems individuales y entre ambas clases de neuronas. De este modo las memorias se almacenan como patrones secuenciales de actividad neural en poblaciones neuronales. Durante el reconocimiento, la activación de las representaciones en CA3 depende de la confluencia de estímulos en la corteza entorrinal, lo que determinara que se activen las representaciones de la región CA3 hipocámpal.

Las conexiones excitadoras y recurrentes en CA3 subyacen a la codificación autoasociativa y recuperación de los rasgos de la memoria episódica (Hasselmo & McClelland, 1999).

Hipocampo y actividad theta.

En registros del electroencefalograma (registro de la actividad de campo de neuronas circundantes a un electrodo de registro) se ha observado que predomina cierto tipo de actividad eléctrica según el tipo de conducta que esté realizando el individuo y el sustrato anatómico que lo sustenta. Diversas evidencias electrofisiológicas indican que durante el procesamiento de información y la formación de la memoria que depende del hipocampo en animales y humanos (Vertes, 1986, Vertes & Kocsis 1997), predomina cierto tipo de actividad eléctrica, denominada actividad theta. La actividad theta hipocampal está presente en ratas anestesiadas con ciertos anestésicos como la ketamina o uretano. También puede aparecer espontáneamente o puede ser generado por varios estímulos sensoriales y por activación eléctrica o farmacológica de la formación reticular del tallo del cerebro (Vertes, 1981). La actividad theta se caracteriza por presentar un patrón de actividad rítmica lenta sinusoidal con una amplitud de 1 a 2 mV (cuando se registra intrahipocampalmente) y una frecuencia de 4 -12 Hz en ratas y de 4-7 Hz en humanos y se presenta generalmente asociada a conductas voluntarias (movimiento de cabeza, desplazamiento, nado, correr, saltar, manipular objetos, cambios de postura, exploración visual), (Vanderwolf, 1988; Bland, 1986). Así pues, la actividad theta se presenta durante conductas asociadas a la adquisición de información, y tiene un papel muy importante en la potenciación de larga duración (PLD) mecanismo que, se ha propuesto, sustenta la memoria a largo plazo (O'Keefe & Nadel 1978).

Existe evidencia que dicha actividad theta, es generada en el hipocampo, pues cuando se realizan registros a varias profundidades por los diferentes

estratos de ésta estructura cerebral, se ha observado una máxima amplitud en la zona del estrato oriens-piramidal del área de CA1 (theta superficial); ventral al θ superficial, al nivel de la fisura hipocampal se localiza un segundo generador (theta profundo I) y en el estrato molecular de la hoja dorsal del giro dentado se observa un tercer generador (theta profundo II); además se ha visto que los generadores profundos presentan un desfase de aproximadamente 180° , con respecto al theta superficial (Monmaur & Thomson, 1986; Bland & Whishaw, 1976). Sin embargo, mas recientemente se ha propuesto que otro generador podría encontrarse en la región de CA3 (Strata, 1998). Se ha sugerido que la actividad theta hipocampal es producida por corrientes inducidas sinápticamente tanto en las células piramidales como en las granulares dentadas, originadas por las descargas rítmicas de sus aferentes (Vanderwolf 1988), y que ciertas estructuras límbicas tienen propiedades intrínsecas oscilatorias del potencial de membrana y además reciben entradas sinápticas de otras células, las cuales son capaces de sincronizar tales oscilaciones (Vertes, Hoover & Viana Di Prisco, 2004; Vertes & Kocsis 1997).

Se han identificado ciertos tipos de células, que disparan durante la ocurrencia de la actividad theta (células relacionadas con la actividad theta). Estas poblaciones de células se han clasificado de acuerdo al patrón de descarga, como theta-ON y theta OFF. Estos tipo de células han sido registradas en la región septal medial (núcleo septal medial y núcleo de la banda diagonal de Broca) (Colom & Bland, 1991), la corteza entorrinal (Dickson, Kirk, Oddie & Bland, 1995), corteza del cíngulo (Colom, Christie & Bland, 1988) y diencefalo caudal (Bland, Konopacki, Kirk, Oddie & Dickson, 1995).

Las células theta-ON se caracterizan porque durante la presencia de actividad de theta en el hipocampo incrementan su actividad, debido a un

incremento en la tasa de descarga, en relación a un incremento en la frecuencia de la actividad de campo registrada simultáneamente.

Las células theta-OFF disminuyen su actividad durante la actividad de campo theta como reflejo de un decremento en la tasa de descarga (a cero en muchos casos) (Colom & Bland, 1987).

La descarga de las células relacionadas a theta (ON-OFF) puede ocurrir en dos patrones: el primero es un patrón de disparo fásico en el cual el disparo de las células ocurre con una relación de fase ocurrente en cada ciclo de actividad de campo theta. El segundo patrón de descarga, tónico, puede ser regular o irregular, y consiste en un patrón de descarga con una relación de fase no consistente a la actividad de campo theta. Las células theta-ON y OFF tienen los subtipos fásico y tónico (Colom & Bland, 1987).

Figura 5.

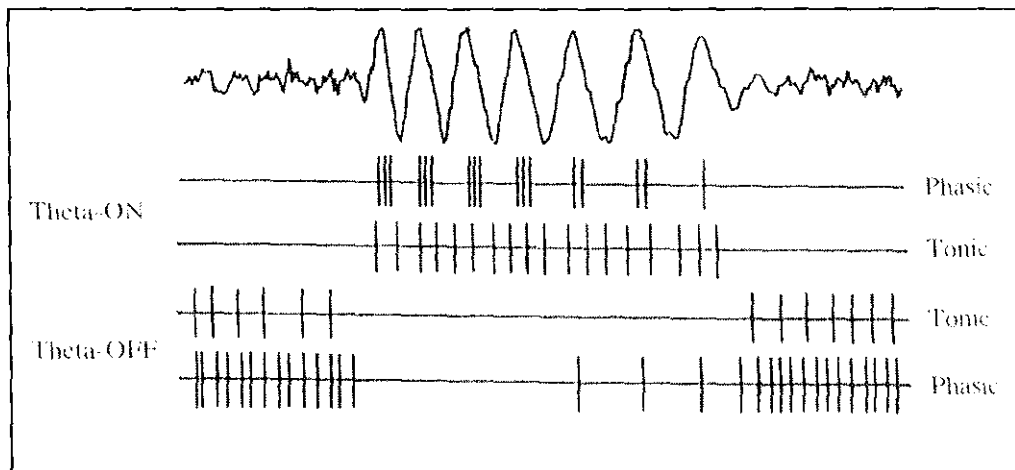


Figura 5. Esquema diagramático de la clasificación de células relacionadas con la actividad theta. La figura de arriba ilustra actividad irregular y actividad theta. Las dos líneas de en medio ilustran los patrones de disparo de las células theta-ON fásicas y tónicas. Las dos líneas de abajo ilustran los patrones de disparo de células theta-OFF tónicas y fásicas. Tomado de: Bland Y Oddie, 1998 (reimpreso de Brain Res, 1987, Elsevier).

Actividad theta y aprendizaje

Un gran cuerpo de evidencias indican que el ritmo theta probablemente está involucrado en el aprendizaje y navegación espacial (Buzsáki, 2005),

pues parece participar en la codificación de la posición de los individuos (O'Keefe & Recce, 1993). Se ha mostrado que ocurre un aumento de la potencia de la banda theta de alta frecuencia durante la realización de una prueba en el laberinto acuático de Morris (Olvera-Cortes et al., 2004). Así, también se ha mostrado que deficiencias en el aprendizaje espacial están asociadas con una disminución del ritmo theta hipocampal (Winson, 1978). Por otro lado se ha visto que la actividad oscilatoria en frecuencias theta predomina durante tareas de memoria de corto plazo (Vertes, 2005). Por lo que se ha sugerido que refleja "en línea" los estados del hipocampo; como una preparación para procesar señales en curso (Buzsáki, 2002).

En humanos se ha observado episodios de actividad theta en el EEG durante la navegación virtual (Nishiyama, Mizuhara, Miwakeichi & Yamaguchi, 2002). Además, se ha sustentado que ocurre un incremento en la actividad theta cuando hay aumento en el aprendizaje y memoria espacial y no espacial en humano (Kahana, 2001).

Por otro lado, el bloqueo farmacológico de los receptores muscarínicos antes del entrenamiento, la lesión de fimbria fórnix o la inactivación septal, así como lesiones del núcleo basal magnocelular y septal, alteran el desempeño de las ratas en tareas de aprendizaje espacial dependientes del hipocampo (aprendizaje de lugar), por lo cual es de gran importancia el papel de la Acetilcolina en el aprendizaje de lugar en el laberinto Acuático de Morris (Morris et al., 1990; Whishaw & Jarrard, 1996).

Se ha propuesto que la actividad theta es dependiente de la actividad colinérgica aferente sobre el hipocampo (Vertes & Kocsis, 1997; Bland & Oddie, 1998) pues cuando ocurre estimulación eléctrica, o farmacológica por agonistas muscarínicos (Carbacol) sobre el área septal, aumenta significativamente la actividad theta o se genera un theta continuo y persistente en el hipocampo (McNaughton, Azmitia, Williams, Buchan & Gray 1980; McNaughton et al., 1988; Markowska, Olton & Givens, 1995; Manseau, Danik & Williams, 2005), lo cual se ha visto relacionado a un mejor

desempeño en procesos de aprendizaje y memoria (Markowska et al., 1995). Lo anterior incide que es de gran importancia el papel de la Acetilcolina en el aprendizaje de lugar en el laberinto Acuático de Morris (Morris et al., 1990; Whishaw & Jarrard, 1996).

Por otro lado lesiones del SM o fimbria-fórnix eliminan permanentemente la actividad theta hipocampal (Vinogradova, 1995; Winson, 1978), induciendo también un deterioro de la memoria (Winson, 1978); de igual manera cuando se inactiva temporalmente a SM mediante la infusión de un anestésico local se altera temporalmente la actividad theta (Mizumori, Barnes & McNaughton, 1989). Además, el aumento de la activación de receptores a GABA en el SM causa un fuerte deterioro en la codificación de información nueva. Por todo lo anterior, el SM/BDBv es considerado como el marcapaso para el ritmo theta hipocampal (Bland, 1986; Vertes, 1986; Vinogradova, 1995).

Buszaki resume en base a diversas evidencias, que la entrada colinérgica septal accede dentro del circuito laminar paralelo del hipocampo y excita rítmicamente células piramidales y granulares; que a su vez, a través de sus axones colaterales, excitan rítmicamente a algunas interneuronas y células principales. Ese periodo de excitación-inhibición podría resultar en fluctuaciones rítmicas del potencial de membrana en las poblaciones de células piramidales y granulares (Buzsaki, Leung & Vanderwolf, 1983).

Se ha propuesto un nuevo modelo de interacción septohipocampal para la generación del ritmo theta de CA1 del cuerno de Ammón. Este refiere que durante la actividad theta, las células piramidales oscilan entre el estado de despolarización (modo de disparo) e hiperpolarización (modo inter-disparo), y tal alternancia de estados, da lugar a flujos de corriente extracelular responsables de la generación del ritmo theta (Vertes & Kocsis, 1997).

En la modalidad de disparo, neuronas colinérgicas de SM/vBDB activan o excitan células piramidales (CPs) e inhiben presinápticamente interneuronas hipocampales, mientras que las células GABAérgicas de

SM/vBDB solamente inhiben interneuronas hipocampales. La acción coordinada de células septales colinérgicas/GABAérgicas sobre CPs (excitación colinérgica acoplada con desinhibición GABAérgica) excitan fuertemente CPs. Esto lleva a la despolarización, la activación de corrientes intrínsecas de sodio y la activación de potenciales de membrana despolarizantes y espigas en CPs. Esto correspondería a la formación del pico de fase positiva de la onda theta (Vertes & Kocsis, 1997).

En la modalidad inter-disparo (el cese del disparo entre las células colinérgicas/GABAérgicas septales entre descargas) las células colinérgicas de SM/vBDB ya no activan CPs o inhiben interneuronas hipocampales, y las células Gabaérgicas no inhiben interneuronas, dando por resultado una disminución de la influencia excitadora y un incremento en la influencia inhibitoria sobre CPs, debido a la supresión de la acción GABAérgica septal sobre interneuronas hipocampales, las interneuronas hipocampales disparan, rítmicamente inhibiendo CPs, hiperpolarizan y bloquean la descarga. Esto correspondería a la fase negativa de la onda theta (Vertes & Kocsis, 1997).

VIAS DE SINCRONIZACION ASCENDENTE

Diversos estudios, han mostrado que los estados del EEG hipocampal (theta y su desincronización), son controlados por un sistema de conexiones originadas en el tallo del cerebro con relevos en el diencefalo y finalmente al septum/hipocampo, conocido como vías de sincronización ascendente (Vertes, Hoover & Viana Di Prisco, 2004; Bland & Oddie, 1998; Kirk, Oddie, Konopacki & Bland, 1996). Tal red ascendente es originada en el núcleo reticular pontis oralis (nRPO) y el núcleo tegmental pedunculopontino (nTPP) pues la estimulación eléctrica o manipulación farmacológica mediante la aplicación de agonistas colinérgicos en ambos núcleos, inducen la generación de actividad theta en la formación hipocampal, a través de la activación de neuronas del diencefalo caudal

como el núcleo hipotalámico posterior (nHP) y núcleo supramamilar (nSUM), los cuales convierten esa entrada en un patrón rítmico de descarga, que es relevado en células marcapaso GABAérgicas/Colinérgicas del complejo SM/BDBv para generar la ritmicidad característica de la actividad theta (Bland & Oddie, 1998; Vertes & Kocsis, 1997; Kirk et al., 1996).

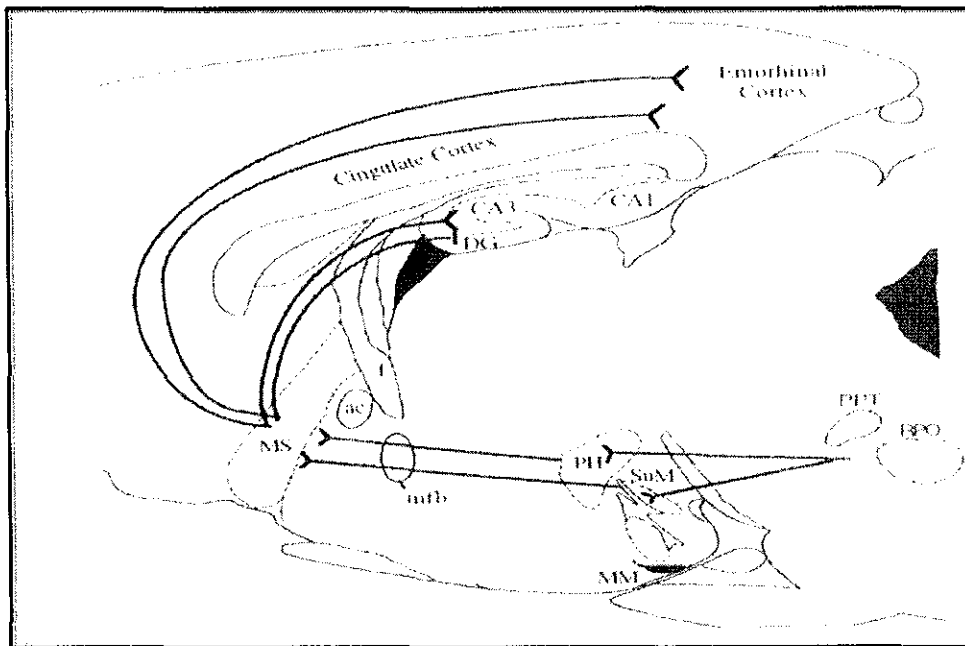


Figura 6. Representación diagramática de las vías de sincronización ascendente. RPO, núcleo reticular pontis oralis; PPT, núcleo tegmental pedunculopontino; PH, núcleo hipotalámico posterior; SUM, núcleo supramamilar; MS, septo medial; CA1, CA3, DG, regiones del hipocampo. Tomado de: Bland y Oddie, 1998.

Formación reticular

Diversas evidencias experimentales apoyan la participación de dichas estructuras en la generación de la actividad theta hipocámpal. Como fue mencionado previamente la estimulación eléctrica del **núcleo reticular pontis oralis (nRPO)** genera actividad theta hipocámpal (Vertes, 1981; 1982), cuya frecuencia es proporcional al incremento de la intensidad de estimulación (Oddie, Bland, Colom & Vertes, 1994), es decir a mayor intensidad de estimulación se incrementa la frecuencia de la actividad

theta. Por otro lado, la aplicación de microinyecciones del agonista colinérgico carbacol en nRPO genera actividad theta en el hipocampo (Nuñez, Andrés & Garcia-Austt, 1991), por lo que se ha sugerido que nRPO es modulado a su vez por una entrada colinérgica (Nuñez et al., 1991). En ambos casos ha ocurrido la activación de células theta-ON fásicas y tónicas en el complejo SM/BDBv (Bland, Oddie, Colom & Vertes, 1994).

Después de investigar las propiedades de descarga de las células del nRPO en ratas anestesiadas con uretano en respuesta a estimulación sensorial y microinyecciones de carbacol, se ha observado que las células de nRPO disparan en un patrón no rítmico (tónico), es decir las células relacionadas a theta en nRPO son theta-ON tónicas y theta-OFF tónicas, existen además células no relacionadas a theta (Nuñez et al., 1991).

La estimulación del nRPO además de generar la actividad theta hipocampal, también se ha relacionado con cambios en el patrón de disparo rítmico característico de células theta-ON fásicas del nSUM y el cuerpo mamilar (MM) (Kirk et al., 1996), y con el incremento en la tasa de disparo de células del nHP, con disparo tónico de células relacionadas a theta (Kirk et al., 1996). Por otro lado cuando se bloquea reversiblemente al nSUM/nPH mediante la aplicación de procaína y se estimula al nRPO, se atenúa su influencia sincronizadora sobre el septo medial y sobre el EEG hipocampal, por lo que varios autores han propuesto que estas estructuras participan haciendo relevo para la generación de la actividad theta hipocampal (Kirk et al., 1996).

El nRPO envía densas proyecciones a través de la parte central de la formación reticular, hacia el nTPP, el núcleo talámico intralaminar y el núcleo hipotalámico posterior (nHP). Pero no envía proyecciones al nSUM (Fortín, 1995) ni al SM/BDBv (Vertes & Martin, 1988). De manera que su influencia sobre el nSUM y el SM/BDBv ocurren a través de relevos sobre nHP. Figuras 6 y 7.

En relación a lo anterior, se ha observado que la microinyección de carbacol o estimulación del **núcleo tegmental pedunculopontino (nTPP)**,

son capaces de generar actividad theta hipocampal (Vertes, Colom, Fortin & Bland, 1993; Vertes, 1982), mientras que, el bloqueo colinérgico en el mismo núcleo, impide la generación de la actividad theta, es decir, éste núcleo tiene la capacidad de determinar que la actividad theta ocurra o no (McNaughton & Sedgwich, 1978). De acuerdo con ello la aplicación de inyecciones de procaína dentro del nTPP, suprime la actividad theta hipocampal en ratas anestesiadas con uretano (Nowacka, Jurkowlaniec & Trojniar, 2002) y cuando se aplica sobre las fibras eferentes del nTPP, se bloquea la generación de theta por estimulación del nPPT, sin afectar la frecuencia (Swain & McNaughton, 1996), en base a esto Woodnorth (2003) menciona que el sistema colinérgico del nTPP no parece contribuir al control de la frecuencia theta, pero puede ser una vía primaria de entrada colinérgica al nRPO en la generación de actividad theta hipocampal (Vertes et al., 1993), pues existe evidencia de una conectividad recíproca entre ambos (Fortín, 1995).

Todo lo anterior indica que el nRPO es crítico para la generación de actividad theta, y que su actividad es modulada por entradas colinérgicas, provenientes del nTPP. Este último envía además proyecciones al nRPO, al núcleo de rafe medial (RM), a los núcleos talámicos intralaminar y medial; al nSuM y al complejo SM/BDBv (Fortín, 1995). Figuras 6 y 7.

Región del Diencefalo caudal.

A nivel del diencefalo caudal, **el núcleo supramamilar** (nSUM) tiene una fuerte influencia directa e indirecta sobre la actividad theta del hipocampo, la cual ocurre a través de sus proyecciones sobre células colinérgicas y gabaérgicas del hipocampo (via supramamilo-hipocampal) y del septo medial (supramamilo-septal) respectivamente. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica o bien la inyección de carbacol en el nRPO de ratas anestesiadas, activa neuronas del nSUM que disparan ráfagas sincrónicas en fase con la actividad theta hipocampal (Kirk & McNaughton, 1991;

Kirk & McNaughton, 1993; Kocsis & Vertes, 1994; Bland, Konopacki, Kirk, Oddie & Dickson, 1995), y que la estimulación específica del nSUM produce actividad theta hipocampal (Vertes, 1981; Oddie et al., 1994), por lo que se ha propuesto que éste núcleo actúa como un relevo en las vías de sincronización ascendente.

Diferentes estudios han evaluado la contribución específica del nSUM en la generación y control de la actividad theta, entre ellos Kirk y McNaughton (1993) realizaron inyecciones de procaina en varias subregiones del nSUM en ratas anestesiadas y observaron que se redujo la frecuencia y la amplitud de la actividad theta generada mediante la estimulación del nRPO (Kirk & McNaughton, 1993). Estos autores observaron además que cuando ocurre un bloqueo temporal específico del SM/BDB la actividad de las células del nSUM no se altera, pero la amplitud de la actividad theta en el hipocampo se reduce, mientras que cuando la inyección se hace dentro de sitios entre nRPO y nSUM se reduce la frecuencia de la actividad theta, pero no la amplitud y la inyección entre el nSUM y SM/BDBv reduce la amplitud de la actividad theta, pero no la frecuencia (Kirk & McNaughton, 1993). Por otro lado Lee et al (1994), mostraron que la inyección de neurotoxina colinérgica (neurotoxin 192 immunoglobulin G-saporin) en el SM/BDBv significativamente reduce la amplitud pero no la frecuencia de la actividad theta (Lee, Chrobak, Sik, Wiley & Buzsaki, 1994). Con base en estos antecedentes se ha propuesto que la frecuencia del ritmo theta es codificada en el nSUM, es decir que la transducción de la intensidad de la activación reticular a la frecuencia de la actividad theta resultante, tiene lugar en tal región, y que la señal que codifica la frecuencia (entrada fásica) es enviada probablemente a través del haz medial frontocerebral (MFB) hacia el complejo MS/BDBv (Kirk, 1998; Kirk & McNaughton, 1993), aunque actualmente no se conoce la vía anatómica. De cualquier manera, en apoyo a la existencia de dicha influencia, hay evidencias experimentales de que la estimulación del nSUM lateral mediante la aplicación de glutamato en ratas anestesiadas genera

un substancial incremento en la población de espigas evocadas por estimulación de la vía perforante en el GD, que dura inclusive hasta 20 minutos, por lo cual se ha propuesto que las aferentes del nSUM lateral constituyen un mecanismo para la modulación heterosináptica de corta y larga duración en el hipocampo (Nakanishi, Saito & Abe, 2001). De acuerdo con ello, la co-activación del nSUM y la vía perforante produce LTP de la población de espigas de las células granulares y dicho LTP es abolido cuando se lesionan las vías aferentes del nSUM al hipocampo (Nakanishi et al., 2001), de ésta manera es evidente que el nSUM podría estar contribuyendo al procesamiento de la memoria asociativa a través de la modulación de la excitabilidad hipocámpal.

Sin embargo, aun es incompleta la información con respecto a la participación de este núcleo en la generación y regulación de la actividad theta, pues los resultados mencionados anteriormente corresponden solo a experimentos realizados en ratas anestesiadas, mientras que en estudios con ratas despiertas (atento quieto o con libertad de movimiento) los resultados son diferentes, pues cuando animales despiertos e inmóviles son infundidos con procaína dentro del nSUM la frecuencia de la actividad theta generada por medio de la estimulación del nRPO presenta una reducción menor que la que ocurre en ratas anestesiadas (McNaughton et al., 1995) y cuando se lesiona al nSUM y se genera actividad theta asociada a movimientos espontáneos y conductas defensivas, su frecuencia no difiere de la de animales intactos (Thinschmidt, Kinney & Kocsis, 1995; Pan, 2000).

Con base a la diferencia en los resultados obtenidos en experimentos con animales anestesiados en oposición a lo observado en animales con libertad de movimiento luego de la manipulación del nSUM, se ha propuesto que durante la conducta desplegada en libertad de movimiento el nSUM es solo uno de dos o más núcleos que controlan conjuntamente la frecuencia de la actividad theta generada reticularmente.

El nSUM envía proyecciones hacia estructuras como el hipocampo, el núcleo reuniens, el septo medial y lateral (Vertes, 1992) y el núcleo hipotalámico posterior (Vertes et al., 1995). Las proyecciones colaterales de neuronas del nSUM que alcanzan al complejo SM/BDBv y a la formación hipocampal, podrían jugar un importante papel en el control directo de la actividad theta (Vertes & Mc Kenna, 2000).

Dentro del nSUM se encuentran células dopaminérgicas (Swanson, 1982; Gonzalo-Ruiz, Morte, Flecha & Sanz, 1992a,b), células aspartato/glutamatérgicas (Leranth & Kiss, 1996; Kocsis, Kiss, Csaky & Halasz, 2003), sustancia P (Ino, Sugimoto, Kaneko, Kamiya & Mizuno, 1988; Borhegyi & Lerant, 1997) y células positivas a calretinina (Carnes, Fuller & Price, 1990).

El SUM proyecta predominantemente a la región de CA2/CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo dorsal y a la capa de células granulares del giro dentado (Vertes, 1992; Leranth & Nitsch, 1994; Magloczky, Acsady & Freund, 1994). En ratas, las fibras del nSUM forman conexiones excitadoras con células colinérgicas y GABAérgicas de MS/BDBv (Leranth & Kiss, 1996; Borhegyi, Magloczky, Acsady & Freund, 1998), se sabe que una subpoblación de células que proyectan al hipocampo y MS/BDBv son glutamatérgicas (Leranth & Kiss, 1996).

El nSUM recibe proyecciones de una población discreta de neuronas GABAérgicas que contienen Calretinina y/o calbindina localizadas entre el borde de septo lateral y medial (Borhegyi & Freund, 1998; Leranth, Carpi, Buzsaki & Kiss, 1999) que termina sobre células que contienen calretinina (no gabaérgicas) en dicho núcleo (Leranth et al., 1999). También recibe fibras de neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal (Gonzalo Ruiz et al., 1999), así como colinérgicas del complejo SM/BDBv y del núcleo tegmental laterodorsal (Gonzalo Ruiz et al., 1999). Aunque varios autores no han encontrado evidencia de proyecciones del hipocampo al nSUM (Amaral & Cowan, 1980; Nitsch & Leranth, 1994; 1996), en otro estudio se ha reportado la existencia de proyecciones de neuronas no piramidales del

cuerno de Ammon sobre la región supramamilar, el área hipotalámica lateral, posterior y dorsal.

En base a todo lo anterior se ha sugerido que la actividad rítmica en el nSUM es requerida para la modulación de la frecuencia de la actividad theta, como un recipiente de altos niveles de activación de nRPO que pueden ocurrir normalmente en estados de una conducta particular (por ejemplo el aprendizaje y emoción) (Vertes 1982; 1983) o durante estimulación del nRPO, pero no sería necesaria para la expresión de theta *per se*. De manera que esto ha permitido generar nuevas propuestas en diferentes estudios de que el nSUM no es el único sitio que controla la frecuencia theta, y que en algún tiempo determinado este núcleo puede no estar involucrado a todos los estados conductuales, por lo que podrían existir algunos núcleos adicionales como el núcleo hipotalámico posterior (Kirk, 1998; Woodnorth, Kyd, Logan, Long & McNaughton, 2003) participando en el control de la frecuencia theta en ratas despiertas. Aun no hay una evidencia clara de la conectividad entre el nRPO y nSUM, pero sí del nRPO con el nHP (Vertes & Martin, 1988). Figura 7.

Como ya se ha mencionado, además del nSUM, **el núcleo o área del hipotálamo posterior (nHP)** ha sido considerado como un importante enlace entre el tallo del cerebro y la formación hipocampal, pues existen neuronas de este núcleo que disparan en ritmo con la actividad theta, además, se ha observado que la estimulación eléctrica del nHP genera una intensa activación de células theta-ON en el SM/BDB (Bland, Oddie & Ford, 1990; Bland, Oddie, Colom & Vertes, 1994), el hipocampo (Smythe, Christie, Colom, Lawson & Bland, 1991; Colom, Ford & Bland, 1987) y la corteza entorrinal (Dickson, Kirk, Oddie & Bland, 1995). Así pues, la estimulación de alta frecuencia (100Hz) en el nHP genera la descarga tónica en este núcleo durante el theta hipocampal (Destradé & Ott, 1981; Smythe, Christie, Colom, Lawson & Bland, 1991), además cuando se aplica estimulación a la

formación reticular se incrementa la descarga tónica de este núcleo y persiste después de que el theta hipocampal fue atenuado mediante la inyección de procaína en el septo (Kirk & McNaughton, 1999), mientras que la aplicación de carbacol en el nHP genera una continua producción de theta en el hipocampo, conjuntamente con la activación de células theta-ON en el SM/BDBv (Bland, Oddie, Colom & Vertes, 1994; Oddie, Bland, Colom & Vertes, 1994). En contraste, la lesión electrolítica de ésta región atenúa la actividad theta, además se presentan frecuencias más bajas de lo normal (Robinson & Whishaw, 1974). También se ha visto que la inyección de procaína en el nHP bloquea la actividad theta hipocampal generada por estimulación reticular (Oddie et al., 1994) y la descarga fásica de células septales, relacionadas con la actividad theta (Bland et al., 1994). También se ha observado que después de la eliminación inicial de la actividad theta, tras la aplicación de procaína la frecuencia de la actividad theta hipocampal se recupera mucho más lentamente que su amplitud (Kirk & McNaughton, 1991; 1993; Oddie et al., 1994; McNaughton et al., 1995; Oddie & Bland 1998), lo que llevó a los autores a sugerir que esta región contribuye más a la frecuencia que a la amplitud de la actividad theta registrada en el hipocampo (Oddie et al., 1994). Además, las neuronas en la región del nHP también han mostrado descarga rítmica en frecuencias theta (Kocis & Vertes, 1994; Bland et al., 1995; Kirk, Oddie, Konopacki & Bland, 1996) y se han hecho registros *in vitro* en los cuales se han observado ráfagas repetitivas a partir del núcleo mamilar de la región del nHP (Alonso & Llinás 1992).

La inactivación reversible combinada del núcleo SUM y nHP, suprime toda la actividad theta hipocampal inducida espontáneamente, sensorialmente y por estimulación de la formación reticular del tallo del cerebro en ratas anestesiadas (Bland & Colom, 1993; Kirk & McNaughton, 1993; Oddie et al., 1994; Oddie & Bland 1998). Estos hallazgos sugieren que la frecuencia de la actividad theta hipocampal también es codificada en el nHP y, es

alimentada al septo medial a través de haces del cerebro anterior medial (Bland et al., 1995; Bland, 2000).

Todo lo anterior apoya el papel del nHP como un relevo en el sistema de sincronización ascendente de la actividad theta, pero como ocurre con el nSUM, el nHP individualmente no parece ser crítica para la expresión de la actividad theta *per se* y se ha sugerido contribuye con la entrada tónica posiblemente colinérgica (Bland et al., 1994; Brazhnik & Vinogradova, 1986; Oddie et al., 1994) al SM y hipocampo (Vertes, Crane, Colom & Bland, 1995), que acentúa el disparo rítmico en células septales (Bland et al., 1994; Brazhnik & Vinogradova, 1986) y la expresión de la actividad de campo theta en el hipocampo (Bland & Colom, 1993).

El nHP proyecta al núcleo reuniens del talamo, núcleo paraventricular y laterodorsal del tálamo, el nSUM, el septo medial y lateral, y a la corteza perirrinal; y no proyecta directamente al hipocampo (Vertes et al., 1995).

Las proyecciones ascendentes al nHP se originan de núcleos colinérgicos del tallo del cerebro (núcleo pedunculopontino), la formación reticular, núcleo de rafe mesencefálico, núcleo parabraquial y periacueductal. Se presentan proyecciones descendentes hacia el nHP de la corteza del cíngulo y septo lateral, y el hipotálamo lateral y medial. También recibe entradas indirectas del hipocampo, amígdala y núcleo supraquiasmático a través de circuitos que incluyen núcleos tanto de la corteza del cíngulo y septo lateral, como del hipotálamo (Abrahamson & Moore, 2001).

La mayoría de las neuronas del nHP contienen glutamato, así como también se encuentra hypocretina, melanina, tyrosina hidroxilasa, neuropeptido Y, y el ácido gamma-aminobutírico, además se han observado fibras inmunoreactivas a la serotonina, dopamina-beta-hidroxilasa y metencefalina en el área y delimitación de los bordes del núcleo (Abrahamson & Moore, 2001).

Así pues, se puede decir que los núcleos pontinos y diencefálicos juegan un papel muy importante en el origen y traducción de los niveles de activación, que han sido originados por algún estado conductual, y así

poder generar la entrada principalmente fásica al septo medial para que en conjunto con él se pueda regular la frecuencia y amplitud de la actividad theta hipocampal obviamente con la participación de los respectivos neurotransmisores, cuya contribución específica aun no es completamente descifrados. Asimismo, los datos anatómicos sugieren la posible participación de otros núcleos de relevo en la modulación y/o generación del ritmo theta hipocampal, ya que han sido poco estudiados. En uno de los estudios más recientes se ha involucrado al Núcleo incertus como otro posible núcleo de relevo entre estructuras del tallo del cerebro (Nuñez, Cervera-Ferri, Olucha-Bordonau, Ruiz-Torner & Teruel, 2006). Figura 7.

Participación del Núcleo Supramamilar en el aprendizaje espacial.

Como se ha mencionado, el hipocampo tiene una importante función en el control de la memoria, especialmente en la memoria espacial. En relación a esto el nSUM como relevo en las vías de sincronización ascendente juega un importante papel en las funciones del hipocampo y podría estar involucrado en el control de la memoria espacial.

Son pocos los trabajos que existen acerca de la participación de este núcleo en los procesos de aprendizaje y memoria espacial.

Pan y McNaughton (1997) han reportado que la inyección de ansiolíticos (clordiazepoxido) dentro del nSUM medial en una prueba de laberinto acuático de Morris en un único día de entrenamiento causa un modesto pero significativo deterioro del aprendizaje espacial, y un modesto decremento en la frecuencia theta 0.35 Hz, en comparación con la aplicación intraperitoneal (Pan & McNaughton, 1997). Posteriormente en otro trabajo, estos mismos autores reportaron que la lesión neuroquímica en el mismo núcleo no produce efectos significativos sobre el aprendizaje espacial pero disminuye a 0.4 Hz la frecuencia hipocampal (Pan & McNaughton, 2002), sin embargo otros autores sí observaron efectos adversos sobre el aprendizaje y el resultado de Pan y McNaughton pudo

deberse a la pequeña extensión de la lesión (Shahidi, Motamedi & Naghdi, 2004). La lesión electrolítica de los cuerpos mamilares y el nSUM medial no deteriora el aprendizaje espacial en el laberinto radial (Sziklas & Petrides, 1993; Sziklas, Petrides & Jackson, 1995). En contraste, otros autores han reportado que lesión del nSUM puede producir deficiencias en la memoria (Sziklas & Petrides 1993).

En un estudio en el que se inactivó, el nSUM mediante la aplicación de lidocaina y se evaluó la memoria de referencia en el laberinto acuático de Morris, se observó que no tiene efecto sobre la adquisición y recuerdo, mientras que la inactivación del nSUM post-entrenamiento deterioró la memoria de referencia espacial. Por otro lado, la inactivación reversible de este núcleo antes y después de la adquisición deteriora la memoria de trabajo espacial en el laberinto acuático de Morris. La inactivación reversible no tiene efecto sobre la actividad locomotora (Shahidi et al., 2004). Estos autores mencionan que el protocolo metodológico, extensión de la lesión y la cepa utilizada, deben estar muy relacionados con las diferencias en los resultados encontrados en los diferentes estudios, al lesionar el nSUM. Además, sugieren que el nSUM medial tiene un efecto prominente sobre el aprendizaje inhibitorio y la memoria, y que la parte más lateral puede jugar un papel importante sobre el aprendizaje y la memoria espacial, ya que esta parte tiene una conexión directa con el hipocampo y podría influenciar los potenciales de campo del giro dentado (Shahidi et al., 2004), pues se ha reportado que la co-activación del nSUM lateral con la vía perforante puede incrementar la población de espigas del LTP en el giro dentado de la formación hipocampal (Nakanishi, Saito & Abe, 2001).

Se ha reportado que al reducirse la frecuencia de la actividad theta, se altera el desempeño en el laberinto acuático de Morris (McNaughton, Ruan & Woodnorth, 2006), por lo cual una frecuencia precisa en la ritmicidad de la actividad theta puede ser importante para la función hipocampal. Es

decir, un pequeño cambio en una frecuencia específica podría alterar la eficiencia en el aprendizaje y memoria.

No existen reportes que evalúen la participación del nHP en la organización del aprendizaje espacial.

Región Septal

Se ha establecido que existen células del **complejo septo medial/rama vertical de la banda diagonal de broca (MS/BDBv)** que disparan rítmica y sincrónicamente con la actividad theta hipocampal, que son responsables de la generación de dicha actividad en la formación hipocampal (Vertes & Kocsis 1997). Es bien conocido que el SM/BDBv está constituida por neuronas de carácter Colinérgico y GABAérgico principalmente y que sus aferentes arriban al hipocampo a través de fimbria fórnix.

Se ha propuesto que la actividad theta es dependiente de la actividad colinérgica aferente sobre el hipocampo (Vertes & Kocsis 1997; Bland & Oddie, 1998) pues cuando ocurre estimulación eléctrica, o farmacológica por agonistas muscarínicos (Carbacol) sobre el área septal, aumenta significativamente la actividad theta o se genera un theta continuo y persistente en el hipocampo (McNaughton, Azmitia, Williams, Buchan & Gray, 1980; McNaughton et al., 1988; Markowska, Olton & Givens, 1995; Manseau, Danik & Williams, 2005), lo cual se ha visto relacionado a un mejor desempeño en procesos de aprendizaje y memoria (Markowska *et al.*, 1995). Por otro lado, lesiones de SM o fimbria-fórnix eliminan permanentemente la actividad theta hipocampal (Vinogradova, 1995, Winson, 1978), induciendo también un deterioro de la memoria (Winson, 1978); de igual manera cuando se inactiva temporalmente a SM mediante a infusión de un anestésico local se altera temporalmente la actividad theta (Mizumori, Barnes & McNaughton, 1989). Por todo lo anterior el

MS/BDBv es considerado como el marcapaso para la actividad theta hipocampal (Bland, 1986; Vertes, 1986; Vinogradova, 1995). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la neurotransmisión GABAérgica determina las oscilaciones de las células colinérgicas (Colom, 2006; Wang, 2002).

El complejo MS/BDBv, actúa como un recipiente en el que convergen las entradas de las vías ascendentes, de manera que con sus células marcapaso, estaría marcando el ritmo de la actividad theta hacia el hipocampo, incluso enviando información descendente acerca del estado theta hacia las partes caudales del diencéfalo.

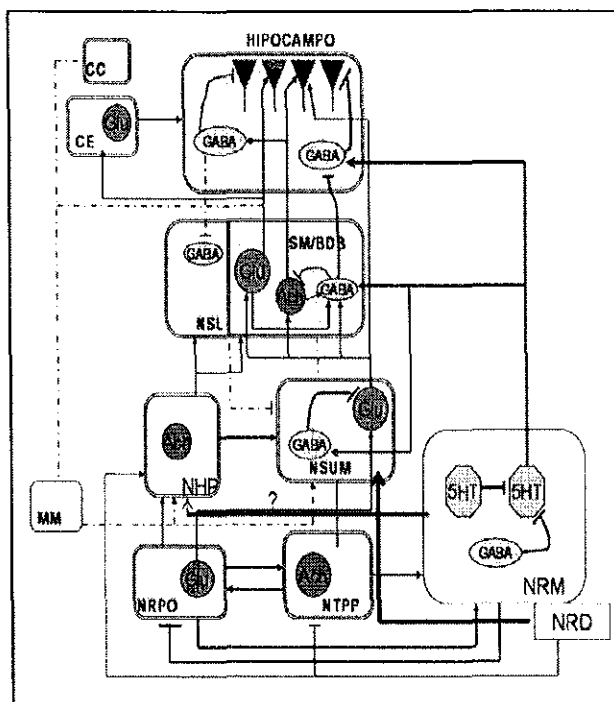


Figura 7. Representación esquemática del sistema sincronizador ascendente y las interacciones del sistema serotoninérgico con otros neurotransmisores en cada nivel de éste. Líneas sólidas, vías ascendentes; líneas punteadas, vías descendentes. Las líneas que terminan en flecha indican actividad excitadora, 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 lateral; SM/BDB, complejo septo medial/banda diagonal de Broca; CC, Corteza del Cingulo, CE, Corteza entorrinal; MM, cuerpos mamilares; NRM, núcleo raquídeo medial; NRD, núcleo raquídeo 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. Tomado de: Gutiérrez-Guzmán, et al., Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. 2007.

De todo lo anterior, sabemos que existe un importante cuerpo de investigación que indica que la ocurrencia del ritmo theta de la formación hipocampal es críticamente dependiente de la integridad de un número de estructuras subcorticales localizadas a nivel del tallo del cerebro, diencefalo y septo medial, ya que contribuyen a la generación sincrónica de la actividad theta (Bland, 1986; Vertes, 1986; Bland & Colom, 1993; Vertes et al., 1995), sin embargo existen evidencias de la participación de otro sistema en la desincronización del EEG hipocampal, originado por neuronas serotoninérgicas del núcleo de rafe, que son capaces de interrumpir la descarga rítmica de las neuronas del área septal medial y a la actividad theta hipocampal (Vertes, Hoover & Di Prisco, 2004; Vertes & Kocsis 1997; Vinogradova, Kitchigina, Kudina & Zenchenco, 1999).

LA SEROTONINA

La serotonina es un neurotransmisor que se encuentra distribuido en varias regiones del cerebro, y se le ha implicado en varias funciones como en la regulación del ciclo sueño-vigilia, control de la impulsividad, regulación del miedo y ansiedad, respuesta al estrés, la depresión, el control cognitivo y el aprendizaje y la memoria.

Síntesis y degradación

La Serotonina es una amina aromática, pertenece a la familia de las indolaminas y está compuesta de un anillo indol hidroxilado en la posición 5, y una cadena lateral etilamínica. Se sintetiza a partir del aminoácido triptófano y, dado que la indolamina no puede cruzar la barrera hematoencefálica, toda la serotonina neuronal del sistema nervioso central es sintetizada localmente, es decir en la neurona, tanto en el núcleo como en las terminaciones nerviosas, aunque posiblemente las últimas

constituyen los puntos más importantes para la regulación rápida de su síntesis (Heimer, Zahm & Alheid, 1994).

La síntesis, se lleva a cabo en un proceso de doble paso, interviniendo dos enzimas: la triptofano hidroxilasa, que cataliza la conversión del triptofano en 5-hidroxitriptofano 5-HTP; y la enzima aminoácido aromático descarboxilasa que convierte el compuesto anterior en 5-hidroxitriptamina, 5HT o Serotonina (Nestler, Hyman & Malenka, 2001; Siegel, Agranoff, Albers, Molinoff & Perry, 1993).

La biodegradación de la Serotonina, se lleva a cabo a nivel intracelular (MAO) y en la hendidura sináptica, dando origen a su principal metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxi-indolacético 5HIAA, por la acción enzimática de la MAO_B. La recaptura de la serotonina es mediada por el transportador llamado SERT, y cuando es inhibido por drogas, se prolonga la señalización sináptica serotoninérgica (Nestler et al., 2001).

Nomenclatura.

Desde el punto de vista anatómico, Dahlstrom y Fuxe (1964), describieron 9 conglomerados de cuerpos neuronales que contienen serotonina (B1-B9) y corresponden a los núcleos del rafe.

Los grupos B6 y B7 son a menudo considerados conjuntamente como el núcleo de rafe dorsal, siendo B6 su extensión caudal. El grupo B8 corresponde al núcleo de rafe medial, también llamado el núcleo central superior, mientras que el B9, parte del tegmento ventrolateral del puente y del cerebro medio, y los grupos celulares B1 a B5, se encuentran situados más caudalmente y contienen un número menor de células serotoninérgicas. Figura 8.

Los núcleos de Rafe dorsal y medial dan salida a múltiples paquetes distintos de axones que forman vías separadas para diferentes regiones cerebrales. Estructuras funcionalmente relacionadas en el cerebro son inervadas por el mismo grupo de neuronas serotoninérgicas. El estriado y

la sustancia negra (sistema de los ganglios basales que median la actividad motora) además de todas las áreas de la corteza cerebral, amígdala, septum lateral, e hipotálamo son inervados por el rafe dorsal (Dahlstrom & Fuxe, 1964), mientras que el hipocampo dorsal y el septum medial están inervados predominantemente por colaterales de una población de neuronas (8-12%) de rafe medial (McKena & Vertes 2001) que también inervan al núcleo supramamilar (Vertes et al., 2004).

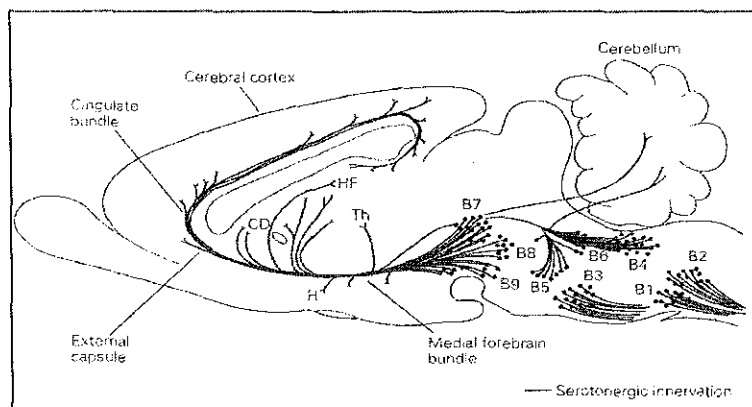


Figura 8. Esquema representativo de un corte sagital del cerebro de ratona, en el cual se muestra la distribución del sistema serotoninérgico. Núcleos B1-B9. Modificado de: Frazer y Hensler, 1994.

Inervación serotoninérgica dentro del hipocampo.

Los principales aferentes serotoninérgicos que arriban al hipocampo lo hacen a través de la fimbria fornix (infra-callosal) (Azmitia & Segal, 1978; MHarzi & Monmaur, 1984) y el haz del cíngulo (supra-callosal), (Azmitia & Segal, 1978), pues se ha mostrado que microinyecciones de 5,7-DHT en dichas aferentes selectivamente destruyen terminales serotoninérgicas del hipocampo dorsal y ventral (Williams & Azmitia, 1981).

La serotonina puede ser liberada a través de varicosidades dentro del espacio extracelular y en las sinapsis. Usualmente las terminales serotoninérgicas hacen sinapsis sobre las dendritas o el soma de ciertas clases de interneuronas GABAérgicas. El efecto directo de la serotonina

sobre otras células principales del hipocampo ocurre a través de liberación difusa en el espacio extracelular (Hensler, 2006).

Los axones y terminales serotoninérgicas muestran diferencias morfológicas relacionadas con el núcleo de origen en el rafe. En el giro dentado, una densa red de axones finos serotoninérgicos se hallan presentes en la región hilar y a través de la porción exterior de la capa molecular; mientras que axones protuberantes se encuentran inmediatamente debajo de capas de células granulares. Una innervación menos densa y discontinua se encuentra entre la capa de células granulares y la molecular. Otros axones protuberantes también se extienden por la capa del cuerpo de células granulares (Mamounas *et al* 1991).

La región CA3 del hipocampo (estrato radiado y estrato oriens), se caracteriza por recibir un plexo de axones densos y protuberantes serotoninérgicos, entremezclado con una acumulación de axones finos serotoninérgicos. Tales axones finos están ausentes de la capa del cuerpo de células piramidales en CA3, y en el estrato lucidum, donde terminan las fibras musgosas (Mamounas, Mullen, O'Hearn & Molliver, 1991).

En el campo CA2 la innervación es similar a la de CA3, con la diferencia de que hay un número moderado de axones serotoninérgicos ramificados dentro de la capa de células piramidales (Hensler, 2006).

En el límite entre CA2 y CA1, la densidad de axones disminuye abruptamente. Está presente una parte o franja estrecha de axones protuberantes serotoninérgicos en el estrato lacunoso molecular de CA1, mientras que en el estrato oriens y estrato radiado del mismo campo son inervados casi exclusivamente por axones serotoninérgicos finos (Mamounas *et al.*, 1991).

Cabe mencionar que los tipos de axones serotoninérgicos presentan diferencias morfológicas relacionadas con el núcleo de origen en el rafe, pues en el núcleo de rafe medial son relativamente gruesos con grandes varicosidades esféricas (fibras tipo M); en contraste con axones del núcleo

de rafe dorsal que son muy finos y típicamente tienen pequeñas varicosidades pleomórficas (Kosofsky & Molliver, 1987).

Estas variedades morfológicas de axones presentan diferencias en las propiedades electrofisiológicas que caracterizan al rafe dorsal, como la actividad rítmica lenta en células activas espontáneamente, con potencial de acción de larga duración y grandes potenciales de hiperpolarización tardía; el rafe medial se caracteriza por presentar pequeña amplitud en sus potenciales de hiperpolarización tardía, corta duración de potenciales de acción, y pequeña resistencia de membrana (Kirby *et al* 2003, Beck *et al* 2004).

Receptores a serotonina y función

Se han encontrado al menos siete tipos de receptores a Serotonina, clasificados según las propiedades estructurales y funcionales, además de la afinidad y susceptibilidad a sus agonistas o sus antagonistas (Barnes & Sharp, 1999). Los receptores 5HT_{1A,B/D}, 5HT_{2A,C}, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆, y 5HT₇ son de carácter metabotrópico, en su mayoría acoplados a proteínas G, involucrados en la regulación de dos vías de segundos mensajeros, la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (Hoyer, 2002). El receptor 5HT₃ es el único de carácter ionotrópico y se caracteriza por permitir el paso de cationes (Nestler *et al.*, 2001). El receptor 5HT_{1A} funciona como autoreceptor en terminales somato-dendríticas reduciendo el disparo, síntesis y liberación de serotonina, al igual el 5HT_{1D} en roedores (5HT_{1B} en humanos) se encuentran solamente en terminales axónicas y generalmente disminuye la liberación del transmisor.

Desde el punto de vista funcional, hay evidencia de que la activación o bloqueo de receptores a serotonina ejercen una variedad de efectos sobre los procesos de aprendizaje y memoria, esto dependiendo del tipo de receptor, su localización en las estructuras del cerebro y el paradigma

conductual utilizado (Harvey, 2003). Por ejemplo, la administración del agonista del receptor 5-HT_{2A/2C} o 5-HT₄ o bien la administración de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₃ y 5-HT_{1B} previenen el deterioro de la memoria y facilitan el aprendizaje, ya sea por inhibición directa o indirecta de la actividad de las células del hipocampo (Buhot, Martin & Segu, 2000). Además, algunos autores han evidenciado que la manipulación farmacológica de los receptores 5HT₁-5HT₇ o de los sitios de recaptura de la serotonina modulan la consolidación de la memoria, lo cual es consistente con que la serotonina juega un papel clave en la formación de la memoria (Meneses, 2007).

La Serotonina en aprendizaje y memoria espacial.

Existen evidencias que muestran poca repercusión del abatimiento de serotonina sobre el aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. Se ha observado que cuando se abate o se interfiere con el sistema serotoninérgico no se afecta el desempeño en el aprendizaje y memoria espacial. Por ejemplo, luego del abatimiento de 5HT mediante la aplicación de 5,7 Dihidroxitriptamina (5,7-DHT) i.c (selectivo de terminales serotoninérgicas) en todo el cerebro, en pruebas del laberinto acuático de Morris y de Olton se ha observado que no hay alteraciones en el desempeño de la rata (Altman, 1990). De igual manera cuando las ratas son tratadas con PCA (p-chloroanfetamina) (Altman, Ogren, Berman & Normile, 1989), PCPA (Chlorophenylalanina) (Richter-Levin & Segal, 1989) o inyección intra-rafe de Dihidroxitriptamina, no tiene efecto en el desempeño en tareas de memoria espacial ya sea en el laberinto radial o acuático de Morris (Asin, Wirtshafter & Fibiger, 1985). Sin embargo la deafferentación serotoninérgica del hipocampo facilita el aprendizaje de discriminación espacial con reforzamiento positivo (Alman et al., 1990). Por otro lado la inyección intraventricular de 5,7-DHT tiene un efecto moderado sobre el desempeño de ratas en tareas de laberinto acuático

(Nilsson et al., 1986). La administración intra-hipocampal del neurotóxico tampoco genera alteraciones en la prueba del laberinto acuático de Morris (Altman et al., 1990).

Pese a ello, Altman, sugiere que la serotonina ejerce una influencia negativa sobre una o más vías hipocampales críticas para el procesamiento de información espacial dependiente del hipocampo (Altman, 1990). Olvera-Cortés (2003), encontro que la disminución parcial de serotonina hipocampal, es capaz de producir deficiencias moderadas en el aprendizaje espacial de señal, sin verse alterado el de lugar; ocurriendo lo contrario cuando se incrementa la actividad serotoninérgica pues se observaron deficiencias en el aprendizaje de lugar, sin afectar el aprendizaje de señal (Olvera-Cortés 2003). Recientemente se ha observado que al eliminar la serotonina en 98-100% la serotonina del hipocampo, ocurre una facilitación en el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo (Gutiérrez-Guzmán et al; enviado a publicación).

La serotonina como desincronizador del EEG hipocampal.

Existen evidencias anatómicas de aferentes serotoninérgicos hacia el hipocampo, complejo septal/banda diagonal de Broca, al nSUM-nHP y a nivel del tallo del cerebro en el nTPP y nRPO. Se ha propuesto que la serotonina es capaz de modular la actividad de neuronas colinérgicas y ejercer además un efecto inhibitorio sobre las terminales colinérgicas del hipocampo y SM de la rata, ya sea por contactos axónicos directos sobre células piramidales del hipocampo o indirectamente vía interneuronas locales GABAérgicas (sobre una subpoblación de células positivas a Calbindina) y mediante la difusión a distancia (transmisión por volumen) sobre células piramidales que presentan receptores a serotonina (Miettinen & Freund, 1992). Además, recientemente se ha conocido que la serotonina también actúa inhibiendo mediante mecanismos semejantes a los observados en el hipocampo (Miettinen & Freund, 1992) las células

glutamatergicas en los diferentes relevos del sistema sincronizador ascendente (Vertes, 2005).

En diversos experimentos, se ha observado que cuando se estimula al rafe mesencefálico se desorganizan las ráfagas de la actividad theta y disminuye su frecuencia paralelamente a la inhibición de la ocurrencia de actividad theta (Vertes et al., 1986), además, la estimulación eléctrica de RM o bien la aplicación de 5-HT mediante iontoforesis inhiben el disparo de células piramidales hipocampales (Segal, 1975) y desincronizan el EEG hipocampal (Kitchigina, Kudina, Kutyreva & Vinogradova, 1999; Vertes, 1981). En otros estudios la lesión específica de RM produce la presencia de actividad theta hipocampal continua y persistente (Yamamoto et al., 1979; Maru, Takahashi & Shinkuro, 1979; Vertes, 1986; Vinogradova, 1995), mientras que la lesión 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 potenciación de larga duración (LTP), tras estimulación septal, pues disminuye a 6.9 Hz (McNaughton et al., 1980). Por otro lado, se ha mostrado que la inhibición de neuronas serotoninérgicas por agonistas selectivos al receptor 5HT1A induce actividad theta hipocampal en gatos en libre movimiento (Marrosu, Fornal, Metzler & Jacobs, 1996), y la aplicación de agonistas al receptor 5HT1A en el RM genera trenes largos y continuos de actividad theta en ratas anestesiadas (Vertes, Kinney, Kocsis & Fortin, 1994), mientras que la disminución de 5HT hipocampal incrementa el tamaño de la población de espigas en GD (Richter-Levin, Greenberger & Segal, 1994). La administración sistémica de agonista al receptor 5HT2C inhibe las oscilaciones theta del MS/BDBv y la actividad de ondas theta en el hipocampo, mientras que cuando se aplican antagonistas selectivos a 5HT2C, esa inhibición es revertida e induce oscilaciones y actividad theta hipocampal, en ratas anestesiadas (Hajos, Hoffmann & Weaver, 2003), por lo tanto este receptor

participa en la mediación de la acción inhibitoria de serotonina sobre la actividad theta.

En relación a lo anterior Vinogradova y colegas concluyen que: “el núcleo de rafe medial puede ser considerado como un antagonista funcional de la formación reticular, suprimiendo poderosamente el disparo theta de neuronas del área septal medial y el ritmo theta hipocampal” (Vinogradova et al., 1999).

Sin embargo otros de los estudios en los que se ha tratado de ver el posible papel de la serotonina en la modulación del EEG hipocampal, han traído resultados muy poco concordantes con los resultados mencionados anteriormente, ya que se ha observado que al eliminar parcialmente la serotonina del hipocampo no produce alteraciones en la frecuencia de la actividad theta hipocampal, pero cuando la actividad serotoninérgica es incrementada ocurre una disminución de la potencia de la actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5Hz) (Olvera-Cortes, 2003). Además recientemente Gutiérrez-Guzmán et al., (*in Press*) eliminarón en un 98-100% la serotonina del hipocampo, y se observó que paralelamente ocurre la separación de las bandas de baja y alta frecuencia un día antes que los otros grupos, es decir ocurre un incremento de la banda de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) antes, además se observó un mayor incremento de theta con respecto al basal durante los ensayos de búsqueda (en el cual se procesa información) también desde el segundo día de entrenamiento hasta el resto de la prueba, y esto no ocurrió en el grupo control.

Como ya se ha mencionado, la actividad theta se presenta durante conductas asociadas a la adquisición de información, y tiene un papel muy importante en la potenciación de larga duración (PLD). Se ha sugerido que la 5HT media la desincronización de theta suprimiendo la PLD y la memoria (O'Keefe & Nadel, 1978; Staubli & Otaky, 1994), es decir, la 5HT podría bloquear o suspender temporalmente los procesos mnesicos del hipocampo (Vertes, 2005). En relación a esto, se ha propuesto que la

información que llega al hipocampo, durante estados en que predomina la actividad theta, es guardada por lo menos temporalmente en el mismo, mientras que aquella información que llega en ausencia de theta no es codificada; al menos no al mismo grado que alcanza la información que llega al hipocampo concurrente con theta (Vertes & Kocsis 1997). Con ello se ha sugerido que el sistema serotoninérgico originado en el rafe medial puede ser una importante parte del sistema directo de conexiones al hipocampo, hasta cierto punto encargado de la capacidad de ignorar eventos ambientales no significativos (Vertes, 2005), como un mecanismo de selectividad de información, para solo codificar la información relevante.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la actividad theta hipocampal está involucrada en funciones de procesamiento de la información espacial y en la formación de memoria dependiente del hipocampo. Además existen evidencias de que en el hipocampo ocurre la generación de la actividad theta y dicha actividad hipocampal está controlada por la influencia de un sistema de conexiones que se originan en el tallo cerebral con relevos en el núcleo supramamilar y núcleo hipotalámico posterior del diencefalo caudal (para la codificación de la frecuencia y amplitud), que envían proyecciones al área septal (que actúa como marcapaso) e hipocampo, conformando las vías multisinápticas de sincronización ascendente para el control de la actividad theta hipocampal.

Por otro lado, se ha propuesto que existe un sistema antagonico o desincronizador de la actividad theta también originada en el tallo del cerebro, este sistema corresponde al serotoninérgico que se origina en los núcleos del rafé que tienen una densa inervación hacia el hipocampo y a los diferentes niveles de las vías multisinápticas de sincronización ascendente. Las evidencias que han llevado a suponer dicho efecto desincronizador por parte de la serotonina se basa en experimentos de lesión/antagonistas que aumentan la actividad theta hipocampal, y a la aplicación de estimulación/agonistas, los cuales suprimen o desincronizan la actividad theta rítmica del hipocampo en ratas anestesiadas. En este mismo sentido, se ha observado que cuando se interfiere en el sistema serotoninérgico directamente en el hipocampo ocurre una facilitación en el aprendizaje asociado a un aumento y predominio de actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) un día antes que los otros grupos, además de un mayor incremento de actividad theta con respecto al basal durante los ensayos de búsqueda de la plataforma en la laberinto acuático de Morris (se procesa información) también desde el segundo día de entrenamiento hasta el resto del a prueba, efecto que no fue observado en el grupo

control. Esto estaría de acuerdo con la teoría de la serotonina como desincronizador, sin embargo suponemos que un efecto mayor sobre ambos (conducta y actividad theta) ocurrirá a partir de la eliminación de serotonina en otros puntos de la vía sincronizadora ascendente como los núcleos nSUM y nHP los cuales reciben inervación serotoninérgica y juegan un importante papel regulador sobre la fisiología hipocampal, ya que forman una crítica área nodal en el diencéfalo caudal y actúan sinérgicamente para la codificación de la amplitud y/o frecuencia de la actividad theta.

Por lo anterior resulta importante estudiar la contribución del sistema serotoninérgico en la modulación de la actividad theta en los diferentes niveles de las vías de sincronización ascendente, particularmente a nivel del diencéfalo caudal, dada la importante relación anatómico-funcional que existe con el hipocampo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la eliminación de la serotonina del núcleo supramamilar y del núcleo hipotálamico posterior sobre la actividad theta hipocampal y supramamilar subyacente al aprendizaje espacial dependiente del hipocampo, en la rata.

Objetivos específicos:

- Evaluar el aprendizaje espacial de ratas después del abatimiento de serotonina del núcleo supramamilar y del núcleo hipotálamico posterior.
- Evaluar la actividad theta hipocampal y supramamilar subyacente al aprendizaje espacial de ratas después de eliminar la serotonina del núcleo supramamilar y del núcleo hipotálamico posterior.

V. HIPOTESIS

La eliminación de la serotonina de los núcleos supramamilar e hipotalámico posterior modificará el aprendizaje espacial en asociación con alteraciones en la potencia de la actividad theta del hipocampo y nSUM.

Hipótesis específicas:

- La eliminación de serotonina de los núcleos supramamilar e hipotalámico posterior producirá una facilitación en el aprendizaje espacial.
- La eliminación de serotonina de los núcleos supramamilar e hipotalámico posterior generará un aumento en la potencia de la actividad theta de alta frecuencia del hipocampo y la región nSUM.

VI. METODOLOGÍA

Se utilizaron 26 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350 a 450 gr de peso, mantenidas en un bioterio bajo condiciones estándar, con un ciclo de luz oscuridad de 12 por 12 horas (7-19 hrs), con suministro de alimento y agua *ad libitum*, los cuales fueron asignados a los diferentes grupos al azar.

Los animales fueron divididos en dos grupos:

Grupo experimental (n=11), se les realizó la lesión de los aferentes serotoninérgicos del núcleo supramamilar y el núcleo hipotalámico posterior con el neurotóxico 5,7-Dihidroxitriptamina (5,7-DHT), y en el mismo procedimiento quirúrgico se les realizó el implante crónico de electrodos de registro, uno en la región de CA1 y otro en la región del giro dentado del hipocampo dorsal derecho, el tercer electrodo fue colocado en el núcleo supramamilar del hipotálamo.

Al **grupo control** (n=15), les fueron implantados tres electrodos de registro al igual que el grupo experimental, pero a diferencia de éste, en los núcleos se aplicó la solución vehículo (solución salina) del 5,7-DHT.

Procedimiento de Lesión Estereotáxica.

En primer lugar las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital Sódico (50mg/kg), administrado por vía intraperitoneal (ip). Media hora antes de realizar la lesión neurotóxica, los animales recibieron 30 mg/kg de desipramina (ip), con la finalidad de proteger las terminales noradrenérgicas y dopaminérgicas para evitar la captura del neurotóxico.

Para la lesión del sistema serotoninérgico de los núcleos diencefálicos ya mencionados, los animales del grupo experimental recibieron la aplicación del neurotóxico 5,7- Dihidroxitriptamina (5,7-DHT) disuelta en solución

salina al 0.1 % con ácido ascórbico (4 μg de base libre de 5,7-DHT en 0.4 μl de solución salina). Al grupo control solo se le aplicó solución salina.

El procedimiento consistió en aplicar bilateralmente una microinyección del neurotóxico en el núcleo supramamilar (dosis 2 μg /0.1 μl a una velocidad de flujo 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 4 minutos, de forma bilateral) y otra en el núcleo hipotalámico posterior (dosis 2 μg /0.1 μl a una velocidad de flujo 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 4 minutos, de forma bilateral), de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas de Paxinos: 4.7 mm posterior a Bregma, 0.2 mm bilateral a la línea media y 8.7 mm dorsoventral a la superficie del cráneo para lesionar el nSUM, y para el núcleo hipotalámico posterior (nHP) las coordenadas fueron 3.7 posterior a Bregma, 0.3 mm bilateral a la línea media y la profundidad de 8.2 mm dorsoventral a la superficie del cráneo.

En el mismo procedimiento quirúrgico se realizó el implante de los electrodos previamente mencionados. Un electrodo bipolar concéntrico, en el estrato oriens/piramidal del área CA1 del hipocampo derecho con coordenadas estereotáxicas 4.5 mm posterior a Bregma, 2.5 mm lateral a la línea media y 2.4 mm dorsoventral a la superficie del cráneo (Paxinos & Watson, 1998), el segundo electrodo en la región de GD con coordenadas 3.5 mm posterior a Bregma, 1.5 mm lateral a la línea media y 4.4 mm dorsoventral a la superficie del cráneo y el tercer electrodo en la región del núcleo supramamilar en las mismas coordenadas de lesión. Los electrodos bipolares fueron contruidos con alambre de nicromo de 65 μm de diámetro, fijado dentro de una cánula de acero inoxidable calibre 25 cubierta con resina epóxica, y se dejó expuesta una punta con una pequeña superficie de registro. Se colocó sobre el hueso del cráneo un tornillo de acero inoxidable que sirvió como electrodo de tierra. Una vez terminada la cirugía tanto de lesión como del implante de electrodos, se les aplicó la inyección de un antibiótico y analgésico. Posteriormente se les

dejó a los animales en recuperación durante 15 días para poder realizar las evaluaciones conductuales y el registro del EEG.

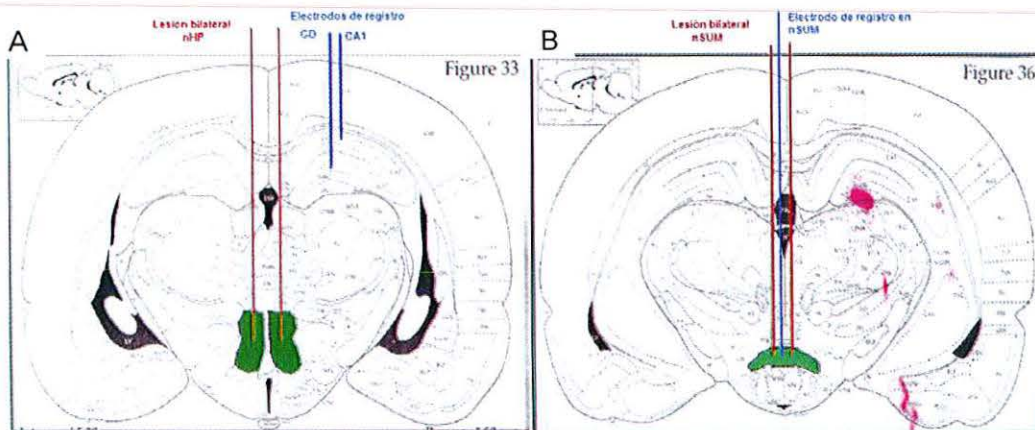


Figura 9. Esquema representativo (corte coronal) de la localización de los núcleos de interés y la colocación de los electrodos de registro en el hipocampo. Tomado de Paxinos y Watson, 1998. A. Núcleo Hipotalámico posterior (nHP), GD y CA1 del hipocampo dorsal. B. Núcleo Supramamilar (nSUM).

Evaluación conductual

Para evaluar el aprendizaje de lugar se utilizó el laberinto acuático de Morris, que consiste en una tina circular de 150 cm de diámetro llena con agua mantenida a 30 °C y teñida o coloreada en azul oscuro para evitar que la rata vea una plataforma de cristal de 12X12 cm que se mantuvo colocada 2 cm bajo la superficie del agua en una posición fija en un solo cuadrante, además se colocaron señales espaciales en el cuarto de registro, alrededor del laberinto.

La prueba consistió en 4 ensayos diarios con intervalo inter-ensayo de 2 minutos, durante 6 días consecutivos (esta establecido que 6 días son suficientes para aprender la prueba y alcanzar un nivel asintótico de desempeño) y si durante el transcurso de cada ensayo, la rata no encontraba la plataforma en 60 segundos, se le colocaba sobre la plataforma por un periodo de 15 segundos. Con el objetivo de evaluar el grado de aprendizaje y determinar el tipo de estrategia utilizada para resolver la prueba, en el día 7 se realizó solamente un ensayo de prueba, el

cual consistió en colocar al animal en la tina sin la plataforma y se le permitió que la buscara durante 30 segundos.

En cada ensayo se dejó al animal partir aleatoriamente de diferentes puntos y de cara a la pared de la tina. La rata tuvo que aprender a llegar a la plataforma de escape.

Las rutas de nado fueron grabadas con una cámara de video y posteriormente se trazaron las rutas para ser digitalizadas y analizadas con la ayuda de un analizador de imágenes digital. Se promediaron los resultados de los 4 ensayos diarios de cada rata por grupo y se analizaron y compararon estadísticamente.

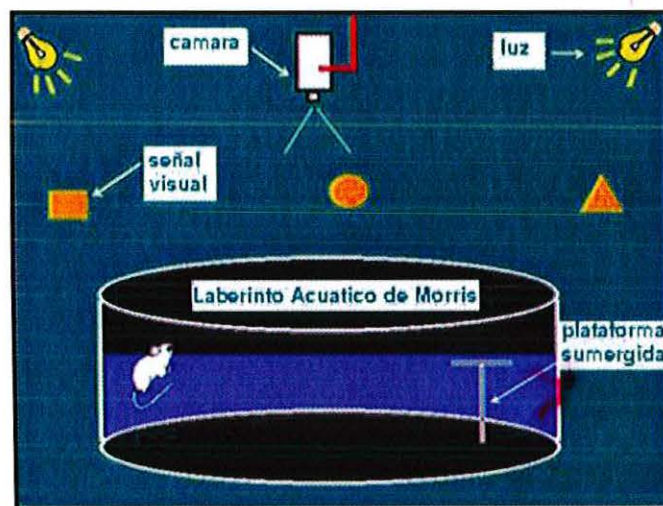


Figura 10. Representación esquemática del cuarto donde se evaluó a las ratas en el laberinto Acuático de Morris. Modificado de <http://www.mcg.edu/Core/Labs/sabc/Morriswatermaze.htm>

Las variables conductuales que se consideraron fueron las siguientes:

- Variables dependientes
 1. Latencia de escape: tiempo que toma el animal en localizar la plataforma. Dicha latencia fue obtenida por cada ensayo por día de entrenamiento.
 2. Distancia total recorrida por cada animal durante la búsqueda de la plataforma por cada ensayo, por día de entrenamiento.

3. Velocidad de nado, calculada a partir de la relación del promedio de los 4 ensayos de latencia y distancia recorrida.
4. Número de cruces por el área del cuadrante donde se ubicaba la plataforma, en la prueba de ensayo sin plataforma.

- Variables independientes

Número de fibras inmunoreactivas a serotonina (lesionados y no lesionados) y los días de entrenamiento.

Registro del EEG hipocampal

El registro de la actividad eléctrica hipocampal se realizó durante la ejecución de las pruebas conductuales.

Antes del inicio del primer ensayo de cada día de los 6 días de entrenamiento se realizó el registro del EEG hipocampal en condición basal con la rata mojada en estado “*Atento quieto*” durante 15 segundos en su caja de reposo; durante la etapa de “*búsqueda*” se registró desde la colocación de la rata en el agua frente a la tina hasta que el animal subió a la plataforma de escape en un tiempo no mayor a 60 segundos, momento a partir del cual se registraron 15 segundos sobre la plataforma, lo que correspondió a la etapa llamada “*meta*”. Al séptimo día en el ensayo de prueba, además del registro basal, también se registro un periodo de 30 segundos sin plataforma correspondiente al ensayo de prueba descrito previamente.

Los filtros de alta y baja frecuencia fueron colocados a 1 y 100 Hz respectivamente, los registros se capturaron a una frecuencia de muestreo de 512 Hz, y se almacenaron para su análisis posterior mediante la Transformada Rápida de Fourier (FFT), que genera el espectro de potencia absoluta y con base a ese de detrimino la potencia relativa.

Para la captura de la actividad EEG se utilizó el programa Polyview (Marca GRASS), posterior a ello se reviso la señal con el objetivo de eliminar

aquellos segmentos con ruido y artefactos que pudieran estar presentes, a través del programa CHECASN2. La señal de cada uno de los sitios de registro fue procesada mediante la FFT a través del programa EEGmagic (Guevara & Hernández-González, 2009) y se realizó el análisis estadístico de los datos de potencia resultantes a través del mismo programa y de Systat V5.

Las variables consideradas del EEG fueron:

DEPENDIENTES: Potencia relativa de las sub-bandas de la actividad theta

- Se midió la potencia relativa del promedio de los cuatro ensayos diarios de cada día de prueba, en cada una de las etapas conductuales, para cada sitio de registro.

INDEPENDIENTES

- Grupo lesionado y no lesionado, día de entrenamiento (1-6) y etapa de registro (basal, búsqueda, meta) por cada sub-banda.

La banda theta (4-12 Hz) fue dividida en sub-bandas de baja (4-6.5 Hz), alta (7-9.5 Hz) y máxima (10-12.5 Hz) frecuencia para su análisis, ya que se ha reportado que dependiendo del estado conductual y farmacológico en el que se encuentra el individuo ocurre el predominio de una u otra sub-banda (Vinogradova, 1995; Olvera-Cortés et al., 2002, 2004, Vanderwolf, 1988). Es decir hay estados conductuales en los que las bandas se agrupan en un rango discreto, y solo en ese rango se pueden presentar cambios asociados al estado conductual. Particularmente en el presente estudio se observó que en animales normales la mencionada división de sub-bandas de theta presentó reactividad o cambios asociados a la conducta.

Preparación de animales para la Inmunohistoquímica

Para verificar el contenido de serotonina se utilizó la técnica de inmunohistoquímica. Para esto primeramente se perfundieron las ratas vía intracardiaca con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (pH 7.4) suplementada con heparina (1000U/lit) y procaína como vasodilatador (1gr/1lit). Posteriormente, se fijaron los cerebros con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). Inmediatamente después de la perfusión, se obtuvieron los cerebros y se mantuvieron en solución fijadora por varias semanas hasta el inicio de la inmunohistoquímica. Para el proceso de inmunohistoquímica, se realizaron cortes coronales de 40µm de espesor en un vibratomo; estos se lavaron en amortiguador de PBS 0.1M para su posterior procesamiento en la determinación de fibras inmuno-reactivas a serotonina del núcleo supramamilar y núcleo hipotalámico posterior de cada rata.

Inmunohistoquímica para fibras serotoninérgicas

La técnica se llevo a cabo en tejidos flotantes. La cual consistió en lo siguiente; una vez lavados los tejidos con solución lavadora para inmunohistoquímica (PB 0.1M pH 7.4; albumina bovina 1 gr; Triton X-100 1ml) se procedio a bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrogeno (0.6%; metanol 10%; PB 0.1 M) durante 30 minutos y se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con solución lavadora. Inmediatamente después, los cortes fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con suero de cabra al 3% en solución de lavado y se procedio a incubarlos durante 36 horas a 4 °C en la oscuridad con el anticuerpo primario (Anti-serotonina hecho en conejo IgG; 2% de suero de cabra; solución de lavado) a una dilución de 1:1000. Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado, los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con suero de cabra al 3% en solución de lavado, posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad con el anticuerpo

secundario (biotinilado anti-conejo IgG; suero de cabra 3%; solución de lavado) a una dilución de 1:200. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con el Complejo Abidina Biotina (ABC). El revelado del marcaje inmunohistoquímico se realizó con Diaminobencidina (DAB) al 0.5%; 0.1 % de peróxido de hidrogeno; PB 0.1M durante 3 minutos. Finalmente, los cortes fueron lavados para eliminar los restos de DAB, se montaron los cortes en portaobjetos y se dejaron secar para inmediatamente colocar resina (Cytoseal 60) y observar al microscopio. Se analizaron los cortes en un microscopio de campo claro Carl Zeiss y se tomaron fotografías con una cámara digital AxioCam. El análisis de la estimación del número de fibras se realizó de la siguiente manera: las secciones se analizaron con el objetivo de 40x y se realizaron 3 conteos del número de fibras en un campo de 1mm² de forma bilateral en 3 a 6 cortes por animal (abarcando la parte anterior, medial y posterior de cada núcleo).

El mismo proceso de inmunohistoquímica sirvió para verificar la posición de los electrodos de registro en la región de CA1 y Giro dentado del hipocampo dorsal derecho y del Núcleo supramamilar.

Estadística.

En lo que respecta a las variables conductuales, la latencia se comparó mediante estadística no paramétrica. Se hicieron comparaciones intragrupalas de la mediana de las latencias promedio por día, aplicando en análisis de varianza de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon. Así mismo, los datos fueron comparados intergrupalmente mediante la prueba de Kruskal-Wallis y por la "U" de Mann-Whitney.

La distancia total recorrida y velocidad de nado fueron comparadas mediante un ANOVA para medias repetidas y como análisis *post-hoc* la prueba de Tukey.

Las comparaciones de la potencia relativa fueron realizadas mediante un análisis de varianza de medidas repetidas y parcelas divididas de tres factores (grupo, día y etapa) por banda, y como prueba *post-hoc* se aplicó la prueba de Tukey. Se realizó la comparación entre etapas (basal, búsqueda, meta) en un mismo día de prueba y por día de prueba en una misma etapa.

Para el análisis del número de fibras inmureactivas a serotonina, se aplicó un ANOVA.

Diagrama de la metodología general

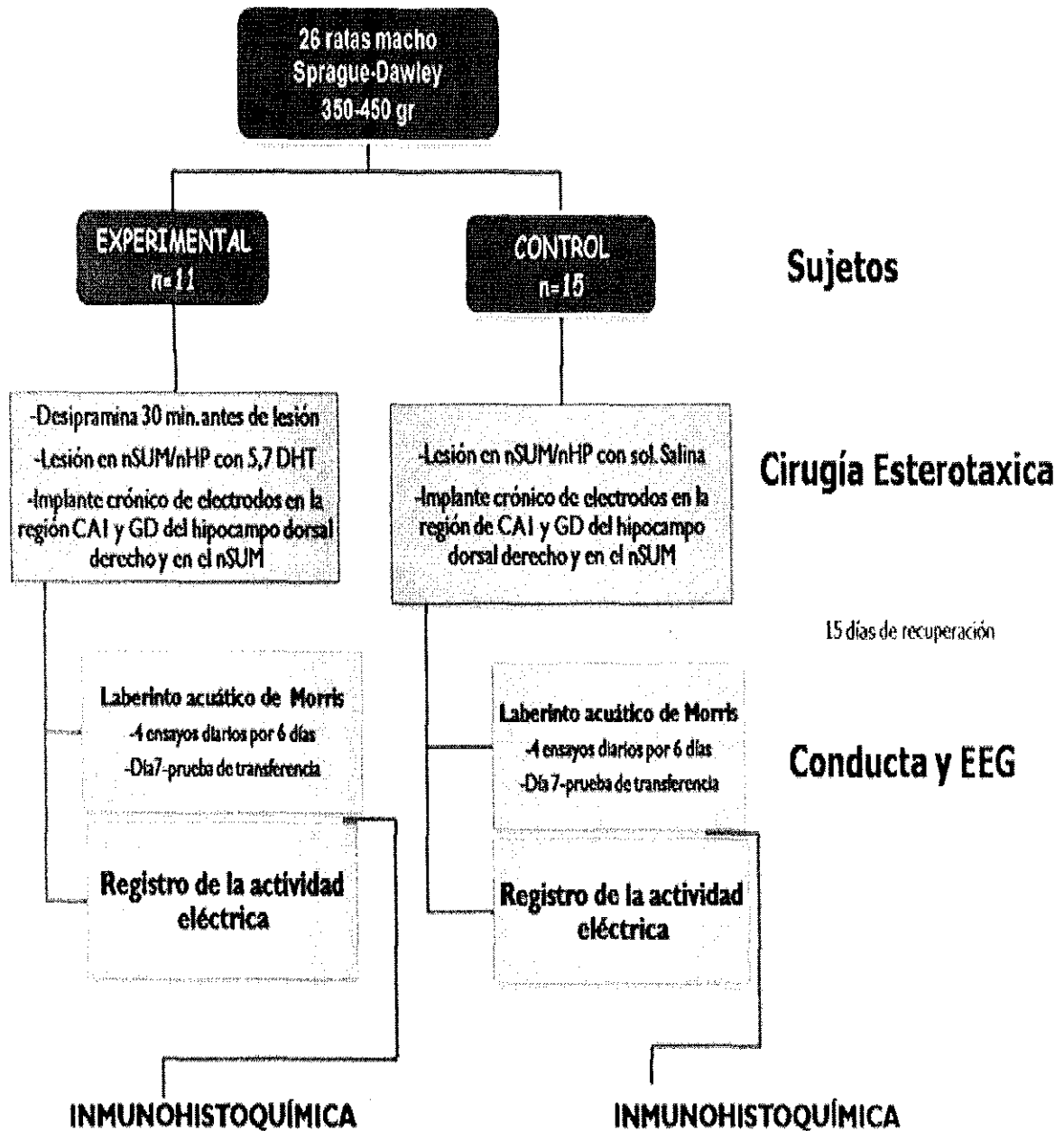


Figura 11. Diagrama de la metodología general. Dos grupos, uno experimental y uno control. La evaluación conductual y el registro EEG se realiza de forma simultánea. Posteriormente se perfunde y fija el cerebro de los animales para realizar el análisis histológico y para la determinación de la cantidad de fibras inmunoreactivas a serotonina que se realiza por la técnica de inmunohistoquímica.

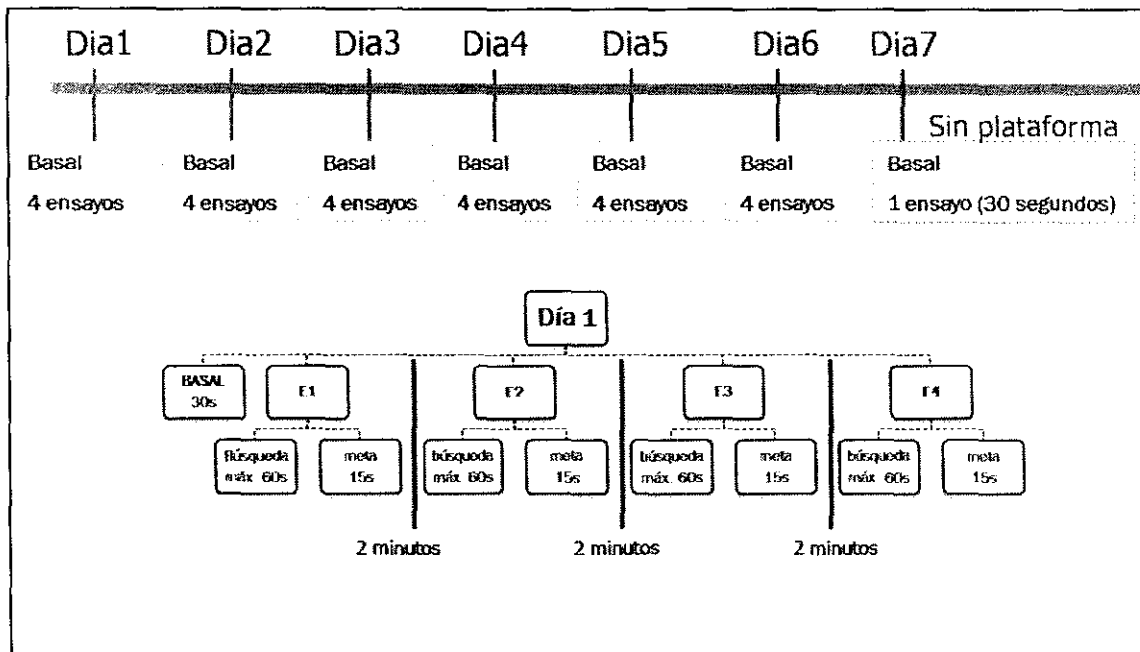


Figura 12. Diagrama representativo de la evaluación conductual durante los diferentes días de entrenamiento. Cada día hay un registro basal y 4 ensayos. Un ensayo consiste en una búsqueda (búsqueda de la plataforma de escape) y la etapa meta (localización y subida sobre la plataforma de escape). Hay un periodo interensayo de 2 minutos. El registro del EEG se realiza durante las 3 etapas: basal, búsqueda y meta de cada uno de los ensayos por cada día. El día 7 de prueba, se quita la plataforma de la tina y se le deja al animal buscar por un único periodo de 30 segundos. E1-E4 (número de ensayos). En la parte de debajo de la figura se representa la evaluación de un día (esto se repite hasta el día 6).

VII.RESULTADOS

Análisis inmunohistoquímico.

El análisis inmunohistoquímico permitió verificar la posición de los electrodos de registro del hipocampo (GD, CA1) y del núcleo supramamilar (nSUM). Los animales que no cumplieron con el criterio de una adecuada localización del electrodo y extensión de la lesión, fueron eliminados de la muestra. En la parte A de la siguiente figura se muestra como la punta del electrodo alcanza el estrato oriens-piramidal de CA1 del hipocampo dorsal derecho; en la parte B se observa la localización del electrodo en estrato granular del Giro dentado, y en la parte C, se observa el electrodo en el núcleo Supramamilar. Figura 13.

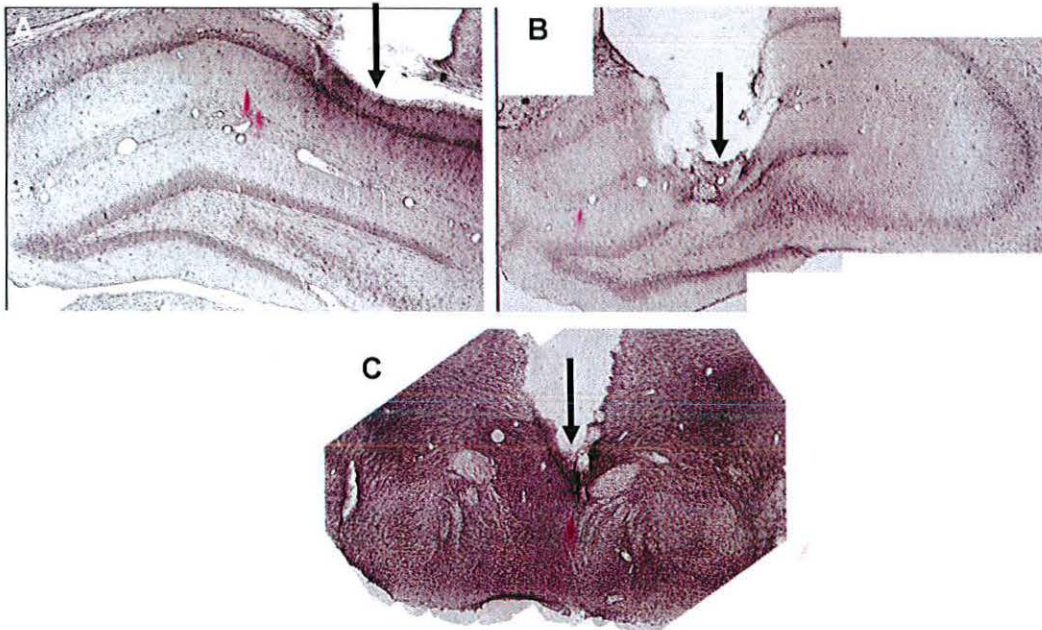


Figura 13. Fotomicrografía de las regiones CA1 y GD del hipocampo y nSUM de la rata en un corte coronal con respecto a su eje transversal. La flecha negra, indica la posición en que estuvo el electrodo de registro. Magnificación, 5X; Tinción con inmunohistoquímica.

A través del análisis inmunohistoquímico se determinó el número de fibras inmunoreactivas a serotonina en los núcleos supramamilar e hipotalámico posterior y se obtuvo que el grupo experimental presento una reducción significativa (0.001) en el número de fibras serotoninérgicas observadas en ambos núcleos (nSUM-nHP) (0.001) con respecto al grupo control.

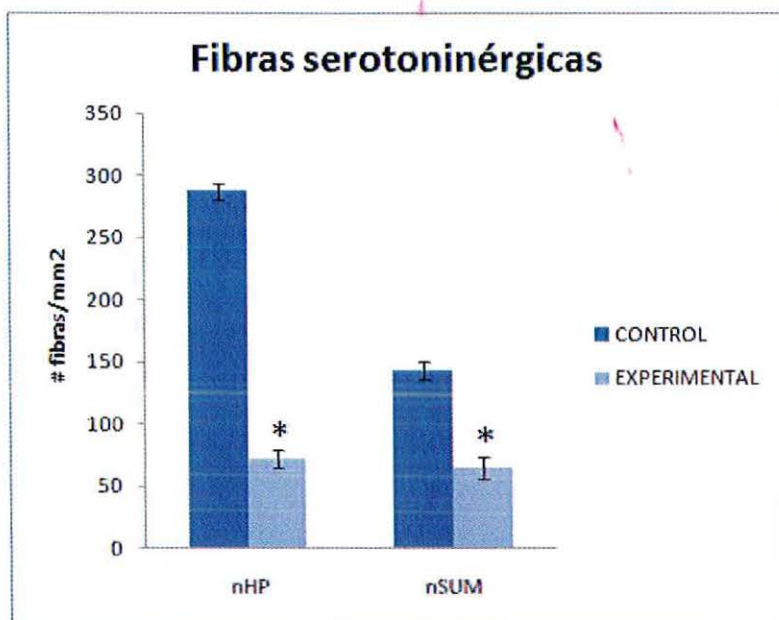


Figura 14. Comparación del número de fibras inmunoreactivas a serotonina (5HT) en los núcleos hipotalámico posterior (nHP) y supramamilar (nSUM) de cada grupo. Media \pm error estándar. *, Control vs Experimental. $P \leq 0.05$

EVALUACIONES CONDUCTUALES

Latencia de escape.

Los animales del grupo control mostraron un aprendizaje eficiente ($X^2=37.952$, $p \leq 0.001$), ya que disminuyeron significativamente la latencia de escape con respecto al primer día, a partir del tercer día ($p=0.005$) hasta el sexto día de entrenamiento ($p=0.002$, $p=0.001$, $p=0.001$; días 4, 5 y 6 respectivamente). Por su parte el grupo experimental ($X^2=10.584$, $p=0.060$), mostró una disminución significativa en su latencia con respecto

al primer día, solamente el ultimo día de entrenamiento ($p=0.021$). Figura 15

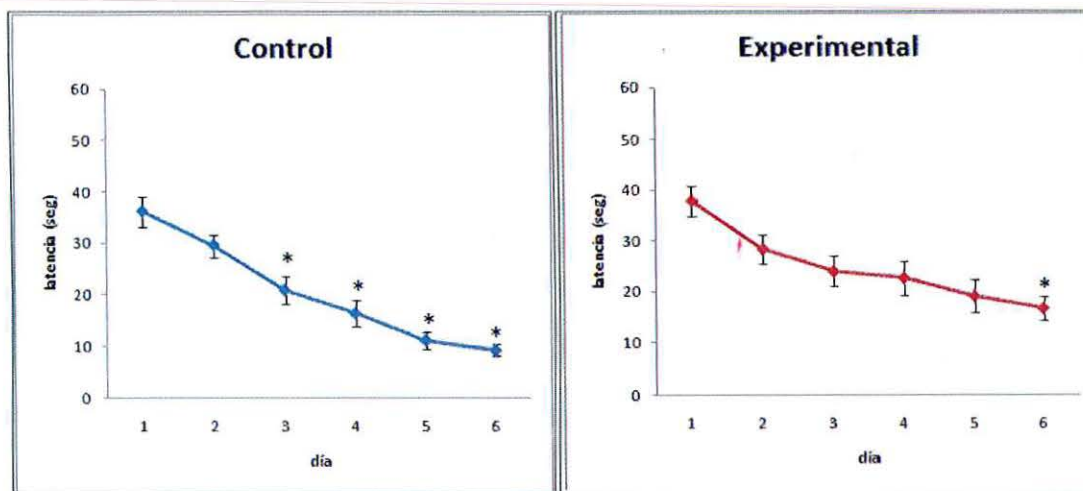


Figura 15. Latencia de escape obtenida por los animales entrenados de los dos grupos. Mediana \pm error estándar de la mediana. *, día 1 vs siguientes; grupo control ($n=15$); grupo experimental($n=11$). $p \leq 0.05$.

En el análisis intergrupar no hubo diferencia significativa en la latencia de escape en ningún día de entrenamiento (grafica no mostrada).

Distancia.

Con respecto a la distancia, el ANOVA del grupo control dio significativa [$F(5,54) = 14.595$, $p < 0.001$]. El promedio de recorrido por día y de acuerdo al análisis intragrupal del grupo control se mostró una reducción significativa en la distancia del día 3 con respecto al primer día 3 ($p=0.005$) y hasta el sexto día de entrenamiento ($p=0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ para los días 4, 5 y 6 respectivamente). Por su parte el ANOVA del grupo experimental no mostro significancia [$F(5,50) = 2.451$, $p=0.074$] y no ocurrió una reducción significativa en la distancia recorrida en ningún día de entrenamiento con respecto al día primero. Figura 16

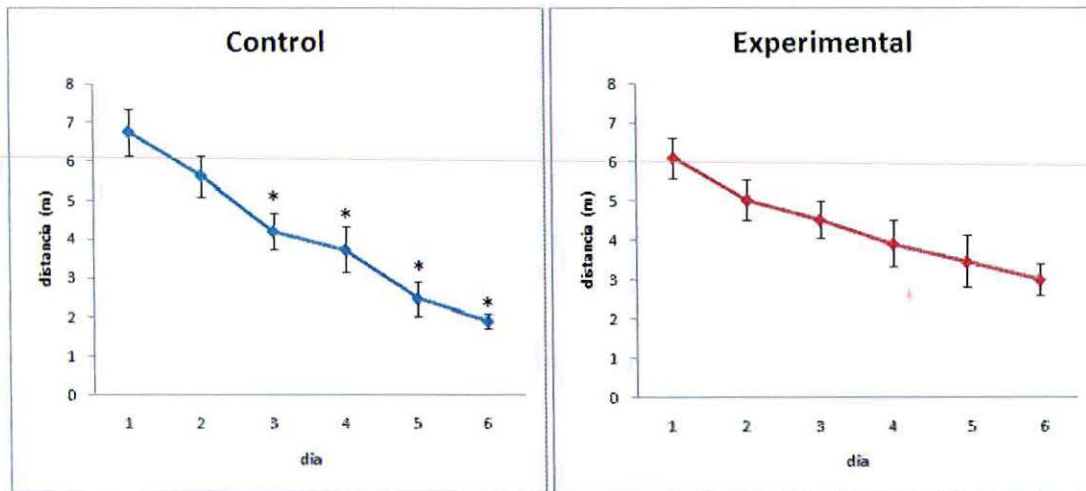


Figura 16. Distancia recorrida por los animales entrenados de cada grupo. Media \pm error estándar de la media. *, día 1 vs siguientes; grupo control (n=15); grupo experimental (n=11). $p \leq 0.05$.

No hubo diferencias intergrupales en la distancia recorrida (grafica no mostrada).

A continuación se muestra de forma representativa lo realizado en las rutas de nado de los animales incluidos en cada grupo durante la prueba del laberinto acuatico de Morris.

Rutas de nado representativas de un animal de cada grupo.

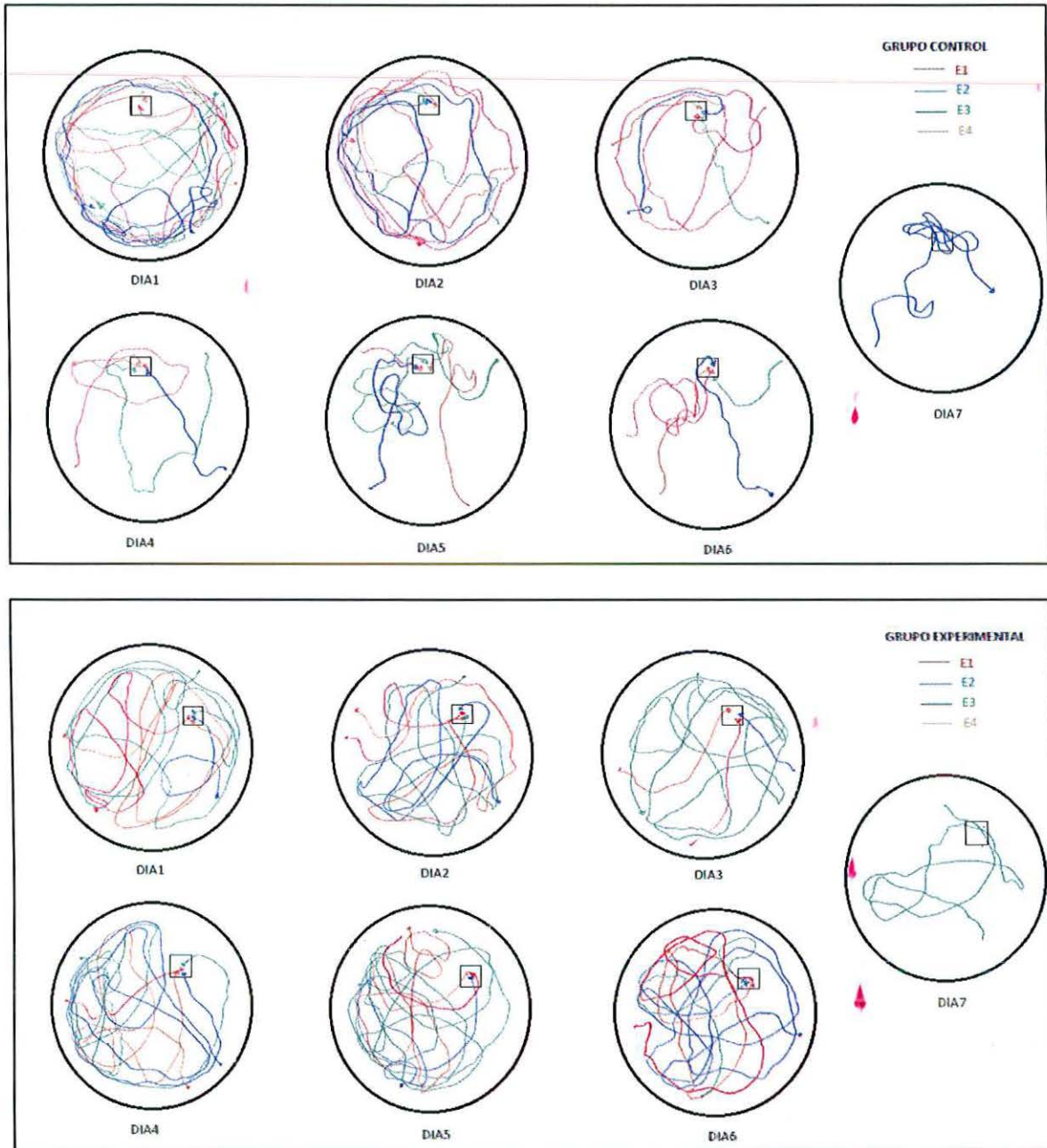


Figura 17. Rutas de nado representativas de un animal **control y experimental**. Los cuatro ensayos diarios están representados de diferente color, durante seis días de entrenamiento. El día 7, el ensayo de prueba que duró 30 segundos muestra que la rata restringió la búsqueda a la zona en la que se encontraba la plataforma sumergida. El punto indica el sitio de inicio de la rata y la punta de flecha indica el término del ensayo. El cuadro gris representa la posición de la plataforma.

Velocidad.

El ANOVA del grupo control fue significativo [F (5,55) = 4.493, p=0.002] y en el análisis de Tukey se observó que incrementó de forma significativa su velocidad de nado los días 4 y 6, (p=0.017, p=0.023; respectivamente) con respecto al primer día de entrenamiento. En el grupo experimental [F (5,50) = 2.056, p=0.087] no se observaron cambios en la velocidad de nado ningún día de entrenamiento con respecto al primer día (p > 0.005). Figura 18.

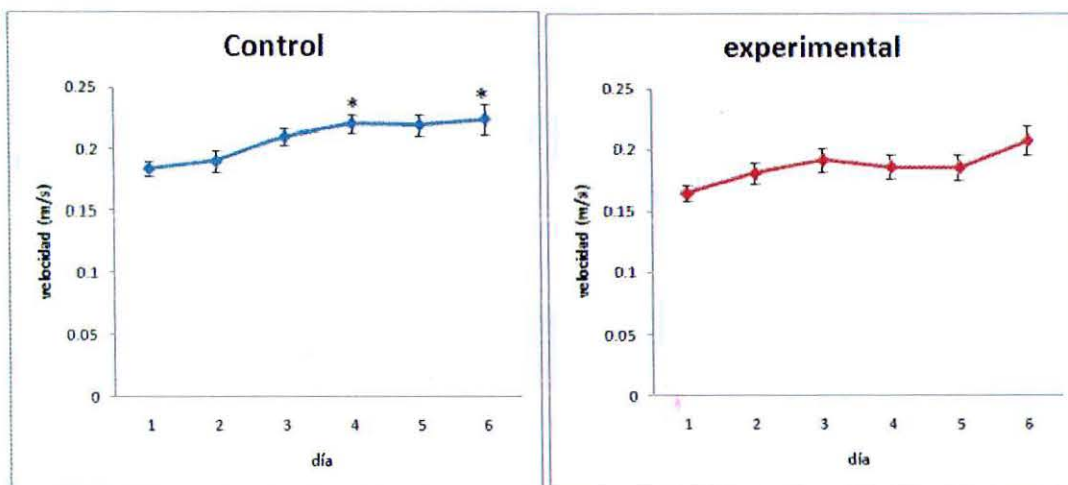


Figura 18. Velocidad de nado desarrollada por los animales entrenados de los dos grupos. Media \pm error estándar de la media. *, día 1 vs siguientes; grupo control (n=15); grupo experimental (n=11). p \leq 0.05.

En el análisis intergrupar se mostró que no existen diferencias en la velocidad de nado (grafica no mostrada).

Día 7, sin plataforma (ensayo de prueba)

Con respecto al número de cruces por el sitio donde se encontraba la plataforma durante los 30 segundos del ensayo del día 7 de prueba, se observó que al realizar el análisis de los cuatro cuadrantes entre grupos, el grupo experimental realizó menor número de cruces con respecto al grupo control (p=0.001). Figura 19

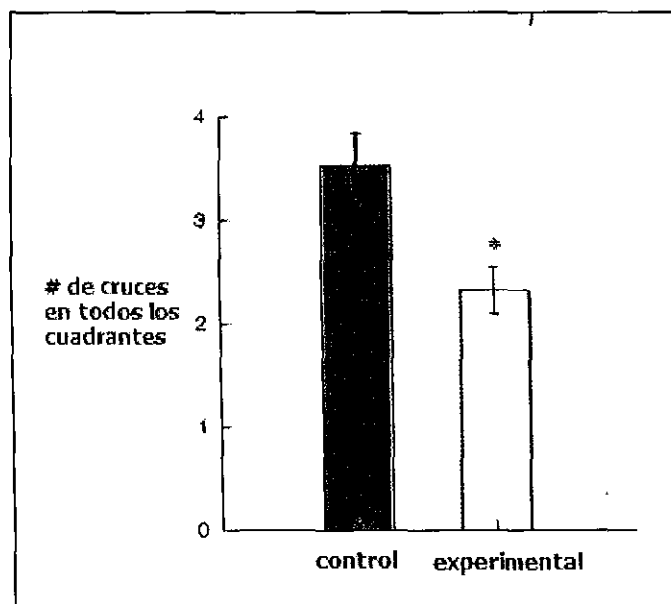


Figura 19. Número de cruces de los sitios de la plataforma en los cuatro cuadrantes en los dos grupos durante el día 7. Media \pm error estándar de la media. *, Grupo control vs grupo experimental; $p \leq 0.05$.

Al hacer la comparación de los tres cuadrantes que no tenían plataforma (S, E, O) con respecto al que la tenía (N), se observó que el grupo control realiza significativamente menor número de cruces en el sitio del cuadrante de enfrente (S) ($p=0.001$). En el grupo experimental también se observó que el número de cruces por sitio del cuadrante S es significativamente menor ($p=0.001$), con respecto al cuadrante N, como se puede observar en la figura 20.

En la misma figura se puede observar que el grupo control como el experimental presentan mayor número de cruces por el sitio en el cuadrante de la plataforma (N).

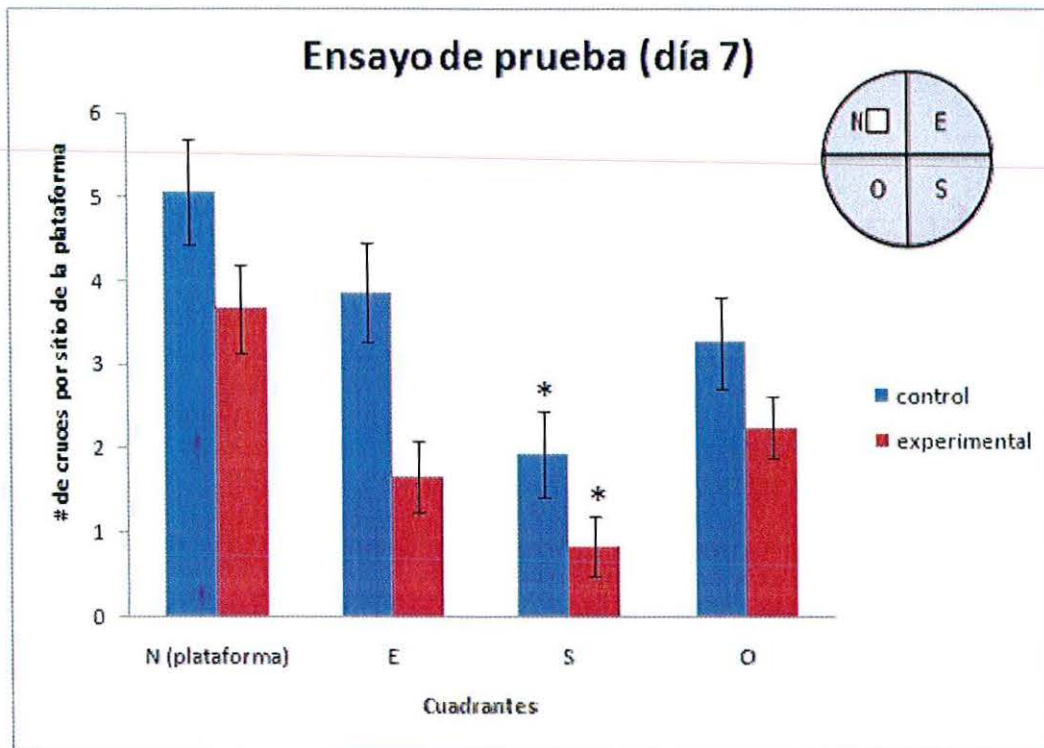


Figura 20. Número de cruces por el sitio de donde estaba la plataforma durante el ensayo del día 7. Comparación de los tres cuadrantes que no tenían plataforma con respecto al que la tenía (N). Media \pm error estándar de la media. *, Cuadrante N vs S, E, O de cada grupo; grupo control (n=15); grupo experimental (n=11). $p \leq 0.05$.

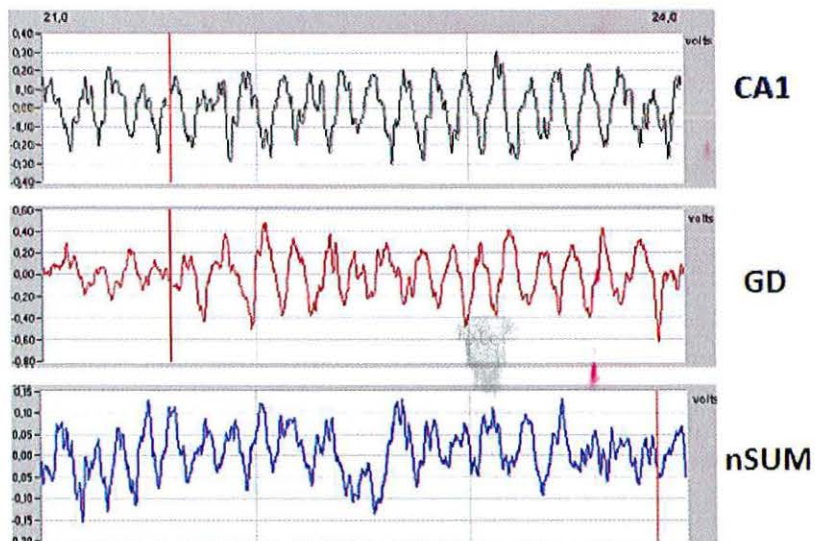
REGISTRO DEL EEG.

- **EEG hipocampal.**

En los registros de la actividad theta hipocampal de la región de CA1 y GD, se mostró la actividad theta durante todos los días de entrenamiento en las etapas basal, búsqueda y meta, con variaciones en cada banda según el día y el grupo considerado.

Se realizó un análisis intragrupal de la potencia relativa (PR) de cada uno de los grupos (control y experimental).

La potencia relativa fue comparada a partir, del promedio por día, la etapa conductual (basal, búsqueda, meta) y las bandas de baja (4-6.5 Hz), alta (7-9.5 Hz) y máxima frecuencia (10-12.5 Hz), para cada grupo.



Trazos de los registros de la actividad de campo de las regiones de CA1 y giro dentado del hipocampo, y nucleo supramamliar del hipotálamo.

A continuación se describen los resultados obtenidos de cada uno de los sitios de registro hipocampal.

REGIÓN DEL CUERNO DE AMMON (CA1)

Con el objetivo de conocer si había efecto en el espectro de potencia de cada banda durante los diferentes estados conductuales (basal, búsqueda, meta), se

realizó el análisis intragrupal mediante el ANOVA y se mostro un efecto significativo en dicha interacción de los factores (etapa-banda) del grupo control [F(4,739) = 149.703, p< 0.001], así como en el ANOVA del grupo experimental [F(4,530) = 28.519, p< 0.001].

Para realizar las comparaciones respecto a estos dos factores, como análisis pos-hoc se aplico la prueba de Tukey y se observó que en los animales del grupo control hubo un aumento en la potencia relativa de la banda de alta frecuencia (6-5-9.5 Hz) durante la etapa de búsqueda (p < 0.001), con respecto a la banda de baja frecuencia en las misma etapa. También se puede observar que durante el estado basal es mayor la potencia de baja frecuencia (4-6.5 Hz) con respecto a la de alta frecuencia (6-5-9.5 Hz) (p < 0.001). Lo anterior indica que hay una predominancia de la actividad theta de alta frecuencia solamente durante la etapa de búsqueda de la plataforma (Figura 21), que puede estar asociado al buen procesamiento de información. A diferencia del grupo control, en el grupo experimental no ocurrió un aumento significativo de la potencia relativa de la banda de alta frecuencia durante búsqueda (p = 0.134) y ocurre predominio de la banda de baja frecuencia en el estado basal y meta (Figura 22).

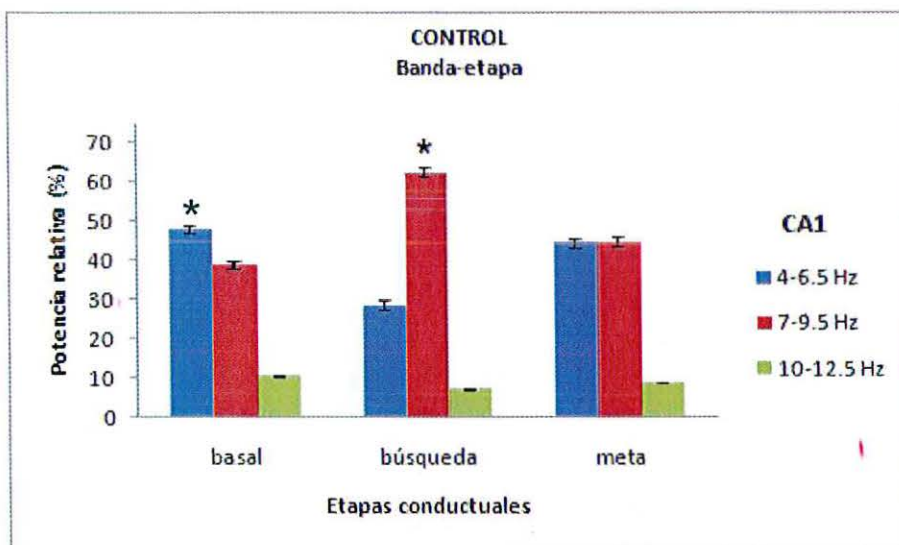


Figura 21. Potencia relativa del grupo control en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

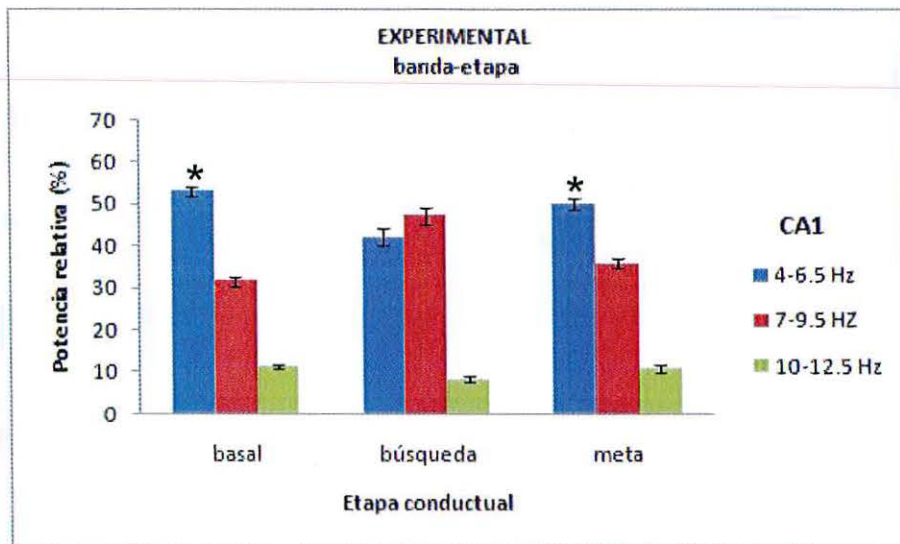


Figura 22. Potencia relativa del grupo experimental en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

Con respecto a la interacción de los factores **día/etapa/banda**, es decir para saber si hubo cambios en las bandas en los diferentes estados conductuales durante los diferentes días, el ANOVA mostró que solamente el grupo control tuvo un efecto significativo en la interacción de los tres factores [F (20,739)=2.594, $p < 0.001$], no así el grupo experimental [F (20,530) = 0.774, $p = 0.746$].

Se observó que solo durante la etapa de búsqueda el grupo control mostró un incremento en la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz) con respecto al primer día de entrenamiento a partir del día 3 y la mantuvo hasta el día 6 de prueba ($p = 0.001$; $p = 0.000$; $p = 0.000$; $p = 0.003$ respectivamente), además esto estuvo asociado a una disminución paralela en la actividad de baja frecuencia (4.5-6.5 Hz) que fue significativamente menor del día 3 al 5 ($p = 0.007$; $p = 0.016$; $p = 0.025$; respectivamente) con respecto al primer día.

También se observó una separación de la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz) con respecto a la de baja frecuencia (4-6.5 Hz) en un mismo día de entrenamiento, ya que a partir del día 2 la banda de alta frecuencia es significativamente mayor con respecto a la de baja frecuencia, y esto se mantiene hasta el resto de la prueba ($p \leq 0.001$). Figura 23

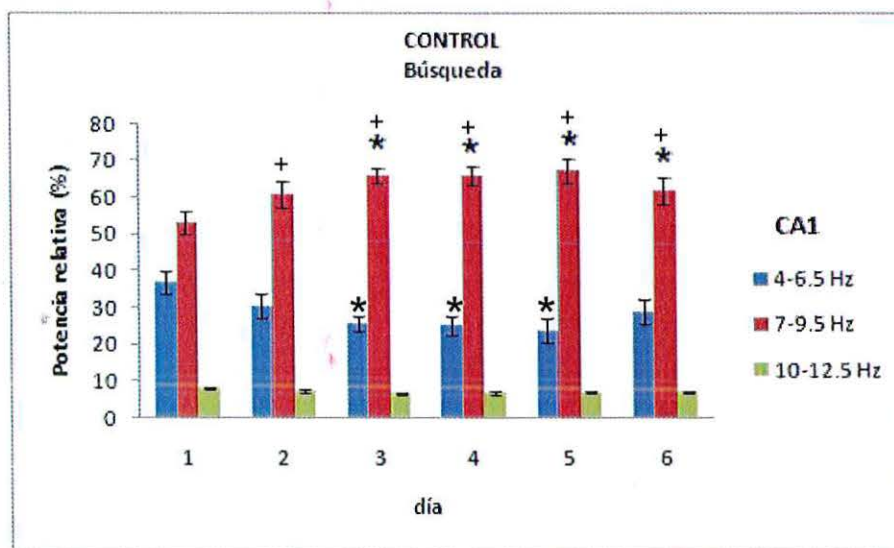


Figura 23. Potencia relativa del grupo control en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsiguientes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

Por su parte el grupo experimental no mostró efecto significativo en la interacción de los factores día-etapa-banda [$F(20,530) = 0.774, p = 0.746$].

Se observó que no ocurre cambio significativo ($p > 0.05$) en las bandas de baja y alta frecuencia en un mismo día de prueba, ni en cada banda con respecto al primer día de entrenamiento. Figura 24.

Lo anterior significa que a diferencia del grupo control, en este grupo no ocurrió el incremento en la actividad de alta frecuencia en ningún día, o bien no ocurrió la separación de bandas.

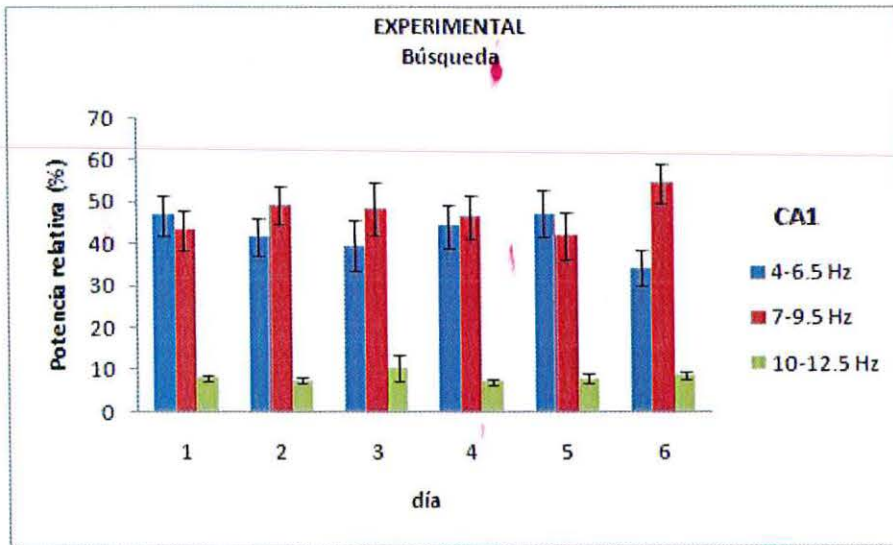


Figura 24. Potencia relativa del grupo experimental en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsecuentes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

Cabe mencionar que a diferencia de la etapa de búsqueda, durante la etapa basal y meta no hubo cambio significativo de la actividad de las bandas en ningún día de entrenamiento y no ocurre la separación de bandas entre baja y alta frecuencia. Figura 25.

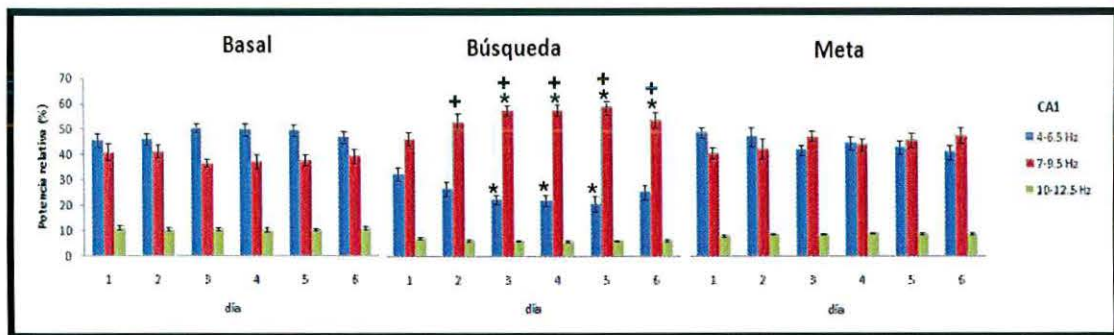


Figura 25. Potencia relativa del **grupo control** (región CA1) en los seis días de entrenamiento de cada etapa, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsecuentes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

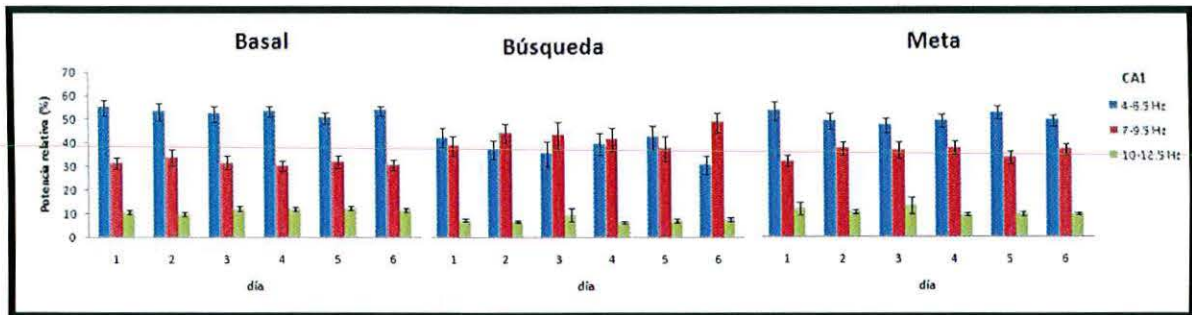


Figura 26. Potencia relativa del **grupo experimental** (región CA1) en los seis días de entrenamiento de cada etapa, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsiguientes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

En lo que respecta a las comparaciones intergrupales, el ANOVA no mostró diferencias significativas [$F(1,224)=2.329$, $p=0.128$] en la actividad theta con respecto a ninguno de los factores considerados en el estudio (datos no mostrados).

REGIÓN DEL GIRO DENTADO (GD)

Se realizó el análisis estadístico de la potencia relativa de la región del giro dentado, y en el análisis intragrupal el ANOVA del grupo control como el experimental muestran efecto significativo solo en la interacción del factor etapa-banda. Control $F(4,739)=37.552$, $p=0.000$], experimental $F(4,530)=27.743$, $p=0.000$].

En el grupo control se observó que durante la etapa de búsqueda la potencia relativa de alta frecuencia (7-9.5 Hz) también es significativamente mayor ($p=0.000$) con respecto a la de baja frecuencia (4-6.5 Hz). También se puede observar que la banda de baja frecuencia es significativamente mayor durante las etapas de basal ($p=0.000$) y meta ($p=0.000$). Figura 27.

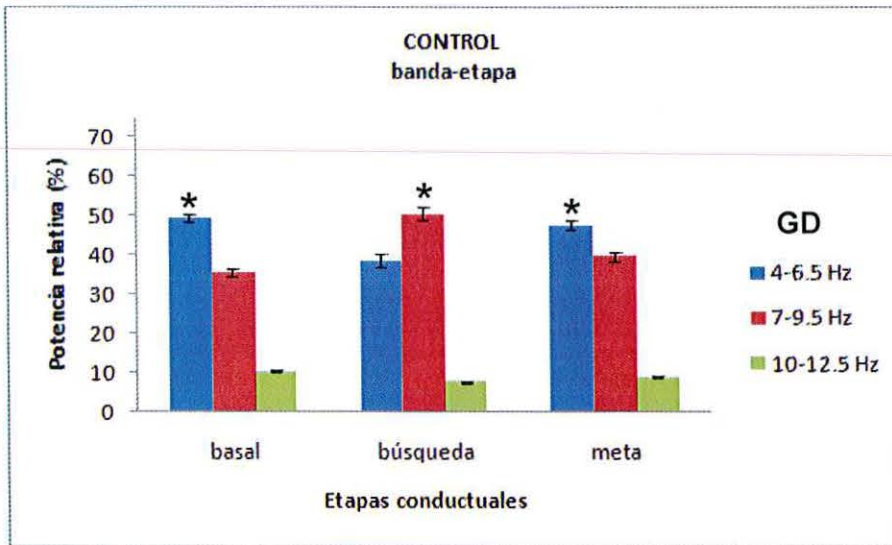


Figura 27. Potencia relativa del grupo control (región GD) en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

En el grupo experimental, se observó que también hay un aumento en la potencia de baja frecuencia durante el registro del estado basal ($p=0.000$) y meta ($p=0.000$), pero a diferencia del grupo control durante el estado de búsqueda no ocurre un incremento de la banda de alta frecuencia ($p=0.197$). Figura 28

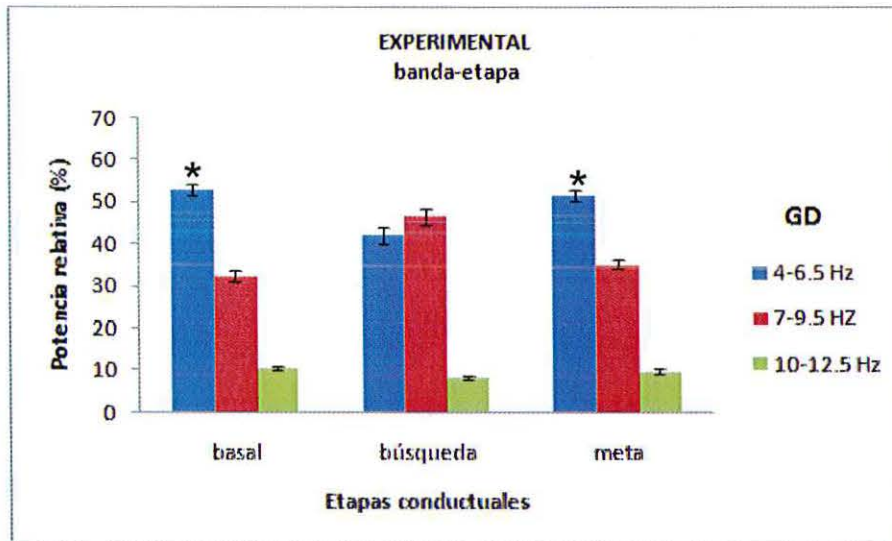


Figura 28. Potencia relativa del grupo experimental (región GD) en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

A diferencia del registro de la región de CA1, en el giro dentado no hay efecto en la interacción día-etapa-banda en ninguno de los grupos, sin embargo al graficar los datos se observa que en el grupo control hay un claro predominio de la banda de alta frecuencia durante todos los días, particularmente durante la etapa de búsqueda y en el grupo experimental no se separan las bandas. Figuras 29 y 30.

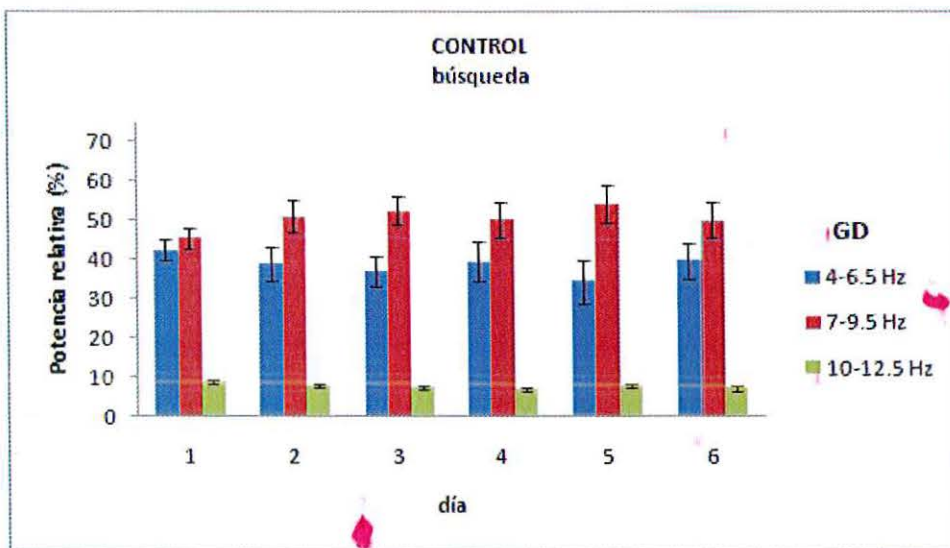


Figura 29. Potencia relativa del grupo control (región GD) en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsiguientes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

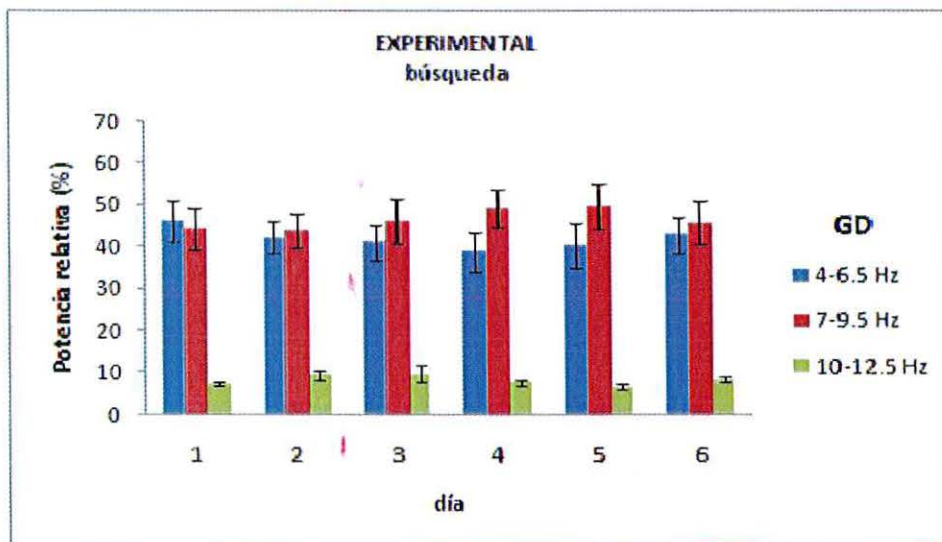


Figura 30. Potencia relativa del grupo experimental (región GD) en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. *, Primer día de entrenamiento vs subsiguientes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

En la siguiente grafica se presentan las potencias relativas durante los diferentes estados conductuales.

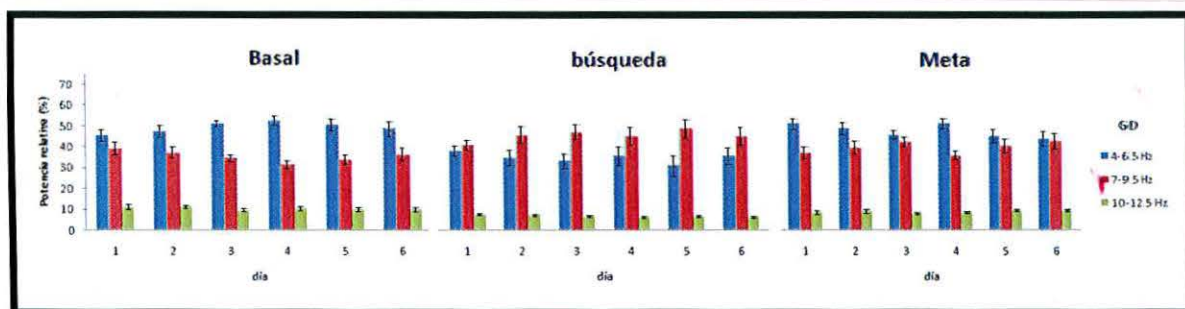


Figura 31. Potencia relativa del **grupo control** (región GD) en los seis días de entrenamiento de cada etapa, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsecuentes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

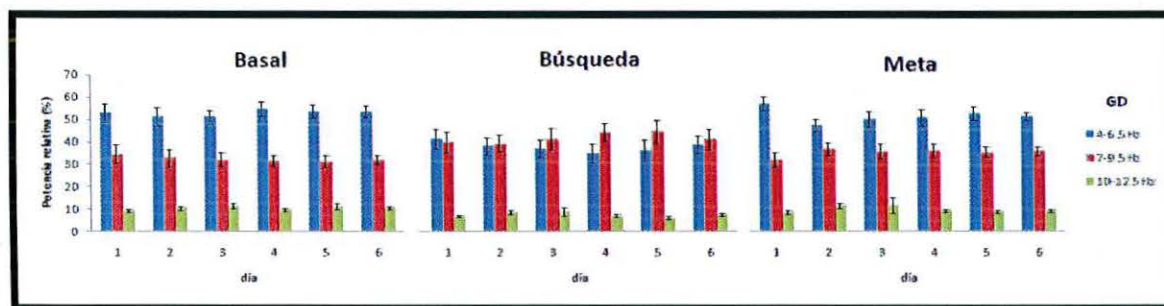


Figura 32. Potencia relativa del **grupo experimental** (región GD) en los seis días de entrenamiento de cada etapa, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsecuentes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

En la comparación intergrupar, el ANOVA no mostró diferencias significativas [$F(1,224)=0.013$, $p=0.908$] en ninguno de los factores considerados en el estudio (datos no mostrados).

Los resultados del registro hipocampal indican que el mayor efecto de eliminar la serotonina de los nucleos supramamilar e hipotalámico posterior ocurre sobre la región de CA1 y no tanto sobre el giro dentado.

NÚCLEO SUPRAMAMILAR (nSUM)

En lo que respecta al registro del núcleo supramamilar, no dio significativo el ANOVA de la interacción etapa-banda del grupo control [$F(4,739)=1.777$, $p=0.132$].

Sin embargo, en el análisis post hoc de la interacción etapa-banda se muestra que la banda de baja frecuencia (4-6.5 Hz) es significativamente mayor con respecto a la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz), durante las tres etapas conductuales; basal ($p \leq 0.000$), búsqueda ($p \leq 0.000$) y meta ($p \leq 0.000$). Figura 33.

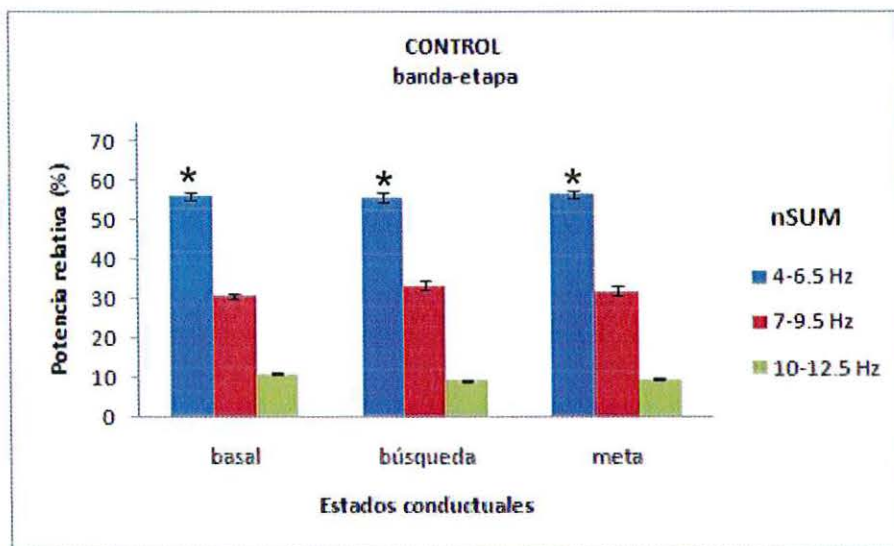


Figura 33. Potencia relativa del grupo control (región nSUM) en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

En el grupo experimental el ANOVA fue significativo [$F(4,530)=13.377$, $p=0.000$], y se observó que existe un predominio de la banda de baja frecuencia (4-6.5 Hz) con respecto a la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz), durante las tres etapas conductuales; basal ($p=0.000$), búsqueda ($p=0.000$) y meta ($p=0.000$). Figura 34.

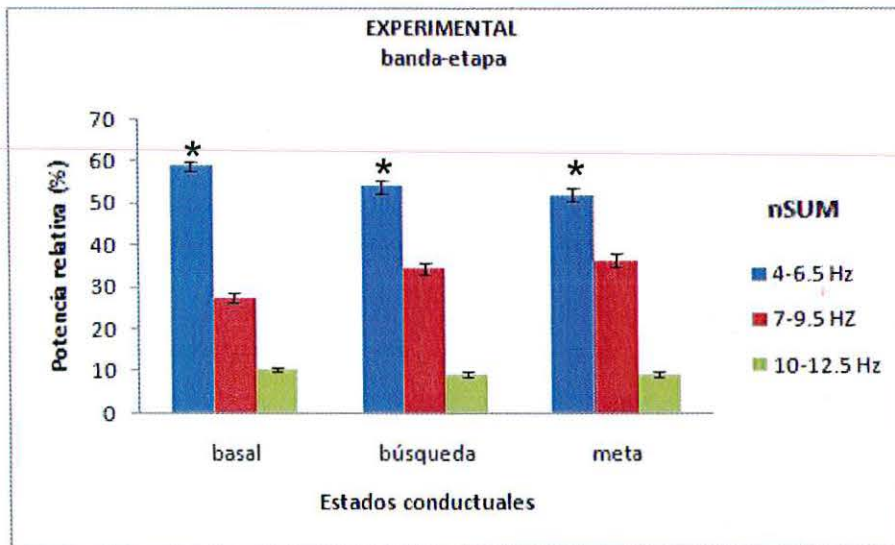


Figura 34. Potencia relativa del grupo experimental (región nSUM) en las tres etapas de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, baja frecuencia vs alta frecuencia.

Durante el análisis de la interacción día-etapa-banda se obtuvo que el ANOVA del grupo control fué significativo [$F(20,739)=2.156$, $p=0.002$] y en el análisis pos hoc se mostró que la banda de baja frecuencia(4-6.5 Hz) es significativamente mayor con respecto a la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz) los días 1,2,5 y 6 ($p<0.001$). Los días 3 y 4 se emparejaron las bandas de baja y alta frecuencia (los cuales son significativos durante el aprendizaje y en la potencia de la región de CA1 del hipocampo y vuelve a separarse el ultimo día). No hay diferencias en ninguna banda con respecto al primer día de entrenamiento. Figura 35.

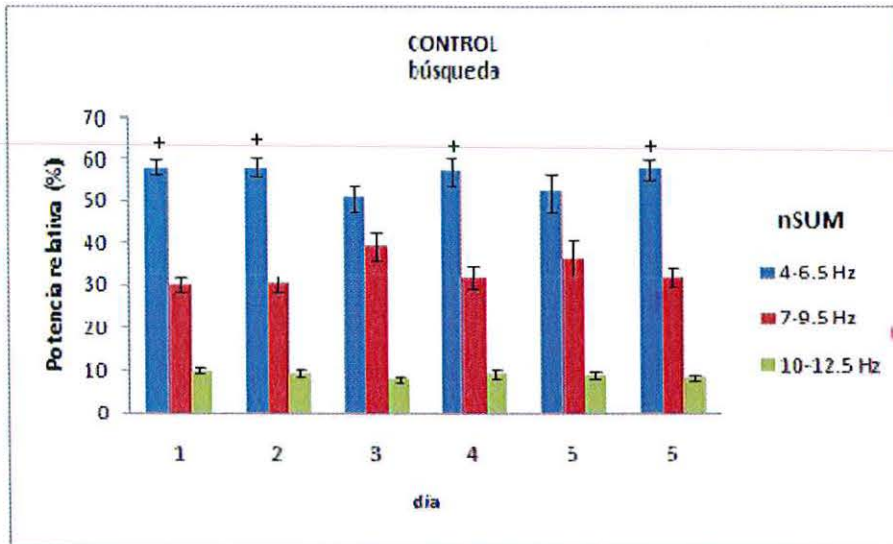


Figura 35. Potencia relativa del grupo control (región nSUM) en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. *, Primer día de entrenamiento vs subsiguientes. +, alta frecuencia vs baja frecuencia, en el mismo día.

En lo que respecta al ANOVA del grupo experimental, no se mostró un efecto significativo de la interacción día-etapa-banda [$F(20,530)=1.121$, $p=0.323$], pero en el análisis pos hoc se observó que es mayor la banda de baja frecuencia (4-6.5 Hz) con respecto a la de alta frecuencia (7-9.5 Hz) durante la búsqueda, en los días 1, 2 y 5 de entrenamiento ($p < 0.005$), pero no hay diferencias con respecto al primer día de entrenamiento.

También se emparejaron las bandas de baja y alta frecuencia durante los días 3, 4 y 6. Figura 36

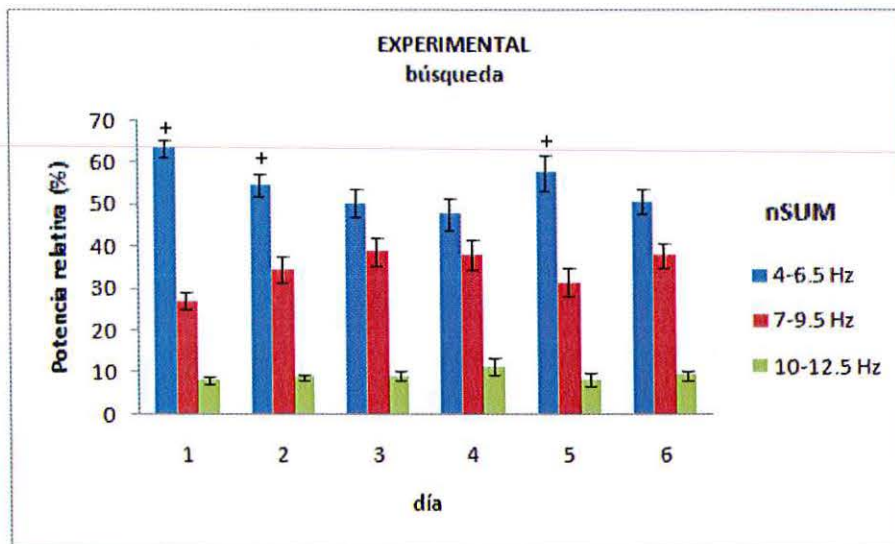


Figura 36. Potencia relativa del grupo experimental (región nSUM) en los seis días de entrenamiento, con respecto a cada banda. Media \pm error estándar de la media. +, banda alta vs banda baja en el mismo día.

En el análisis intergrupar, no hubo diferencias significativas en el ANOVA [$F(1,224)=1.100$, $p=0.295$] de los factores considerados.

VIII. DISCUSIÓN

El conjunto de estudios relacionados con la participación de la serotonina en los procesos de aprendizaje y memoria ha sido motivo de controversia, ya que según el tipo de tarea (Carli, Luschi, Garofalo & Samanin, 1995) y el sustrato neural que sustenta el tipo de prueba, puede variar el efecto observado. Por ejemplo, se ha reportado que lesiones serotoninérgicas no tienen efecto (Alman et al., 1989; Hagan, Jansen, Nefkens & Boer, 1990), facilitan (Everitt et al., 1994; Altman, 1989) o deterioran (Cassaday, Norman, Shilliam, Vincent & Marsden, 2003; Mogensen, Wörtwein, Plenge & Mellerup, 2003) el desempeño en varias tareas de aprendizaje.

El desempeño en el laberinto acuático de Morris depende de la acción coordinada de diferentes regiones del cerebro, constituyendo una red neural funcionalmente integrada (Cain & Saucier 1997; D'Hooge & De Deyn, 2001).

En nuestros resultados se ha mostrado que la disminución selectiva de la serotonina del núcleo hipotalámico posterior y núcleo supramamilar (nHP-nSUM), contribuyó a que los animales tuvieran un cambio gradual muy pequeño en la distancia recorrida cada día, sin alcanzar trayectorias significativamente más cortas en los diferentes días de entrenamiento, así también presentaron un menor número de cruces por el sitio de la plataforma de los cuadrantes en comparación al grupo control como lo indican las gráficas de distancia y cuadrantes. Lo anterior significa que el grupo experimental logra aprender la tarea, pero los animales son mucho menos eficientes para resolver la prueba que un animal normal. A pesar de que no hay diferencias significativas en las comparaciones intergrupales de los indicadores de aprendizaje (a excepción de la latencia, en la que hay diferencia el día 6), este efecto podría considerarse irrelevante, sin embargo su importancia radica en que de acuerdo a la relación anatómica-funcional que existe entre los núcleos nSUM-nHP con el hipocampo, significaría que de alguna manera están trabajando en conjunto para el procesamiento de

la información necesaria para el aprendizaje y memoria espacial que depende del hipocampo, ya que pese a que se ha reportado que cuando se abate o se interfiere con el sistema serotoninérgico de forma sistémica o selectiva al hipocampo, no se afecta, el desempeño en el aprendizaje y la memoria espacial (Altman, 1990; Altman et al., 1989; Richter-Levin & Segal, 1989; Asin et al., 1985; Altman et al., 1990; Olvera-Cortés, 2003) o bien tiene un pequeño pero significativo efecto facilitador (Gutiérrez-Guzmán, et al; enviado a publicación); en el presente estudio se observó un marcado efecto adverso en la resolución de la prueba.

En otros tipos de pruebas de aprendizaje espacial se ha reportado que la reducción serotoninérgica por vía intraventricular con 5,7-DHT deteriora la memoria de corto plazo evaluada en el laberinto en Y (Hritcu, Clicinschi & Nabeshima, 2007) y se ve alterada la adquisición de una tarea de memoria de trabajo (Helen et al., 2003), por lo cual se ha sugerido que el sistema serotoninérgico juega un papel importante en las funciones cognitivas, lo que está de acuerdo con nuestros datos obtenidos.

Existen evidencias que indican una participación del nSUM en procesos de aprendizaje y memoria (Shahidi et al., 2004), ya que la lesión causa un modesto deterioro en la memoria espacial (Pan & McNaughton, 1997) y la inactivación reversible causa deterioro en la consolidación de la memoria de referencia y deterioro en la consolidación y recuerdo de la memoria de trabajo espacial (Shahidi et al., 2004). Además la lesión electrolítica del nSUM y núcleos adyacentes deterioran la capacidad para resolver una tarea de memoria de trabajo espacial (Aranda, Santín, Begega, Aguirre & Arias, 2006), También se ha reportado que la co-activación del nSUM lateral con la vía perforante puede incrementar la población de espigas asociada al LTP (mecanismo que se ha propuesto sustenta la memoria) en el giro dentado de la formación hipocampal (Nakanishi, Saito & Abe, 2001) por lo cual la funcionalidad del nSUM es importante para la función hipocampal. Y la estimulación del nSUM a frecuencia theta es capaz de reestructurar la función hipocampal (McNaughton et al., 2006). Por lo

anterior se sugiere que el efecto observado en el grupo experimental puede deberse principalmente a la influencia anatómica-funcional directa que tiene el nSUM sobre el circuito septo-hipocampal (se libera principalmente glutamato y acetilcolina).

Podría pensarse que al modificar la actividad neuroquímica suprimiendo la actividad serotoninérgica en dichos núcleos, la funcionalidad del circuito local, supramamilo-septal y supramamilo-hipocampal posiblemente se alteró. En relación a esto, existen estudios en los que se muestra que la manipulación de sistema serotoninérgico sólo, no causa cambios en la función cognitiva per se, sino más bien ocurre por la interacción que tiene con otros sistemas de neurotransmisores, como el colinérgico (Richter-Levin & Segal 1989; Riekkinen, Sirvio, Valjakka, Miettinen & Riekkinen, 1991; Sahgal & Keith, 1993), glutamatérgico y GABAérgico (King, Charles, Marsden & Fone, 2008). Se ha sugerido que a nivel del diencefalo caudal (nHP-nSUM) la serotonina podría estar ejerciendo un efecto inhibitor a través de sus diferentes receptores sobre las células principales de estos núcleos (glutamatérgicas y colinérgicas), incluso podría ser un mecanismo semejante al que ocurre a nivel septal (Vertes, 2005; Jeltsch-David, Koenig & Cassel, 2008). El receptor 5HT1A se ha identificado en el núcleo hipotalámico posterior y núcleo supramamilar (Gundlach, Pecins-Thompson, Schutzer & Bethea, 1999), y dado que se conoce que la alteración de la actividad glutamatérgica y/o colinérgica por efecto del receptor posináptico 5HT1A causa deterioro en la cognición (King et al., 2008), podría sugerirse que el mecanismo del efecto observado podría involucrar al menos la modificación de la actividad de este receptor.

Desde el punto de vista conductual, no existen reportes que relacionen al núcleo hipotalámico posterior con funciones de aprendizaje y memoria de ningún tipo, pero debido a su influencia sobre la actividad theta hipocampal, podría existir alguna relación (participación de las aferentes colinérgicas), sin embargo faltaría determinar si el efecto observado se

debe a la acción sinérgica entre ambos núcleos como ya se ha reportado en ratas anestesiadas (Vertes, 1997) o si el efecto se debe a la acción única o predominante de un núcleo.

En lo que respecta a la actividad eléctrica registrada de este estudio, se observó que la actividad theta de la región de CA1 y GD del hipocampo es altamente reactiva a lo que ocurre conductualmente, como ya ha sido sustentado en previos reportes en los que la actividad theta se asocia con la extracción activa de información ambiental (Vinogradova, 1995) y cambios en el aprendizaje y memoria reflejan cambios en su patrón de actividad (Buzsáki, 2005; Olvera-Cortes et al., 2004).

En la región de CA1 del hipocampo se mostro un aumento en la potencia relativa de la banda de alta frecuencia (7-9.5 Hz) y una disminución de la banda de baja frecuencia (4-6.5 Hz) del grupo control durante el desempeño en los diferentes días de entrenamiento de la prueba conductual. Existe una gran relación entre los días en los que se obtuvo el grado de significancia del aprendizaje y el aumento significativo de la potencia de la actividad theta, ya que se alcanza durante los mismos días de prueba. Este efecto ya ha sido observado en otros experimentos (McNaughton et al., 2006; Olvera-Cortes et al., 2002, 2004), sin embargo lo interesante es que en el grupo experimental este efecto no se observó, es decir, la potencia relativa se mantuvo relativamente igual durante los diferentes días de prueba y los animales presentaron un bajo desempeño en el aprendizaje. Lo anterior indica que la serotonina de los núcleos del hipotálamo posterior (nHP-nSUM) es importante para que dichos núcleos ejerzan su función sobre la actividad theta del hipocampo. En apoyo a esto, se ha reportado que los núcleos hipotalámico posterior y supramamilar son parte fundamental en el relevo de información que asciende hasta el hipocampo (Bland & Oddie, 1998; Woodnorth & McNaughton, 2005), particularmente sobre la región de CA1, pues recientemente se ha demostrado que la aplicación de agonistas

colinérgicos (carbacol) sobre nHP-nSUM suprime la excitabilidad sináptica de las células piramidales de CA1 (Jiang & Khanna, 2006) con un efecto mediado al parecer por receptores nicotínicos distribuidos en la parte lateral del nSUM (Zacky Ariffin, Jiang, Chian-Ming & Khanna, 2010). Y la aplicación de glutamato sobre el nSUM genera la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 y GD (Nakanishi et al., 2001). Otros autores también han observado que ocurre un aumento en la potencia de theta durante la estimulación sensorial y evocada espontáneamente (Kocsis & Kaminski, 2006), además en un estudio el theta del nSUM fue usado para “reparar” la ritmicidad hipocampal y fue efectiva para reestructurar la función en el laberinto acuático de Morris en la rata (McNaughton et al., 2006). También se ha mostrado que la destrucción del SUM (incluyendo cuerpos mamilares) no impacta sobre el tamaño del campo de las células de lugar, pero si disminuye la tasa de disparo de las células y retrasa la respuesta de la localización espacial (Sharp & Koester, 2008). Recientemente el grupo de McNaughton, determinó la relación del potencial de campo entre el hipocampo y nSUM durante el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris en un solo día de prueba y observaron que la señal de ambas regiones es altamente coherente durante el aprendizaje en el laberinto de Morris (Ruan, Young & McNaughton, 2010).

Un aspecto importante es que debido a que la actividad theta hipocampal se elimina con la inactivación del septo medial y no con la lesión de los núcleos HP-SUM, el papel que se ha propuesto tienen estos núcleos en la organización de la actividad theta es modulador (Buzsaki, 2002). Dicha modulación podría estar ejercida por la interacción de la serotonina con las células colinérgicas, glutamatérgicas y/o gabaérgicas de los núcleos para determinar la entrada de información hacia el septo medial e hipocampo, en función de la demanda de información o el estado conductual en que se encuentre el animal. Sin embargo, a pesar de que el papel modulador de estos núcleos pueda ser mínimo con respecto a la expresión de la actividad theta en condiciones de inmovilidad, bajo

anestesia o durante libre movimiento sin procesar información, es evidente que estos núcleos en conjunto si están participando en la correcta expresión de la actividad theta asociada con el aprendizaje en animales en libre movimiento con alta demanda de información que depende del hipocampo.

Por otro lado, ha sido establecido que en además de las neuronas marcapaso del SM/BDB, el sistema serotoninérgico y el área supramamilar son dos de las mayores aéreas subcorticales que influyen la actividad theta hipocampal (Vertes & Kocsis, 1997) directamente (Freund, Gulyas, Acsady, Gores & Toth, 1990; Leranthy & Kiss 1996; Leranthy & Vertes, 1999) o indirectamente, vía SM/bDB (Leranthy & Kiss 1996; Leranthy & Vertes 1999).

Agonistas serotoninérgicos bloquean la PLD (Staubli & Otaky, 1994) mientras que antagonistas a serotonina aumentan la PLD y memoria (Buhot, 1997; Staubli & Xu, 1995; Vertes, 1981). En adición, estimulación del rafe medial desincroniza la actividad theta hipocampal (Assaf & Miller 1978; Vertes & Kocsis 1997; Vertes, 1981). Además la estimulación del área supramamilar tiene un efecto facilitador sobre la actividad hipocampal relacionada a la memoria (ritmo theta, población de espigas generadas en corteza entorinal y el flujo de información en el circuito excitador) lo que indica la existencia de una estrecha relación entre los dos sistemas (Kocsis & Vertes, 1994; Leranthy & Nitsch, 1994; Nitsch & Leranthy, 1996; Swain & McNaughton, 1996; Vertes & Kocsis 1997).

En el presente trabajo observamos que la disminución de serotonina de los núcleos (nSUM-nPH) ejerce un efecto atenuador sobre la actividad theta relacionada con el aprendizaje, contrario a lo observado directamente en el hipocampo (Gutiérrez-Guzmán et al., enviado a publicación), lo cual indica que probablemente la acción del sistema serotoninérgico puede estar generando un efecto diferente en cada sustrato anatómico, es decir mientras en un sistema o sustrato ejerce un efecto (ej. mayor descarga de

sus neuronas), en otro sustrato puede estar ejerciendo todo lo contrario, para dar una mayor eficiencia a la función. Por otro lado debido que dichos núcleos presentan disparo fásico de sus neuronas y actividad rítmica que se enfasa con la del hipocampo (principalmente en nSUM) y esto es importante para codificar información (Kocsis & Kaminski, 2006), los resultados obtenidos podrían indicar que la serotonina es importante para determinar las características propias de circuito interno, es decir para determinar la ocurrencia de la actividad rítmica del núcleo, y esto a su vez es importante para procesar información. Así, puede ser que los disparos de las células 5HT del rafe ayuden a sincronizar la actividad del nSUM, con respecto a la del hipocampo (faltarían experimentos para comprobar esto), por ejemplo Vertes en una reciente revisión menciona que la serotonina del núcleo de rafe dorsal puede ser crítica para la coordinación (sincronizador) de la actividad del nSUM y otras estructuras (tálamo anterior, amígdala, estriado y corteza prefrontal) durante estados theta (Vertes, 2010).

Por otro lado, se conoce que la serotonina que se libera en el hipocampo está ejerciendo efectos en la función a través de su acción sobre el giro dentado. Por ejemplo se ha mostrado que la serotonina hiperpolariza las células granulares del giro dentado a través de su acción sobre los receptores postsinápticos 5HT_{1A} e incrementa la liberación espontánea de GABA de las interneuronas inhibitorias mediante la activación de receptores 5HT₃ y/o 5HT₂ (Piguet & Galvan, 1994), así como también se afecta la PLD por la disminución de serotonina en el giro dentado (Bliss et al., 1983), incluso la perturbación genética de la función del receptor 5HT_{2c} puede modular la plasticidad del giro dentado y modificar los mecanismos neurales de la conducta dependiente del hipocampo (Tecott, Logue, Wehner & Kauer, 1998), adicionalmente se ha observado que la disminución de 5HT directa del hipocampo facilita el aprendizaje y aumenta la potencia de la actividad theta registrada en GD (Gutiérrez-Guzmán, Medina-Navarro, Guevara & Olvera-Cortés, 2008). Lo anterior

indica que la serotonina que llega al hipocampo, independientemente del origen está modificando la función del hipocampo a través del giro dentado. Sin embargo, a pesar de que en el presente estudio el mayor efecto se observa sobre la región de CA1, dicho efecto puede estar mediado a través del giro dentado por ser la vía de entrada de información dentro del circuito trisináptico del hipocampo y ser el principal sitio al cual el SUM envía información por vía directa hacia el hipocampo

El registro del nSUM muestra que este núcleo trabaja a baja frecuencia independientemente de la etapa conductual, sin embargo, los cambios que puedan ocurrir sobre la frecuencia durante el aprendizaje en una prueba de Morris pueden ser muy sutiles (Herz por Herz y no en bandas de frecuencia) e importantes para el buen procesamiento de información, como ya ha sido reportado (McNaughton et al., 2006). Como se mostró en los resultados, la interacción día-etapa-banda del grupo control dio significativa y a través de los días hay un predominio de la banda de baja frecuencia a excepción del día 3 que ocurre un aplanamiento de las bandas de baja y alta frecuencia, lo cual se relaciona con el día en que ocurre la separación de bandas en CA1 y significativamente se alcanza el aprendizaje. A diferencia, en el grupo experimental no hay significancia de los 3 factores, lo cual podría indicar que posiblemente si se modificó la función de los núcleos SUM y nHP. A pesar de lo anterior, se requiere realizar un análisis de correlación y coherencia que nos permitirá obtener información sobre la relación o acople funcional que existe en el tiempo del nSUM con las regiones de CA1 y GD del hipocampo durante el aprendizaje y memoria, ya proyectados en una siguiente etapa.

Finalmente no se descarta la participación de otros sitios de relevo en los cuales la serotonina puede estar actuando sobre la función hipocampal, ya que se ha reportado que otros sitios del diencefalo (Woodnorth et al., 2003, 2005), septo medial (Jiang & Khanna, 2004) y área tegmental ventral (Orzel-Gryglewska, Jurkowlaniec & Trojnar, 2006; Orzel-Gryglewska,

Kuśmierczak & Jurkowlaniec, 2010) son importantes para determinar la ocurrencia de la ritmicidad de la actividad theta.

IX. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados refuerzan que el sistema serotoninérgico está actuando como un modulador de la conducta y que la participación de los núcleos HP y SUM es importante para la función del hipocampo ya que el abatimiento de la serotonina selectiva del nSUM y nHP produjo deficiencias en el desempeño de los animales en una prueba de memoria espacial dependiente del hipocampo en relación con la ausencia de cambios EEG relacionados con el entrenamiento, particularmente de la región CA1 del hipocampo.

X. REFERENCIAS

- Abrahamson, E.E., & Moore, R.Y. (2001). The hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Research*, 889(1-2), 1-22.
- Alkon, D.I., Amaral D.G., Bear, M.F., Black, J., & Carew, T.J. (1991). Learning and memory. *Brain Research Reviews*, 16, 193-220.
- Alonso, A., & Llinás, R.R. (1992). Electrophysiology of the mammillary complex *in vitro*. II. Medial mammillary neurons. *Journal Of Neurophysiology*, 68, 1321-1331.
- Altman, H. J., Ogren, S.O., Berman, R.F., & Normile, H.J. (1989). The effects of p-chloroanphetamina, a depletory of brain serotonin, on the performance of rats in two types of positively reinforced complex spatial discrimination tasks. *Behavioral and Neural Biology*, 52, 131-144.
- Altman, H.J., Normile, J.H., Galoway, P.M., Ramirez A., & Azmitia, C.E. (1990). Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT-induced deafferentation of the hippocampus. *Brain Research*, 518, 61-66.
- Alyan, S.H & Jander, R. (1994). Short-range homing in the house mouse (*Mus musculus*): stages in the learning of directions. *Animal Behaviour*, 48, 285-98.
- Amaral, D.G., & Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of the anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-91.
- Amaral, D.G., & Witter, M.P. (1995). Hippocampal formation. In G. Paxinos (Eds.), *The rat nervous system* (2nd ed., pp. 442-493). San Diego: Academic press.
- Amaral, D.G. & Cowan, W.M. (1980). Subcortical afferents to the hippocampal formation of the monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 189, 573-591.
- Aranda L., Santín, L.J., Begega, A., Aguirre, J.A., & Arias, J.L. (2006). Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior. *Behavioural Brain Research*, 167, 156-164.
- Asin, K.E., Wirtshafter, D. & Fibiger, H.C. (1985). Electrolytic, but not 5,7-dihidroxytryptamina, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of radial maze task. *Behavioral and Neural Biology*, 44, 415-424.
- Barnes, N.M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38, 1083-1152.
- Bland, B.H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Progress in Neurobiology*, 26, 1-54.

- Bland, B.H. (2000). The medial septum: Node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. In: *The behavioral neuroscience of the septal region* (Eds. R.Numan) (pp.115-145), Springer Verlag-NY, New York.
- Bland, B.H. & Whishaw, I.Q. (1976). Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anesthetized and freely moving rat. *Brain research*, 118, 259-280.
- Bland, B.H. & Colom, L.V. (1993). Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Progress in Neurobiology*, 41,157-208.
- Bland, B.H. & Oddie, S.D. (1998). Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22, 259-273.
- Bland, B.H., Konopacki, J., Kirk, I.J., Oddie, S.D., & Dickson, C.T. (1995). Discharge patterns of hippocampal theta-related cell in the caudal diencephalons of the urethane anesthetized rat. *Journal of Neurophysiology*, 74, 322-333.
- Bland, B.H., Konopackin, J., Kirk, I.J., Oddie, S.D., & Dickson, C.T. (1995). Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalons of the urethane-anesthetized rat. *Journal of Neurophysiology*, 74, 322-333.
- Bland, B.H., Oddie, S.D., & Ford, R.D. (1990). Responses of septal θ -on and θ -off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Research Bulletin*, 24, 71-79.
- Bland, B.H., Oddie, S.D., Colom, L.V. & Vertes, R.P. (1994). The extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 4, 649-660.
- Borhegyi, Z. & Freund, T.F. (1998). Dual projections from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Research Bulletin*, 46, 453-459.
- Borhegyi, Z., Magloczky, Z., Acsady, L., & Freund, T.F. (1998). The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience* 82, 1053-1065.
- Borhegyi, Z., & Lerant, C. (1997). Distinct substances P- and calcitonin-releasing factor-containing projections from the supramammillary are to the hippocampus in rats: a species difference between rats and monkeys. *Experimental Brain Research*, 115, 369-374.
- Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The use of Morris water-maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience*, 48, 26-69.
- Brazhnik, E.S. & Vinogradova, O.S. (1986). Control of the neuronal rhythmic bursts in the septal pacemaker of the theta-rhythm: Effects of anesthetic and anticholinergic drugs. *Brain Research*, 380, 94-106.

- Buhot, M.C., Martin, S., & Segu, L. (2000). Role of serotonin in memory impairment. *Annals of Internal Medicine*, 32(3), 210-21.
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325-40
- Buzsáki, G. (2005). Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, 15(7), 827-40.
- Buzsáki, G., Leung, L.W., & Vanderwolf, C.H. (1983). Cellular Bases of Hippocampal EEG in the Behaving Rat. *Brain Research Reviews*, 6, 139-171.
- Cain, D.P., & Saucier, D. (1996). The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Reviews Neuroscience*. 7, 215-231.
- Carli, M., Luschi, R., Garofalo, P., & Samanin, R. (1995). 8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5HT1A receptors in the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 67, 67.
- Carnes, K.M., Fuller, T.A., & Price, J.L. (1990). Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 302, 824-852.
- Cassaday, H.J., Norman, C., Shilliam, C.S., Vincent, C., & Marsden, C.A. (2003). Intraventricular 5,7-dihydroxytryptamine lesions disrupt acquisition of working memory task rules but not performance once learned. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(1), 147-56.
- Colom L.V., Christie, B.R., & Bland, B.H. (1988). Cingulate cell discharge patterns related to hippocampal EEG and their modulation by muscarinic and nicotinic agents. *Brain Research*, 460, 329-338.
- Colom, L.V., & Bland, B.H. (1987). State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: Evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Research*, 422, 277-286.
- Colom, L.V., & Bland, B.H. (1991). Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine. *Hippocampus*, 1, 15-30.
- Colom, L.V. (2006). "Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimers disease". *Journal of Neurochemistry*, 96, 609-623.
- Colom, L.V., Ford, R.D., & Bland, B.H. (1987). Hippocampal formation hippocampal pathway, 410,12-20.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., & Roth, R.H. (2003). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology (Edic.Octava)*. Ed. OXFORD. (Pp. 312-356).
- Corkin S, Amaral, D.G., Gonzalez, R.G., Johnson, K.A., & Hyman, B.T. (1997). HM's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*, 17, 3949-79.

- D'Hooge, R. & de Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36, 60-90.
- Dahlstrom, A., & Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. *Acta Physiol Scand*, 62 (Suppl. 232), 1-55.
- Destrade, C., & Ott, T. (1981). Quantitative análisis of hippocampal rhythmical slow activity induced by stimulation of differential diencephalic structures. *Neuroscience*, 6, 1089-1094.
- Dickson, C., Kirk, I.J., Oddie, S.D., & Bland, B.H. (1995). The classification of theta related cells in the entorhinal cortex: Evidence that the ascending brainstem hippocampal synchronising pathway exerts parallel control of the EC theta cell discharges. *Hippocampus*, 5, 306-319.
- Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for 'What', 'Where' and 'When'. *Learning & Memory*, 11, 397-405.
- Eichenbaum, H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 123-33.
- Etchepareborda, M.C., & Abad-Mas, L. (2005). Memoria de trabajo en los procesos basicos del aprendizaje. *Revista de Neurologia*, 40 (Supl 1), S79-S83.
- Everitt, B.J., Harrison, A.A., Humby, T., Warburton, E.C., Ward, B., & Wilkinson, L.S. (1994). Impact of forebrain serotonin on learning, memory and attention. *Journal of Psychopharmacology*,
- Fortin, W.J. (1995). A PHA-L analysis of projections from the nucleus reticularis pontis oralis, the pedunculopontine tegmental nucleus and the median raphe nucleus in the rat: implications for the modulation of the hippocampal EEG. Un published Master's thesis. Boca Raton: Florida Atlantic University.
- Freund, T.F., & Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347-470.
- Frotscher, M., & Gähwiler, B.H. (1988). Synaptic organization of intracellularly stained CA3 pyramidal neurons in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*, 24, 541-551.
- Gallistel, C.R. (1990). *The Organization of Learning*. MIT Press/Bradford Books, Ma.
- Gonzalo-Ruiz, A., Alonso, A., Sanz, J.M., & Llinas, R.R. (1992b). Afferent projections to the mammillary complex of the rat, with special reference to those from surrounding hypothalamic regions. *The Journal of Comparative Neurology*, 321, 277-299.
- Gonzalo-Ruiz, A., Morte, L., Flecha, J.M., & Sanz, J.M. (1999). Neurotransmitter characteristics of neurons projections to the supramammillary nucleus of the rat. *Anatomy and Embryology*, 200, 377-392.

- Gottesmann, C. (1992). Theta rhythm: the brainstem involvement. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 16, 25-30.
- Guevara, M.A & Hernández-González, M. (2009). EEGmagic: programa para analizar señales electroencefalográficas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. XXX (1), 41-53.
- Gundlach C., Pecins-Thompson, M., Schutzer, W.E., & Bethea, C.L. (1999). Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Molecular Brain Research*, 63, 325-339.
- Gutiérrez-Guzmán, B.E. (2007). Efecto de la eliminación de serotonina hipocampal sobre la actividad theta subyacente al aprendizaje espacial, en la rata. Tesis licenciatura Biología. UMSNH. (pp. 72). México. Morelia Michoacán.
- Gutiérrez-Guzmán, B.E., Guevara, M.A., González-Burgos, I., & Olvera-Cortés, M.E. (2007). "Modulación Serotoninérgica de la actividad theta hipocampal" en Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. Instituto de Neurociencias. Universidad de Guadalajara. (pp.558), Guadalajara, Jalisco, México.
- Gutiérrez-Guzmán, B.E., Medina-Navarro, R., Guevara, M.A., Olvera-Cortés, M.E. (2008). Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. ISBN 978-607-00-2083-4.
- Hagan J.J., Jansen, J.H.M., Nefkens, F.E.W., & deBoer, T. (1990). Therapeutic effects of THA on hemicholinium-3-induced learning impairment is independent of serotonergic and noradrenergic systems. *Psychopharmacology*, 101, 376-83.
- Hajos, M., Hoffmann, W.E., & Weaver, R. (2003). Regulation of septo-hippocampal activity by 5-Hydroxytryptamine_{2C} receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 605-615.
- Harvey, J.A. (2003). Role of the Serotonin 5HT_{2a} receptor in learning. *Learning & Memory*, 10, 355-362.
- Hasselmo, M.E & McClelland, J.L. (1999). Neural models of memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 9, 184-8.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior*, New York: Wiley
- Helen, J., Cassadaya, Normana, C., Claire, S., Shilliam, Vincenta, C., Charles, A., & Marsden. (2003). Intraventricular 5,7-dihydroxytryptamine lesions disrupt acquisition of working memory task rules but not performance once learned. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27, 147- 156.
- Hensler, J.G. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30, 203-214.
- Hodges, H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and the water maze compared. *Cognitive Brain Research*, 3, 167-181.

- Hoyer, D., Hannon, J.P., & Martin, G.R. (2002). Molecular pharmacological and functional diversity of 5HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 71(4), 533-554.
- Hritcu, L., Clicinschi, M., & Nabeshima, T. (2007). Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology & Behavior*, 91(5), 652-657.
- Ino, T., Sugimoto, T., Kaneko, T., Kamiya, H., & Mizuno, N. (1988). The supramammillary region of the cat sends substance P-like immunoreactive axons to the hippocampal formation and the entorhinal cortex. *Neuroscience Letters*, 90, 259-264.
- Jeltsch-David, H., Koenig, J., & Cassel, J.C. (2008). Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: General data and focus on 5-HT_{1A} receptors of the medial septum. *Behavioural Brain Research*, 195, 86-97.
- Jiang, F., & Khanna, S. (2006). Microinjection of carbachol in the supramammillary region suppresses CA1 pyramidal cell synaptic excitability. *Hippocampus*, 16, 891-905.
- Johnston, D., & Amaral, D. (1998). *Hippocampus The Synaptic Organization of the Brain*. (Pp. 417-458).
- Kahana, M.J., Seeling & Madsen, R. (2001). Theta returns. *Currents Opinión in Neurobiology*, 11, 739-744.
- Kesner, R.P., & Martinez, J.I. (2007). *Neurobiology of learning and memory*. (Edic. Second). Elsevier, Amsterdam. (Pp. 600).
- King, M.D., Marsden, C.A., & Fone, K. (2008). A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29 (9), 482-492.
- Kim, J.J., & Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675-7
- Kirby, L.G., Pernar, L., Valentino, R.J. & Beckm, S.G. (2003). Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*, 116, 669-683.
- Kirk, I.J. (1998). Frequency Modulation of Hippocampal Theta by the Supramammillary Nucleus, and Other Hypothalamo-Hippocampal Interactions: Mechanisms and Functional Implications. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 22, 291-302.
- Kirk, I.J., & McNaughton, N. (1991). Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *NeuroReport*, 2, 723-725.
- Kirk, I.J., & McNaughton, N. (1993). Mapping the differential effects of procaine on the frequency and amplitude of reticularly- elicited rhythmical slow activity. *Hippocampus*, 3, 517-526.

Kirk, I.J., Oddie, S.D., Konopacki, J., & Bland, B.H. (1996). Evidence for Differential Control of Posterior Hypothalamic, Supramammillary, and Medial Mammillary Theta-Related Cellular Discharge by Ascending and Descending Pathways. *Journal of Neuroscience*, 16, 5547-5554.

Kitchigina, V.F., Kudina, T.A., Kuttyreva, E.V., & Vinogradova, O.S. (1999). 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, 453-463.

Kocsis, B., & Vertes, R.P. (1994). Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *Journal of Neuroscience*, 14, 7040-7052.

Kocsis, B., Kiss, J., Csaky, A., & Halasz, B. (2003). Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Research Bulletin*, 61, 459-468.

Kocsis, B., & Kaminski, M. (2006). Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus*, 16(6), 531-40.

Kosofsky, B.E., & Molliver, M.E. (1987). The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1, 153-168.

Lacaille, J.C., Kunkel, D.D., & Chwartzkroin, A.P. (1989). Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. In: Chan-Palay, V. and Kohles, C.H. (Eds). *The Hippocampus*. (PP. 297-305), New Vistas. Alan R. Liss, Inc. USA.

Lee, M.G., Chrobak, J.J., Sik, A., Wiley, R.G., & Buzsaki, G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*, 62, 1033-1047.

Leranth, C., & Kiss, J. (1996). A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. *Journal of Neuroscience*, 16, 7699-7710.

Leranth, C., & Vertes, R.P. (1999). 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. *The Journal of comparative neurology*, 410(4), 586-98.

Leranth, C., Carpi, D., Buzsaki, G., & Kiss, J. (1999). The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience*, 88, 701-718.

LK, Chu H.M., & Tecott, L.H. (1998). Epilepsy and obesity in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 15, 861, 74-8.

Long, J.M., & Kesner, R.P. (1996). The effects of dorsal versus ventral hippocampal, total hippocampal, and parietal cortex lesions on memory for allocentric distance in rats. *Behavioral Neuroscience*, 24, 897-931.

Lynch, M. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84 (1), 87-136.

Madeleine, V., King, C.A., Marsden & Fone, K. (2008). A role for the 5-HT1A, 5-HT4 and 5-HT6 receptors in learning and memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(9), 482-492.

Magloczky, Z., Acsady, L., & Freund, T.F. (1994). Principal cells are the postsynaptic targets of the supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, 4, 322-334.

Mamounas, L.A., Mullen, C.A., O'Hearn, E., & Molliver, M.E. (1991). Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminal exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *The Journal of Comparative Neurology*, 314, 558-586.

Manseau, F., Danik, M., & Williams, S. (2005). A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *The Journal of Physiology*, 566 (3), 865-884.

Markowska, A., Olton, D., Givens, B. (1995). Cholinergic manipulations in the Medial Septal Area: Age-related Effects on the Working Memory and Hippocampal Electrophysiology. *Journal of Neuroscience*, 15 (3), 2063-2073.

Marrosu, F., Fornal, C.A., Metzler, C.W., & Jacobs, B.L. (1996). 5-HT1A agonists induce hippocampal theta activity in freely moving cats: role of presynaptic 5-HT1A receptors. *Brain Research*, 793, 192-200.

Magloczky, Z., Acsady, L., & Freund, T.F. (1994). Principal cells are the postsynaptic targets of the supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, 4, 322-334.

Maru, E., Takahashi, L.K., & Shinkuro, I. (1979). Effects of median raphe lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Research*, 163, 223-234.

McDonald, R.J., & White, M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107, 3-22.

McKenna, J.T., & Vertes, R.P. (2001). Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 54(6), 619-630.

McNaughton, N., & Sedgwick, E.M. (1978). Reticular stimulation and hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs. *Neuroscience*, 2, 629-632.

McNaughton, N., Logan, B., Panickar, K.S., Kirk, I.J., Pan, W.X., Brown, N.T., & Heenan, A. (1995). Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus*, 5, 534-545.

- McNaughton, N., Azmitia, E.C., Williams, J.H., Buchan, A., & Gray, J.A. (1980). Septal elicitation of hippocampal theta rhythm after localized deafferentation of serotonergic fibres. *Brain Research*, 200, 259-269.
- McNaughton, N., Ming Ruan., & Woodnorth, M.A. (2006). Restoring Theta-Like Rhythmicity in Rats Restores Initial Learning in the Morris Water Maze. *Hippocampus*, 16, 1102-1110.
- McNaughton, N., James, D.T., Steward, J., Gray, J.A., ValeroI & Drenowski, A. (1988). Septal driving of hippocampal theta as a function of frequency in the male rat: effect of drugs. *Neuroscience*, 2, 1019-1027.
- Meneses, A. (2007). Do serotonin(1-7) receptors modulate short and long-term memory?. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 561-72.
- Meneses, A. (2007). Stimulation of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A/2C, 5-HT3 and 5-HT4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 184(1), 81-90.
- Milner, B., Squire, L.R., & Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-68.
- Mizumori, S.J.Y., Barnes, C.A., & McNaughton, B.L. (1989). Reversible inactivation of the medial septum: selective effects on the spontaneous unit activity of different hippocampal cell types. *Brain Research*, 500, 99-106.
- Mogensen, J., Wörtwein, G., Plenge, P., & Mellerup. E.T. (2003). Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 381-95.
- Monmaur, P., & Thomson, M.A. (1986). Spatial distribution of hippocampal-dentate theta rhythm following colchicine injection into the hippocampal formation of the rat. *Brain Research*, 365, 269-277.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40(5), 289-297.
- Morris, R.G.M., Schenk, F., Tweedie, F., Jarrad, L.E. (1990). Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *The European Journal of Neuroscience*, 2, 1016-18.
- Morris, R.G.M. (1984). Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60.
- Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., & Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: A unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*, 207, 335-66.
- Muller, R. (1996). A quarter of a century of place cells. *Neuron*, 17, 813-22.

- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter system involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*, 41, 268-287.
- Nadel, L., & Eichenbaum, H. (1999). Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus*, 9, 341-5.
- Nakanishi, K., Saito, H., & Abe, K. (2001). The Supramammillary nucleus contributes to associative EPSP-spike potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 13, 793-800.
- Nestler, E.J., Hyman S.E., & Malenka, R.L. (2001). *Molecular Neuropharmacology: A foundation for Clinical Neuroscience*. Chapter 9. Serotonin, Acetylcholine, and Histamine. Ed. Mc Graw-Hill. New York. Pp. 191-211.
- Nishiyama, N., Mizuhara, H., Miwakeichi, F., Yamaguchi, Y. (2002). Theta episodes observed in human scalp EEG during virtual navigation-spatial distribution and task dependence. *Neural Information Processing*, 1, 18-22.
- Nitsch, R., & Leranth, C. (1994). Substance P-containing hypothalamic afferents to the monkey hippocampus: an immunocytochemical, tracing, and coexistence study. *Experimental Brain Research*, 101, 231-240.
- Nitsch, R., & Leranth, C. (1996). GABAergic neurons in the rat dentate gyrus are innervated by subcortical calretinin-containing afferents. *The Journal of Comparative Neurology*, 364, 425-438.
- Noback, C.R. y R.J. Demarest.1975. *The Human Nervous System: Basic Principles of Neurobiology*. Edic 2nd. Ed. McGraw-Hill. PP. New York. 539.
- Nowacka, A., Jurkowlanec, E., & Trojnar, W. (2002). Microinjection of procaine into the pedunculo-pontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Research Bulletin*, 58(4), 377-84.
- Nuñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F., Ruiz-Torner, A., & Teruel, V. (2006). Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*, 23, 2731-2738.
- Nuñez, A., Andrés, I., & Garcia-Austt, E. (1991). Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Experimental Brain Research*, 87, 303-308.
- O'Keefe, J., & Recce, M.L. (1993). Phase relationships between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3, 317-330.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.

- O'Keefe, J., & Dovstrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*, 34, 171-5.
- Oddie, S.D., Bland, B.H., Colom, L.V., & Vertes, R.P. (1994). The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 4, 454-473.
- Orzeł-Gryglewska, J., Jurkowlaniec, E., & Trojnar, W. (2006). Microinjection of procaine and electrolytic lesion in the ventral tegmental area suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Research Bulletin*, 68, 295-309
- Orzeł-Gryglewska, J., Kuśmierczak, M., Jurkowlaniec, E. (2010). Involvement of GABAergic transmission in the midbrain ventral tegmental area in the regulation of hippocampal theta rhythm. *Brain Research Bulletin*, xxx, xxx-xxx.
- Olvera-Cortés, M.E. (2003). Estudio experimental sobre la modulación serotoninérgica del ritmo theta hipocámpal durante el curso temporal del aprendizaje espacial. Tesis de Doctorado. Instituto de Neurociencias. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 200 pp.
- Olvera-Cortés, M.E., Cervantes, M., & González-Burgos, I. (2002). Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Research Bulletin*, 58(3), 261-70.
- Olvera-Cortés, M.E., Guevara, M.A., & González-Burgos, I. (2004). Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Research Bulletin*, 62, 379-384.
- Pan, W.X., & McNaughton, N. (2002). The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16(9), 1797-809.
- Pan, W.X., & McNaughton, N. (1997). The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behavior in rats. *Brain Research*, 764, 101-108.
- Paxinos, G., & Watson, C.H. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Edit. Academic press. Edic.4ta. San Diego, CA. USA.
- Rawlins, J.N.P. (1985). Associations across time: The hippocampus as a temporary memory store. *Behavioral and Brain Sciences*, 8, 479-496.
- Richter-Levin G., & Segal, M. (1989). Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. *Brain Research*, 477, 404-7.
- Richter-Levin, G., Greenberger, V., & Segal, M. (1994). The effects of general and restricted serotonergic lesions on hippocampal electrophysiology and behavior. *Brain Research*, 642, 111-116.

Riekkinen P., Sirvio, J., Valjakka, A., Miettinen, R., & Riekkinen, P. (1991). Pharmacological consequences of cholinergic plus serotonergic manipulations. *Brain Research*, 552, 23-6.

Robinson, T.E., & Whishaw, I.Q. (1974). Effects of posterior hypothalamic lesions on voluntary behavior and hippocampal electroencephalograms in the rat. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 86, 768-786.

Ropert, N., Miles, R., & Korn, R.H. (1990). Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 428, 707-722.

Ruan, M., Young, C.K., & McNaughton, N. (2010). Minimal Driving of Hippocampal Theta by the Supramammillary Nucleus During Water Maze Learning, *Hippocampus*, 00, 000-000.

Sahgal, A., & Keith, A.B. (1993). Combined serotonergic-cholinergic lesions do not disrupt memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45, 995-1001.

Santín, L.J., Rubio, A.S., Begega, R., Miranda., & Arias, J.L. (2000). Aprendizaje espacial e hipocampo. *Revista de Neurología*, 31(5), 455-462.

Segal, M. (1975). Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Research*, 94, 115-131.

Shahidi S., Motamedi, F., Bakeshloo, S.A., & Taleghani, B.K. (2004). The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 152, 81-87.

Shahidi, S., Motamedi, F., & Naghdi, N. (2004). Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Research*, 1026(2), 267-74.

Sharp, P.E., & Koester, K. (2008). Lesions of the mammillary body region alter hippocampal movement signals and theta frequency: Implications for path integration models. *Hippocampus*, 18, 862-878.

Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Molinoff, M., & Perry, P. (1993). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular, and Medical Aspects*. Edic.Primer. Ed. Raven Press. New York. PP.

Smythe, J.W., Christie, B.R., Colom, L.V., Lawson, V.H., & Bland, B.H. (1991). Hippocampal theta field activity and theta-on/theta-off cell discharges are controlled by an ascending hypothalamo-septal pathway. *The Journal of Neuroscience*, 11, 2241-2248.

Squire, L.R., Stark, C.E., Clark, R.E. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279-306.

Squire, L.R. 1987. *Memory and brain*, Oxford University Press.

- Vertes, R.P., & Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81, 893-926.
- Vertes, R.P., & Martin, G.F. (1988). Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 275, 511-541.
- Vertes, R.P., & McKenna, J.T. (2000). Collateral Projections from the Supramammillary Nucleus to the Medial Septum and Hippocampus. *Synapse*, 38, 281-293.
- Vertes, R.P. (1981). An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *Journal of Neurophysiology*, 46, 1140-1159.
- Vertes, R.P. (1982). Brainstem generation of hippocampal EEG. *Progress in Neurobiology*, 19, 159-186.
- Vertes, R.P. (1986). Brainstem modulation of the hippocampus. Anatomy, physiology, and significance. In R.L Isaacson & K.H. Pribram (Eds). *The hippocampus*, Vol. 4, Plenum, New York, pp. 41-75.
- Vertes, R.P. (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 326, 595-622.
- Vertes, R.P. (2005). Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus*, 15(7), 923-35.
- Vertes, R.P., Kinney, G.G., Kocsis, B., & Fortin, W. (1994). 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, 441-451.
- Vertes, R.P., Colom, L.V., Fortin, W.J. & Bland, B.H. (1993). Brain stem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Experimental Brain Research*, 96, 419-429.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Viana Di Prisco, G. (2004). Theta Rhythm of the Hippocampus: Subcortical Control and Functional Significance. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 3(3), 173-200.
- Vicens, P., Redolat, R., & Carrasco, M.C. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539-544.
- Vinogradova, O.S. (1995). Expresión, control, and probable, functional significance of neuronal theta-rhythm. *Progress in Neurobiology*, 45, 523-583.
- Vinogradova, O.S., Kitchigina, V.F., Kudina, T.A., & Zenchenco, K.I. (1999). Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta-rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in the rabbit. *Neuroscience*, 94, 745-753.

- Whishaw, I.Q., & Jarrard, L.E. (1996). Evidence for extrahippocampal involvement in place learning and hippocampal involvement in path integration. *Hippocampus*, 6, 513-524.
- Wiener, S.I., Paul, C.A., & Eichnbaum, H. (1989). Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *Journal of Neuroscience*, 9, 2737-63.
- Winocur, G. (1990). Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behavioural Brain Research*, 38(2), 145-54.
- Winson, J. (1978). Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science*, 201, 160-163.
- Witter, M.P. (1989). The Hippocampus: Connectivity of the Rat Hippocampus. *New Vistas*. Pp. 53-69. Alan R. Liss, Inc.
- Woodnorth, M.A., Kyd, R.J., Logan, B.J., Long, M.A., McNaughton, N. (2003). Multiple Hypothalamic Sites Control the Frequency of Hippocampal Theta Rhythm. *Hippocampus*, 13, 319-332.
- Yamamoto, T., Watanabe, S., Oishi, R., & Ueki, S. (1979). Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats. *Brain Research Bulletin*, 4, 491-495.
- Zacky Ariffin, M., Jiang, F., Chian-Ming., & Khanna, S. (2010). Nicotinic Receptor Mechanism in Supramammillary Nucleus Mediates Physiological Regulation of Neural Activity in Dorsal Hippocampal Field CA1 of Anaesthetized Rat. *Hippocampus*, 20, 852-865.

XI. ANEXOS

A1. Acción de 5,7-Dihidroxitriptamina

La 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) es muy utilizada para la lesión química selectiva de neuronas serotoninérgicas. La selectividad del 5,7-DHT, ocurre por la alta afinidad a la captura de la droga a través del transportador SERT de la membrana de neuronas serotoninérgicas. La toxicidad de 5,7-DHT es generada por autooxidación, al disolver el oxígeno a pH fisiológico con catálisis de una enzima catalasa. Las mitocondrias catalizan la oxidación de 5,7-DHT, por oxígeno molecular. El ferrocitocromo C, promueve un rápido incremento en el consumo de oxígeno, por lo que el transporte de los electrones desde la indolamina a dicho ferrocitocromo puede ocurrir dentro de las mitocondrias en la terminal del citocromo c oxidasa del segmento de la cadena respiratoria. La neurotoxicidad involucra una serie de reacciones que genera la formación de especies oxígeno-reductoras (O_2 , HO, H_2O_2) radicales, productos resultantes de la reacción de la autooxidación. La consecuencia de tales reacciones en el agotamiento del oxígeno conduce a la hipoxia, y la combinación de hipoxia y formación de OH, también induce daño a la neurona (Tahereh Tabatabaie, Monika Z. Wrona, and Glenn Dryhurst, 1990; Tahereh Tabatabaie and Glenn Dryhurst, 1992).

TECNOLOGIA