

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Instituto Nicolás Cabrera



**Estudio de los circuitos funcionales de hipocampo
mediante generadores multicelulares
del potencial extracelular**

Tesis doctoral presentada por:
Dña. Nuria Benito Frías

Dirigida por:
Dr. Oscar Herreras Espinosa

Madrid, Junio 2013

ÍNDICE

1. Introducción general	5
1.1. Circuitos: una de las claves para entender el funcionamiento del cerebro	6
1.2. ¿Qué es el potencial de campo? La lectura de la actividad poblacional	7
1.3. Avances y técnicas para el estudio de los mecanismos celulares del LFP	12
1.4. Citoarquitectura y estructura espacial de los campos eléctricos	14
1.5. Generadores LFP en el hipocampo	15
1.6. Tratamiento de señales compuestas en el volumen del cerebro: ¿Por qué funciona el ACI?	18
1.7. ¿Cómo son, qué representan y cómo se pueden utilizar los generadores LFP del hipocampo? ..	21
1.8. Objetivos	22
2. Material y métodos	23
2.1. Animales	24
2.2. Cirugía	24
2.3. Estimulación	25
2.4. Registro y adquisición de datos	25
2.5. Histología	25
2.6. Potenciales provocados	26
2.7. Análisis de Componentes Independientes (ACI)	27
2.7.1. Extracción de generadores	28
2.7.2. Reconstrucción de LFP específicos de vía	28
2.8. Análisis de densidad de fuentes de corriente (DFC)	29
3. Generadores principales del LFP de hipocampo	32
3.1. Introducción	33
3.2. Material y métodos	33
3.2.1. Farmacología	33
3.2.2. Experimentos crónicos	34
3.2.3. Procedimientos de análisis	34
3.3. Resultados	35
3.3.1. Localización subcelular de los generadores LFP de hipocampo	35
3.3.2. Generadores LFP del hipocampo en animal no anestesiado	39
3.3.3. Naturaleza excitadora e inhibidora de los generadores LFP hipocámpicos	41
3.4. Discusión	44
4. Alcance espacial de los generadores principales de hipocampo	49
4.1. Introducción	50
4.2. Material y métodos	52
4.2.1. Procedimientos experimentales específicos	52
4.3. Resultados	54
4.3.1. Módulos espaciales mínimos de correlación para LFPs específicos de vía	55

4.3.2. Similitudes y discordancias en la actividad de los generadores de hipocampo revelan una topología específica de las poblaciones aferentes	57
4.3.3. El grado de sincronización de las unidades presinápticas también determina la extensión de la coherencia espacial de LFPs	60
4.4. Discusión	62
4.4.1. Implicaciones funcionales de los límites estructurales del LFP coherente	63
5. Asimetría bilateral del generador Schaffer	68
5.1. Introducción	69
5.2. Material y métodos	71
5.2.1. Procedimientos experimentales	71
5.2.2. <i>Spike sorting</i>	72
5.2.3. Clasificación de unidades	72
5.2.4. Correlación cruzada	72
5.2.5. Coherencia espacial	73
5.2.6. Detección de eventos	73
5.2.7. Estadística de los eventos correlacionados	74
5.2.8. Correlaciones triples	75
5.2.9. Lesión	75
5.3. Resultados	76
5.3.1. Caracterización bilateral	76
5.3.2. Estudios estadísticos de las señales	77
5.3.3. Correlaciones triples	79
5.3.4. Eventos no pareados	80
5.3.5. Modulación unilateral	81
5.4. Discusión	83
6. Generador de actividad inhibitoria recurrente en el LFP de hipocampo durante actividad espontánea	86
6.1. Introducción	87
6.2. Material y métodos	89
6.2.1. Correlación espacial y coherencia espectral	89
6.2.2. Farmacología	90
6.2.3. <i>Spike sorting</i>	90
6.3. Resultados	90
6.3.1. Identificación del generador perisomático	90
6.3.2. Caracterización espacial del generador recurrente inhibitorio	93
6.4. Discusión	94
7. Estudio de la propagación de la depresión de Leão desde el análisis de generadores de hipocampo	98
7.1. Introducción	99
7.1.1. <i>Spreading Depression</i> como modelo de despolarización propagada	99
7.2. Material y métodos	100
7.3. Resultados	101

7.4. Discusión	104
8. Discusión general	106
9. Conclusiones	113
10. Bibliografía	116
11. Apéndice	126

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Circuitos: una de las claves para entender el funcionamiento del cerebro

La actividad animal depende del funcionamiento coordinado y preciso de muchos tipos celulares estructurados en Órganos y Sistemas, pero sin duda, las neuronas, son las más decisivas. Entender los mecanismos por los cuales estas células, especializadas en procesar la información proveniente tanto del exterior como del propio organismo, consiguen desencadenar un comportamiento animal complejo, es uno de los grandes retos de la ciencia actual. La gran diversidad de tipos neuronales del Sistema Nervioso (SN) está en función de la cantidad de variables físico-químicas que el organismo mide. Sin embargo, al menos en vertebrados, el número y la complejidad de los comportamientos parecen haber evolucionado sobre los mismos tipos neuronales. ¿Dónde reside, entonces, el hecho diferencial? A menudo se consideran dos posibilidades, la conectividad (factor estructural) y la actividad (función). En realidad, no son mutuamente excluyentes. De hecho, ni la estructura es tan rígida como se contemplaba décadas atrás, ni la actividad es tan variable como se podría desprender de algunas observaciones parciales.

Hoy en día sabemos que, en promedio, una neurona forma del orden de 1000 conexiones sinápticas y que el cerebro humano contiene al menos 10^{11} neuronas, de forma que se estiman unas 10^{14} conexiones sinápticas en el cerebro. Esta enorme cantidad de sinapsis, en cifras casi difíciles de manejar, está, sin embargo, cuidadosamente organizada en una complejísima red de células nerviosas, que en última instancia constituye el sustrato físico responsable de nuestra percepción del mundo externo y adaptación al mismo. El sustrato físico es el objeto de estudio de la Neuroanatomía. Conocer la topología de la red neural es esencial, pero no suficiente. Son las capacidades computacionales y las operaciones lógicas realizadas individualmente en cada neurona y colectivamente quienes conforman los flujos de información en el SN. Un primer paso será por tanto entender cómo las neuronas se organizan en cadenas de señalización y en qué consiste la codificación y procesamiento neurales.

Una pregunta que se plantea a menudo es si los diferentes procesos mentales residen en circuitos elementales localizados en regiones específicas o bien si podrían ser representados como propiedades emergentes del cerebro. Admitiendo la pregunta por su valor heurístico, tanto en un caso como en otro habríamos de reconocer que dilucidar las reglas que relacionan Anatomía y Fisiología del SN es esencial para entender la naturaleza del procesamiento de la información en el cerebro. Aunque las nuevas técnicas de imagen de actividad global del cerebro muestran activación coherente de un gran número de áreas y subregiones, sabemos que el cerebro procesa varios tipos de información simultáneamente y muchas de las estructuras implicadas pueden, y de hecho, son compartidas, lo que dificulta enormemente la clasificación de estructuras y circuitos en base a las distintas capacidades cognitivas o comportamientos concretos del animal. La noción clásica de grandes cadenas de flujo de información preferente, tales como los sistemas límbico, reticular, motor piramidal y extrapiramidal, etc., sigue siendo válida y sumamente útil desde un punto de vista práctico.

En tales sistemas, formados por varios núcleos o estructuras, más o menos distantes, conectadas por haces de axones desde las denominadas células de proyección, los circuitos locales juegan un papel crítico en la elaboración de información de salida de cada núcleo. Por su parte, las múltiples aferencias que recibe

cada núcleo se distribuyen entre los subtipos neuronales que conforman la red local. E individualmente, las neuronas han sido contempladas como procesadores elementales de las múltiples entradas, actuando como operadores lógicos, detectores de coincidencia, etc., dependiendo del repertorio específico de las conductancias intrínsecas de sus membranas excitables, su distribución subcelular, y del tipo de entrada sináptica recibida. Pero más allá de los distintos niveles de organización estructural y/o funcional, el flujo de información afecta e involucra a todos ellos. Así, dentro de una región, es común encontrar que aferencias a un subtipo neuronal concreto alteran la actividad de los demás subtipos, e incluso del núcleo en su conjunto. Esta característica funcional, aun siendo soportada por la topología de las conexiones entre los distintos tipos neuronales, refleja la extraordinaria capacidad y rango de interacciones dinámicas a las que se enfrenta el estudioso del SN.

Para entender todos los niveles de procesamiento cerebral, desde la integración de señales elementales en células individuales, a los relativos a operaciones cognitivas y comportamientos, se requiere el conocimiento detallado de las redes neuronales y de cuáles son las **relaciones celulares y sinápticas** responsables de la funcionalidad, ya sea sensorial, motora o cognitiva, a lo que Cajal ya se refirió como “junglas impenetrables” (“...*impenetrable jungles where many investigators have lost themselves...*”, Ramón y Cajal, 1923). Desafortunadamente, los grados de libertad en un sistema estructuralmente tan complejo son demasiados como para predecir el rango de actividades que puede albergar únicamente en base a sus características citoarquitectónicas y de conectividad, de manera que se hace imprescindible **caracterizar la actividad** de estos circuitos en lo posible.

Para explorar esas “junglas” que mencionaba Cajal al referirse a los microcircuitos neuronales, los neurocientíficos explotaron durante décadas el registro eléctrico mediante electrodos finos que capturan la actividad de una o unas pocas neuronas dentro de una región. Uno de los grandes problemas es la dificultad experimental para registrar de forma simultánea tantas neuronas como sería necesario. También son escasos y poco eficientes los recursos analíticos requeridos para una caracterización biofísicamente realista de las redes neuronales en las que participan. Por otro lado, los circuitos neuronales pueden involucrar a millones de neuronas, por lo que era probable, y así se ha comprobado en numerosas observaciones, que la codificación temporal de los estímulos se realiza mediante grupos neuronales funcionales o clústers cuya actividad conjunta sería invisible para los registros unitarios. Además, dada la capacidad de modulación de la eficiencia de sus conexiones, la conectividad funcional individual de las neuronas está sujeta a reorganizaciones continuas y dinámicas, de manera que una misma neurona participa en diferentes momentos en distintos clústers funcionales. Es por esto que medir la actividad multineuronal puede ser más útil para caracterizar las propiedades de un circuito que las respuestas de células individuales. En la actualidad, disponemos de dispositivos de registro de alta densidad con los que se puede capturar tanto la actividad de espigas de gran número de neuronas, como otros parámetros de la actividad de grupos neuronales, tales como el potencial de campo, que, combinados con modernas herramientas analíticas para el procesamiento de datos y con modelos biofísicos, nos acercan a una visión del comportamiento cooperativo de las neuronas.

1.2. ¿Qué es el potencial de campo? La lectura de la actividad poblacional

El potencial eléctrico extracelular o potencial de campo se genera por superposición espacio-temporal de todos los procesos que implican movimiento de carga eléctrica en el medio, desde potenciales de acción a

las fluctuaciones más lentas. Inicialmente, este potencial eléctrico fue referido como *ondas cerebrales* (*brain waves*) y posteriormente ha sido denominado de diferentes maneras atendiendo a dónde y cómo era registrado: electroencefalograma (EEG) cuando se registra desde la superficie del cráneo, electrocorticograma (ECoG) cuando se capta desde la superficie de la corteza, y EEG intracraneal o potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés: *Local Field Potential*) cuando se registra intracranealmente con un electrodo fino. Las condiciones de registro son importantes pues condicionan qué partes de la actividad eléctrica total y en qué proporción relativa son captadas. Así, el LFP contiene una mayor contribución relativa de las células que rodean al electrodo, si bien la mayoritaria puede ser generada en cualquier región, incluso remota. En emplazamientos apropiados, cercanos a clústeres activos de neuronas, el LFP es, por tanto, el tipo de registro que contiene mayor información y el más idóneo para captar la actividad espontánea de los distintos subtipos neuronales de una red local.

Existe una enorme cantidad de bibliografía acerca de las aplicaciones clínicas, fisiológicas y psicológicas del LFP, pero su fisiología, fuentes y mecanismos de regulación, que han sido objeto de estudio durante décadas, han producido avances desiguales y, en general, escasos. La complejidad estructural y heterogeneidad funcional de los generadores celulares de la corriente y del medio por el que se propagan, así como diversas dificultades técnicas y teóricas de difícil solución han limitado enormemente la extracción de información de este importante parámetro de la actividad neuronal. De hecho, aún hoy perduran dos cuestiones básicas para la comprensión del LFP: (1) ¿cuál es la naturaleza de sus generadores elementales? y (2) ¿cuál es la relación del LFP, entendido como reflejo de actividad poblacional, y la actividad real a nivel neuronal? Las dos preguntas están íntimamente relacionadas de forma que ni en su tratamiento teórico son fácilmente dissociables.

En el primer tercio del siglo XX la teoría dominante postulaba que las fluctuaciones temporales del LFP reflejarían la tasa de descarga de potenciales de acción unitarios originados por neuronas cercanas al electrodo, en cuanto que esta es la forma más visible de actividad nerviosa extracelular. Bajo esta teoría se encontraba el hecho de que las espigas extracelulares tienen una amplitud considerable mientras que las corrientes sinápticas son imperceptibles. Varios experimentos con registros (Berger, 1929) o incluso modelos (Adrian & Matthews, 1934) parecían confirmar observaciones de Adrian y Moruzzi (1939) en las que se apreciaba una correlación entre el EEG registrado en corteza y la frecuencia de disparos neuronales en la vía espinal descendente. Sin embargo, otros investigadores discreparon con este modelo al encontrar potenciales lentos sin relación evidente con disparo unitario (Gerard et al., 1936) y postularon su origen en regiones dendríticas, pues fueron registrados en las capas más superficiales de la corteza donde los somas celulares y las espigas son escasos. Con la llegada de los microelectrodos (Li et al., 1956) se mejoró el estudio del potencial extracelular permitiendo demostrar que las espigas y las ondas lentas tienen como origen mecanismos celulares diferentes. También surgió la que a la postre sigue siendo la característica más significativa e intrigante del LFP: el carácter no focalizado de su actividad, esto es, algunas fluctuaciones se pueden registrar con similares características en grandes extensiones de tejido.

En esta línea, fueron importantes diversas series experimentales que realizaron registros secuenciales en profundidad (laminares) con microelectrodos y que sugerían que los diferentes componentes de un LFP espontáneo se originarían a distinta profundidad en el tejido (Calvet et al., 1964), al igual que los componentes de los potenciales generados por una sola neurona a lo largo de su eje (Spencer y Brookhart, 1961; Fatt, 1957). Así, en diferentes lugares de la superficie se podría registrar un LFP distinto

dependiendo de la localización subcelular de las corrientes generadas por las distintas entradas sinápticas. A partir de estas observaciones se postuló que cada sinapsis podría actuar como un generador unitario independiente, mientras que el potencial de membrana en un registro intracelular somático representaría la suma temporal de todas las contribuciones sinápticas individuales. Determinar si era la actividad de espinas sinápticas individuales o la actividad integrada registrable en los somas la que guardaba relación causal con el LFP requirió de gran número de experimentos y no menos debate. Mientras que la actividad somática guarda una relación clara con la tasa de disparo de potenciales de acción, la pequeña amplitud de las corrientes sinápticas parecía poco probable como generador de una actividad extracelular de gran amplitud. Sin embargo, a este respecto hay que tener en cuenta que los axones de células aferentes (presinápticos) tienden a ramificarse profusamente y hacer múltiples contactos con numerosas espinas en neuronas cercanas, o incluso en una misma neurona. Considerando que dichas sinapsis son activadas simultáneamente por el disparo de la fibra aferente, el generador unitario mínimo sería el grupo de sinapsis que comparten la misma entrada presináptica, motivo por el que se denominó como **unidad sináptica funcional** (Elul, 1972) y que, por tanto, puede, y de hecho tiene un carácter multineuronal.

Hoy día se acepta que la actividad sináptica constituye la mayor contribución al potencial de campo extracelular, de forma que el solapamiento espacial y temporal de las corrientes extracelulares generadas a través de las membranas de muchos compartimientos subcelulares individuales genera una señal medible (Elul 1971; Niedermayer y Lopes da Silva, 2005; Logothetis, 2004). El mecanismo básico se puede describir de la siguiente manera. Los neurotransmisores químicos actúan sobre receptores en la membrana postsináptica, ocasionando la apertura de un canal iónico a través de la membrana por el cual fluyen iones a favor de gradiente electroquímico entre el interior y el exterior celular. En el caso de neurotransmisores excitadores, como por ejemplo el Glutamato, se establece un flujo neto de cargas positivas llevadas fundamentalmente por iones de Na^+ y Ca^{2+} al interior celular, de manera que la pérdida neta de cargas en la cara externa genera una zona electronegativa denominada *sumidero de corriente extracelular*. Para mantener la electroneutralidad a lo largo de la neurona, esta corriente eléctrica transmembrana se balancea mediante una salida de cargas equivalente en membranas adyacentes, dando lugar a una *fuentes de corriente extracelular*. Considerando exclusivamente el espacio extracelular, este circuito o lazo de corriente transmembrana se comporta como una separación espacial de cargas, esto es, un dipolo eléctrico. La región de la membrana sináptica se denomina *activa*, mientras que las membranas adyacentes por las que la corriente retorna al espacio extracelular se consideran *pasivas*. En principio, las sinapsis excitadoras serían, individualmente, contribuyentes más fuertes al LFP, pues su mayor potencial de equilibrio genera corrientes transmembrana mayores que en el caso de las sinapsis inhibitoras. Por ejemplo, los receptores inhibitoras tipo GABA-A añadirían poca corriente al medio extracelular al estar el potencial de equilibrio del Cl^- muy cerca del potencial de reposo de la membrana (Bartos, 2007; Koch 1999). En neuronas activas, donde la membrana está despolarizada, las corrientes inhibitoras pueden generar corrientes sustanciales (Trevelyan, 2009; Bazélot 2010). Sin embargo, es importante hacer notar que en última instancia la contribución al LFP de unas y otras depende no tanto de la fuerza electromotriz como de la cantidad, agrupación espacial y otros factores arquitectónicos, algunos de los cuales son objeto del presente estudio, de tal manera que globalmente hacen impredecible la naturaleza sináptica química de un LFP dado contribuido por varios generadores.

Existen otros fenómenos eléctricos de membrana que también contribuyen de forma neta al potencial extracelular, tales como los potenciales de acción (de duración menor a 2 ms), las espigas de Ca^{2+} (evento no sináptico de larga duración: 10-100ms disparadas por potenciales postsinápticos excitadores ó EPSPs),

y otras corrientes intrínsecas. Además de éstos, las uniones intercelulares tipo *gap*, las interacciones neurona-glia y los fenómenos efápticos generan corrientes eléctricas cuyo componente extracelular se añadiría al potencial de campo, si bien en mucho menor grado, quizá residual.

La interpretación unitaria de las fluctuaciones del LFP no cuenta con suficientes datos experimentales y se utiliza más frecuentemente la inferencia teórica. A este respecto resulta muy completo el análisis realizado ya tiempo atrás por Rafael Elul (1972). Para relacionar la actividad macroscópica y la de los generadores elementales se deben considerar dos modelos, dependiendo de si la actividad de estos últimos se encuentra sincronizada o no. En este análisis se ha puesto mayor énfasis en aquellas relaciones basadas en la fase de ambas señales, esto es en su relación temporal. Si la actividad LFP resulta de suma de generadores sincronizados es claro que cualquiera de los generadores elementales estaría en fase con el LFP, incluso cuando tuvieran una orientación diferente (como las espinas alrededor en una misma dendrita) o generaran dipolos de polaridad opuesta (como las espinas en el árbol basal o el apical). Sin embargo, en ambos casos, y a pesar de la coincidencia de fases unitaria/poblacional, se esperaría una menor actividad de esta última por cancelación mutua entre las unitarias. Podría pensarse que la suma de varios generadores no sincronizados diera lugar a una actividad poblacional mínima o nula por falta de fases preferentes en la población. En cambio, puede mostrarse analíticamente que no es así, pues excepto en el caso de generadores 180° fuera de fase, las actividades no se cancelan y generan una actividad poblacional con espectro tan amplio de frecuencias como el de los generadores unitarios, si bien no se observaría una relación de fase constante del LFP con ninguno de los generadores unitarios, excepto por casualidad.

Continuando en el plano teórico, y respecto a la relación de amplitud de las actividades unitaria y poblacional es fácil predecir que en el caso de generadores sincronizados la señal LFP aumenta directamente con el número de generadores activos. En cambio, si los generadores no están sincronizados la relación de amplitudes, no sería directa, sino proporcional a la raíz cuadrada del número de generadores unitarios.

Los estudios experimentales dirigidos a relacionar actividad LFP y unitaria comenzaron hace alrededor de medio siglo, y tanto entonces como en tiempos más recientes se han centrado en la comparación de actividad LFP y las variaciones del potencial de membrana en los somas de neuronas individuales, los elementos celulares accesibles técnicamente en registros de animal completo. Hoy día sabemos que la actividad registrada en el soma neuronal es un compendio de la actividad eléctrica de los numerosos generadores individuales en las espinas dendríticas cercanas y distantes al soma, así como de generadores intrínsecos no sinápticos (canales dendríticos activados por voltaje), y por tanto no tiene por qué guardar una relación temporal con la actividad de aquellas. Sin embargo, las comparaciones de actividad unitaria y poblacional, con las debidas reservas, siguen siendo útiles y han aportado buena cantidad de información. En estas comparaciones es más frecuente el estudio de las relaciones de fase que de amplitud, debido a la ausencia de datos esenciales sobre la contribución cuantitativa de un generador elemental (una espina sináptica) a la actividad LFP poblacional. Los primeros estudios comparativos de actividad intracelular y LFP o EEG ya revelaron coincidencias temporales en eventos espontáneos específicos, tales como las “puntas” del sueño (*spindles*). Curiosamente, las ondas intracelulares ocurrían sólo en un porcentaje de las veces que se observaban en el LFP, lo que sugería una sincronización ocasional de la unidad con la población generadora del LFP. A una conclusión similar llevaron los estudios de Elul, en los que se provocaron episodios silentes intermitentes en el LFP cortical que sólo

concordaban con la actividad unitaria en algunas ocasiones. Globalmente, las comparaciones LFP/actividad somática intracelular descartan la interpretación del LFP como el resultado de una población de generadores unitarios desincronizados, pues en tal caso los periodos silentes solo se podrían observar a causa de una disminución drástica o la abolición completa de la actividad unitaria, en contra de la observación experimental. Por otro lado, la pequeña amplitud de la actividad LFP espontánea (decenas a centenares de microvoltios) comparado con la provocada por estimulación exógena de la población completa (10 a 100 veces mayor) indica claramente que la sincronización espontánea de una pequeña porción de la población total de generadores ya alcanzaría una actividad significativa y medible. Comenzó, así, a fraguarse el concepto de que el LFP es la consecuencia de una sincronización transitoria de una fracción cambiante de los generadores de una población. Esta sugerente teoría admitía, además, que el resto de la población puede permanecer continuamente activa pero no sincronizada, de forma que su contribución sería tan pequeña que permanecería por debajo de la capacidad resolutive de los registros.

Es importante tener en cuenta que la sincronización de la actividad sináptica de las neuronas cercanas al electrodo y cuyas corrientes transmembrana se suman para dar lugar al LFP, es una manifestación directa de la sincronización de las neuronas aferentes a través de sus axones y contactos sinápticos con las células generadoras, estén aquellas cerca (e.g. interneuronas locales de axón corto) o en estructuras lejanas (neuronas de proyección con axón largo). La interpretación actual más aceptada por los teóricos sería, por tanto, que el LFP es una variable mesoscópica que contiene información espaciotemporal precisa de la actividad sináptica de las poblaciones convergentes en una región dada (Nunez y Srinivasan, 2006) y que sería originado por sincronizaciones intermitentes de grupos establecidos de células nerviosas, pudiendo estar la sincronización comandada por un marcapasos externo. Dicho de otra manera, las fluctuaciones del LFP en un sitio reflejarían las fluctuaciones de la salida de la población aferente. Desafortunadamente, la imposibilidad técnica de registrar la actividad de miles de espinas dendríticas impide la contrastación de la anterior hipótesis, o de cualquier otra, por lo que las distintas teorías han tenido escasa influencia sobre la utilización posterior de los LFPs y la interpretación de los datos experimentales.

Para avanzar en la interpretación de los LFPs, los autores clásicos ya observaron la necesidad de conocer con detalle el patrón espacial (tridimensional) de las conexiones sinápticas que se activan en un instante dado, pues es bien conocido que un voltaje concreto e incluso un gradiente espacial pueden ser generados por un número no finito de combinaciones de los generadores microscópicos en el espacio. Sería necesaria una descripción tridimensional del potencial eléctrico en cada instante, datos que parecen ciertamente inalcanzables. En efecto, la profusa arborización terminal de los axones que contactan en la población neuronal cercana al registro, el solapamiento variable en las dendritas de los contactos sinápticos realizados por axones procedentes de distintas neuronas y poblaciones aferentes, y la gran variabilidad en el subgrupo concreto de neuronas de cada subpoblación aferente que se activa en cada instante, parecen constituir en su conjunto un problema insoluble. En esta Memoria nos proponemos mostrar que quizá ya hemos conseguido la suficiente capacidad técnica y analítica para abordar este problema de una manera cuantitativa en registros reales.

Para ello, hemos de aprovechar todas las ventajas posibles que nos ofrece el sistema nervioso para su estudio. Y entre ellas, es bien conocido que aquellas regiones cerebrales donde la regularidad anatómica es muy elevada, tales como el hipocampo y la neocorteza, son las que, en general, muestran LFPs de mayor amplitud. Es en esta regularidad anatómica en la que se encuentran situaciones espacialmente

favorables, y donde se pone de manifiesto que la sincronización transitoria de un cierto número de generadores unitarios requiere, además, de su concentración en el espacio, de tal manera que la suma de sus corrientes elementales genere un potencial eléctrico significativo.

En particular, es bien conocido que estas regiones cerebrales desarrollan actividad LFP con un patrón espacial laminar característico, fácilmente registrable en su totalidad con las modernas técnicas que emplean multielectrodos lineales. Esta actividad laminar se presenta como brotes espontáneos de cambios de voltaje coherente en grupos de electrodos contiguos y presentan la enorme ventaja de que cubren una extensión espacial fácilmente cotejable con la citoarquitectura de la zona registrada. Si bien esta observación no modifica las conclusiones de las observaciones realizadas con electrodos sencillos medio siglo atrás, y a partir de las cuales ya se admitía la posibilidad de que “ondas cerebrales” de diferentes características se podían generar en partes discretas homólogas de cada neurona, la observación simultánea en diferentes niveles ha permitido la aplicación de nuevas técnicas de análisis más eficientes y con mayor capacidad de prospección. En las siguientes secciones repasaremos brevemente la información más moderna relativa a los mecanismos celulares del LFP, siempre en relación a las bondades y deficiencias que caracterizan cada técnica, para acabar planteando los objetivos concretos que se han perseguido en esta Memoria.

1.3. Avances y técnicas para el estudio de los mecanismos celulares del LFP

Al no disponer de un mapa que indique las conexiones anatómicas precisas entre cada neurona y no contar con herramientas de análisis suficientemente poderosas como para registrar y analizar las relaciones funcionales entre todas las neuronas que contribuyen en cada instante al LFP, hemos de confrontar y ensamblar la información obtenida con técnicas más generales que permiten explorar aspectos estadísticos de las relaciones entre generadores individuales. Como veremos, la falta de una teoría contrastada experimentalmente, ha hecho que los investigadores recurran sobre los mismos conceptos y aproximaciones que los ya introducidos hace décadas.

La aproximación más común ha sido estudiar el voltaje extracelular con métodos de descomposición exclusivamente temporal, dejando a un lado el importante componente espacial, y abundando en el concepto de fase mencionado. Este concepto está estrechamente ligado a la duración de los eventos eléctricos en las membranas neuronales. Así, se han tratado de encontrar aquellos eventos unitarios que pudieran estar específicamente relacionados con bandas de frecuencia, en las que típicamente ha sido dividido el EEG intracraneal (Logothetis, 2002). En una división primaria se han reconocido dos fracciones, la correspondiente a actividad multiunitaria (MUA) que ocupa la banda de frecuencias más elevada (>300-500 Hz) y los LFPs propiamente dichos (<100 Hz). La MUA representaría la suma ponderada de los potenciales de acción de las neuronas dentro de un radio estimado de unas 200 μm alrededor de la punta del electrodo de registro (Holt y Koch, 1999; Gold et al., 2006), aunque algunos autores aumentan dicho radio y sugieren que reflejaría la actividad de un gran número de neuronas en una esfera de uno a algunos milímetros alrededor del electrodo de registro (Mitzdorf, 1985; Juergens et al., 1999, aunque también Katzner et al., 2009). Por su parte, el resto de actividad comprendida en las frecuencias más lentas estaría más correlacionada con los potenciales excitadores postsinápticos (PEPSs), potenciales intrínsecos lentos y espigas dendríticas que con las corrientes generadas durante los

potenciales de acción de las neuronas circundantes (Haberly y Sepherd., 1973; Mitzdorf, 1985; Logothetis, 2002).

En los últimos 15-20 años se han seguido varias aproximaciones para estudiar la relación entre espigas y LFPs (O'Keefe y Recce, 1993; Fries et al., 2001; Laurent, 2002; Pesaran et al., 2002; Bédard et al., 2004; Kreiman et al., 2006; Belitski et al., 2008; Montemurro et al., 2008; Rasch et al., 2008; Nauhaus et al., 2009). Las conclusiones no avanzan nada esencial sobre los postulados clásicos generados a partir de técnicas más rudimentarias e inferencias teóricas. Por ejemplo, se han aportando datos que muestran la correspondencia entre ambas señales en base a operaciones de filtrado lineal en la actividad de una o varias neuronas, que supuestamente explicarían una fracción significativa del curso temporal del LFP (Rasch, 2009). Sin embargo, otros estudios niegan una linealidad en la relación entre las dos señales y sugiriendo una mayor complejidad de los componentes que forman el LFP (Koch, 1999).

También se recoge en la literatura moderna que el LFP refleja la activación sincrónica entre agrupaciones de neuronas locales (Fries et al., 2001; Laurent 2002; Logothetis 2002; Womelsdorf et al., 2006; Montemurro et al., 2008) y que podría ser una manifestación de computaciones locales, limitadas en el espacio y en un intervalo de tiempo definido, ideas ya avanzadas tiempo atrás por investigadores como Elul, Woodbury, etc. Por su parte, la biofísica que subyace a la generación de los LFPs tampoco ha avanzado notablemente. El número de neuronas involucradas y cómo los eventos neuronales a través de agrupamientos locales dan lugar al potencial de campo son detalles que aún están lejos de ser aclarados, aunque aproximaciones recientes como la que empleamos en nuestro trabajo ya han proporcionado datos concretos de la contribución de diversas fuentes espaciales de corriente al LFP (Korovaichuk et al., 2010; Fernández Ruiz et al., 2012).

La fidelidad con la que se pueden registrar las rápidas fluctuaciones temporales del LFP nos permite albergar la expectativa de que la descodificación del LFP ayudará a entender los principios del procesamiento cerebral de la información. Hasta ahora, resolver la actividad eléctrica dentro del tejido neural y descomponerla en sus fuentes informativas originales ha resultado problemático (Nunez y Srivasan 2006). Debido a la alta velocidad de propagación de las corrientes eléctricas en el volumen conductor del cerebro, los potenciales generados por una fuente de corriente discreta en distintos puntos de registro son, en la práctica, sincrónicos, esto es, coherentes. En los últimos años han aparecido nuevas aproximaciones que tienen en cuenta el carácter espacial del voltaje producido por las corrientes sinápticas, tales como el estudio de la coherencia espectral entre señales múltiples (Kocsis et al., 1999; Montgomery et al., 2009), el uso de metodología de componentes principales, o el de análisis de poblaciones laminares, y que han permitido identificar algunas características de las fuentes eléctricas intracerebrales (Einevoll et al., 2007; Kocsis et al., 1999). Sin duda, el más idóneo para analizar mezclas espaciales de señales en un volumen es el análisis de componentes independientes, que ha conseguido estos objetivos con una resolución espacial y temporal suficiente (Bell y Sejnowski 1995; Makeig et al., 2004; Jung et al., 2005; Castellanos y Makarov 2006). Ciertamente es que, en su aplicación a registros múltiples extracraneales (EEG), existen factores fuertemente restrictivos, como las propiedades heterogéneas del medio conductor, que pueden distorsionar los campos eléctricos, e incluso podría condicionar una propagación variable de corrientes de distinta frecuencia si finalmente se confirma la existencia de componentes capacitivos que operen en un rango fisiológico (Destexhe, 2003). Tales restricciones limitan la utilidad del ACI sobre registros extracraneales a una localización grosera en profundidad de grandes fuentes eléctricas (zonas o estructuras de grandes dimensiones), pero de origen

celular desconocido. Afortunadamente, dichos factores no son relevantes para su aplicación a LFPs intracerebrales debido a la cercanía de las fuentes de corriente al electrodo de registro, minimizando los efectos de propiedades eléctricas heterogéneas del tejido (Tanskanen et al., 2005; Fernandez Ruíz., 2013).

1.4. Citoarquitectura y estructura espacial de los campos eléctricos

Como ya se ha mencionado, todos los tipos neuronales contribuyen al potencial extracelular, pero su contribución relativa depende en buena medida de la morfología tridimensional de la célula, pues durante eventos electrogénicos la corriente cruza la membrana neuronal al espacio extracelular dos veces, una por la zona sináptica activa y otra, de magnitud equivalente y polaridad opuesta, repartida por el resto de la célula tras ser distribuida internamente por conducción electrotónica, obviamente con diferente peso. Desde el punto de vista extracelular, la activación de una sola espina sináptica genera corriente en todos los puntos de la anatomía neuronal. Las neuronas piramidales poseen una morfología axial muy polarizada, con dendritas largas y finas que pueden generar fuertes dipolos a lo largo del eje somato-dendrítico. Tales dipolos dan lugar a un campo eléctrico con estructura espacial de campo abierto, como fue denominada por Rafael Lorente de Nó (1947). Por el contrario, las neuronas de morfología esférica y simétrica radial, como las tálamo-corticales que poseen dendritas de tamaño similar en todas direcciones, darán lugar a un campo cerrado (Lorente de Nó, 1947), aunque esto sólo ocurra cuando todas las dendritas están activadas simultáneamente. Asumiendo que el medio es homogéneo, los principales factores que determinan el valor del potencial de campo son el alineamiento espacial de las neuronas y la sincronización temporal de los dipolos que generan (Buzsáki, 2006; Buzsáki et al., 2003; Linden et al., 2011). En estructuras regulares como el hipocampo, corteza y cerebelo, las neuronas están ordenadas en empalizada, con sus arborizaciones dendríticas entrelazadas y en paralelo, y con buena parte de las entradas aferentes estratificadas en perpendicular al eje somato-dendrítico y realizando contactos sinápticos en zonas discretas del árbol dendrítico. Esta configuración es ideal para la superposición de dipolos activos sincrónicos y explica en buena medida por qué el LFP en el hipocampo muestra una gran amplitud. Otro factor importante que afecta a la magnitud de las corrientes extracelulares es la arquitectura global de la población, pues la activación sincrónica de una población con distribución curva genera distorsiones importantes en la suma extracelular de los dipolos unitarios (Woodbury 1960).

Todos estos factores señalan a la monocapa de células piramidales de la región CA1 del hipocampo como una estructura idónea para el análisis del LFP mediante el ICA, pues su regularidad y estructura cuasiplanar ofrece numerosas ventajas, tanto para la separación de actividad coherente como para la identificación celular de las fuentes eléctricas separadas. A diferencia de la neocorteza, donde las dendritas homólogas están dispuestas a diferentes alturas y dendritas diferentes comparten dominios espaciales, en la región CA1 del hipocampo la mayoría de neuronas corresponden a una sola clase morfológica de células piramidales orientadas con su eje principal en paralelo, constituyendo una empalizada de dipolos eléctricos a la que llegan de forma estratificada algunas de sus entradas sinápticas. Estas entradas proceden de distintas subpoblaciones de neuronas aferentes, tanto extrínsecas como locales. Por ejemplo, varios subtipos de interneuronas locales poseen terminaciones axonales circunscritas a dominios dendríticos discretos de las células piramidales, bien conocidos por estudios histológicos (Lorente de Nó, 1934; Somogyi y Klausberger 2005). Así, la actividad conjunta de cada subtipo de neurona aferente se espera que contribuya al LFP en bandas espacialmente fijas, que corresponden a su territorio sináptico en las dendritas de las células piramidales.

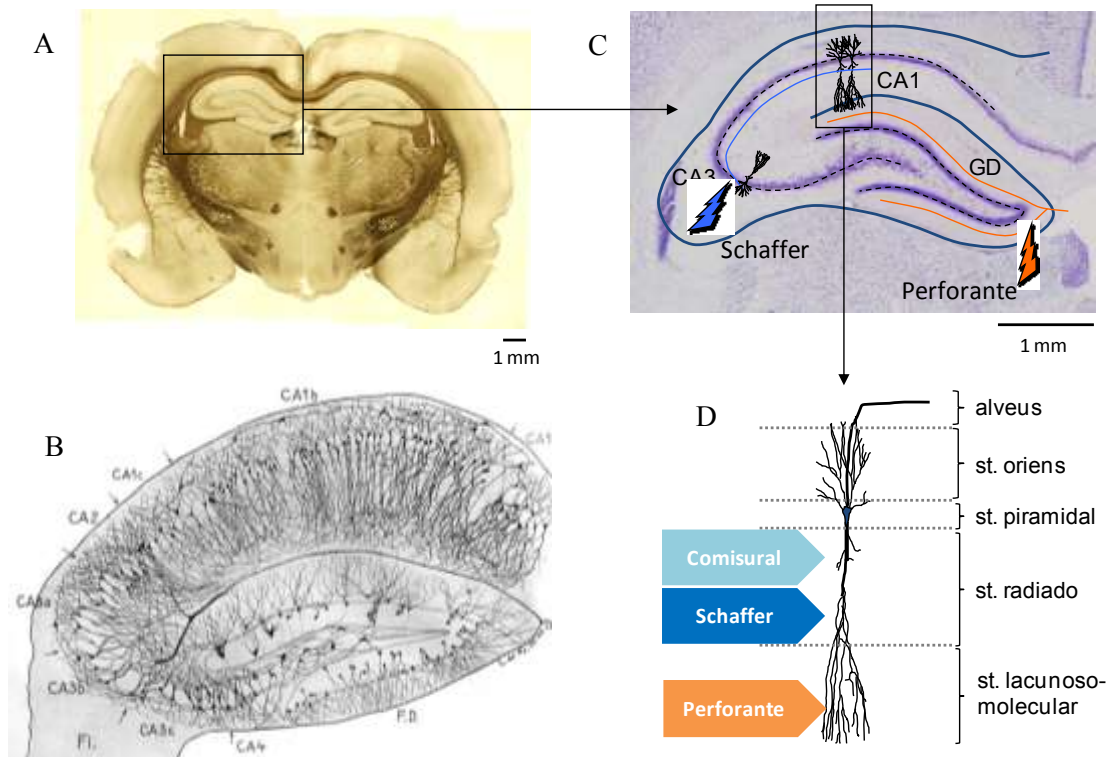


Fig. 1. Anatomía del Hipocampo. **A.** Sección histológica (tinción *Nissl*) que ilustra la localización y estructura general de la formación hipocámpal (*Hippocampus Book* Fig.3-2). **B.** Diagrama realizado por Lorente de Nó (1934) en el que se muestran las distintas regiones del hipocampo en ratón adulto (*Hippocampus Book* Fig. 2-10). **C.** Corte histológico sagital de hipocampo de rata con representación esquemática de sus regiones (CA1, CA2, CA3 y DG). **D.** Detalle de las aferencias principales (Colaterales de Schaffer, Comisural y Perforante) a las células piramidales de CA1 en la que se diferencian los distintos estrados o dominios dendríticos (alveus, sr. oriens, st. piramidal, st. radiado y st lacunosomolecular).

1.5. Generadores LFP en el hipocampo

Más allá de las condiciones anatómicas ideales que posee el hipocampo para el análisis de las fuentes del LFP mediante el ACI hay que mencionar que se trata de una formación de la arcuocorteza cerebral de vertebrados superiores situada dentro del lóbulo temporal medial, que ofrece características electrofisiológicas idóneas para abordar el estudio de las relaciones dinámicas entre poblaciones neuronales. Durante décadas esta estructura ha suscitado gran interés por participar en el procesamiento de las entradas sensoriales y numerosas habilidades cognitivas. Además, su alta susceptibilidad a desarrollar plasticidades sinápticas relacionadas con memoria y aprendizaje (Vanderwolf, 1969; Bliss y Lomo, 1973; Jarrard, 1978; O'Keefe y Nadel, 1978; Morris et al., 1982; Muller y Kubie, 1987; Amaral y Witter, 1989; Lopes da Silva et al., 1990; Muller et al., 1991; Wilson y McNaughton, 1993; Burgess y O'Keefe, 1996; Buzsáki et al., 1996; Shapiro y Eichenbaum, 1999) hacen de esta estructura un objetivo fundamental en el estudio de la fisiología cerebral.

Como aproximación para investigar la dinámica espontánea de las poblaciones aferentes a una región dada, el laboratorio del Dr. Herreras en colaboración con el matemático VA Makarov de la U. Complutense de Madrid, ha desarrollado un método de alta resolución basado en una serie de procesamientos de señales múltiples, entre los que es parte central el ACI (Bell y Sejnowski 1995; Makeig et al., 2010; Stone 2004), para separar especialmente las fuentes del LFP del hipocampo de rata

registrado mediante multielectrodos lineales, (Makarov et al., 2010 y Korovaichuk et al., 2010). Este método permite separar varios componentes del LFP (denominados generadores-LFP) cada uno de los cuales contiene una fracción de la actividad sináptica generada en la población de células diana locales por activación específica de distintas subpoblaciones de neuronas aferentes. En estructuras regulares permite, además, la identificación subcelular de la región dendrítica correspondiente al territorio sináptico de cada aferencia, así como la cuantificación de la contribución de cada uno de ellos al LFP del hipocampo.

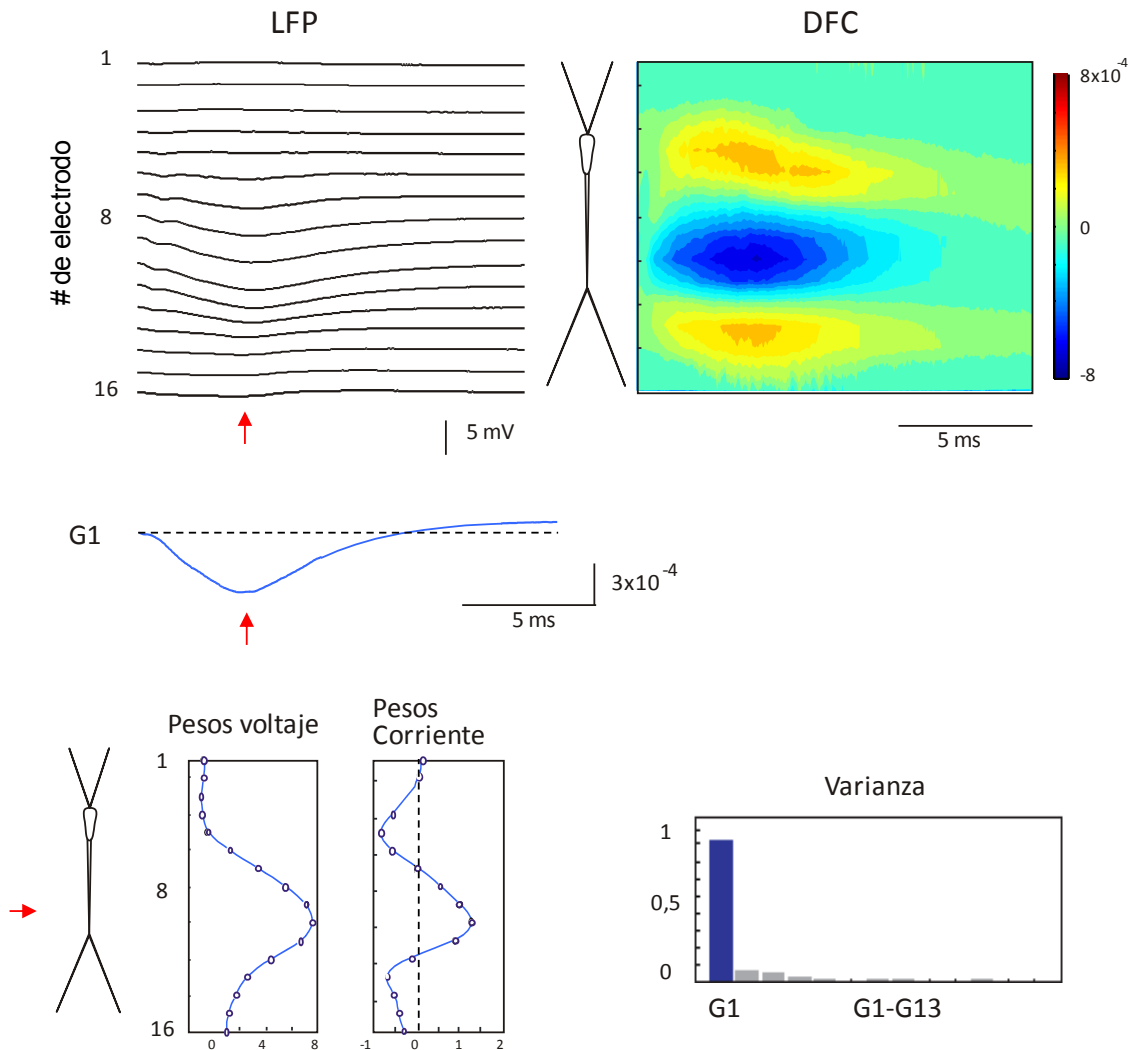


Fig. 2. Representación del método de ACI a partir de un LFP registrado en las células piramidales de CA1 y producido por una activación subumbral de las colaterales de Sch. El potencial provocado desde las células de CA3 genera un potencial negativo en el árbol dendrítico apical de las células piramidales de CA1. El flujo de corrientes transmembrana producido por este potencial revela corrientes de entrada (sumidero en azul) en la zona del contacto aferente en el *stratum radiatum* flanqueado por fuentes pasivas (amarillo) en la capa de somas y del *stratum lacunosum*. La aplicación del ACI al perfil del LFP muestra un único componente significativo con un curso temporal que coincide con el cambio de voltaje en los electrodos centrales. Los mapas de voltaje y de corriente representan los perfiles espaciales del potencial y de las corrientes del registro original. Cada electrodo de registro queda representado por un punto vacío en el mapa. (Korovaichuk et al. *J Neurophys.* 2010).

Ya hemos mencionado que en cada población neuronal convergen varias entradas procedentes de distintas estructuras o poblaciones, cuyas corrientes se mezclan en el espacio extracelular de una manera

compleja. Más aún, el mayor o menor solapamiento espaciotemporal de las distintas aferencias en cada neurona dificulta la visualización de dominios de actividad poblacional separados en grupos de electrodos que pudieran asociarse a cada una de las vías convergentes. La aplicación del ACI a registros múltiples contiguos de LFP que conjuntamente conforman un mapa espacial de voltaje a lo largo del eje dorso-ventral de la población de células piramidales de CA1, y de los granos de la Fascia Dentada, permitió una separación de generadores LFP cuya distribución es estable, lo que indicaba su origen en dominios somatodendríticos fijos de entrada y salida de corriente, específicos para cada vía aferente a la región de registro (Korovaichuk et al., 2010). La localización precisa y estable de dominios celulares de corriente se pudo establecer mediante análisis de fuentes de corriente (AFC) (conocido comúnmente por las siglas inglesas de *current-source density*, *CSD*: Freeman y Nicholson, 1975; Mitdorf, 1985) para cada generador aislado. El AFC elimina la contribución de las corrientes extracelulares generadas en sitios remotos al registro (conducción por volumen) y proporciona la distribución espacial promedio de la corriente transmembrana a lo largo del eje de las células principales que rodean a la sonda multielectrodo (piramidales de CA1 o granulosas). Además, se aportaron evidencias directas de la correlación espacial de promedios de LFPs realizados alrededor de los disparos espontáneos de las neuronas de origen de algunas vías sinápticas conocidas y sus correlatos poblacionales mediante estímulo eléctrico masivo de la vía (potenciales provocados) (Makarov et al., 2010, Fernández et al., 2012).

La aplicación del ACI a los perfiles espaciales de LFPs en CA1 de rata ha proporcionado una herramienta para la lectura paralela de las actividades discretas de poblaciones neuronales aferentes. Ya los primeros estudios mostraron de forma robusta la presencia de sólo unos pocos generadores LFP principales con definición espacial estable (Makarov et al. 2010 y Korovaichuk et al., 2010). Como observación destacada, se constató que la contribución cuantitativa de las principales vías de excitación al hipocampo, la entrada desde la región CA3 ipsilateral a la región CA1 vía colaterales de Schaffer, y la entrada a las células granulosas de la Fascia Dentada procedente de la corteza entorrinal por la Vía Perforante, es minoritaria comparada con otros generadores LFP encontrados. Aunque en trabajos previos (Hajos et al., 2000; Herreras et al., 1988; Oren et al., 2010) se argumentaba a favor de cierta preponderancia de la actividad sináptica inhibitora en el hipocampo, no había evidencias directas ni cuantificables de la contribución relativa de entradas excitadoras e inhibitoras al LFP.

La potencialidad de dicho método para el estudio de actividad espontánea de poblaciones específicas a partir de una señal espacialmente tan compleja como el LFP quedó patente en trabajos del grupo con uno de los generadores correspondientes a una de las vías sinápticas mejor conocidas y más estudiadas en Neurofisiología, los colaterales de Schaffer (Fernández 2012ab). La correlación de largas series temporales de espigas de las neuronas de origen de dicha vía en la región CA3 con los LFPs registrados en la zona diana ipsilateral de la región CA1 permitió una reconstrucción temporal de la actividad sincrónica de pequeños grupos neuronales de CA3 o clústeres funcionales, generando un patrón postsináptico espontáneo en CA1 en forma de micro-ondas de pequeño voltaje repetidas a la frecuencia gama. Estas ondas fueron denominadas micro-PEPSs. Su definición espacial y temporal fue tan precisa que incluso pudieron estudiarse cambios de naturaleza plástica (potenciación a largo plazo) tras protocolos habituales de estimulación repetida, constituyendo la primera observación de cambios sostenidos y cuantificables de este tipo en un segmento de una cadena sináptica.

1.6. Tratamiento de señales compuestas en el volumen del cerebro: ¿Por qué funciona el ACI?

Los LFP son señales de naturaleza espacial que debe ser debidamente tenido en cuenta para su estudio. Entendemos por carácter espacial el de aquellas señales que se captan con valor distinto pero proporcional en distintos sitios, tales como el campo eléctrico generado por una fuente de corriente en el medio conductivo del cerebro. Por consiguiente, las fluctuaciones temporales en la intensidad de la fuente serán proporcionales en cualquier punto del espacio y un solo electrodo emplazado en cualquier lugar del campo podría captarlas con precisión. Ahora bien, la mezcla de campos eléctricos generados por dos o más fuentes de distinta localización hace que el peso de cada una sea desigual en cualquier punto, por lo que las variaciones de potencial contendrían mezcla de dos generadores con una contribución relativa desconocida y cambiante. Este simple hecho debilita cualquier medida experimental del potencial extracelular en un punto único generado por varias fuentes de localización dispar, al no conocerse la composición instantánea de las fuentes activas ni sus posiciones.

Existen otras causas de distorsión del campo eléctrico que afectan incluso a una única fuente. Si asumimos que el espacio extracelular es fundamentalmente óhmico la magnitud del potencial eléctrico en un punto con respecto a una referencia lejana neutra dependerá de la magnitud y localización de la fuente de corriente y de la conductividad del medio extracelular, que deriva del grado de isotropía y homogeneidad del medio. Algunos experimentos sugieren que el medio es anisotrópico y homogéneo (Logothetis et al., 2004; Nicholson y Freeman, 1975) y otros sugieren que es fuertemente anisotrópico, no homogéneo (Poskancer y Yuste 2001; Goto et al., 2010; Hoeltzell y Dykes, 1979) e incluso que posee propiedades capacitivas (Graybiel 2008; Pritchard 1992; Bedard 2009). A pesar de una cierta notoriedad y polémica surgidas en torno a este tema, estas observaciones no serán esenciales para el desarrollo del presente trabajo por dos razones que consideramos objetivas. En primer lugar, el posible impacto cuantitativo estaría aún por definir, pero se intuye podría ser escaso incluso en el caso extremo. En segundo lugar, sería de relevancia sólo para registros remotos, en los que una larga distancia desde la fuente al electrodo permitiría la acumulación de distorsiones del campo eléctrico que pudieran causar un desvío significativo en comparación con un medio homogéneo e isotrópico. El trabajo que presentamos aquí se centra en fuentes de origen local, esto es, registrando los campos eléctricos en el mismo sitio donde se originan, por tanto las posibles distorsiones de su campo en posiciones remotas al electrodo son irrelevantes.

El problema de la separación de fuentes de localización desconocida es uno de los más longevos y difíciles de resolver en Neurofisiología. Las técnicas de descomposición utilizadas en este trabajo, por su novedad y por la implicación que pueden tener en el futuro para el estudio de LFPs, merecen cierto detenimiento. El ACI es una de las técnicas de separación ciega de fuentes (BSS) capaz de descomponer señales complejas en componentes independientes (Choi et al., 2005) basándose en sus características estadísticas. El término "ciego" deriva del hecho de desconocer tanto las fuentes como el mecanismo que las mezcla. El ACI genera, a partir de una matriz construida con las señales originales, otra matriz de separación en la que los canales o señales resultantes muestran la mayor independencia posible (Okada et al., 1997; Nadasdy et al., 1998; Koch, 1999; Trevelyan, 2009; Glickfeld et al., 2009; Bazetot et al., 2010). Esta búsqueda de independencia condiciona que las nuevas señales tengan un único curso temporal con valor proporcional en los distintos puntos de captura, lo que reproduce precisamente la proporcionalidad intrínseca de registros múltiples realizados en un campo eléctrico para una sola fuente de localización fija.

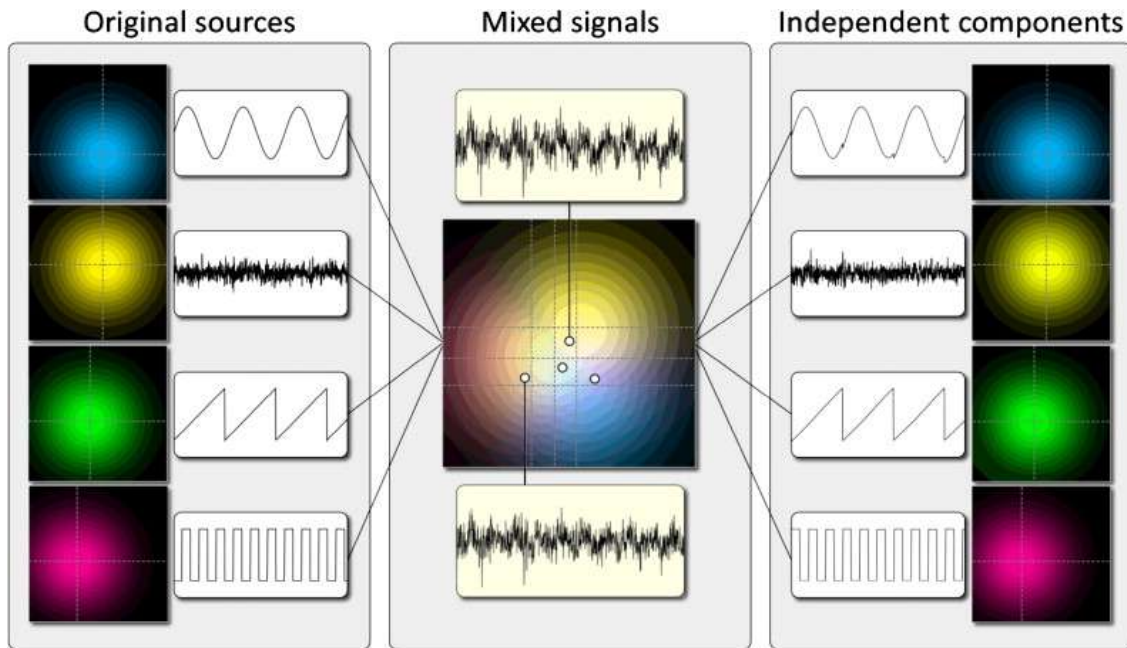


Fig. 3. Ejemplo del empleo de ACI para la separación de distintas fuentes acústicas a partir de una mezcla de señales. En el panel izquierdo se muestran las fuentes originales con diferentes cursos temporales y localizaciones en el espacio. En el panel central se refleja la mezcla lineal de las fuentes independientes originales sobre la que se aplicará el ACI. En el panel derecho se indican las señales que resultan de la descomposición llevada a cabo por el ACI, en las que se recuperan las fuentes originales de la señal manteniendo el curso temporal y la distribución espacial de cada uno de ellos (Moraux y Iannetti, 2008).

Como ya hemos mencionado, la señal del EEG intracraneal es compleja, ya que está formada por la suma de la actividad eléctrica de distintas poblaciones neuronales localizadas en diferentes áreas cerebrales, que se activan de forma independiente pero simultánea. Cada fuente del potencial extracelular es un área cerebral con actividad diferente, una entrada o generador sináptico que contribuye a la mezcla y que está determinado por las características de la señal eléctrica y su propagación por diversos tejidos hasta alcanzar los electrodos de registro. Si los requisitos de independencia entre fuentes se cumplen, los componentes calculados serán iguales a las fuentes extraídas por el ACI, de forma que la mezcla de los LFPs reconstruidos a partir de cada componente nos proporcionaría la señal original. En el caso que nos ocupa, los registros se hacen, no a distancia, sino en el mismo volumen ocupado por las propias fuentes de corriente, las neuronas piramidales o granulosas. De esta manera, el grupo lineal de electrodos colocado a lo largo de sus ejes principales mapea con detalle su geometría individual, de forma que el campo eléctrico generado por una vía sináptica concreta es capturado en su conjunto con gran detalle espacial, permitiendo incluso definir los elementos celulares que lo generan.

Para que el ACI sea eficaz, las señales deben cumplir una serie de requisitos (Vigario et al., 2000; Barlett et al., 1995; Hyvärinen y Oja, 1999; Jung et al., 1998) que en líneas generales son asumibles en los LFPs:

- Un primer requisito teórico es la independencia de los componentes de la mezcla a lo largo del tiempo, que puede asumirse para dos entradas sinápticas procedentes de estructuras aferentes distintas que procesan información distinta. Este requisito ha sido, sin embargo, considerado en exceso en cuanto a las señales cerebrales, pues algunos autores han considerado erróneamente que la entrada sináptica de una población a otra destruye la independencia de sus respectivas salidas, que pudieran mezclarse en el mismo sitio de registro. En realidad, es bien conocido que

el ACI sigue siendo eficaz incluso en señales que muestran periodos de marcado acoplamiento, pues un ligero desfase temporal entre dos señales, como el de un simple retraso sináptico, es suficiente para permitir una separación efectiva de las señales.

- La mezcla de las fuentes debe ser lineal e instantánea en cada electrodo. La conducción por volumen de las corrientes eléctricas y las características conductoras de los tejidos que atraviesan hacen asumible este requisito en el LFP.
- Los algoritmos son incapaces de separar más de dos fuentes con distribución gaussiana debido a que su suma genera otra señal de distribución gaussiana.
- El número de mezclas debe ser mayor o igual que el de fuentes. Es por esta razón por la que el número de electrodos de registro será un factor limitante, puesto que el ACI no podrá arrojar una cantidad de generadores mayor que el de sensores que sean utilizados para el registro.
- En el LFP, la independencia de sus fuentes hace posible separar componentes con topografías similares pero no idénticas (Mizuno-Matsumoto et al., 1999; Litt y Echauz, 2002; Litt y Lehnertz, 2002). Esta es la razón por la que se ha extendido su uso, al permitir eliminar artefactos que aparecen en los registros del EEG (Makeig et al., 1996; Vigarío, 1997; Jung et al., 1998).

Existen varios métodos de ACI diferenciados por las diversas formas en que se resuelve la independencia entre las fuentes (Hyvärinen y Oja, 2000; Giannakopoulos et al., 1999). Los resultados pueden variar según el algoritmo utilizado, de modo que cada uno se ajusta mejor al análisis de unos determinados tipos de señal, aunque en general las diferencias son escasas. Los más populares son el *fast-ica*, que implementa el algoritmo de punto fijo (*fast fixed-point algot*) (Gavërt et al., 2005) y el *run-ica*, que emplea el principio *infomax* (Delorme y Makeig, 2004). Los generadores resultantes variarán bajo la aplicación de uno u otro método, en particular en lo referente a los generadores más débiles o que contribuyen en menor medida al LFP. Recientemente hemos corroborado la mayor eficiencia del algoritmo *KDICA* para el estudio de LFPs de las características espaciales y temporales del hipocampo (Chen, 2006), pero en este trabajo la mayor parte de los resultados ya fueron obtenidos con el *infomax*.

El uso de ACI para el aislamiento ciego de fuentes en señales mezcladas ha sido empleado en diferentes campos, incluyendo fMRI, EEG de superficie (Jung et al., 2005) e incluso en registros de LFP profundo (Tanskanen et al., 2005). Aunque otros métodos aportan información valiosa, sólo el ACI tiene la capacidad de separar y cuantificar la contribución de las diferentes fuentes independientes, ofreciendo además información espaciotemporal precisa de cada una de ellas (Mouraux and Iannetti, 2008). Por ejemplo, los análisis basados en descomposición de Fourier han sido empleados para la separación y cuantificación de actividad en diferentes bandas de frecuencia, pero no pueden disgregar las contribuciones de dos aferencias diferentes de distintas poblaciones con campos terminales solapados. Más aun, como hemos visto anteriormente, las bandas específicas de frecuencia en el LFP no definen la actividad particular de neuronas, ni individual ni colectivamente. Una de las mayores ventajas del método ACI es su ya comprobada eficiencia para descomponer LFPs irregulares, cuya presencia es mayoritaria en el hipocampo a pesar de ser la estructura más buscada para el estudio de actividades rítmicas. La actividad LFP irregular presumiblemente contiene una mezcla más equilibrada de las contribuciones de las distintas vías sinápticas, posibilitando el análisis cuantitativo de la actividad global de múltiples subpoblaciones de neuronas.

Si bien el uso mayoritario del ACI se ha dirigido a la eliminación de artefactos en registros electroencefalográficos sin alterar las señales originales, como por ejemplo en periodos de actividad epileptiforme (Kobayashi et al., 2001; Makeig et al., 1997; Kobayashi et al., 1999; Nam et al., 2002; Makeig et al., 1996; Makeig et al., 1999; Makeig et al., 1996), en estos momentos se está abriendo camino como técnica que permite una nueva aproximación para detectar y separar las propias fuentes del EEG. De hecho, ya se ha aplicado con buenos resultados en el estudio de potenciales relacionados con eventos (Makeig et al., 1997; Jung et al., 1998; Jung et al., 2001; Makeig et al., 1996; Makeig et al., 1999; Makeig et al., 2000), así como durante actividad espontánea (Makarov et al., 2009; Korovaichuk et al., 2010; Makarova et al 2010; Fernández et al., 2012; Benito et al., 2013).

1.7. ¿Cómo son, qué representan y cómo se pueden utilizar los generadores LFP del hipocampo?

Los alentadores primeros resultados funcionales utilizando la descomposición espacial de una señal macroscópica como el LFP requieren, sin embargo, de una gran cautela. Para poder abordar el estudio de los mecanismos de procesamiento de información neural es necesario un conocimiento profundo y detallado de la conectividad y de las relaciones funcionales entre diferentes grupos neuronales. En el caso de los generadores LFP encontrados con el ACI en el hipocampo es claro que pueden tener mayor o menor relevancia dependiendo de si son o no específicos de población aferente y a qué vías concretas pertenezcan. No está claro si todas las vías anatómicas principales pueden generar LFP, y en qué proporción. Tampoco es evidente que exista una relación directa entre la presencia cuantitativa de un generador LFP y su papel funcional en la red neural a la que pertenecen las poblaciones origen y diana. También es imprescindible profundizar en las relaciones cuantitativas de la conectividad micro y macroscópica con los generadores LFP. Como ya fue anticipado por los investigadores hacia la mitad del siglo pasado, la complejidad geométrica de las fuentes es un hándicap para descifrar los orígenes celulares de un LFP. Por otro lado, las neuronas de una misma población se activan en pequeños grupos cambiantes y es necesario comprender cómo esa variabilidad se manifiesta en el generador LFP en la zona diana. Los LFPs varían de unas zonas a otras de la misma región y hasta ahora no había sido posible examinar con métodos experimentales los mecanismos de tal variabilidad. Baste recordar que si los territorios axonales de las células origen que disparan sincrónicamente se solapan, las corrientes sinápticas tendrán oportunidad de sumarse y aportar mayor energía al LFP registrado. La anatomía por sí sola no puede predecir cuál es la extensión esperable de actividad coherente en la zona diana, pues la activación espontánea de clústeres neuronales, así como la composición de éstos es impredecible. Es claro por tanto que se necesita una descripción detallada de las características anatómo-funcionales de los generadores LFP hipocámpicos, lo que ha constituido el objeto genérico del presente trabajo.

1.8. Objetivos

El principal objetivo del presente trabajo ha sido la extracción y análisis de los principales elementos que componen el potencial extracelular en hipocampo mediante la identificación de cada una de las fuentes neuronales que lo forman. La aplicación de un método matemático basado en el Análisis de Componentes Independientes (ACI) en combinación con los perfiles de densidad de fuentes de corriente (DFC) ha permitido la lectura en paralelo de la activación temporal de cada una de las poblaciones presinápticas que constituyen cada generador. A continuación se enumeran cada uno de los objetivos específicos que serán abordados en cada capítulo de esta memoria:

- 1.** Descomposición del LFP de hipocampo en sus principales componentes espaciales y caracterización de cada una de sus fuentes neuronales utilizando el método combinado ACI/DFC.
- 2.** Elaboración de mapas anatómico-funcionales de los generadores subcelulares en hipocampo, demostrando el carácter modular de las poblaciones presinápticas.
- 3.** Estudio de la conectividad bilateral del hipocampo mediante la extracción de la actividad específica de la conexión CA3-CA1.
- 4.** Identificación del generador inhibitorio responsable de la actividad recurrente en la región de CA1 de hipocampo y cuantificación de su contribución al LFP espontáneo.
- 5.** Aplicación del método de ICA en modelos *in vivo* de *Spreading depression* originados farmacológicamente, analizando la estructura de las corrientes eléctricas que subyacen a la misma y el mecanismo de sincronización de los disparos previos a la despolarización.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las directrices de la Unión Europea (86/609/EU), así como la legislación española (BOE 67/8509-12,1988), concernientes al uso de animales de laboratorio. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Investigación del Instituto Cajal del CSIC.

Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley (~250 g) criadas en el estabulario del Instituto Cajal. Los animales fueron anestesiados con uretano (1.5 g/kg, Sigma U2500) inyectado intraperitonealmente. Una vez alcanzado el plano anestésico adecuado, se colocaron a los animales en un aparato estereotáxico (Narishige Scientific Instrument Lab. SR-6R). La temperatura corporal se mantuvo constante a 36°C mediante una manta termorreguladora (Cibertec SA. RTC1).

2.2. Cirugía

Tras aplicación de un anestésico local de larga duración (Bupivacaína 0.75%, Braun) bajo la piel de la calota, se practicó una incisión anteroposterior, dejando al descubierto las suturas coronal y lambda. Se retiró el periostio, de forma que los puntos de referencia Bregma y Lambda estuvieron accesibles para la toma de coordenadas utilizada en la colocación estereotáxica de dispositivos. Con el fin de mantener el campo quirúrgico despejado se separaron del hueso temporal las apófisis de los músculos temporales en su porción más dorsal y se colocaron sendas torundas de algodón en ambas inserciones con fin hemostático y a modo de reservorio de anestésico local. Tras la toma de coordenadas utilizando el punto Bregma como referencia (Ver tabla 1) se realizaron los correspondientes trépanos de 1 mm de diámetro mediante una broca (FST 224RF027), retirándose la duramadre para dejar la corteza cerebral al descubierto. Ésta fue cubierta con suero salino al 0.9% (Sigma S9888) para mantener la homeostasis de las células y evitar el deterioro de las capas más superficiales del cerebro hasta la inserción de los dispositivos de estímulo y registro.

	AP	LM	Prof.
Estimulación Sch	-3.2	±2.6	-3.3
Estimulación Perf	-8	±4 - 5	-3.5
Estimulación Alv	-4.8	+2.6	-1.5
K⁺-SD	-5	+3	-2 - -3
Corteza Entorrinal	-8.5	+4	-5
Registro CA1	-4.5	±2.6	-2.2

Tabla 1. Coordenadas desde Bregma (Paxinos y Watson, 2007, 6ªEd). AP: coordenadas eje anterioposterior. LM: coordenadas eje lateromedial. Prof: profundidad desde superficie cerebral. ±: a ambos lados de la línea media. Sch: estimulación en colaterales de Schaffer. Perf: vía Perforante (Medial - Lateral). Alv: Alveus de CA1 (estimulación antidrómica del circuito recurrente). K⁺-SD: Generación de Spreading Depression mediante inyección de KCl 1M.

2.3. Estimulación

Se utilizaron electrodos de estimulación concéntricos bipolares fabricados *ad hoc* a partir de cánulas de acero inoxidable 27G-30G (Small Parts Inc) y un filamento interior de tungsteno de 110 μm (40 μm para ratones) aislado con teflón (778000 A-M. Systems Inc) excepto en la punta, que fue liberada en \sim 200-400 μm . Los pulsos de corriente fueron establecidos entre este extremo y la cánula, y consistieron en pulsos rectangulares de 0.1ms a diferentes intensidades (0.1-1mA) y frecuencias, generados mediante un estimulador multicanal (Stimulus Generator mod. 4002, Multichannel Systems).

2.4. Registro y adquisición de datos

Los potenciales de campo extracelulares fueron registrados inicialmente mediante micropipetas de vidrio (borosilicato, A-M Systems Inc. N°603000) fabricadas a partir de un estirador (Puller P-97, Sutter Instruments Co.), con un diámetro en la punta de 7 a 10 μm . Posteriormente, la pipeta fue completada con una solución conductora (NaCl 0.9%) inyectada en su interior. El electrolito fue conectado mediante un electrodo de plata clorada (Ag/AgCl, A-M Systems Inc. N°782500) a la entrada de un transistor de alta impedancia con efecto de campo (FET). Los registros iniciales con estas micropipetas fueron utilizados para optimizar los emplazamientos de estimulación sin dañar el tejido en su búsqueda, guiándose por el potencial provocado característico. A continuación se sustituyó la micropipeta por multielectrodos lineales con tecnología de sílice de una o dos lancetas (A1x16-5mm50-177 y A1x32-6mm50-413 (Neuronexus Technologies, Ann Arbor, MI). Dichos multielectrodos se conectaron a un cabezal múltiple de alta impedancia para reducir la pérdida de la señal por manipulación y disminuir las interferencias por ruido eléctrico ambiental. Como referencia para el registro se utilizó un electrodo de plata clorada introducido bajo la piel del cuello del animal.

Las señales registradas con pipetas fueron filtradas (1Hz-5kHz) y amplificadas (100x) utilizando un equipo de acomodación de señales fabricado por J. M. Ibarz y un dispositivo de eliminación electrónica de ruido (Humbug, 50-60Hz). Su adquisición a un ordenador se realizó mediante una tarjeta digitalizadora (DigitaData 1200, Axon Instruments) a una frecuencia de muestreo de 20 kHz. Las señales registradas con multielectrodos fueron adquiridas con un sistema integral de filtro, amplificación y digitalización de Multichannel Systems (Reutlingen, Alemania) y software MC Rack 4.0 de la misma compañía.

2.5. Histología

La localización de los multielectrodos fue comprobada post-mortem mediante histología. Para ello se sumergieron las lancetas antes de su implantación en el cerebro en perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) en una solución de N-N-dimetilformamida al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Al final de cada experimento, los cerebros fueron extraídos y fijados en una solución de paraformaldehído al 4% (MERK 104005) y tampón fosfato 0.1% (MERK 524650), y posteriormente fueron procesados histológicamente. Para ello se hicieron secciones sagitales de 100 μm de grosor mediante un vibratomo, que fueron teñidas con bisbenzimidida

H33258 (Sigma B2883) y Nissl (Tionina 251742.1606, Panreac) para su estudio bajo microscopía de fluorescencia (560-610nm).

2.6. Potenciales provocados

En el hipocampo se ha descrito ampliamente el flujo de información preferente a través del circuito trisináptico excitador, que se inicia con la entrada desde la corteza entorrinal hacia las células granulosas de la Fascia Dentada (FD) por la Vía Perforante. Los axones de estas (fibras musgosas) conectan con las células piramidales de la región CA3, que a su vez excitan a las células piramidales de la región CA1 a través de los colaterales axónicos de Schaffer. Desde esta región, la información fluye hacia el subículo hasta llegar de nuevo a la corteza entorrinal. Todos estos relés han sido caracterizados mediante potenciales provocados (Andersen, 1960; Fujita y Sakata, 1962; Andersen y Lomo, 1966; Andersen et al., 1971; Herreras, 1990), siendo los más conocidos los de las conexiones CA3-CA1 y Vía Perforante-FD. La estimulación eléctrica, bien en las capas de somas de la región de origen, bien en los haces de fibras respectivos en el estrato radiado o en la Vía Perforante, provocan respuestas controladas en sus respectivas regiones diana (CA1 y FD) en forma de potenciales extracelulares de gran amplitud y desarrollo laminar característico, claramente reconocibles en los diferentes dominios subcelulares agrupados en estratos de las poblaciones piramidal y granulosa. Los potenciales provocados se han utilizado frecuentemente para estudiar la excitabilidad global de poblaciones neuronales, tomándose como índices cuantitativos promedio de eventos de membrana en las células diana (Andersen et al., 1971; López-aguado et al., 2002; Varona et al., 2002). También han permitido la optimización del ACI en la eliminación de artefactos presentes en el registro (Iriarte et al., 2003; Zhou et al., 2005; Escudero et al., 2007), entendiéndose por artefacto aquella señal de origen desconocido y externo al sistema que se introduce casual e incontroladamente contaminando la señal de interés.

En anteriores estudios, los potenciales provocados se han utilizado para comprobar la resolución espacial y temporal de los generadores proporcionados por el ACI (Korovaichuk et al., 2010). Con este fin, se utilizaron estímulos eléctricos de baja intensidad que permanecieron subumbrales para la generación de espigas, evitando así la activación de corrientes intrínsecas generadas por voltaje (Herreras 1990; Magee y Johnston 1995; Canals et al., 2005). Estas últimas constituyen una fuente eléctrica distinta a la sináptica, con localización espacial propia y no siempre fija, pues pueden ser propagadas, requisito que no las hace aptas para el ACI.

En el presente trabajo se han utilizado los potenciales provocados como herramienta para la identificación de la vía aferente que da lugar, con su actividad, a los distintos componentes del LFP espontáneo. Para ello se han estimulando vías conocidas del hipocampo con secuencias de pulsos subumbrales y aleatorios a una frecuencia media de 1Hz. Este procedimiento se utilizó también para introducir en la señal la actividad de una vía conocida de escaso peso de forma controlada, con el fin de aumentar su contribución (varianza) relativa con respecto a las demás y facilitar su separación mediante el ACI. La aleatoriedad de los estímulos tuvo como objeto evitar iteraciones regulares que pudiesen generar plasticidades sinápticas no deseadas, habiendo comprobado con anterioridad que tal protocolo de estímulo no afectaba ni a la varianza total del generador ni alteraba el resultado del análisis

2.7. Análisis de Componentes Independientes (ACI)

El perfil espacial de LFPs registrados puede representarse como la suma ponderada de la actividad de N fuentes neuronales o generadores del LFP:

$$u(t) = \sum_{n=1}^N V_n s_n(t), \quad \Delta V_n = I_n / \sigma \quad \forall n \in [1, N]$$

donde $V = [V_1, V_2, \dots, V_N]^T$ es la matriz de mezclas compuesta por los pesos espaciales de todos los generadores, $\{s_n(t)\}_{n=1}^N$ son los cursos temporales de todos los generadores, σ es la conductividad del espacio extracelular y $\{I_n\}_{n=1}^N$ son las densidades de corriente. Como ya hemos mencionado en la introducción, el LFP observado en cualquiera de los electrodos resulta de la mezcla lineal de la actividad eléctrica, contribuida por varios generadores independientes, que procede de las corrientes transmembrana de las células que lo forman. Una vez separados los generadores podemos analizar su actividad en el tiempo de forma aislada, e incluso reconstruir el perfil espacial del LFP específico que generaría cada uno de los componentes extraídos por ACI si tal vía sináptica pudiera actuar en solitario. Por tal motivo se les denomina *LFPs virtuales* (ver sección 2.7.2).

Cada generador se describe disociado en dos partes complementarias, una espacial y otra temporal. La *distribución espacial* V_k es fija y característica de cada generador, y se la representa como una curva de valores en el espacio que aglutina el conjunto de pesos y polaridades que cada generador tiene en los distintos canales de registro. Comoquiera que se conoce la localización de estos por las pistas espaciales obtenidas a partir de los potenciales provocados, la curva es fácilmente asociable a la anatomía subcelular de las células principales de cada región. La segunda parte $s_k(t)$, denominada *activación* o *curso temporal*, es variable para cada segmento de LFP analizado, y refleja las fluctuaciones temporales de la corriente sináptica poblacional generada por la vía específica correspondiente a cada generador. Esta parte no tiene información espacial alguna, siendo común a todos los puntos de registro (como corresponde a las fluctuaciones de un campo eléctrico generado por una fuente de intensidad variable en el volumen del cerebro). Por consiguiente, las activaciones temporales no pueden ser utilizadas para discriminar unos generadores de otros. Esta discriminación se realiza en base a la diferencia de las curvas de distribución espacial, que dependen de la distribución de los terminales axónicos aferentes a lo largo de la célula diana y por tanto han de ser similares entre generadores que correspondan a la misma población de neuronas presinápticas. Diferentes segmentos de LFP pueden arrojar pequeñas variaciones en la distribución espacial de un generador concreto debidas a la interacción intracelular con otros generadores cuya actividad tiene otro curso temporal. Esto puede plantear dificultades en la discriminación de generadores de perfil espacial parecido, sobre todo para tiempos de análisis muy cortos. Para resolver este problema se realiza el ACI sobre numerosos fragmentos de LFP registrados en la misma posición, y los generadores resultantes se clasifican en familias mediante análisis de clúster jerarquizado, usando una medida de distancia entre curvas. De esta manera, los perfiles espaciales específicos de cada generador se liberan de contaminaciones temporales, y simultáneamente se consigue la normalización del curso temporal, de forma que sus fluctuaciones son consistentes internamente.

2.7.1. Extracción de generadores

Para el ACI se usaron varios algoritmos que fueron testados y comparados en trabajos previos utilizando señales reales y modelos numéricos (Makarov 2010). El más utilizado en este trabajo es el *infomax*, inicialmente propuesto por Bell y Sejnowski (1995) e implementado en el EEGLAB MATLAB *toolbox* (Delorme and Makeig, 2004). Su ejecución da como resultado los cursos temporales $s_n(t)$ y las distribuciones espaciales V_n en unidades arbitrarias (u.a.) pero dependientes, normalizadas bien al valor máximo en el espacio o en el tiempo. El ACI puede aislar tantos generadores como canales componen la matriz de mezclas, esto es, como señales o electrodos utilizados para adquirir LFPs simultáneamente (habitualmente 16 ó 32). Tras el agrupamiento mediante clusterización jerarquizada de generadores idénticos que hubieran resultado desdoblados, el número de generadores LFP con varianza significativa en el hipocampo fue siempre muy inferior al de canales. El número final de componentes que pueden extraerse con este método depende de varios factores, tales como la región particular de estudio, la relación señal-ruido, y la extensión espacial de sus componentes activos. En este estudio se considerarán generadores de LFP aquellos que cumplan las siguientes condiciones: (1) que la contribución mínima a la varianza total del perfil sea, al menos, el 1% del total, y (2) que se pueda relacionar de forma inequívoca con vías anatómicas conocidas a tipos celulares conocidos, de forma que su posterior evaluación mediante CSD resulte en corriente neta cercana a cero.

Para identificar los generadores con presencia estables en LFPs espontáneos de una región cerebral (Makarov et al., 2010), primero se identifican los generadores obtenidos por análisis de periodos suficientemente largos (decenas de segundos). Luego se dividen los mismos registros en segmentos contiguos cortos, de 1 segundo, y se les aplica de nuevo el ACI. Los generadores más estables (con presencia continua en el tiempo) se encuentran en todos los segmentos y con un perfil invariable, mientras que los más débiles e inestables aparecen ocasionalmente y su distribución espacial fluctúa excesivamente entre segmentos.

Existen métodos adicionales para confirmar la especificidad de vía sináptica de un generador LFP concreto. Uno consiste en identificar, en su curso temporal, la presencia de eventos característicos conocidos por la literatura, tales como las ondas *sharp-wave* presentes en el generador Schaffer (Korovaichuk et al., 2010). Otro método es realizar correlaciones cruzadas del curso temporal de cada generador con el disparo de las células de origen de la fuente, resultando sólo significativos aquellos que tengan una relación causal fuerte (Fernández Ruiz et al., 2012).

2.7.2. Reconstrucción de LFP específicos de vía

La extracción de los generadores que forman el LFP espontáneo nos permite reconstruir los LFPs específicos de cada uno de ellos de modo virtual, y analizar su dinámica de forma independiente. La localización precisa y la magnitud de las corrientes transmembrana subyacentes se obtienen evaluando la densidad de fuentes de corriente (DFC) del LFP reconstruido, que reflejará, si el generador es específico de vía, un perfil espacial de corrientes coherente con la terminación de la vía anatómica sobre la población diana. Este perfil subcelular de DFC es fácilmente comparable con el estimado para un potencial provocado por estímulo exógeno de la misma vía. Los mapas temporales de DFC virtual

contrastan, por su sencillez laminar, con la complejidad de los obtenidos directamente de la señal LFP original, que es multisináptica.

La reconstrucción de LFPs virtuales específicos para cada componente aislado se realiza multiplicando su curva de pesos espaciales por el curso temporal específico del segmento analizado.

$$u_{G_k}(t) = V_k s_k(t)$$

De esta manera, se recupera la polaridad correcta de los potenciales en los distintos sitios de registro que podría estar oculta o dominada por generadores concomitantes de mayor potencia en el LFP nativo. Además, nos proporciona una estimación cuantitativa de la varianza y potencia de cada generador. La potencia de un generador, estimada como V^2 , fue calculada en el electrodo que mostró la amplitud máxima durante actividad LFP irregular, excluyendo períodos de actividad oscilatoria:

$$P_{G_k} = \max_{m \in [1, K]} \left(\int_0^T u_m^2(t) dt \right)$$

donde T es el período analizado. La evolución temporal de la potencia se estimó mediante un algoritmo de ventana deslizante, usando la convolución con un kernel cuadrado (H).

$$P_{G_k}(t) = \int H(t - \tau) s_k^2(\tau) d\tau$$

donde τ es la distancia de desplazamiento de una señal sobre la otra.

2.8. Análisis de densidad de fuentes de corriente (DFC)

Aunque fue Lorente de Nó en 1947 quien adaptó las ecuaciones de Maxwell para estimar las corrientes transmembrana a partir de gradientes de potencial extracelular, su aplicación al estudio de la actividad neuronal no se adoptó rutinariamente hasta dos décadas después, cuando Freeman y Nicholson mostraron que su uso era factible en este campo y realizaron medidas del tensor de conductividad en cerebro de anfibios. La principal ventaja de esta técnica es que elimina los llamados efectos de conducción por volumen, consistentes simplemente en el registro desde cualquier punto de potenciales de campo generados por fuentes lejanas a la posición del electrodo. La “lejanía” es tan sólo relativa pues en estructuras laminares la estratificación de elementos celulares en el espacio es tan marcada que apenas unas decenas de micras son suficientes para que las corrientes transmembrana cambien de magnitud o polaridad, motivo por el cual los campos eléctricos extracelulares en cada punto de registro contienen fuerte mezcla de elementos celulares cercanos distintos y confunden la localización de fuentes y sumideros.

Para evaluar los mapas de DFC en un potencial provocado en el hipocampo, y a menudo también en LFPs espontáneos es común aplicar una aproximación unidimensional del operador de Laplace por diferencias finitas

$$DFC = -\frac{1}{\sigma} \Delta = -\frac{u_{k-}(t) - u_k(t) + u_{k+}(t)}{\sigma^2}$$

donde $h=50\mu\text{m}$ (distancia entre electrodos).

El mapa de DFC para un generador viene dado por $I_n = -\sigma \Delta V_n$, donde σ es la conductividad del espacio extracelular (Makarov et al. 2010).

En condiciones ideales (Freeman y Nicholson, 1975; Rappelsberger et al., 1981; Mitzdorf, 1985) y asumiendo que el medio extracelular es isotrópico y homogéneo, la variación de la densidad de la corriente en un tiempo determinado t en el eje z , $I_z(t)$, viene calculada como:

$$I_z(t) = - \sigma_z \frac{d^2 \theta(t)}{dz^2}$$

donde $\theta_z(t)$ es el potencial a un tiempo t y σ_z es el valor del tensor de conductividad en el eje Z . Aunque existe una variación de la conductividad a lo largo del eje Z (López-Aguado et al., 2001), en la práctica no introduce un error significativo como para modificar la distribución calculada de los generadores de corriente en el perfil espacial. El cálculo experimental del tensor de conductividad es complejo y puede no ser preciso, por lo que habitualmente se utiliza el término proporcional $-I/\sigma_z$ o su término equivalente, que es la segunda derivada espacial del potencial extracelular, cuyos resultados se expresan en V/mm^2 y se puede aproximar numéricamente por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{\delta^2 \theta}{\delta z^2} = \frac{\theta(z+h) - 2\theta(z) + \theta(z-h)}{h^2}$$

Este análisis genera un notable nivel de ruido en los resultados por lo que es frecuente utilizar métodos de suavizado espacial del potencial. Uno de los más ventajosos es la promediación simétrica ponderada del potencial alrededor de un punto dado (Freeman y Nicholson, 1975). Sin embargo, el suavizado espacial del potencial produce una atenuación del valor real, es decir, un efecto de filtro espacial de las fuentes y sumideros correspondientes. Por este motivo, y tan solo para los potenciales provocados se ha utilizado un método no distorsionante que consiste en la eliminación por reajuste de la línea base de los componentes lentos del EEG previos a la aplicación del pulso eléctrico, lo que reduce notablemente el ruido (Herreras, 1990).

En el hipocampo, la aproximación unidimensional para la estimación de la DFC, (típicamente a lo largo del eje somatodendrítico), es sólo fiable cuando el potencial generado por la activación no varía en las otras direcciones, esto es, dentro de un mismo estrato dendrítico. Para ello, se requiere una activación homogénea de un volumen suficientemente grande, criterio que cumplen los potenciales provocados. Podría no ser así en el caso de los LFPs espontáneos, en los que la activación puede ser espacialmente restringida. Precisamente, la extensión espacial de la activación espontánea de generadores LFP es uno de los objetos principales de este trabajo (ver Capítulo 2). Un caso particular es la distorsión ocasionada por curvaturas en las estructuras, en las que los gradientes laterales y oblicuos son inevitables. En esta situación sería necesario hacer una estimación del campo eléctrico instantáneo en tres dimensiones (Nicholson y Freeman, 1975; Pettersen et al., 2006). Las curvaturas existentes en el hipocampo son muy variables, por lo que la práctica habitual es realizar interpretaciones cualitativas para registros en zonas menos planas y mantener las cuantitativas para aquellos en regiones más planas.

Conocer la polaridad de la DFC es necesario pero no suficiente para identificar un generador con una entrada excitadora o inhibitoria. Si bien el DFC permite averiguar los dominios celulares donde entra o sale corriente, la naturaleza activa (sináptica) o pasiva (corriente de retorno) no es directamente deducible y sólo puede inferirse por la configuración espacial completa en el eje somatodendrítico, y mejor aún

mediante técnicas complementarias. Un problema similar lo tiene el ACI. Los componentes espacial y temporal no tienen polaridad cierta (Hyvärinen and Oja 2000), pero sí su producto, de manera que la reconstrucción del LFP virtual recupera magnitud absoluta y polaridad correcta para cada componente sináptico. De esta manera, la estimación de la DFCs sobre los LFPs virtuales específicos de vía permite la localización subcelular precisa de fuentes y sumideros (Makarov et al 2010; Korovaichuk et al., 2010). También, el uso de potenciales provocados intercalados en el LFP permite una identificación sencilla de algunos generadores, pues su actividad queda capturada en uno sólo (Korovaichuk et al., 2010).

3. GENERADORES PRINCIPALES DEL LFP DE HIPOCAMPO

3. GENERADORES PRINCIPALES DEL LFP DE HIPOCAMPO

3.1. Introducción

Los registros de LFP capturan la actividad eléctrica producida por las neuronas durante la integración de las entradas sinápticas. Estas corrientes transmembrana que se generan en la población postsináptica se mezclan en el volumen extracelular, haciendo muy difícil discriminar su origen. En el laboratorio se ha propuesto un esquema biofísico para identificar y separar los distintos generadores del LFP. La aproximación se basa en la distinta distribución espacial de los terminales sinápticos pertenecientes a vías aferentes concretas en la población diana, aprovechando su estratificación laminar en el hipocampo. De esta forma, los LFPs están contribuidos por varios generadores específicos de vía, cuya actividad eléctrica será una convolución temporal de las espigas emitidas por la población presináptica. Un generador puede ser por tanto considerado una entidad dual, formada por una aferencia desde una población específica de origen y otra de neuronas diana.

Las técnicas de análisis basadas en la discriminación de actividad coherente en el espacio, capturada con registros múltiples lineales, comienzan a emplearse como herramienta para analizar LFPs. En concreto, el ACI se ha utilizado para buscar LFPs específicos de vía aferente, mostrando una alta resolución espacial. Así, en el hipocampo de rata anestesiada ha revelado la presencia de varios componentes espaciales del LFP con localización subcelular estable y reproducible entre animales (Korovaichuk et al., 2010), que mostraron además relaciones temporales específicas con el disparo de neuronas locales, presumiblemente interneuronas (Makarov et al., 2009). En este Capítulo se describen en detalle los principales generadores LFP y su localización en las distintas subregiones del hipocampo, FD, CA3, y CA1, tanto en animales anestesiados como despiertos. También se describe su naturaleza sináptica química, y su origen presináptico.

3.2. Material y métodos

Para la descripción del procedimiento experimental ver sección Material y Métodos Generales (Sección 2). (*n=29 en las series experimentales en agudo*)

3.2.1. Farmacología

La naturaleza química de los generadores se estudió mediante la aplicación local de bloqueantes específicos de neurotransmisores (*n=4-10 animales*). Los registros se realizaron mediante multielectrodos de 32 canales (100 μm de distancia entre sitios) dispuestos en dos lancetas paralelas separadas entre sí por 500 μm . Las drogas se introdujeron en una pipeta de vidrio de 7-10 μm en la punta, que fue localizada a distintas profundidades en estratos específicos de las regiones CA1 o FD. La pipeta se introdujo con un ángulo de 10°, de forma que la distancia de la punta al multielectrodo de registro fuese de 300-500 μm . A través de las pipetas se inyectaron microgotas (50-100 pL) con ayuda de un Picospritzer (General Valve, Fairfield, NJ, USA), ajustándose la presión para que la droga alcanzase una distancia inferior a 500 μm alrededor de la pipeta. Esto fue determinado por la modulación selectiva de los potenciales provocados en

una sola lanceta y en el grupo de electrodos correspondiente a la zona de la entrada sináptica responsable del generador bajo estudio (Canals et al. 2005).

Las drogas empleadas fueron Bicuculina metaioduro (BIC; Sigma, St. Louis, MO, USA) y 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona 1mM (DNQX; Tocris, Bristol, UK) para bloquear receptores inhibidores gabaérgicos (GABA-A) y excitadores de tipo no-NMDA, respectivamente. Estos compuestos se disolvieron en líquido cerebrospinal artificial a concentraciones 50 veces superiores a las empleadas habitualmente in vitro, y en algunos experimentos se les añadió el colorante DiI al 4% con el fin de estimar su alcance en el tejido post-mortem. Una inyección produjo cambios estables en el potencial provocado de referencia durante al menos 60 s. En algunos experimentos fueron requeridos efectos más duraderos de la droga, para lo que se realizaron microinyecciones sucesivas a intervalos de 5 minutos, monitorizándose la amplitud de los potenciales provocados de manera continua para asegurar una estabilidad razonable.

3.2.2. Experimentos crónicos

Para comprobar la estabilidad e identidad de los generadores LFP identificados en los experimentos realizados bajo anestesia, se utilizaron datos cedidos por el Profesor Gyorgy Buzsáki. Los procedimientos de preparación, cirugía y registro han sido descritos en Montgomery et al. 2009. En este grupo de experimentos (n=2), los registros fueron obtenidos a partir de ratas despiertas implantadas con un dispositivo de seis lancetas lineales paralelas separadas 500 μm , con un total de 92 posiciones de registro (16x6). Dicho entramado de electrodos fue dispuesto para cubrir las regiones CA1-CA3/GD en un corte transversal.

En estos experimentos los generadores fueron representados mediante sus límites macroscópicos espaciales en las diferentes regiones del hipocampo. Para ello, se representaron líneas de contorno isopotencial en dos dimensiones construidas a partir de las curvas espaciales de los generadores LFP obtenidos en un análisis conjunto de los 96 registros. Como quiera que la actividad específica de un mismo generador en distintas localizaciones pudiera no ser idéntica, este procedimiento proporciona generadores con una activación temporal promediada en todo el territorio sináptico, que podría no corresponder a la actividad local, si bien este punto no es determinante para determinar el territorio sináptico global.

3.2.3. Procedimiento de análisis

Para el análisis completo de un LFP desde su adquisición, ya sea en experimento agudo (32 puntos de registro) o crónico (92 electrodos), se han seguido las etapas detalladas en Material y Métodos Generales (Sección 2). A partir de las señales originales registradas a lo largo de una trayectoria vertical en el eje CA1-FD aplicamos el método de extracción (reducción de dimensiones mediante PCA, seguido de ACI, y clusterización jerárquica), reconstrucción de LFPs virtuales y análisis de DFC.

Para ello, se han analizado perfiles espaciales de LFPs espontáneos. Para localizar e identificar el origen de los componentes se realizó estimulación selectiva de distintas vías aferentes con el objeto de visualizar

en cuales aparecía la actividad provocada. En particular se utilizaron tres vías excitadoras conocidas que, por sus características anatómicas, hacían posible su manipulación experimental y específica mediante estímulos eléctricos. Estas fueron: la entrada desde la corteza entorrinal medial (CEM) y lateral (CEL) a las células granulosas de la FD por la vía perforante medial (VPM) y lateral (VPL), respectivamente, y la entrada desde la región CA3 ipsilateral a la CA1, vía colaterales de Schaffer (Sch). Los estímulos fueron aleatorios y subumbrales.

3.3. Resultados

3.3.1. Localización subcelular de los generadores LFP de hipocampo

Los LFPs registrados simultáneamente en diferentes estratos a lo largo del eje principal de las células piramidales o granulosas muestran episodios de actividad coherente en bandas estables conformadas por electrodos contiguos. A priori, estas bandas indicarían dominios somato-dendríticos de activación sináptica que pudieran corresponderse con los territorios sinápticos de las poblaciones aferentes, descritos anatómicamente (Lorente de Nó, 1934; Hjorth-Simonsen, 1973). Sin embargo, los brotes de actividad muestran un patrón temporal extremadamente complejo y variable y suelen estar solapados, tanto en el tiempo como en el espacio, por lo que en la práctica es imposible la clasificación de las fluctuaciones encontradas en los registros a corrientes postsinápticas generadas en una u otra banda dendrítica, y mucho menos cuantificar su intensidad. Esto se consiguió mediante el ACI (Makarov et al., 2010; Korovaichuk et al., 2010; Makarova et al., 2011; Fernández-Ruiz et al., 2012; Fernández-Ruiz et al., 2012). La efectividad de la separación espacial de los distintos brotes de actividad en componentes separados puede ser apreciada a simple vista comparando las fluctuaciones del LFP espontáneo encontradas en un grupo de electrodos con las obtenidas en los mismos intervalos en alguno de los generadores separados (Fig. 4).

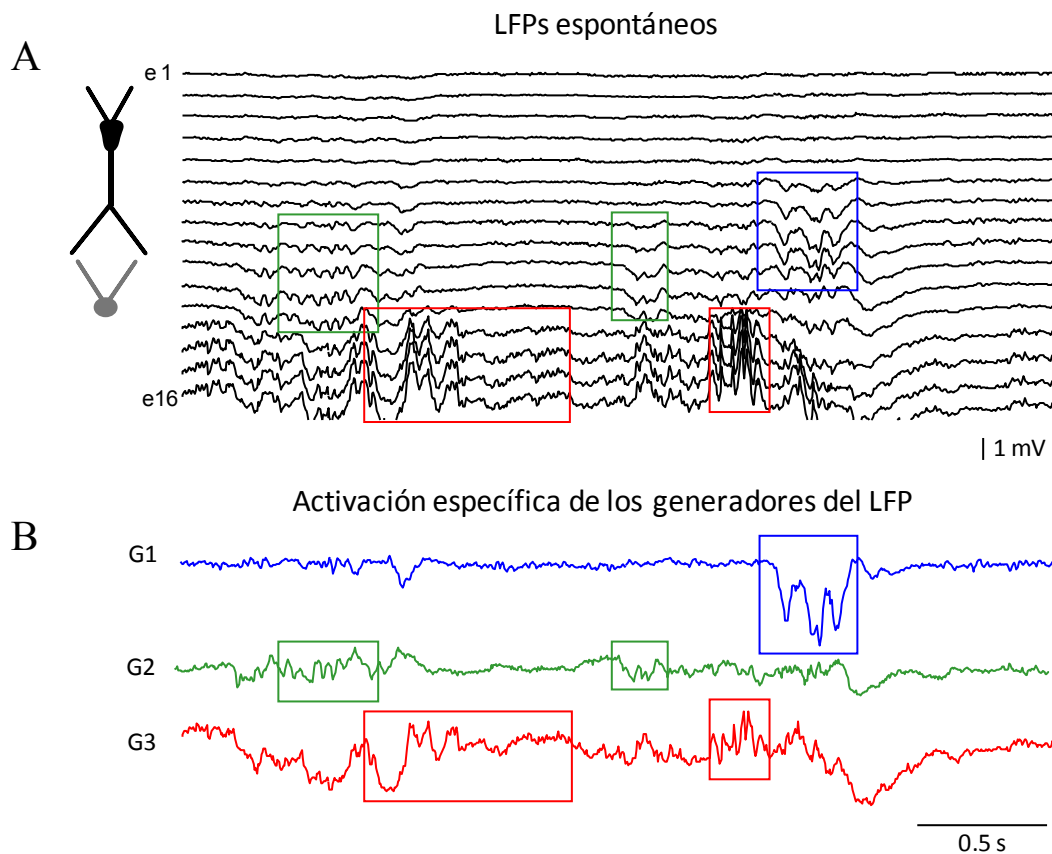


Fig. 4. Separación de las múltiples fuentes mediante discriminación espacial de los componentes sinápticos específicos llevada a cabo por el ACI. Registro representativo del un LFP espontáneo. Algunos brotes de actividad ocupan diferentes grupos de electrodos contiguos que se muestran en cajas para facilitar su reconocimiento. La estabilidad espacial observada en ellos indica un dominio dendrítico estable de las fuentes de corrientes sinápticas. En B se muestra la actividad de los tres generadores extraídos por ACI a partir del LFP espontáneo (A).

El primer objetivo que se ha abordado en el presente trabajo ha sido definir todos los dominios dendríticos con contribución significativa y estable a los LFPs hipocámpicos en rata anestesiada. Con el fin de favorecer la presencia del mayor número de generadores, el estudio se realizó sobre intervalos de actividad irregular (~100 s), puesto que la actividad rítmica de una sola entrada puede alcanzar gran magnitud y enmascarar la presencia de otras. En trabajos previos con simulaciones numéricas se pudo confirmar que cuando alguna de las aferencias sinápticas aporta una varianza mayoritaria al conjunto de registros, la eficiencia del ACI para discriminar las contribuciones más débiles se vería reducida (Makarova et al., 2011). Tal situación ocurre, por ejemplo, durante ritmos macroscópicos como el ritmo theta hipocámpico, por lo que fue excluido del presente estudio.

Se detectaron un total de seis generadores principales (G1-G6) en perfiles de LFP realizados sobre tracto único a través de las regiones CA1-FD y CA1-CA3. En todos los casos, la varianza acumulada representó al menos el 99% del total. Estos generadores aparecieron de forma estable en todos los experimentos y animales analizados. En la Figura 5 se muestra un fragmento de un LFP espontáneo registrado a lo largo de las regiones CA1 y FD con su correspondiente mapa espaciotemporal de corrientes transmembrana calculado a partir de los LFPs virtuales reconstruidos. Puede observarse en los perfiles de LFP específicos

para cada generador una acumulación de actividad en distintos dominios dendríticos de las células principales.

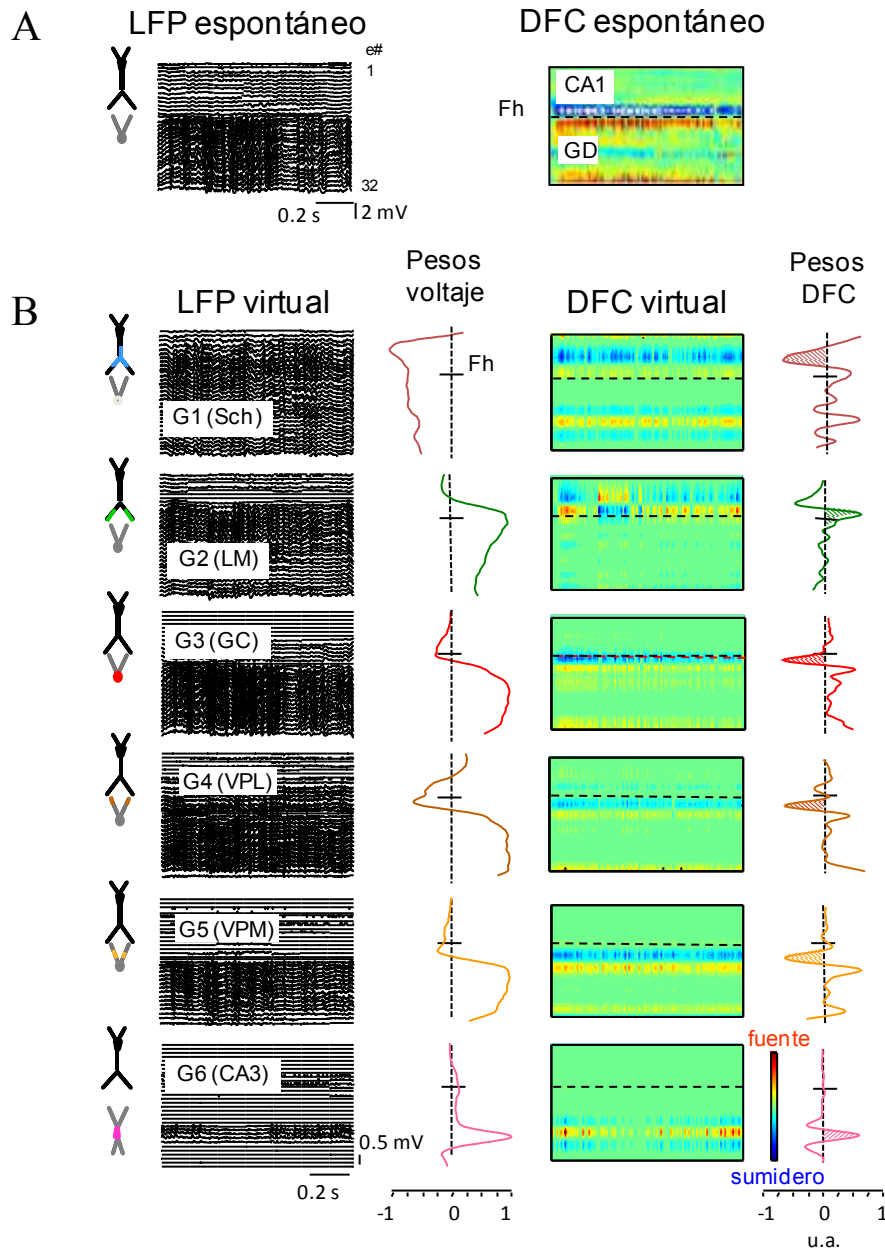


Fig. 5. Localización subcelular de los generadores principales del LFP de hipocampo. A. Ejemplo representativo de un LFP espontáneo e en electrodo de 32 canales (izquierda) y el perfil de DFC correspondiente (derecha). El tracto analizado cubre la región de CA1 desde la capa de somas hasta la hoja inferior del GD. Las fuentes de corriente se muestran en rojo/amarillo y los sumideros en azul. Fh: Fisura hipocampal. B. Perfil de los LFPs virtuales y los pesos espaciales correspondientes reconstruidos a partir de cada generador extraído que se extienden en bandas discretas o estratos con localizaciones subcelulares precisas. El DFC de cada generador está restringido a un generador celular único (CA1 de las células piramidales de CA3 o células granulosas). Excepto en un caso (G2, en el estrato lacunoso-molecular de CA1) todos los generadores presentaron bandas definidas de entrada y salida de corriente y perfiles espaciales son un solo máximo. Los CSDs virtuales fueron obtenidos a partir de LFPs virtuales y sus pesos de DFC son la segunda derivada espacial de las curvas de peso de voltaje. Las áreas rayadas muestran las bandas dendríticas donde las corrientes activas (sinápticas) fueron localizadas por farmacología local. La escala de DFC se muestra en unidades arbitrarias (u.a.) para facilitar la visualización de las corrientes más débiles.

Para iniciar la identificación de las poblaciones presinápticas correspondientes a los 6 generadores principales obtenidos se estudió la localización espacial de sus corrientes. G1 y G2 mostraron máxima potencia en el estrato radiado y lacunoso-molecular de la región CA1, respectivamente, aunque el G2 también se extendió a la hoja superior de la FD a través de la fisura hipocámpica. Los sitios de máxima amplitud de los generadores G3, G4 y G5 se localizaron en la FD, todos ellos en la región del hilus, interpuesta entre las dos capas de células granulosas. Finalmente, el G6 exhibió máxima varianza en la capa piramidal de la región CA3. Comparativamente, los generadores más potentes fueron aquellos localizados alrededor de la fisura hipocámpica (G2) y dos de la FD. El G2 aportó una varianza relativa de $23 \pm 2\%$, mientras que los de la FD aportaron $25 \pm 5\%$ (G3) y $32 \pm 5\%$ (G4), respectivamente (Ver Tabla 2).

Generador LFP	Varianza relativa (%)	Potencia media (mV^2)
Sch	10 ± 2	0.036 ± 0.01
LM	23 ± 2	0.086 ± 0.02
VPM	7 ± 3	0.022 ± 0.01
VPL	32 ± 5	0.149 ± 0.04
GC _{som}	25 ± 5	0.116 ± 0.03
CA3	3 ± 1	0.017 ± 0.01

Tabla 2. Varianza relativa y potencia absoluta de los generadores de LFP separados por ACI. La varianza relativa es medida como porcentaje de la contribución de los generadores de LFP extraídos en el perfil de CA1-GD al LFP total. La potencia media ha sido estimada a partir del punto de peso máximo del LFP reconstruido, específico de cada generador (LFP virtual). Los valores representan la media \pm ES

Los dominios subcelulares sobre los que se extiende cada generador LFP pueden ser aproximados mediante la curva de distribución espacial correspondiente. Sin embargo, como los LFPs se extienden más allá del lugar de sus fuentes de corriente debido a la conducción por volumen (Lorente de Nó, 1934), se precisó la localización subcelular de las membranas sinápticas activas mediante el análisis de DFC aplicado a los perfiles de LFPs virtuales, minimizando así la contribución de corrientes distantes al electrodo. Esta técnica devuelve un mapa espaciotemporal de las corrientes transmembrana a lo largo del eje principal de las células principales, de tal manera que la activación específica de una vía aferente se observará una distribución balanceada de corrientes de entrada (sumidero extracelular) y de salida (fuente extracelular) circunscritas a la anatomía del generador (Freeman y Nicholson, 1975; Herreras 1990). Durante un LFP natural se activan múltiples vías convergentes con intensidad y solapamiento temporal variables, de forma que el DFC de un LFP espontáneo arroja una complicada mezcla de corrientes difícil de descomponer e interpretar (Figura 5A) en la que no se aprecian claramente los dominios dendríticos que fueron activados en cada instante. En contraste, el DFC obtenido de los LFPs virtuales específicos reconstruidos a partir de cada generador proporciona mapas espaciales característicos, con fuentes y sumideros circunscritos en dominios subcelulares estables, bien de células piramidales de CA1 (G1 y G2) o CA3 (G6), o de células granulares (G3-G5). Las áreas marcadas en las curvas de los pesos espaciales de los DFC indican las zonas sinápticas activas, como se determinó por farmacología local (ver más abajo). El generador G1 presentó un patrón espacial característico de corrientes excitadoras en el estrato radiado, distribución que fue previamente identificada como la entrada excitadora desde la región CA3 a las células piramidales de la región CA1 (Korovaichuk et al., 2010; Fernández-Ruiz et al., 2012). El generador G2, localizado en el estrato lacunoso-molecular de la región CA1 (dendritas apicales distales),

fue el único que mostró una sucesión de sumidero y fuentes en un mismo dominio dendrítico. Los generadores localizados en la FD desplegaron un patrón espacial simétrico con respecto al hilus de la FD, con corrientes circunscritas a las capas de granos en ambas hojas, y ausentes en el hilus. Estos perfiles espaciales fueron coherentes con los potenciales provocados estándar y los perfiles de DFC obtenidos por activación sináptica en las células granulosas provocada por estímulos en la VPL y VPM (McNaughton, 1980; Golarai y Sutula, 1996; Canning y Leung, 1997; Korovaichuk et al., 2010). Los tres presentaron fuentes de corriente en ambas capas de células granulosas y sumideros en las capas moleculares correspondientes, aunque con diferentes intensidades y distribuciones subcelulares. Así, el G3 presentó fuentes de corriente potentes en la capa de somas (en adelante denominado como GCsom), mientras que los G4 y G5 se caracterizaron por sumideros de corriente bien delimitados en el tercio medial y externo de la capa molecular, respectivamente.

La identidad de algunos generadores sinápticos pudo ser corroborada fácilmente mediante estimulación selectiva de las vías aferentes específicas. La Figura 6 muestra como los generadores G1, G4 y G5 captaron de forma específica y sin contaminación apreciable en los demás, la actividad provocada por estímulos subumbrales en las correspondientes vías anatómicas de Sch, VPM y VPL.

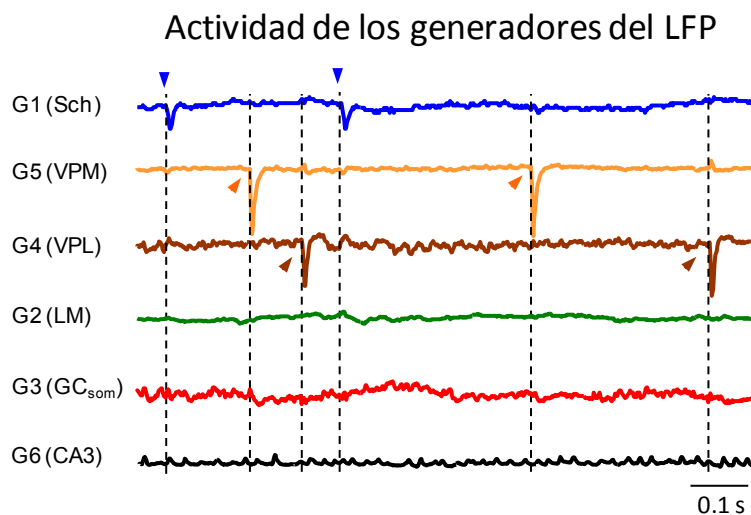


Fig. 6. Estimulación eléctrica de las principales vías excitatorias provocadas por EPSPs cuya actividad fue capturada selectivamente por las activaciones temporales de los respectivos generadores de LFP (escala en u.a.). Sch, Vía Perforante Medial (VPM) y Vía Perforante Lateral (VPL), originan los generadores de Schaffer, Perforante Medial y lateral, respectivamente. GCsom: generador de somas de células granulosas. Los triángulos indican el momento de estimulación de CA3 ipsilateral y las secciones medial y lateral del haz angular. No hay muestras de contaminación cruzada entre generadores. La escala vertical es mostrada en u.a.

3.3.2. Generadores LFP del hipocampo en animal no anestesiado

Los primeros resultados indican una correspondencia espacial de al menos algunos generadores LFP con vías anatómicas conocidas. El número de generadores encontrado en animal anestesiado es claramente inferior al vías conocidas, por lo que cabía la posibilidad de que las vías que se activan espontáneamente bajo anestesia sean menos o distintas que en situación de vigilia. Así pues, se analizaron LFPs en

animales no anestesiados durante estados en los que el hipocampo mostró actividad irregular (estado de alerta, tareas consumatorias y sueño de onda lenta).

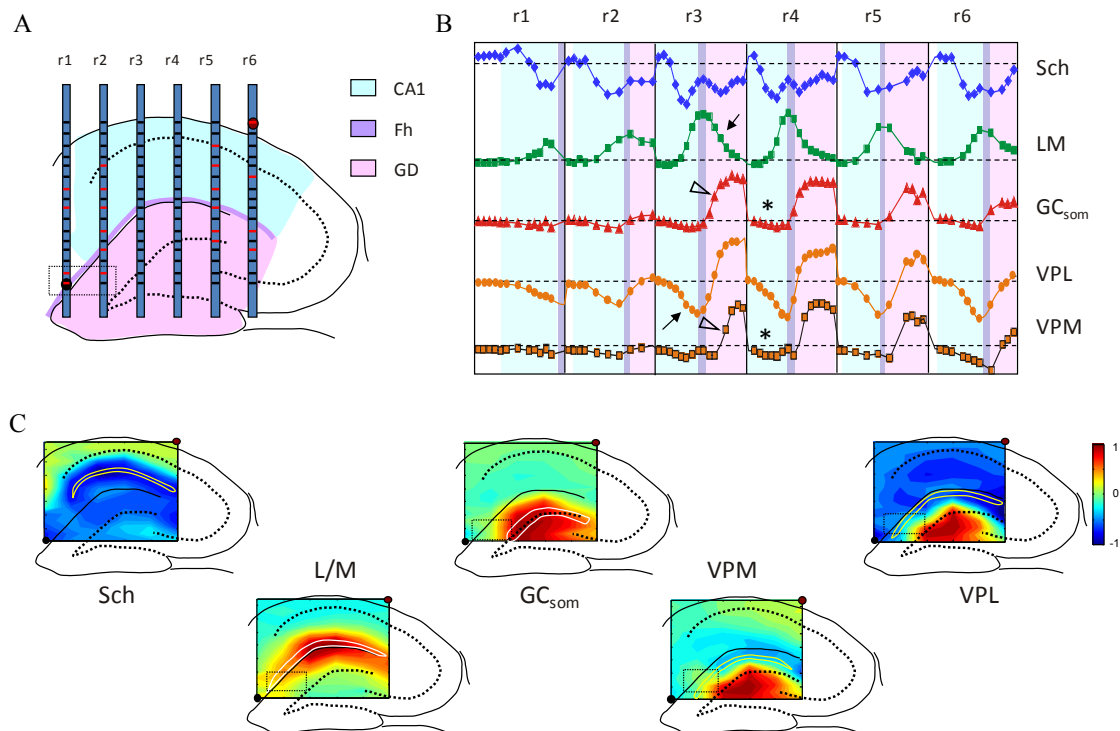


Fig. 7. Distribución de los generadores de LFP coincidentes con límites anatómicos y subcampos hipocampales. **A.** Geometría del dispositivo de electrodos utilizado para su implantación crónica, indicando la localización de las lancetas de registro (los electrodos defectuosos fueron marcados en rojo). **B.** Representación de subcampos hipocampales mostrando la reconstrucción espacial de los pesos relativos correspondientes a cada generador aislado. Las flechas negras indican la actividad conducida por volumen introducida en los subcampos (CA1 o GD) por generadores con corrientes sinápticas activas en dominios dendríticos distales de los demás (LM y VP). Los generadores con corrientes en regiones no distales, como GCsom y VPM en el GD, generan una pequeña actividad en áreas remotas (asteriscos en CA1). Los perfiles espaciales similares de algunos generadores (GCsom y VPM) son discriminados eficazmente por cambios abruptos en los límites del máximo correspondiente (punta de flecha) en la capa molecular de GD. **C.** Representación bidimensional de los LFPs específicos virtuales en subcampos hipocampales indicando el alcance espacial, fuerza relativa y polaridad, excepto para el generador LM cuya polaridad es indiscriminable. Las corrientes sinápticas activas identificadas farmacológicamente están definidas por líneas amarillas o blancas y pequeños reuadros que indican las zonas de peor definición debido a la falta de electrodos. *Datos proporcionados por Montgomery & Buzsaki.*

Los registros de estos animales fueron cedidos por el laboratorio de G. Buzsáki, y se realizaron con un dispositivo de 6 lancetas en paralelo que cubrieron buena parte de las subregiones del hipocampo. Esto permitió no sólo investigar el número y distribución laminar de los generadores LFP sino también su extensión espacial en cada subregión. La disposición de los diferentes electrodos permitió la construcción de una matriz en dos dimensiones para mostrar los resultados. Tras análisis de múltiples segmentos de LFP se obtuvo un número de generadores principales con varianza significativa y distribución espacial idénticas a aquellos encontrados en animales anestesiados. Representando los pesos relativos en cada punto de registro en todas las lancetas se obtuvieron curvas espaciales combinadas, que representadas en un corte anatómico revelaron distintos patrones espaciales para cada generador plenamente coincidentes con las obtenidas en animal anestesiado. Así, en la Figura 7 puede observarse como marcadores espaciales característicos tales como los loci de valor máximo y de cambio de polaridad para cada generador se correlacionan con la anatomía curvada del hipocampo, manteniendo su presencia en los

mismos niveles dendríticos (Figura 7). Tras estimación de la DFC para cada generador, varios de ellos (G2, G4 y G5) mostraron un patrón espacial dominado por sumideros de corriente ajustables al territorio sináptico de las vías excitadoras mencionadas (Schaffer, VPM y VPL).

Una observación importante común a los generadores LM y VPL, localizados en las dendritas distales de las células piramidales de CA1 y de los granos, respectivamente, es que ambos mostraron un notable potencial de campo en la subregión vecina por conducción de volumen (flechas negras-Fig. 7), a diferencia de los generadores VPM o GCsom (asteriscos-Fig 7). También fue notable el hecho de que se encontraran potenciales de campo positivos en el hilus en todos los generadores de la FD, generados igualmente por conducción de volumen de corrientes con origen en las membranas de células granulares. Dada la similitud espacial entre los generadores VPM, VPL y GCsom, su discriminación en LFPs fue más difícil, por lo que hubo que recurrir a selección de canales *ad hoc* para potenciar la presencia de los registros con más diferencias en los estratos molecular y somático (punta de flecha-Fig. 7).

3.3.3. Naturaleza excitadora e inhibidora de los generadores LFP hipocámpicos

Mediante la estimulación selectiva de vías excitadoras principales se había podido identificar las poblaciones de origen de algunos de los generadores descritos (Korovaichuk et al., 2010). Sin embargo, para conocer el origen del resto se investigó la naturaleza excitadora o inhibidora de los mismos. Estos datos se obtuvieron mediante el bloqueo local de receptores sinápticos no-NMDA o GABA-A usando DNQX y BIC, respectivamente. Con el fin de incrementar la resolución espacial de los experimentos se seleccionaron, como diana del estudio farmacológico, las bandas o dominios dendríticos que mostraron fuentes o sumideros de corriente, para así determinar cuál de ellos correspondió a la banda sináptica activa.

La inyección local del bloqueante de receptores de glutamato redujo selectivamente el fEPSP provocado por estimulación de los colaterales de Schaffer en la lanceta caudal, mientras que en la rostral, localizada a 500µm en dirección rostral, no se observaron efectos (ver Figura 8). Este efecto diferencial permitió comparar las curvas espaciales de los generadores obtenidos en ambas lancetas antes y después de la aplicación de bloqueantes. Así, el efecto del DNQX pudo ser apreciado en la disminución selectiva de la varianza en el dominio dendrítico correspondiente a los terminales de Schaffer de la lanceta caudal próxima a la inyección. Más aún, el DNQX solo redujo el fEPSP y la varianza del generador Schaffer cuando se administró la droga en el estrato radiado, pero no cuando se inoculó en la capa de somas o en el estrato oriens. Este procedimiento permitió conocer los dominios somatodendríticos activos y su naturaleza química en los 6 generadores identificados.

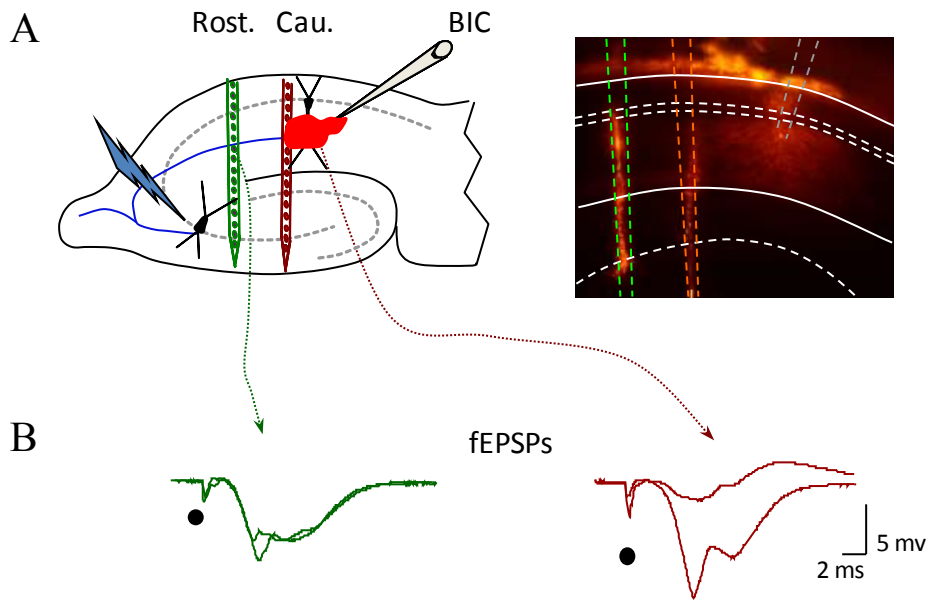


Fig. 8. Naturaleza química de los generadores de LFP hipocampales. **A.** Situación de electrodos y procedimiento experimental (panel izquierdo). Se usó un multielectrodo con dos lancetas separadas 500 μ m y una pipeta de registro e inyección que fue usada para introducir los diferentes bloqueantes de neurotransmisores a una distancia de 500 μ m de las lancetas a los diferentes niveles y campos dendríticos deseados. La localización de las lancetas de registro fue cotejada por los tractos visibles tras el procesamiento histológico, así como la extensión del volumen de droga inyectado en el st. radiado del campo de CA1 (panel derecho). Los efectos locales de DiI estuvo restringido a una de las lancetas, sin efectos observables en la adyacente. **B.** La reducción selectiva del fEPSP provocado por Sch en la lanceta caudal. Experimento representativo que muestra el efecto selectivo de la BIC en uno de los dos generadores (Sch) extraídos del mismo perfil vertical. El punto negro indica el artefacto de la estimulación asociado al PP.

Para ello, se compararon las potencias medias en segmentos de 200 s del LFP reconstruido a partir de cada generador antes y tras la aplicación de los bloqueantes sinápticos en las siguientes regiones: estrato radiado y lacunoso-molecular de CA1 para los generadores Sch y LM, respectivamente, el estrato molecular de la FD para VPM y VPL, y las capa de somas de las células granulares para GCsom y de las piramidales de CA3 para el correspondiente a esa zona.

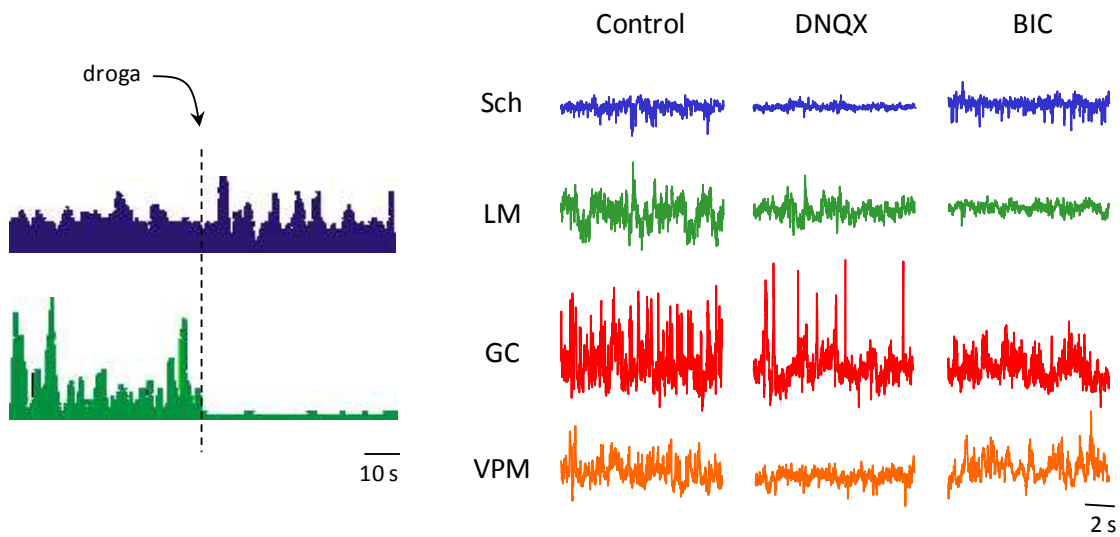


Fig. 9. Naturaleza química de los generadores principales. A la izquierda se muestran las correspondientes envolventes de la potencia media en el lugar de máxima actividad (ventana de 0.5s) para el generador de Sch (arriba) y LM (abajo). Los efectos del DNQX y la BIC en la activación de los distintos generadores son mostradas en la derecha. La escala vertical es mostrada en u.a.

El tratamiento con DNQX disminuyó dramáticamente la actividad de los generadores Sch, VPM y VPL ($29.2 \pm 9.9\%$; $15.7 \pm 6.5\%$; $7.5 \pm 3.0\%$ respectivamente; $P < 0.01$, t de Student) mientras que LM, GCsom y CA3som fueron afectados por ambas drogas, BIC y DNQX, aunque de forma significativa sólo disminuyó GCsom en respuesta a DNQX ($n=4$, $P^{**} < 0.01$, t de Student) (Ver figura 9). Mientras que los efectos antagónicos de BIC indica un origen inhibitor GABAérgico, la reducción en el potencial observada en el mismo LFP tras el bloqueo de receptores excitadores para Glu sugiere una combinación de dos generadores sinápticos, uno excitador y otro inhibitor, o alternativamente, la reducción en la entrada excitadora a una población de interneuronas con cuerpos somatodendríticos y proyecciones axonales en el mismo dominio espacial al alcance de la droga. El reducido dominio espacial en el que se presentaron las corrientes sinápticas activas producidas por los generadores LM y GCsom sugieren una correspondencia con entradas sinápticas inhibitoras de sendas subpoblaciones de interneuronas con axones terminales en la porción distal de las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 y de los somas granulares, respectivamente.

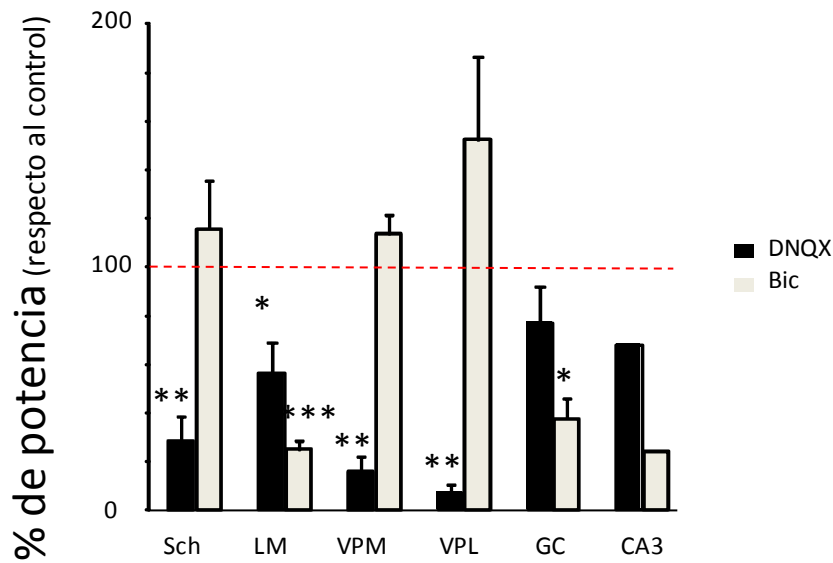


Fig. 10. Datos poblacionales que muestran el efecto del bloqueo específico en cada generador. Los datos (media±error estándar [ES]), representan el porcentaje de potencia en la lanceta afectada por la droga en relación a la no afectada. N=4-10 animales, excepto para el generador de CA3 (n=2); test *t* de Student: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

3.4. Discusión

En general, es difícil interpretar los LFPs en situaciones donde corrientes sinápticas iniciadas por diferentes poblaciones aferentes se solapan de forma compleja y variable en el espacio y en el tiempo. Hasta ahora los datos existentes se restringían a comparaciones temporales entre ritmos macroscópicos o eventos muy específicos del LFP, tales como las ondas agudas en CA1 (*Sharp waves*) o FD (*dentate spikes*) con actividad unitaria o registros intracelulares (Buzsáki et al., 1983). Estas comparaciones han aportado cierta información sobre las fuentes celulares que las generan, pero no sin reservas. Para eliminar la ambigüedad en las interpretaciones de una forma definitiva se requiere información detallada de la geometría y la ordenación espacial de las fuentes neuronales unitarias, información difícilmente alcanzable. Una buena aproximación es conseguir un desglose de las contribuciones específicas de vía aferente, aprovechando la regularidad arquitectónica de algunas estructuras y la estratificación de algunas vías anatómicas en dominios espaciales restringidos. Lo que macroscópicamente denominamos actividad espontánea está contribuida por la activación instantánea de células individuales o grupos funcionales de células que pueden proyectar a diferentes partes de la región postsináptica. Con tiempo suficiente, es de prever que el territorio sináptico completo acabará activándose de una forma más o menos homogénea. En este Capítulo se ha mostrado cómo la optimización de técnicas de discriminación espacial permite la separación de los LFPs del hipocampo en sus generadores sinápticos individuales. Hasta el momento, hemos separado y analizado 6 generadores estables que conjuntamente explican la mayor parte de la varianza del LFP. Cada uno de ellos presenta actividad en dominios específicos de las células principales, coincidiendo con los territorios sinápticos donde contactan vías conocidas, algunas intrínsecas, otras extrínsecas.

El procedimiento de separación, cuyo elemento central es el ACI, ha sido testado previamente y comprobada su eficacia y rangos útiles para LFPs de varias estructuras cerebrales, así como para LFPs simulados con mezclas sinápticas de patrones temporales conocidos y similares a los del hipocampo (Comon, 1994). Es importante destacar que es una herramienta de análisis ciego, esto es, al algoritmo de separación no se le introduce ninguna información sobre qué son, ni cuantas fuentes hay, ni cómo se mezclan, lo que da mayor seguridad en que la separación de componentes obedece exclusivamente a los criterios estadísticos para los que fue diseñado, esto es, para separar mezclas con una distribución espacial diferente y estable. En este Capítulo se ha prestado atención a este parámetro, dejando para otros los cursos temporales y su variabilidad regional.

Es importante destacar que los registros fueron realizados simultáneamente con multielectrodos Michigan en distintas localizaciones del hipocampo, pues la separación de componentes espaciales así lo requiere. No son por tanto aplicables a registros realizados con un solo electrodo, con los cuales no se puede conocer ni la composición, ni la naturaleza química, ni la posición de las fuentes que los contribuyen. También es importante destacar que para la correcta interpretación celular es necesario asignar con precisión los pesos de los componentes en cada sitio de registro con el dominio celular concreto cercano al electrodo. Esto es realizable con relativa sencillez en el hipocampo gracias a los marcadores espaciales que encontramos en los perfiles típicos de potenciales provocados y de las corrientes extracelulares estimadas en las distintas posiciones de registro mediante análisis de DFC. De hecho, se ha podido comprobar cómo los pesos de voltaje de los generadores así como de su segunda derivada espacial replican con precisión los perfiles conocidos de aquellos, pudiendo reconocer en algunos casos por simple inspección visual y de forma sencilla a qué vía sináptica aferente corresponden varios de los generadores (Korovaichuk et al., 2010). En este sentido, el DFC del LFP reconstruido a partir del generador refleja con precisión y exclusividad las corrientes postsinápticas generadas por una sola aferencia, aislándolas de las corrientes con las que aparecía mezclada en el LFP nativo, buena parte de las cuales puede ser espuria.

Como principales generadores del LFP de hipocampo, aunque no únicos, presentamos en este trabajo, dos correspondientes a la región CA1 (G1 y G2), tres a la FD (G3-G5) y uno a la región CA3. Al igual que los perfiles de los potenciales provocados generados por la activación selectiva de vías anatómicas (Andersen et al., 1971), los generadores del LFP tienen distribuciones espaciales sin transiciones bruscas, en general con morfología de campana y un solo máximo. Además, la distribución espacial de las corrientes de entrada y salida está finamente circunscrita a la extensión física de las células principales de una sola región, bien piramidales en CA1 o CA3, bien a los granos en ambas capas de la FD. Esta doble observación apuntala la interpretación de los generadores como reflejo de una sola vía sináptica de distribución estratificada en dominios subcelulares concretos. En un caso concreto, el generador Schaffer presenta máximos en dos regiones CA1 y CA3. Esta observación fue atribuida a la inevitable activación sincrónica de los colaterales de Schaffer en CA1 y de los colaterales recurrentes sobre las células piramidales de CA3 (Korovaichuk et al., 2010).

Se podría argumentar que las bandas dendríticas específicas para cada generador no tienen por qué corresponder de forma ajustada a una entrada exclusiva desde una población homogénea, ya que pudieran contener actividad de sinapsis activadas por vías diferentes y cuyos contactos axónicos comparten el mismo dominio subcelular. Sin embargo, debemos tener en cuenta la naturaleza esencialmente sincrónica de un LFP. Sólo aquellas corrientes sinápticas que sean activadas en sitios cercanos y con polaridad y curso temporal similar tienen posibilidad de sumarse y construir un LFP de magnitud apreciable. Durante

actividad espontánea, esta doble característica espacial y temporal sólo es atribuible a la activación de un grupo de neuronas aferentes que codifiquen conjuntamente y proyecten sus axones a los mismos dominios dendríticos de la misma población de neuronas postsinápticas. Podría pensarse que activaciones aisladas de espinas dendríticas de aferencias diferentes podrían ser capturadas en un generador espacial que macroscópicamente pertenezca a otra vía. Esto implicaría cierto grado de contaminación inespecífica en cada componente. Si bien esto es posible para activaciones esporádicas de espinas aisladas, su contribución al LFP sería tan pequeña (ca. varios órdenes de magnitud menor) como la de una espina “asíncrona” de la propia vía, y por tanto despreciable. Como evidencia de que la contaminación entre vías con territorio sináptico solapado es escasa y despreciable es que los perfiles de potencial y de corriente estimados para varios de los generadores principales reportados en este Capítulo y entresacados de épocas naturales de LFP replican de forma precisa la de los potenciales provocados por vías específicas, por lo que no queda mucho margen para contribuciones mixtas. Estas necesariamente habrían causado un desvío en el perfil espacial para ese generador y época de LFP analizado. Ciertamente, el análisis de fragmentos cortos genera cierta dispersión en la distribución espacial de un generador (Makarova et al., 2011), motivo por el cual se utilizaron fragmentos de LFP de duración suficiente (> 100 s). Además, como los generadores son separados en un único paso, si un generador contuviera un porcentaje significativo de otra vía, esta se vería mermada en tal porcentaje y su distribución espacial también cambiaría con respecto a la obtenida por activación provocada de su vía específica. Tales desvíos no fueron observados. En trabajos anteriores (Makarova et al., 2011) realizados mediante simulación de LFPs con entradas sinápticas de solapamiento espacial y temporal variable se pudieron encontrar dos excepciones. La más notable se refiere a la contaminación sufrida por generadores que introducen una varianza relativa pequeña en el conjunto de señales (generadores débiles). La otra excepción se refiere al porcentaje de tiempo total en que dos o más generadores covarían de forma idéntica. Ninguna de estas excepciones es aplicable a los generadores descritos en esta sección.

En el hipocampo se conocen dos importantes entradas sinápticas, cuyas corrientes asociadas son fácilmente reconocibles en un AFC. La primera de ellas está causada por la despolarización iniciada en el estrato radiado, por lo que el sumidero de corriente activa en esta zona correspondería a los axones de las células piramidales localizadas en la CA3, cuyos colaterales (de Schaffer) inervan directamente las células piramidales de CA1. La segunda de las aferencias descritas en la literatura es la proyección de axones que viajan desde la corteza entorrinal por la VP y que contactan en su mayoría con las células granulares de la FD. Estas vías anatómicas se pueden identificar con los generadores excitadores Sch, VPM y VPL, cuyos sumideros activos se encuentran localizados en el estrato radiado de CA1 y en los tercios medio y externo de la capa molecular, respectivamente. Como es de esperar en vías excitadoras, la actividad de esos generadores es selectivamente deprimida tras bloqueo farmacológico de los receptores de glutamato. En el caso de los generadores CA3som y GCsom, los perfiles espaciales de fuentes y sumideros coinciden con los esperados para vías sinápticas inhibitorias somáticas y perisomáticas. De hecho, sus actividades fueron selectivamente abolidas con el bloqueante de receptores GABAérgicos. Con estos datos y aún sin disponer de un correlato unitario preciso, podemos señalar a la subpoblación de interneuronas en cesto de cada subregión como el origen presináptico de ambos generadores. En particular destaca el generador GCsom por el gran peso de la fuente de corriente en la capa de somas de las células granulares. La reconstrucción de su LFP virtual mostró eventos lentos pero de gran amplitud, que contribuyeron con un porcentaje muy elevado a la varianza total. Por último, hemos obtenido resultados inconcluyentes para el potente generador LM, ya que fue parcialmente deprimido por ambos bloqueantes y mostró una sucesión temporal de fuentes y sumideros. Este dominio dendrítico apical distal

puede generar sumideros activos por activación de la VP (Leung y Peloquin, 2010), así como fuentes activas por activación de las interneuronas or-lac con soma en el estrato oriens y proyección axónica en el LM. Una posible explicación es que este generador esté constituido por la combinación de dos entradas que convergen en el mismo dominio dendrítico, el penacho distal de las células piramidales (Brankack et al., 1993), cuyo solapamiento espacial podría ser tan fuerte que serían difícilmente discriminadas por el ACI. Otra posibilidad que respondería a la doble modulación de este generador vendría dada por la aferencia de una población inhibitoria con dendritas en el mismo estrato LM, y comandada por una población excitadora.

A partir de estos datos podemos considerar cada generador LFP como un componente específico que refleja la actividad de una vía aferente, con poblaciones de origen en la región CA3 ipsilateral, corteza entorrinal medial y lateral y 3 diferentes subredes inhibitorias locales: 2 de tipo basket en CA3 y FD, y otra con territorio sináptico distales en la región CA1.

La estabilidad de este grupo de generadores LFP se ha confirmado en animales no anestesiados, en los que mostraron una idéntica distribución espacial. Por una parte, esta identidad confirma la utilidad del ACI para discriminar y separar la activación de varias de las poblaciones neuronales intrínsecas y aferentes al hipocampo durante el procesamiento de estímulos naturales. Por otra, nos indica que independientemente de las posibles diferencias de activación bajo los efectos de la anestesia en comparación con el animal despierto, los LFPs hipocámpicos están dominados por la actividad sináptica de un número concreto y específico de vías sinápticas, (no aparecen ni desaparecen generadores), validando la preparación bajo anestesia para el estudio de las características anatómo-funcionales que se presentará en Capítulos sucesivos.

Una observación notable es que los generadores LM y VPL, ambos generados por corrientes circunscritas a las dendritas distales de sus respectivas células, muestran un voltaje notable en las regiones adyacentes. Una explicación alternativa podría apuntar a un daño en el tejido producido por la implantación del electrodo. La formación de cicatriz glial ante un implante crónico y la respuesta inmune que conlleva, podría facilitar la conducción por volumen en esa región y aumentar el alcance de las corrientes desde su origen. Sin embargo, tal heterogeneidad se esperaría que produjera un cambio en el perfil del potencial y a su vez generaría corrientes espurias en el de DFC. Los perfiles sin embargo, mantienen la coherencia anatómica tanto en rata anestesiada como despierta, por lo que la explicación más razonable es la conducción por volumen facilitada para corrientes distales con mayor momento dipolar.

Si recopilamos la literatura que describe las vías anatómicas del hipocampo y la que estudia la activación de estas vías mediante potenciales provocados queda patente que las conexiones cuyas activaciones sincrónicas producen potenciales de campo sobrepasa en número los generadores descritos para LFPs naturales en el presente trabajo. Entre las vías sinápticas no representadas están: una excitadora y otra inhibitoria provenientes del septum, aferencia excitadora contralateral (comisural) a CA1 y a CA3, y un gran número de entradas inhibitorias locales en todos los subcampos (Andersen et al., 1961; Amaral 1978; Buzsáki y Eidelberg, 1982; Somogyi y Klausberger, 2005). La explicación más razonable a estas ausencias es que estas entradas o bien no poseen territorios sinápticos con una estructura espacial apropiada o bien su patrón de activación temporal es escaso o desincronizado (Elul, 1972; Makarova et al., 2011; Ho et al, 2012) y por tanto no contribuirían significativamente a los LFPs macroscópicos. Sin embargo, a pesar de no generar las corrientes extracelulares o las fluctuaciones temporales requeridas

para quedar reflejados en los LFPs, son esenciales en el procesamiento de la información por las redes en las que participa el hipocampo. Dicho en otras maneras, debemos ser conscientes de que los LFPs nos muestran sólo una parte de la actividad total de una red neural formada por numerosas poblaciones interconectadas.

4. ALCANCE ESPACIAL DE LOS GENERADORES PRINCIPALES DE HIPOCAMPO

4. ALCANCE ESPACIAL DE LOS GENERADORES PRINCIPALES DE HIPOCAMPO

4.1. Introducción

Buena parte del conocimiento acerca de la organización conectiva del hipocampo, sobre la que descansan sus funciones, deriva de estudios anatómicos. Desde el punto de vista estrictamente funcional, los estudios anatómicos son necesarios pero no suficientes. El flujo de información por las distintas vías anatómicas aferentes al hipocampo y conexiones intrínsecas es muy dispar, por un lado varía en relación al estado funcional general y en comportamientos concretos (Vinogradova, 2001). Por otro, depende de las propiedades electrofisiológicas particulares de cada población neuronal de las redes involucradas (Ranck, 1975, Buzsáki, 1983). Las conexiones funcionales relevantes en cada instante pueden y de hecho tienen una representación cuantitativa y unas proporciones cambiantes que no son reflejadas por la anatomía. Los datos fisiológicos proporcionan mapas corticales funcionales que describen las cadenas de poblaciones neuronales involucradas en el procesamiento de señales específicas. Estos mapas funcionales contienen buen número de estructuras y núcleos, y la intensidad de su activación es habitualmente muy diferente de la que se podría inferir por el peso de las vías anatómicas. A menudo, vías de baja densidad anatómica pueden encauzar un flujo de muy alta densidad (e.g. redes interneuronales). Sin embargo, debemos entender la relación entre unas y otras como las del tráfico en la red viaria. Su estudio combinado parece, cuando menos, ofrecer más posibilidades experimentales para describir la operación y funciones del SN.

Recientemente, estudios teóricos han proporcionado herramientas matemáticas que persiguen clasificar las redes neuronales en base a su patrón de conectividad. Un ejemplo de acercamiento formal es el uso de la teoría de grafos, que permite la clasificación de las topologías mediante coeficientes estadísticos. Con este tipo de herramientas varios estudios han mostrado la relación entre estados de sincronía en redes complejas y la topología subyacente. Incluso, neuropatologías como la epilepsia o la enfermedad de Alzheimer han sido asociadas con cambios en la topología de la red y la conectividad funcional (Marconi et al., 2012). Parece lógico concluir que al menos una parte de las propiedades funcionales y capacidades computacionales de las estructuras nerviosas y redes neurales refleje su estructura conectiva.

En lo referente al hipocampo, el conocimiento específico de la organización y conectividad de sus circuitos deriva de los trabajos pioneros de Santiago Ramón y Cajal (1902) y Rafael Lorente de Nó (1934), extendidos posteriormente por numerosos autores (Hjorth-Simonsen, 1973; Amaral, 1978). Las principales subregiones de la formación hipocámpica están conectadas en una secuencia de conexiones unidireccionales que dan lugar al denominado circuito trisináptico básico. El primer eslabón es la FD que recibe su entrada principal de la corteza entorrinal a través de la VP. Sus células granulares envían axones (fibras musgosas) a la región CA3, cuyas células piramidales emiten a su vez axones, uno de cuyos colaterales (Schaffer) conecta con la región CA1. Finalmente, las células piramidales de esta última proyectarán hacia el subículo, último relé antes de completar el circuito en la corteza entorrinal. Este circuito básico excitador, junto con el postulado psico-físico del hipocampo como un mapa cognitivo, aun siendo incompletos y sesgados, han resultado conceptos útiles para entender la función de la estructura. Conocer sus elementos y conexiones revelaría qué tipo de computaciones puede llevar a cabo, esto es, las transformaciones de las señales de entrada en otras de cualidad diferente, así como el lugar exacto en el que ocurren y a qué estructuras son conducidas. Sin embargo, la conectividad de buena parte de sus redes

locales, compuestas en cada subregión por varios subsistemas interneuronales (Somogyi y Klausberger 200; Buzsáki et al., 1983), está aun bajo estudio. Sólo en la región CA1 se han descrito al menos 12 doce subtipos interneuronales con localización, morfología dendrítica, y territorio sináptico diferentes. No está mucho más avanzado la descripción de sus propiedades electrofisiológicas, que se están investigando en la actualidad, al igual que su participación en la generación de LFPs.

Andersen y colegas (Andersen et al., 1969, 1971), en base a las características anatómicas y a la cobertura espacial de las respuestas provocadas dentro del propio hipocampo por estimulación en las distintas estaciones del circuito trisináptico (Lomo, 1971), propusieron una organización funcional según la cual estaría organizado en lamelas funcionales paralelas. La *hipótesis lamelar* formó la base conceptual para el uso de las preparaciones con rodajas mantenidas in vitro, y aún son consideradas, no sin críticas, como un módulo suficiente para estudios fisiológicos. Esta hipótesis fue revisada por Amaral, quien enfatizó la presencia de fuertes conexiones longitudinales dentro del hipocampo, tales como la dispersión de las proyecciones de los colaterales de Schaffer desde CA3 a CA1 en el eje septo-temporal. Sin embargo, lejos de ser aleatorias, estas proyecciones mantienen una topología definida que depende de la posición septotemporal y transversal de la neurona de CA3 (Brivanlou, 2003).

En aquellos mismos trabajos con potenciales provocados (Andersen et al., 1971) se constató que la estratificación de las entradas sinápticas en dominios dendríticos discretos de las células postsinápticas produce perfiles laminares de potencial diferentes para cada vía estimulada (dipolos laminares). Estos potenciales son obviamente coherentes a lo largo del territorio sináptico de la vía, y si la activación es completa permiten una descripción espacial del territorio sináptico bastante ajustada. Lógicamente, la activación espontánea es siempre parcial y por tanto desarrolla potenciales de campo que cubren de forma incompleta y cambiante el territorio sináptico de cada vía aferente sobre la población de células postsinápticas. Sin embargo, hoy en día se conocen estados funcionales en los que el hipocampo recibe una entrada sincronizada o la genera internamente en alguna de sus subregiones, permitiendo observar registros de muy alta coherencia dentro y entre distintas regiones (Buzsáki et al., 1983). De hecho, esta estructura exhibe múltiples potenciales de campo oscilatorios, incluyendo aquellos que muestran patrones de frecuencia theta y gamma (Buzsáki et al., 1983). Estas oscilaciones probablemente involucran la actividad sincrónica de una o algunas de las vías sinápticas y han sido ampliamente usados para estudiar plasticidades sinápticas y como correlatos neuronales del comportamiento (Paulsen and Moser, 1998; Traub et al., 1998; Reichinnek et al., 2010). El significado mecanístico de tales oscilaciones de campo es, en cambio, poco conocido, así como sus bases celulares. Mucho más pobre es aún la información que poseemos sobre otros tipos de actividad. Así, el espectro fisiológico del LFP espontáneo contiene una amplia colección de actividades irregulares que no han sido estudiadas en profundidad y sin duda contienen detalles relevantes para entender el procesamiento de la información en hipocampo, estudios que se hacen más accesibles mediante el análisis de sus generadores independientes. Es intuitivo que las activaciones parciales de distintas vías producirán potenciales coherentes en zonas pequeñas, pero que dejarán de ser coherentes en cuanto se co-activen varias vías con territorio sináptico diferente y solapado en parte.

Normalmente, la sincronización del disparo de un grupo de neuronas suele estar asociado con entradas sinápticas compartidas (Diesmann et al., 1999), que se manifiestan postsinápticamente como fluctuaciones del LFP (Bach and Kruger, 1986; Arieli et al., 1995; Elul, 1972; Nunez and Srinivasan, 2006). En el caso concreto del hipocampo, ha quedado establecido en los últimos años que los potenciales

de campo macroscópicos tienen un origen multifocal, constituido por las corrientes inyectadas en el espacio extracelular originadas en sinapsis activas. Cada grupo de dichas sinapsis activadas sincrónicamente constituye una unidad sináptica elemental (Elul, 1972) cuyos componentes pueden estar localizados en múltiples neuronas postsinápticas de acuerdo a la distribución de sus ramificaciones axonales y a su topología. Si los territorios axonales de las unidades presinápticas que disparan sincrónicamente solapan en la región diana, las corrientes se suman y dan lugar a LFPs considerables. A pesar de que las activaciones tengan lugar de forma sincrónica, los LFPs registrados en dos lugares cercanos pueden coincidir o ser diferentes, lo que se puede deber a la variación en la cobertura espacial de las fuentes multineuronales coactivadas.

El objetivo de las series experimentales descritas en el presente capítulo ha sido describir la topología de los principales generadores LFP descritos en el capítulo X, determinando la extensión espacial de cada uno de ellos, y su relación con la conectividad anatómica conocida. Es intuitivo que las activaciones parciales de distintas vías producirán potenciales coherentes en zonas pequeñas, pero que dejarán de ser coherentes en cuanto se co-activen varias vías con territorio sináptico diferente. Interpretar LFPs de patrón irregular en función de los grupos cambiantes de células aferentes requiere, por tanto, conocer la cobertura espacial de los contactos sinápticos de cada clúster de células aferentes sobre la zona diana. Para ello, se han combinado registros múltiples lineares en el eje septo-temporal del hipocampo, y se han utilizado las técnicas de discriminación espacial ciega (Bell and Sejnowski., 1995, Choi et al., 2005) para separar los LFPs específicos de cada vía aferente, permitiendo así el análisis independiente de cada una de sus fuentes y describir el alcance y grado de su coherencia temporal.

La pregunta genérica que se pretende responder es si el LFP irregular en el hipocampo surge como una concurrencia espaciotemporal ocasional de corrientes sinápticas con múltiples orígenes presinápticos independientes o si existen módulos de actividad topológicamente determinados en relación con cada una de las vías anatómicas. Con ese propósito se ha explorado la existencia de tales módulos espaciales en las diferentes aferencias o generadores durante la actividad espontánea del hipocampo, analizando registros múltiples simultáneos en las poblaciones diana. Tras identificar los principales generadores que dan lugar al LFP y analizar su naturaleza química, se ha procedido a estudiar su coherencia espacial por comparación de los cursos temporales de cada generador a lo largo del eje septo-temporal, comprobando su estabilidad con diferentes grados de sincronización aferente.

4.2. Material y métodos

Para la descripción del procedimiento experimental y del análisis realizado remitirse a la sección Material y Métodos Generales en Capítulo 2.

4.2.1. Procedimientos experimentales específicos

Para el registro de LFPs se utilizaron multielectrodos lineales de 16 (una lanceta, 100 μm de separación) ó 32 canales (distribuidos en una o dos lancetas con separación entre sitios de 50 μm o 100 μm , respectivamente), implantadas a lo largo del eje de las células principales de CA1 y FD. Las lancetas múltiples fueron situadas en paralelo a la línea media a lo largo del eje septo-temporal de la parte dorsal

del hipocampo, entre las coordenadas AP: 4.5 y 6.5 y L: 2.6-3.5mm. En experimentos realizados bajo anestesia se utilizaron hasta dos dispositivos de dos lancetas, de forma que cada una quedó a 500 μm , pero recolocando una de los dispositivos tras la captura de una serie de registros. Así se consiguió un mayor barrido espacial, con un total de 6 posiciones en el hipocampo dorsal, siendo la posición 1 la más anterior y 6 la más caudal (Fig. 11).

Se persiguió explorar la coherencia de algunos generadores en lugares muy distantes del hipocampo. Debido al difícil acceso al hipocampo ventral mediante registros lineales, estas comparaciones se restringieron al generador Schaffer, para lo cual se obtuvieron puntos adicionales de registro con pipetas de vidrio con la punta situada en el estrato radiado de localizaciones latero-ventrales, guiando el emplazamiento por los potenciales provocados tras estimulación de la región CA3 ipsilateral. Tales registros se mostrarán en las figuras como las posiciones septo-temporales 7 a 10.

En el grupo de experimentos dirigidos a manipular el grado de sincronización presináptica espontánea (sin estimulación eléctrica) se procedió a bloquear localmente la inhibición GABAérgica en la región de origen de los generadores. La desinhibición resultante produce un incremento en el disparo de las células principales que altera el patrón temporal natural, haciéndolo mucho más sincrónico. Para ello se inyectaron microgotas de BIC mediante pipetas con un diámetro de punta entre 10-12 μm , consiguiendo una extensión espacial de la droga que asegurase la hipersincronización de buena parte de la población aferente. Estos experimentos fueron realizados en la región CA3 (para el generador Schaffer) y en la CEM (para el generador VPM).

La extensión espacial de los generadores de LFP se ha determinado estimando el índice de correlación cruzada de la envolvente temporal de cada generador entre pares de posiciones.

En una serie experimental se estudiaron las variaciones locales en las fluctuaciones temporales del generador correspondiente a la entrada excitadora de Schaffer desde CA3 a CA1 a lo largo del eje septotemporal en su zona dorsal, comparando el curso temporal de los generadores obtenidos en 4 posiciones diferentes de forma independiente. De esta manera se aseguraba la contribución local a cada lanceta de registro durante la captura sincrónica de LFPs en todas ellas. La línea base de la activación de este generador está compuesta de una serie de eventos de campo discretos o micro potenciales postsinápticos excitatorios de campo ($\mu\text{-fEPSPs}$). Estos eventos constituyen paquetes de actividad excitadora rítmica en la frecuencia gamma, que pueden ser cuantificados. Para ello hemos usado la transformada *Wavelet* de $v(t)$:

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int v(t) \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt,$$

donde ψ es la onda madre Haar, adecuada para la detección de pulsos cortos en una señal, a la escala de tiempo y b la localización en el tiempo. En ella se rectificaron los coeficientes de onda usando la siguiente ecuación:

$$C(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \max\{W(a, b), 0\}$$

La superficie bidimensional obtenida describe el ajuste linear del LFP específico de Sch por la función tipo pulso cuadrado (Haar) a la escala a y localización b . Valores mayores absolutos de $C(a,b)$ en un instante de tiempo dado y escala correspondiente a la transición abrupta del pulso en $v(t)$. Así podemos asociar tales puntos en el plano (b,a) con eventos singulares del LFP. En consecuencia el máximo local de $C(a,b)$ evaluado como máximo sobre un grupo de dominios suficientemente pequeños $\{w_k\}$ definen los instantes de tiempo de los μ -fEPSPs ($t_k=b_k-a_k/2$), su duración (a_k) y amplitud ($A_k=C(a_k b_k)$).

$$(a_k, b_k) = \underset{(a,b) \in w_k}{\operatorname{argmax}} C(a, b)$$

A continuación se calculó la correlación cruzada de los μ -fEPSPs obtenidos por separado en dos localizaciones y los cuantos definidos para una ventana de tiempo de ± 2 ms (Fig de suplementario 5). Las amplitudes de los μ -fEPSPs pareados en diferentes lancetas o puntos de registro se representaron y se evaluó su índice de correlación cruzada: $r = \frac{C_{12}}{\sqrt{C_{11} C_{22}}}$, donde $\{C_{ij}\}$ es la matriz de covarianza.

La coherencia espectral de la actividad de un generador en dos localizaciones fue calculada como:

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

donde $\{P_{ij}(f)\}$ es la matriz de la densidad espectral de la potencia cruzada .

Por último, con el fin de determinar el nivel de significación de la coherencia espectral, se ha llevado a cabo un test de datos surrogados (Schreiber y Schmitz, 2000). De esta forma, relacionando fases aleatorias y manteniendo las otras características de primer orden intactas, se han obtenido series de surrogadas en el tiempo a partir de las señales originales. Para cada experimento se generaron 100 surrogadas y se evaluó la coherencia espectral. El nivel de significación ($\alpha=0.05$) fue calculado para cada valor de frecuencia y la coherencia sobre ese nivel fue considerada estadísticamente significativa.

4.3. Resultados

Como ha sido mencionado en la introducción los LFPs registrados en puntos cercanos pueden coincidir o mostrar diferencias en base a una serie de factores. Para determinar las causas se requiere conocer qué vías anatómicas hacen contacto sináptico cerca de los puntos de registro, cuando se activa cada una de ellas, y cuál es la geometría de las fuentes que dan lugar al potencial extracelular. Con anterioridad se ha comentado la ventaja que supone el hecho de que algunas vías anatómicas hagan contactos sinápticos en dominios estratificados de la población de células diana. Así, la activación de dichas vías produce corrientes sinápticas espacialmente estables y potenciales específicos de cada aferencia (Andersen et al., 1971; Leung ,1979; Herreras, 1990; Golarai y Sutula, 1996), cuya distribución laminar específica permite su separación mediante técnicas de discriminación espacial.

Las similitudes y diferencias entre puntos cercanos se pueden observar a simple vista en registros simultáneos de LFPs en electrodos de tractos paralelos a lo largo del eje de las células principales de CA1 y FD del hipocampo dorsal. Los registros en una misma lanceta permiten explorar los distintos dominios

celulares mientras que los registros en distintas lancetas permiten explorar la cobertura multicelular (en el eje septotemporal) (Fig 11). Es fácil observar diferencias en registros dentro y entre lancetas, lo cual indica ya sugiere que la mezcla de corrientes sinápticas puede ser más compleja y específica en algunas regiones y dominios neuronales que en otros.

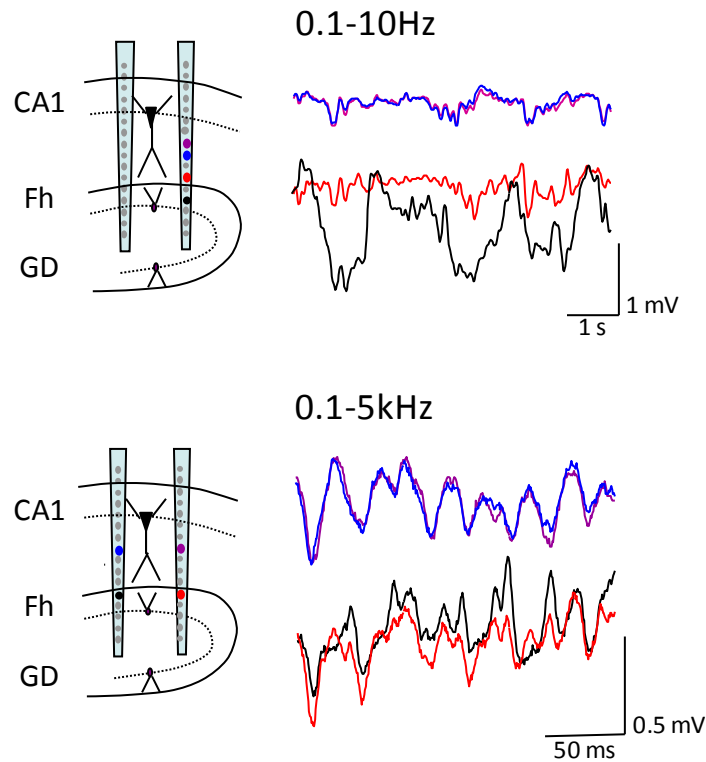


Fig. 11. Los LFPs hipocámpales presentan una distribución laminar y sus múltiples fuentes pueden ser separadas en componentes sinápticos específicos de dominio. Esquema de las lancetas paralelas (2x16 canales) que cubren la región de CA1-GD y ejemplos de fragmentos de LFP espontáneos registrados en posiciones cercanas (los colores representan las distintas localizaciones comparadas). Los LFPs pueden coincidir o diferir significativamente entre distintas posiciones y momentos. El grado de similitud varía a lo largo del mismo tracto vertical (panel superior) y dentro del mismo dominio dendrítico (panel inferior). Así, la mezcla de corrientes sinápticas parece ser más compleja y restringida en el espacio en algunas regiones y dominios neuronales que en otros.

4.3.1. Módulos espaciales mínimos de correlación para LFPs específicos de vía

Los LFPs registrados simultáneamente en varias lancetas presentaron los mismos generadores en distintas localizaciones del eje septotemporal. Analizadas una a una, los cursos temporales de cada generador pudieron diferir más o menos. La correlación de estos por pares indicará si las corrientes postsinápticas tuvieron un curso temporal similar en los distintos lugares de registro. Con este propósito se han registrado simultáneamente LFPs usando multielectrodos dispuestos en dobles lancetas que se fueron reubicando sucesivamente hasta cubrir la totalidad del hipocampo dorsal (Fig. 12).

De esta forma se ha estimado el coeficiente de correlación medio entre los cursos temporales de dos generadores excitadores (Sch y MPP) y otros dos inhibidores (LM y GCsom). Como era de esperar, la

correlación espacial de todos los generadores disminuyó con la distancia, aunque se encontraron diferencias notables. El GCsom mostró una correlación alta y estable, incluso para localizaciones muy distantes. En contraste, el generador VPM presentó baja correlación incluso en distancias cortas (n=3-10 animales) (Ver Fig. 12B).

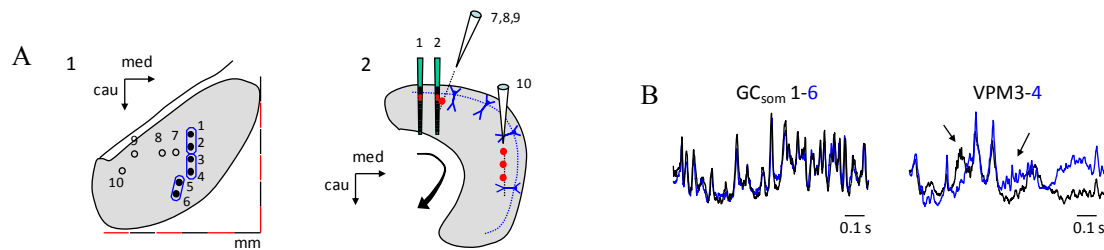


Fig. 12. Los generadores del LFP muestran módulos específicos para cada generador de coherencia espacial. A. Esquema en el que se indican los puntos de inserción de las lancetas paralelas cubriendo el perfil CA1-GD (posiciones 1-6) y los registros adicionales en el estrato radiado de CA1 (7-10) del hipocampo ventral. Los multielectrodos de doble lanceta están englobados en óvalos. B. Activaciones superpuestas de dos localizaciones diferentes de los generadores GCsom (izquierda) y VPM (derecha). En ocasiones las posiciones distantes (1 y 6) muestran activaciones similares, mientras que posiciones cercanas (3 y 4) pueden diferir significativamente.

Normalizando la separación entre registros a una interdistancia de 1mm y haciendo un promedio de los pares de valores registrados con esta interdistancia a lo largo del eje septohipocámpico en su porción dorsal (Ver Fig. 13), se ha visto una fuerte correlación espacial para ambos generadores inhibitorios, el LM en la región CA1 y el GCsom en la FD (0.6 ± 0.01 y 0.8 ± 0.01 , respectivamente, n=4). El generador excitador de Schaffer mostró una correlación promedio de 0.75 ± 0.1 (n=5) a una distancia de 1.5mm. En este caso se excluyeron del análisis los periodos en los que aparecieron ondas de gran amplitud tipo *sharp wave* (SPW), para las que la correlación nunca bajó de 0.9. Para separaciones mayores de las lancetas la correlación fue cayendo gradualmente. Por el contrario, el generador excitador VPM únicamente presentó correlación elevada (0.89 ± 0.1 , n=4) para interdistancias muy cortas (200 μ m), disminuyendo abruptamente a distancias mayores de 500 μ m (0.33 ± 0.1 , n=7).

Mediante registros realizados con pipetas en posiciones más ventrales del estrato radiado se obtuvieron correlaciones a larga distancia para el generador de Sch. Estos registros fueron limitados en una banda del estrato radiado, previa comprobación de la contribución mayoritaria de la entrada de Sch al LFP en ese punto, minimizando las contaminaciones de fuentes de LFP distales. La correlación de puntos ventrales con los dorsales cayó por debajo de 0.2 para distancias mayores de 2mm y se aproximaron a cero al aumentar la separación entre registros. Estos datos sugieren no sólo la existencia de clústeres de activación distintos de células presinápticas de CA3 como origen de la actividad en las porciones ventral y dorsal, sino una organización con topología parcialmente solapada y con orientación predominantemente lamelar.

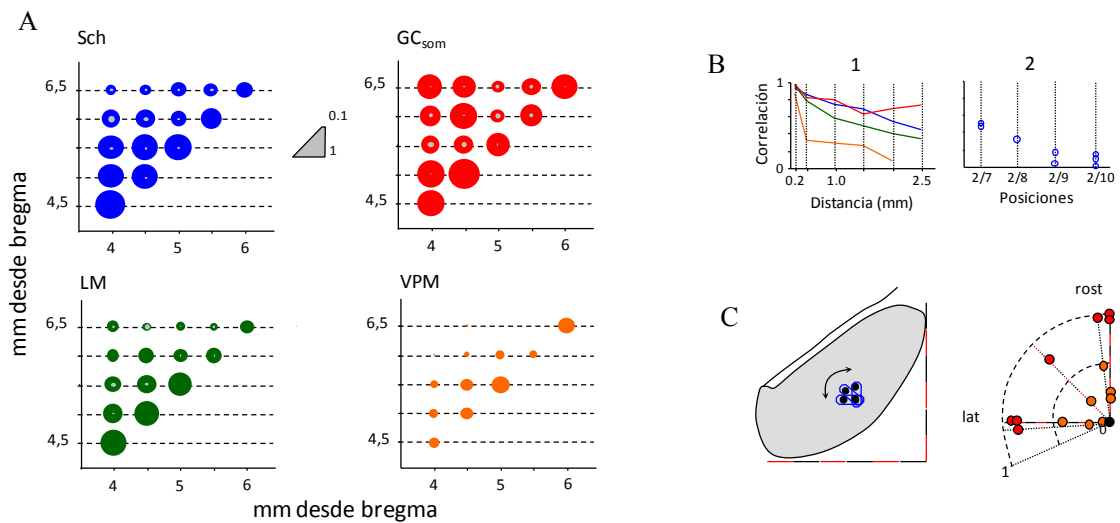


Fig. 13. Correlaciones espaciales. **A.** Coeficientes de correlación cruzada para diferentes generadores en posiciones paralelas a la línea media (puntos 1-6, escala en mm desde Bregma). Los círculos internos representan el error estándar. **B.** Vista comparativa del grado de la correlación espacial para diferentes generadores en localizaciones paralelas a la línea media en un animal representativo. Los datos han sido agrupados de acuerdo con las distancias entre los puntos de registro pareados (1-6). A la derecha, comparaciones adicionales para el generador de Sch entre posiciones 3 y distintas localizaciones del hipocampo ventral. **C.** Efecto de la rotación entre puntos de registro con la línea media como referencia (500µm de separación entre lancetas). No se ha encontrado modificaciones en la correlación. Los datos corresponden a comparaciones individuales para los generadores GC_{som} (círculos negros) y VPM (círculos grises) n=4.

Se comprobó la posible influencia de la diversa geometría y orientación descrita para los dominios espaciales axónicos de los colaterales de Schaffer de células piramidales individuales en la región CA1 (Ishizuka et al., 1990; Somogy y Klausberger, 2005) mediante la rotación de la posición relativa de las lancetas con distinto ángulo de penetración sobre el plano horizontal (Fig. 13C). Para interdistancia entre lancetas de 0.5 mm se encontraron correlaciones idénticas para ambos generadores, Sch y MPP (círculos negros y grises respectivamente, n=3).

Globalmente estos resultados indican módulos espaciales de extensión mínima estable para cada generador, y específicos para cada una de las entradas y componentes del LFP, correspondiendo los más amplios a la entrada inhibitoria a las células granulares de la FD y los de menor tamaño al generador excitador VPM.

4.3.2. Similitudes y discordancias en la actividad de los generadores de hipocampo revelan una topología específica de las poblaciones aferentes

La aparición de un módulo espacial que genera LFPs correlacionados en el espacio puede originarse por el disparo sincrónico de unidades presinápticas, cuyas aferencias estén solapadas en la región diana, o por modulación conjunta de su tasa de disparo sin que medie un solapamiento de los axones individuales. Se exploraron ambas posibilidades en los dos generadores que exhibieron mayores módulos de correlación espacial mínima: la entrada excitadora de Schaffer a CA1 y la entrada inhibitoria a FD contenida en el

generador GCsom. Para ello se comparó la estructura temporal de los cursos temporales entre pares de lancetas.

La envolvente temporal, estimada como las variaciones de la potencia instantánea (integrada en ventana deslizante de 200 ms), mostró patrones idénticos para el generador Sch en dos sitios paralelos a la línea media (Fig. 14 puntos 1-2, 0.93 ± 0.02 , $n=7$). Esta correlación sólo disminuyó significativamente cuando se compararon localizaciones distantes próximas al subículo (posiciones 1-6, 0.35 ± 0.07 , $n=4$). En esta comparación la disminución de correlación fue inducida mayormente por la desigual cobertura espacial de las SPWs (flechas en la Fig. 14). La correlación cruzada entre el curso temporal del generador Schaffer en posiciones del hipocampo dorso-medial (posiciones 2-3) y latero-ventral (7-8) cayó a valores muy bajos, independientemente de la presencia de SPWs (0.13 ± 0.02 , $n=6$ medidas en dos animales; Fig. 14: 3-8), indicando que los diferentes grupos independientes de células aferentes de CA3 proyectan a sitios de CA1 desplazados lateralmente.

Los μ -fEPSPs causados por el disparo secuencial de los clústeres de neuronas de CA3 (Fernández-Ruiz, 2012) presentaron un retraso rostro-caudal estable de 2.0 ± 0.22 m/s ($n=9$), muy similar a la velocidad de conducción de los potenciales de acción en los colaterales de Sch medidos en la espiga poblacional (Andersen et al 1971). Además, se observó una fuerte covariación en la amplitud de los μ -fEPSPs elementales en lugares a lo largo de una línea paralela a la línea media, sugiriendo que el mismo clúster de CA3 produjo el potencial de campo registrado a lo largo de esas posiciones. Tras extracción y cuantificación de los μ -fEPSPs elementales obtenidos independientemente para cada lanceta se realizó una comparación por pares. El índice de covariación estimado mediante regresión lineal entre series de pares fue de 0.92 ± 0.3 entre lugares de CA1 localizados 4-6 mm posterior al bregma (Ver Fig. 14, $n=11$ de 4 animales) y cayó a valores mínimos al comparar sitios desplazados lateral y ventralmente ($r = 0.17 \pm 0.02$, $n = 6$ registros en 3 animales). El porcentaje de μ -fEPSPs pareados también disminuyó de $74.1 \pm 3.1\%$ a $46 \pm 0.8\%$.

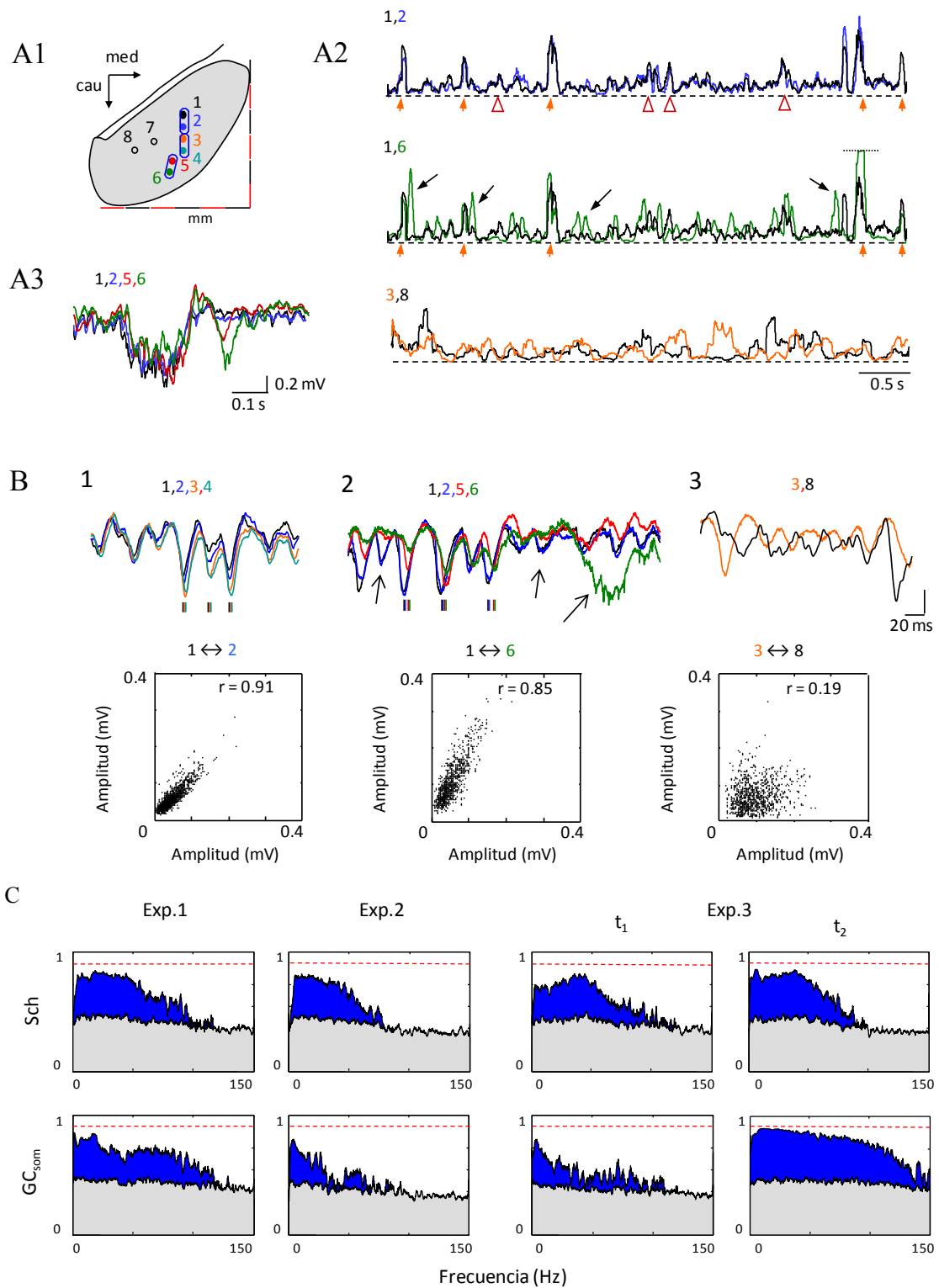


Fig. 14. Detalles temporales dentro de los módulos de alta coherencia espacial indicando distintos mecanismos para la activación sincrónica en diferentes generadores. **A1.** Esquema de los puntos de inserción de los multielectrodos en paralelo. **A2.** Envolturas temporales de la potencia (ventana de 0.1s) para el generador de Sch en diferentes localizaciones paralelas a la línea media. Se han superpuesto activaciones de los puntos 1-2 y 1-6 pertenecientes al mismo evento del LFP. **A3.** Los grandes brotes de actividad corresponden a SPWs. El alcance espacial de las SPWs varía notablemente. **B.** Los μ -EPSPs elementales dentro de la misma frecuencia gamma mantienen proporcionalmente la amplitud a lo largo de las pistas paralelas a la línea media, indicando un origen común y un sustrato local. El retraso rostro-caudal coincide con la conducción de espigas por las colaterales de Sch (las líneas verticales indican el pico del evento en el generador de cada localización y su activación secuencial). A medida que los

registros están más distanciados (1-3), algunos de los eventos empiezan a mostrar diferencias en las amplitudes (flechas), mientras que la activación temporal de las SPWs difieren normalmente. Las comparaciones entre las activaciones rostro-medial y ventrolateral (3) son totalmente distintas. Debajo de ellas se muestra la covariación de la amplitud en eventos pareados entre localizaciones, donde r es el índice de correlación cruzada. Estos datos indican un fuerte solapamiento de los axones presinápticos como el sustrato de módulos de alta coherencia espacial. C. Comparación de la coherencia espectral de intervalos de 1min para los generadores de Scha (arriba) y GCsom (abajo) entre pares de localizaciones separadas 0.5mm en diferentes experimentos e intervalos. El área en gris indica el nivel de significación estadística (test de surrogadas). El generador de Sch muestra perfiles espectrales similares para cada rango de frecuencia, mientras que el generador inhibitor GCsom varía considerablemente incluso en diferentes intervalos de un mismo animal (t1 y t2 el experimento3). Esta discrepancia sugiere la existencia de diferentes mecanismos que subyacen la alta coherencia espacial.

Finalmente se evaluó la coherencia espectral para el generador Schaffer entre pares de lancetas. Se analizaron un total de 36 intervalos de 1 min cada uno en cuatro animales. Estos estadísticos ofrecieron perfiles de frecuencia suaves y repetibles, con valores de coherencia alta (>0.8) para frecuencias hasta 50 Hz y decreciendo gradualmente hasta valores no significativos por encima de 100 Hz (Ver Fig. 14C).

Cuando se comparó el espectro del generador GCsom con el de Sch se encontraron algunas similitudes y notables diferencias. Ambos mostraron una sucesión de eventos gamma dominantes, aunque en el GCsom no se apreció un retraso en los pares de eventos elementales como ocurría en Sch (0.09 ± 0.11 ms, $n = 16$ ensayos en 4 animales), lo que indica que la conducción de las espigas a través de la arborización axonal de las células presinápticas alcanza las células diana de una forma más sincrónica y homogénea que los colaterales de Schaffer. Para este mismo generador, a pesar de la fuerte correlación global entre lugares distantes (hasta 2.5mm), los perfiles de coherencia espectral fueron muy irregulares entre animales y variaron incluso en diferentes intervalos analizados en el mismo animal (Fig 14C). Así pues, mientras que el módulo espacial de coherencia del generador GCsom es compatible con una modulación conjunta de la tasa de disparo en múltiples unidades presinápticas (Whittington et al., 1995), los territorios sinápticos individuales que contribuyen al LFP local podrían no estar solapados y acaso ser activados de forma independiente de acuerdo con las demandas de procesamiento.

4.3.3. El grado de sincronización de las unidades presinápticas también determina la extensión de la coherencia espacial de LFPs

Algunos de los resultados anteriores indican la importancia de detalles anatómicos tales como la disposición de los axones y su ramificación en la región diana a la hora de determinar la correlación espacial de los LFPs. Sin embargo, también se observaron eventos que claramente sugerían que las variaciones en la sincronización de las unidades presinápticas eran responsables de la extensión variable de la coherencia espacial. Un caso notable es el de las SPWs que aparecen en el generador de Sch. A diferencia de los μ -fEPSPs elementales, las SPWs cubren de forma variable extensas porciones de la CA1 con una cobertura supralamelar, presumiblemente por el mayor número de neuronas aferentes con descarga sincrónica en la región CA3 que conjuntamente presentan un territorio sináptico en la región CA1 mucho más extenso que los clústeres funcionales.

Con el fin de probar experimentalmente la relación entre una variable funcional como es el nivel de sincronización promedio de la población aferente y la cobertura espacial de los LFPs en la región diana, se realizaron intervenciones farmacológicas en aquella. Se estudiaron dos generadores excitadores con rangos extremos de alta y baja coherencia espacial, Sch y VPM, y cuyas aferencias se originan en las

regiones CA3 ipsilateral y en la corteza entorrinal medial, respectivamente. El grado medio de sincronización de disparo en las unidades presinápticas fue aumentado por desinhibición mediante bloqueo local de receptores de GABA con BIC inyectada a través de una pipeta de registro (Fig. 15), lo que provocó un foco epiléptico de tipo interictal en estas regiones. Las puntas epilépticas pudieron registrarse claramente con las propias pipetas de registro/inyección en la población aferente (ver flechas Fig. 15 pre), y provocaron fEPSPs en las respectivas dianas postsinápticas registradas con lancetas multielectrodo (flechas Fig. 15 post), asegurando la conexión topológica entre las dos áreas específicas.

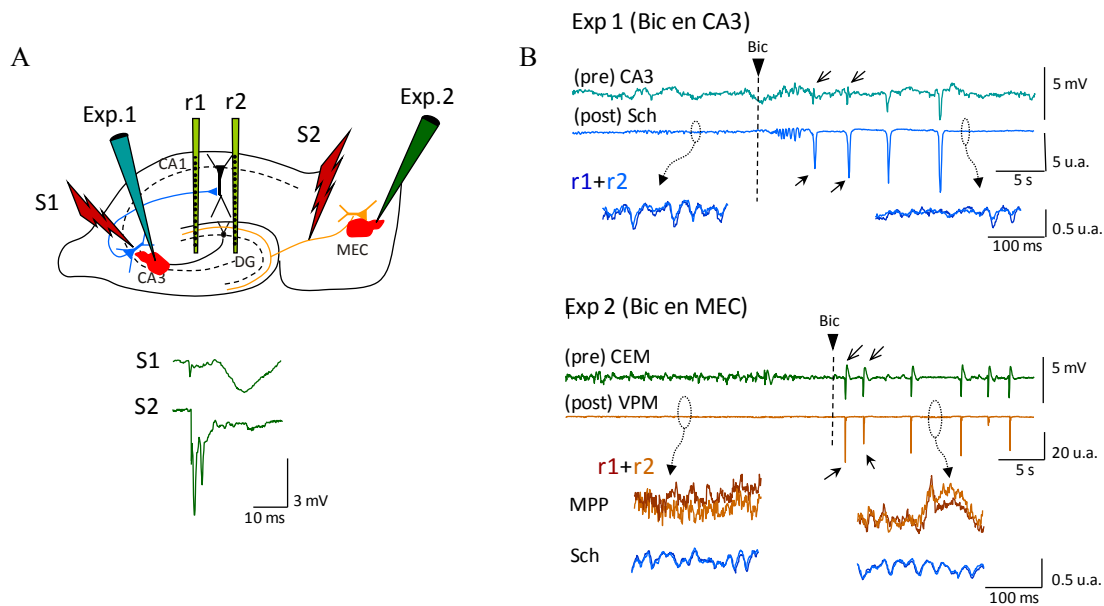


Fig. 15. La coherencia espacial de LFPs depende también de la sincronización de las poblaciones aferentes. **A.** El procedimiento utilizado para la modulación del disparo espontáneo ha sincronizado las neuronas presinápticas que dan lugar a los generadores del LFP. Los generadores de Sch y VPM fueron obtenidos independientemente a partir de perfiles de LFP en los dos localizaciones paralelas (r1 y r2; 0.5mm de separación). Los electrodos de estimulación (S1 y S2) fueron introducidos en CA3 ipsilateral y la región medial del haz angular. Una pipeta de registro e inyección cargada con BIC fue también localizada en la capa somática de CA3 (experimento1) o la corteza entorrinal medial (experimento2). **B.** LFPs registrados en las pipetas de inyección en las poblaciones aferentes presinápticas y activar los generadores en las regiones postsinápticas. Tras la inyección de la BIC, aparecieron las espigas epilépticas que se desarrollaron localmente en ambos experimentos (flechas en registros de CA3 y corteza entorrinal) que produjo gran actividad sináptica en los distintos generadores (flechas en las activaciones correspondientes). Sin embargo la correlación de la actividad de la línea base en periodos entre espigas epilépticas solo incrementó en el generador de la VPM. Aunque el aumento de la sincronización ocurrió en ambas poblaciones aferentes, ésta sólo se reflejó en el generador cuyo mínimo módulo de coherencia espacial es menor que en la distancia registrada (el VPM). De este modo, los patrones temporales de la actividad de Sch puede cambiar, la correlación entre localizaciones activadas por los mismos axones no queda afectada, al ser ya sincrónica en condiciones control.

La hipótesis predecía que la vía sináptica que mostrara un modulo de coherencia espacial en sus LFPs muy extenso en situación control debería mostrar cambios de coherencia espacial por un exceso de hipersincronización aferente, mientras que si debería esperarse en generadores de baja coherencia espacial. La coherencia de LFPs se estudió entre puntos de las zonas diana separados 500 μm , y se excluyeron los instantes en que aparecieron espigas epilépticas. Cuando la BIC fue inyectada en la región CA3 se desarrollaron potenciales epilépticos locales que causaron grandes fEPSPs en la región CA1 postsináptica. La aplicamos de ICA a esto LFPs mostró que éstas aparecieron selectivamente en el generador de Sch. Si bien se observaron variaciones claras en el patrón temporal estándar (la actividad gamma fue gradualmente eliminada) los cursos temporales de este generador se mantuvieron fuertemente

correlacionados, con valores de coherencia espacial similares antes y después del efecto de la droga (0.88 ± 0.02 y 0.84 ± 0.01 en control y BIC respectivamente, $n=6$). Sin embargo cuando se inyectó BIC en la corteza entorrinal medial la coherencia espacial del generador VPM en la FD aumentó notablemente (0.5 ± 0.02 y 0.77 ± 0.03 en control y BIC respectivamente).

4.4. Discusión

La extensión espacial, amplitud y polaridad del LFP están influenciadas por la combinación de varios factores, entre los que se incluyen los patrones espaciales de territorios sinápticos sobre la población de células diana, la mezcla variable en el tiempo de las corrientes sinápticas y la topología de las conexiones. Por definición, los generadores que forman el LFP del hipocampo exhiben coherencia laminar completa, dado que los axones aferentes permanecen estacionarios y provocan campos eléctricos espacialmente estables. También son laminares los potenciales provocados, que, además, carecen de los problemas relativos a la incertidumbre sobre la polaridad y amplitud variable cuando registramos en diferentes niveles o estratos. La estabilidad en el eje celular implica que la entrada es única y por tanto, es posible averiguar la extensión espacial específica de cada instante para un generador concreto por simple correlación de las actividades registradas en diferentes localizaciones del plano transversal que recorre el territorio sináptico. En otras palabras, la coherencia espacial permite delimitar el territorio sináptico activado en cada instante por un generador dado. Es importante reiterar que esto solo es cierto si los LFP son específicos de vía, pues en LFPs nativos generados por corrientes sinápticas en múltiples estratos (multiorigen), los cambios de coherencia en el plano transversal al eje de las neuronas no pueden achacarse con certeza a una u otra vía.

Hemos visto en el presente Capítulo evidencia de la variación de la extensión espacial de los generadores LFP del hipocampo causada por cambios en la sincronización de las unidades presinápticas. La extensión septo-temporal sobre la que cada generador del LFP fue sincrónico varía durante la actividad espontánea, reflejando la activación cambiante de las unidades presinápticas que disparan agrupadas, variabilidad que es esperable en el devenir natural de la codificación de información. Incluso en algunas vías como la de Sch podemos reconocer patrones espaciales de actividad postsináptica diferentes que se corresponden con modos estereotipados de disparo sincronizado de las células de origen del generador. En este caso, la disponibilidad de módulos espaciales específicos para cada generador ha permitido reconocer estados de organización celular funcional que pueden ser identificados en los registros espontáneos de LFPs hipocámpicos.

Los módulos espaciales de actividad coherente en los generadores estudiados pueden ser explicados tanto por un fuerte solapamiento de los territorios sinápticos de las neuronas aferentes coactivadas, tales como los clústeres o grupos funcionales de CA3 en el generador Sch, o por la fusión de territorios postsinápticos, como parece ser el caso de la inhibición somática de las células granulares que originan el generador GCsom. Con estos datos queda patente que, para registros separados por una distancia mayor que la de los módulos mínimos correspondientes, los LFPs específicos reflejan actividad de clústeres independientes. La activación de cada clúster o unidad funcional de la misma población presináptica, podrá, por tanto, ser reconocida por la distinta cobertura espacial de los generadores postsinápticos.

4.4.1. Implicaciones funcionales de los límites estructurales específicos del LFP coherente

Hoy en día, preguntas tales como de qué manera la organización de la estructura tridimensional del hipocampo gobierna su funcionamiento en red y cómo codifica la mayoría de la información cerebral, son entendidas de forma incompleta (O'Keefe y Nadel, 1978; Treves y Rolls, 1992; McNaughton et al., 1996; Leutgeb et al., 2007; Morris, 2007; Rolls, 2010). En este Capítulo hemos descrito resultados que pueden contribuir significativamente. Veremos cómo el uso de diferentes lugares de registro simultáneo va a permitir una lectura topológica detallada de la actividad espontánea de las células presinápticas

¿Cuál es el significado de una extensión espacial o módulo mínimo de actividad coherente? Tal limitación espacial indica una relación con alguna propiedad estructural de los generadores LFP, y como actividad postsináptica que los compone, debe estar relacionada con el territorio sináptico. Para llegar a una visión clarificadora, debemos analizar en detalle estos resultados.

Las aferencias sinápticas que originan los generadores de Sch y MPP exhiben módulos de coherencia espacial notablemente diferentes, a pesar de las similitudes que muestran en cuanto a estructura temporal. Su activación se caracteriza en ambos casos por una dominancia de bloques excitadores a la frecuencia gamma (Fernández-Ruiz, 2012). En ambas, las neuronas aferentes proyectan axones que se ramifican y dejan múltiples botones a lo largo del eje longitudinal del hipocampo, contactos sinápticos que deberían producir LFPs similares a lo largo de las regiones diana, pues son quasi-sincrónicos, generados por las mismas espigas en botones *en passant*. Así pues, las diferencias encontradas en los módulos espaciales han de deberse a factores anatómicos adicionales, como el grado de solapamiento espacial de los territorios axonales de las células individuales. De hecho, estudios anatómicos han demostrado claramente que la organización estructural del circuito trisináptico hipocámpico es mucho más intrincado de lo que originalmente se consideraba.

Históricamente ha quedado establecida la idea de que las interacciones en el lóbulo temporal entre la corteza entorrinal y el hipocampo se organizan topográficamente. Parte de esta topología consiste en una organización lamelar a modo de módulos espaciales independientes o lamelas con circuitos paralelos que pueden operar independientemente. Veremos en qué grado la extensión espacial de los módulos espaciales mínimos para los generadores de LFP son compatibles con esta estructura anatómo-funcional.

Varios estudios con trazadores neuronales han concluido que la corteza entorrinal emite una inervación topográficamente organizada aunque divergente sobre el giro dentado (Wyss, 1981, Ruth et al., 1982, 1988, Witter et al., 1989). En el caso concreto del generador VPM (entrada desde la corteza entorrinal medial al hipocampo) la baja correlación espacial de los LFPs específicos producidos es indicativa de una fuerte concentración espacial de los grupos de sinapsis que forman la unidad funcional de actividad postsináptica en esta vía. Ya de entrada, esta observación demuestra que el registro en un punto de la región postsináptica del generador VPM no es representativo de la actividad poblacional en la corteza entorrinal, sino de clústeres, subgrupos o subregiones de actividad independiente y cuya proyección axonal se dirige a un grupo espacialmente cercano de células granulosas. Notablemente, esta inferencia implica la escasa utilidad de los registros realizados con electrodos sencillos en esta región para monitorizar estados funcionales globales de la transmisión en esta vía, pues obviamente son demasiado parciales. Por otro lado, también implica que los registros son muy informativos y vaticinan que el uso

combinado de varios permitirá obtener lecturas múltiples de actividad aferente notablemente independiente y con un alto grado de detalle temporal.

Algunos datos indican que la estimulación local de las fibras de la VPM cerca de su entrada a la FD excita las células granulares en un plano transversal restringido (Hjorth-Simonsen y Jeune, 1972), originando fEPSP específicos que disminuyen en amplitud de forma abrupta a cada lado del punto de aferencia principal (Lomo 1971, 2009). Estos datos indican una fuerte topología de la entrada perforante y apoyarían la hipótesis lamelar (Tamanaki y Nojyo, 1993). Sloviter y Lomo (2012) plantean que, en lugar de láminas transversas o lamelas anatómicas de espesor constante y definido, la entrada de MPP estaría organizada en láminas funcionales que interactuarían en conexiones longitudinales. Sin embargo, los datos presentados en este capítulo apoyarían la existencia de grupos funcionales distribuidos laminarmente cuya interacción no se correspondería a una estructura exclusivamente longitudinal, sino con un solapamiento parcial en el eje transversal. Tal solapamiento parcial mantiene la individualidad de cada grupo funcional en la región postsináptica dando lugar a la baja correlación espacial. Es importante destacar que la activación eléctrica de un grupo de fibras aferentes, sea cerca o lejos de la zona diana, no es equiparable a la activación natural. Los clústeres funcionales en la región de origen no tienen porqué mantener sus axones cercanos a lo largo de la vía como para asumir que la estimulación local de unos pocos cercanos a un electrodo replique la activación de un clúster funcional en origen. En este sentido hemos de quitar crédito a la distribución planteada tanto por las técnicas histológicas como por las de potenciales eléctricos provocados por el experimentador y planteamos una topología funcional más compleja y divergente de lo hasta ahora planteado.

Una vez que los impulsos salen de la FD y alcanzan la región CA3 a través de las fibras musgosas, las conexiones recurrentes excitatorias entre células piramidales de CA3 (Miles y Wong, 1987) y sus axones principales transmiten esa información topográficamente a las múltiples dianas, incluyendo las interneuronas inhibitorias y las células piramidales de CA1 (Ishizuka et al., 1990; Tamamaki y Nojyo 1991; Li et al., 1994; Wittmer et al., 2006). El generador Sch ha resultado ser altamente coherente dentro de láminas de 2 x 0.5mm que se extienden en paralelo a la línea media en el hipocampo dorsal, distribución que se asemeja a la arborización axonal de una sola célula piramidal de CA3 en la región CA1 (Ishizuka et al., 1990). A partir de esta distancia la correlación cae de forma abrupta en la dirección lateral, en apenas 0.5 mm. La covarianza de la amplitud de μ -fEPSPs independientes con fuertes fluctuaciones temporales, y el retraso rostro-caudal característico sólo pueden ser explicados por la activación sincrónica de clústeres de CA3. Los axones colaterales de Schaffer con orientación y topología rostro-caudal dominante que se origina en los grupos funcionales activos de las células piramidales de CA3 (Hjorth-Simonsen, 1973; Li et al., 1994) son los responsables de la sincronización de disparos en las células diana. A medida que los registros se hicieron en localizaciones separadas por largas distancias en el eje septotemporal se ha observado un incremento en la divergencia de los LFPs de Sch, reflejando la actividad independiente de los distintos subgrupos de neuronas presinápticas de CA3.

Estos datos apoyan la idea de que la actividad basal del generador de Sch mantiene la formación axónica lamelar (Andersen et al., 1971). Sin embargo, este flujo de información en lamelas paralelas no es el único en este segmento del circuito. Las ondas tipo SPWs representan una notable excepción a la conexión lamelar. Estos eventos cubren áreas de activación (territorios sinápticos) mayores y más variables de CA1. Los retrasos de activación a lo largo de la lamela son mucho mayores y más variables, al contrario que el retraso fijo de los μ -fEPSPs. Además, se desarrollan en una secuencia espacial sin

dirección preferente que puede bloquearse repentinamente en diferentes localizaciones. Estas características son compatibles con una activación de tipo avalancha en las células de origen, de tal forma que las células de CA3 se irían reclutando al disparo en base a cercanía celular y sin una estructura topológica evidente que pudiera proceder de activación similar en los granos de la FD. Esta activación de progresión longitudinal lenta de las unidades de CA3 en el eje septo-temporal es compatible con un reclutamiento a través de la red local recurrente (eg Vincent et al., 2012). Así, la diferencia espacial de la cobertura de las SPWs y los μ EPSPs reflejan dos modos y grados de sincronización en las unidades de CA3 presinápticas.

En este Capítulo se ha mostrado cómo las entradas inhibitorias pueden ser el origen de generadores de gran potencia. Los plexos inhibitorios de las interneuronas se extienden sobre distancias considerables ejerciendo su efecto sobre gran número de células principales, por lo que individualmente podría contribuir a LFPs de forma coherente en distancias considerables (~ 1 mm en algunos subtipos; Somogyi and Klausberger, 2005). Estas distancias son aún marcadamente más cortas que el tamaño de los módulos mínimos de coherencia espacial. Para compatibilizar estos resultados debemos suponer que grupos de interneuronas homogéneas forman subredes funcionales moduladas globalmente por un marcapasos externo que sincronizaría la tasa de disparo promedio de las unidades. De acuerdo con esta hipótesis, las corrientes inhibitorias producidas por los axones de las interneuronas conformarían módulos estables por solapamiento de los territorios sinápticos individuales, solapados o no. Esta interpretación coincide con resultados funcionales que proponen actividad correlacionada en subredes de neuronas homólogas (Whittington et al., 1995; Fukuda y Kosaka, 2000; Ho et al., 2012). Tal sería el caso del generador inhibitorio GCsom, en el que encontramos notables variaciones en la coherencia espectral a pesar de la fuerte y estable correlación global que manifiesta a lo largo de la FD.

En lo referente al papel modulador de la sincronización presináptica presentamos evidencias de que a mayor sincronía en el disparo, como ocurre en un estado epiléptico producido por desinhibición, mayor es la correlación de los LFPs en distintos puntos del territorio sináptico en la región diana, presumiblemente debido a la combinación de territorios postsinápticos coactivados. Como era de esperar esto sólo ocurre para las proyecciones de la corteza entorrinal medial, pero no en la entrada de Sch a CA1 que ya presentaba una alta coherencia en estado control. Estos datos muestran claramente la participación de factores tanto espaciales (solapamiento de territorios sinápticos) como temporales (activación sincrónica) en la generación de los LFPs. De esta forma, la sincronización en el disparo de todas las fibras aferentes de una vía anatómica mediante un estímulo eléctrico artificial produciría la activación sincrónica y completa de la región postsináptica. Sin embargo, durante la actividad espontánea del hipocampo, sólo pequeños grupos de neuronas aferentes con activación sincrónica disparan espigas de forma sincrónica, de forma que sus axones activan porciones variables de la región postsináptica de acuerdo a la topología de sus conexiones.

En definitiva, los LFPs son producto del disparo de las poblaciones aferentes, por lo que los patrones espaciales de coherencia encontrados en los registros a lo largo del hipocampo reflejan patrones temporales específicos de la activación sincrónica y de la topología de las unidades aferentes.

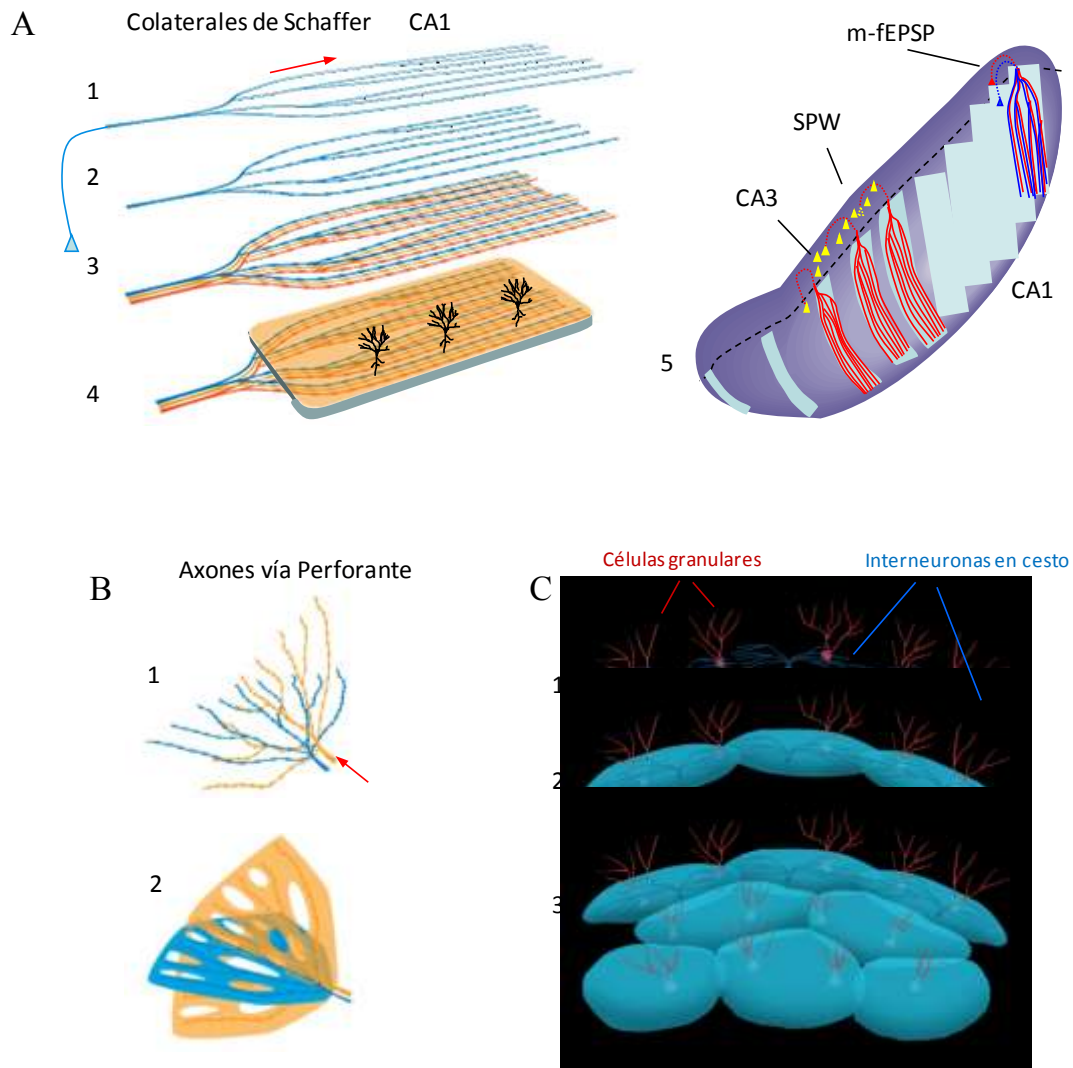


Fig. 16. Estructura propuesta y determinantes funcionales de la coherencia espacial para algunos generadores de hipocampo. A. Entrada excitadora de Sch a CA1. Cada neurona piramidal de CA3 envía axones que dejan múltiples colaterales en CA1 con orientación paralela dominante (1) dejando botones sinápticos *en passant* (2) en numerosas células piramidales de CA1. Los grupos funcionales de células piramidales de CA3 tienen territorios axónicos similares (3) y su activación conjunta produce corrientes sinápticas sincrónicas en una estrecha banda de células piramidales de CA1 (4) que conforma un módulo espacial en forma de pista de actividad coherente. La anchura de estas pistas viene definida como el alcance medio de un axón celular individual y la topología común de un grupo funcional de CA3. Un mismo módulo espacial puede estar formado por diferentes niveles de CA1, pero desaparece cuando el disparo aferente asincrónico se organiza diferencialmente, como durante las SPWs en las que codisparan neuronas de CA3 propagándose a niveles septotemporales. B. Entrada de la vía Perforante. En ella la actividad LFP está pobremente correlacionada en lugares cercanos, posiblemente debido a las ramificaciones en forma de abanico (1) y el solapamiento de corrientes sinápticas sincrónicas causadas por la alta curvatura. C. Generador GCsom ó inhibición somática de células granulares. El plexo axonal de las interneuronas en cesto (gris) pueden producir corrientes inhibitorias en le soma de un gran número de células granulares (en negro). (2,3) La modulación sincrónica de la subpoblación de células en cesto produce la fusión de territorios sinápticos de las células en cesto, así la coherencia espacial del generador GCsom se extiende mucho más que la extensión del plexo axonal de una sola célula.

En cuanto a la falta de correlación observada entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo hay que señalar la existencia de numerosos datos previos que sugieren una división funcional de estas dos regiones, basándose en diferencias en la expresión de algunos marcadores génicos así como en patrones de conectividad aferente y eferente dispares (Fanselow y Dong, 2010). De hecho, hay datos sustanciales

que apoyan la teoría de que el polo dorsal o septal del hipocampo estaría específicamente involucrado en funciones de memoria mientras que el ventral, o temporal, modularía los procesos emocionales o afectivos (Moser et al., 1995). Los datos de correlatos electrofisiológicos de comportamientos y pautas concretas han ido confirmando paulatinamente esta segregación. Además, la detallada descripción de la expresión génica apoya inequívocamente una segregación de las principales regiones del hipocampo (CA1, CA3 y GD) en las regiones dorsal, intermedia y ventral. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente capítulo que muestran una falta de coherencia a medida que los registros se alejan del hipocampo dorsal son consistentes y avalan la idea de procesamiento independiente entre ambas zonas. Aunque no demuestran diferentes capacidades funcionales en una misma estructura, no son incompatibles con tal postulado.

En el presente capítulo se ha mostrado cómo no todos los factores que influyen en la generación de un LFP son anatómicamente obvios. La relevancia fisiológica de la coherencia espacial reside en su utilidad para discernir cómo un generador de LFP contiene la información de cada población presináptica y los factores por los cuales ocurre de ese modo. Un LFP espacialmente coherente puede tener su origen en el solapamiento de territorios axónicos de células individuales, tanto si disparan sincrónicamente como si no, o bien en el disparo sincrónico de células presinápticas únicamente si sus axones solapan en las regiones diana. Por el contrario, LFPs de curso temporal diferente necesariamente indicarán actividad diferente en las unidades presinápticas, fuere cual fuere la organización topológica de su territorio sináptico en la zona diana. Naturalmente, estos modelos de organización serán sólo aplicables a LFPs específicos de vía aferente. En conclusión, la detección de módulos específicos en la actividad de las poblaciones de origen de cada generador sirve para revelar la topología de las conexiones y el flujo cambiante en partes de ellas, explicando así las diferencias en registros cercanos. Esto representa un primer paso para mapear los cambios temporales en los LFPs y sus correlaciones con total entendimiento de sus bases biofísicas.

5. ASIMETRÍA BILATERAL DEL GENERADOR SCHAFFER

5. ASIMETRÍA BILATERAL DEL GENERADOR SCHAFFER

5.1. Introducción

La mayoría de los sistemas biológicos muestran algún grado de asimetría, desde especializaciones de función y estructura, hasta características externas que las evidencian. En humanos y otros mamíferos, los dos hemisferios cerebrales difieren también en su anatomía y función. Esta especialización bilateral queda patente en estudios de desarrollo, genéticos y comportamentales. Las asimetrías en el esquema funcional del cerebro, han sido en general correlacionadas con comportamientos específicos. El lenguaje fue una de las primeras observaciones de asimetría cerebral aportada por Broca y Wernicke aunque posteriormente se ha asociado también a campos como la percepción auditiva, preferencias motoras y agudeza sensorial. De hecho, a pesar de que las asimetrías en corteza motora son bastante sutiles se ha detectado que la lateralización del lenguaje y la dominancia motora están interrelacionados, aunque de una manera compleja. Sin embargo, la lateralización de la función cerebral puede tener un carácter más cognitivo en primates superiores y humanos. Durante muchos años se ha pensado que la especie humana era la única que mostraban lateralización cerebral funcional a niveles poblacionales, reflejando una demanda de procesamiento única requerida para producir y comprender el lenguaje. Más recientemente varios estudios han mostrado estas asimetrías funcionales en primates no humanos y otras especies. De esta forma parece que las asimetrías biológicamente determinadas han persistido a través de la evolución de los vertebrados, siendo las de humanos sólo un ejemplo.

Los factores que afectan a la asimetría pueden ser variados, la orientación fetal, componentes hereditarios y el ambiente podrían influir en la lateralización de las estructuras. Un ejemplo de ello son los procesos embrionarios que lideran la asimetría funcional y estructural de la corteza motora responsable del lenguaje, que hoy en día son un foco de intenso estudio. Además, efectos hormonales pueden influir en la asimetría de la microestructura del cerebro, indicando que algunas asimetrías no son necesariamente establecidas genéticamente, sino que podrían resultar de la estimulación sensorial lateralizada en el desarrollo pre y postnatal. También enfermedades como el Alzheimer permiten observar una lateralización, puesto que el hemisferio izquierdo siempre se ve afectado en primer lugar y más severamente.

Podemos encontrar en la literatura distintos tipos de asimetrías que intervienen en la organización cerebral descritas hasta el momento. Por un lado se han encontrado asimetrías neuroquímicas, que algunos investigadores han ligado a papeles funcionales específicos para cada hemisferio (Tucker y Williamson, 1984). En estos estudios se ha asignado al hemisferio izquierdo una organización dependiente de la activación de dopamina mientras que el derecho obedecería a los niveles de noradrenalina. Aunque los dos hemisferios son similares en peso y en volumen, la distribución del tejido difiere marcadamente entre ellos. Estas características de la forma del cerebro reflejan diferentes volúmenes en regiones frontales y occipitales. Por tanto la citoarquitectura será también un nivel en el que encontraremos asimetrías. A nivel celular no se han encontrado diferencias marcadas entre hemisferios en cuanto a relación celular. Sin embargo, Fears y colaboradores (2011) han publicado que la extensión de la arborización dendrítica de alto orden (finas ramificaciones situadas lejos de la dendrita principal) eran mayores en el hemisferio izquierdo, en zonas relacionadas con el lenguaje, que en sus homologas de la corteza derecha. Los autores también detectaron que el hemisferio derecho se

desarrollaba más rápidamente en el primer año postnatal planteando la hipótesis de que sería el inicio de experiencias lingüísticas el que dispararía el desarrollo del izquierdo. De hecho, la idea de que los hemisferios llevan a cabo procesamientos analíticos (hemisferio izquierdo) y holísticos (hemisferio derecho) de forma lateralizada, sigue suscitando un largo y apasionado debate.

En el procesamiento de la memoria también se han podido reconocer asimetrías. El hipocampo es una de las estructuras del cerebro más intensamente investigadas debido a su papel central en la formación de memoria episódica en humanos y memoria espacial en roedores. En particular, se ha visto que el uso del hipocampo derecho es dominante durante tareas de memoria espacial mientras que la memoria episódica está más asociada al hemisferio izquierdo.

En general, los cerebros asimétricos tienen un cuerpo caloso reducido al área medio-sagital si los comparamos con los que son simétricos, lo que puede reflejar la existencia de finas fibras de conexión de los dos hemisferios. De hecho si se secciona el cuerpo caloso, como ocurre en casos terapéuticos como tratamiento contra desórdenes neuronales, la comunicación de percepción, cognición y aprendizaje entre los dos hemisferios queda eliminada. Los límites temporales en la transferencia callosa de la información entre hemisferios cerebrales, pueden también haber favorecido el desarrollo de redes unilaterales, al menos en aquellos que posean un tamaño suficientemente grande.

Dentro de cada hemisferio el hipocampo es esencial para la codificación y consolidación de la memoria episódica (Cohen and Eichenbaum, 1993). En roedores el hipocampo izquierdo y derecho están altamente interconectados (Blackstad, 1956) con sinapsis funcionales (Andersen et al., 1966) sugiriendo una cooperación entre ambos durante el procesamiento de la información. Muchos de los estudios anatómicos se han enfocado en las conexiones del hipocampo (Witter y Amaral, 2004; Amaral y Lavenex, 2007).

En la rata, el sistema comisural que conecta los dos hipocampos consiste por un lado en la comisura hipocampal ventral (VHC) que lleva conexiones homotípicas desde piramidales de CA3 y neuronas del hilus polimórficas y por otro la comisura dorsal (DHC), formada por los axones de las células de subículo y corteza entorrinal. El paquete de axones que forma la VHC recorre la transición entre el cuerpo y las columnas del fornix y el DHC lo hace ventralmente al final caudal del cuerpo caloso (Blackstead, 1956; Amaral et al., 1984; Demeter et al., 1985; Witter, 1986; Van Groen y Wyss, 1988). La entrada del hilus a las células granulares es gabaérgica (Douglas et al., 1983) mientras que la entrada de CA3 emplea glutamato y aspartato como neurotransmisores (Lopes da Silva et al., 1990). En experimentos realizados por Lopes da Silva (et al., 1990) han visto que la sincronía bilateral durante episodios epilépticos desaparece después de la sección de una parte específica de la VHC, el tercio dorso-caudal y sin embargo la sección de otras fibras comisurales o la lesión del área septal no tuvo ningún efecto en la comunicación interhemisférica. Estos datos indican que el componente homotípico de la entrada VHC es necesario para la transferencia de los potenciales provocados locales al hipocampo contralateral y que es la VHC la vía comisural más potente de conexión de los dos hipocampos en ambas direcciones.

Está descrito que la VHC está formada por dos componentes principales de fibras comisurales (Blackstead, 1956). Una de ellas conecta la capa molecular del GD con el hemisferio opuesto, recibiendo proyecciones de las células del hilus contralateral (Hjorth-Simonsen y Lauberg, 1977; Fricke y Cowan, 1978; Laubert, 1979; West et al., 1979). Además las células piramidales de CA3 dan lugar a proyecciones

comisurales (colaterales de Sch) a CA3 y CA1 (Hjorth-Simonsen, 1973; Swanson et al., 1978; Lauberg y Sorensen, 1981), pudiendo incluso una sola célula proyectar a ambos hemisferios (Swanson et al., 1980). En este caso, las neuronas de CA3 han de extender sus axones hasta el 75% de la extensión septotemporal de CA1 (Tamamaki et al., 1984; Li et al., 1994). Más aún, los axones comisurales CA3-CA1 terminan en el estrato oriens y en radiado (Andersen et al., 1966; Buzsaki y Fidelberg, 1982), pudiendo hacer sinapsis en células piramidales (Andersen et al., 1966; Gottlieb y Cowan, 1972) y no piramidales (Frotscher y Zimmer, 1983). En el caso de la conexión entre piramidales de CA3 y CA1 el estrato radiado de CA1 dorsal recibe más sinapsis con origen ipsilateral que contralateral, mientras que al estrato oriens llegan más inervaciones contralaterales. Este es el caso de CA1 anterior, sin embargo, en regiones más posteriores las aferencias a radiado y a oriens se encuentran más equilibradas. Resultados preliminares muestran que las fibras que llegan desde CA3 en el hipocampo dorsal cruzan por una banda estrecha localizada en la parte dorso-caudal de la VHC, mientras que las fibras que llegan del esplenium y de partes ventrales del hipocampo cruzan en posiciones progresivamente más rostral y ventral. A pesar de estas diferencias los resultados de Shinohara (et al., 2008) indican que la densidad de sinapsis en radiado de CA1 con origen de CA3 no es significativamente distinto entre los dos hemisferios.

A pesar de la descripción exhaustiva de las comisuras no se ha llegado a una cuantificación del grado de acoplamiento ni de la dinámica de la transferencia de potenciales entre los dos hipocampos. El estudio selectivo de las fuentes del LFP en hipocampo hará posible estudiar la conectividad bilateral y permitirá a su vez la cuantificación de la contribución de cada uno de los generadores y de la similitud de sus activaciones temporales. De este modo ICA podrá ayudarnos a entender si hay dos representaciones independientes en el cerebro normal, una perteneciente al procesamiento en cada hipocampo, o es una representación única formada por el procesamiento cooperativo de ambos.

5.2. Material y métodos

Para la descripción del procedimiento experimental general remitirse a la sección 2 de Material y Métodos. La programación necesaria para el desarrollo de los respectivos análisis ha sido llevada a cabo por el Dr. Valeri Makarov (Universidad Complutense de Madrid).

5.2.1. Procedimientos experimentales

A diferencia de los métodos empleados en secciones anteriores, en el presente capítulos se han utilizado para el registro dos dobles multielectrodos (cada una de las lancetas con 16 canales, 100µm de separación, 64 canales en total), cada uno de ellos localizado en el eje CA1-GD/CA3 de cada hemisferio en coordenadas AP 4 y 4.5cm desde Bregma (n=6). De esta forma la actividad presente cada una de las cuatro localizaciones, distribuidas en los dos hemisferios, ha sido registrada durante el mismo intervalo de tiempo con el fin de poder comparar la activación específica de los distintos generadores de forma sincrónica. Los mismos electrodos de registro se han utilizado para registrar espigas unitarias provocadas de forma espontánea por las neuronas piramidales de CA1.

El número de electrodos de estímulo también ha sido duplicado, permitiendo la activación selectiva con PPs de las colaterales de Sch desde CA3. Cada uno de ellos provocará la estimulación ipsilateral para el hemisferio en el que ha sido colocado y contralateral para el opuesto.

Una vez obtenidos los generadores principales mediante el uso del ICA y con la ayuda de los DFCs correspondientes y se ha seleccionado el generador de Sch para su análisis, estudiando en el presente capítulo la actividad específica de la aferencia desde CA3 de forma bilateral.

5.2.2. Spike sorting

Se usó el método de clasificación de las unidades registradas *wavelet-enhanced* (Pavlov et al., 2007) que optimiza la separación de las unidades en multielectrodos lineares. Para el empleo de este método se necesitan LFPs registrados en electrodos contiguos para obtener las corrientes locales transmembrana en la proximidad del electrodo central. Este método permite la cancelación efectiva de las corrientes extracelulares paralelas al eje principal, una fuerte fuente de contaminación en el *spike sorting*, y facilita la detección de las corrientes transmembrana a las que contribuyen las espigas. No se ha empleado ningún filtro de frecuencias, lo que mantiene las formas de onda originales de las espigas y mejora de esta forma su clasificación. A continuación un componente principal analizado en base a todas las espigas registradas se aplica para la extracción de las llamadas “espigas representativas”. Entonces los parámetros de la onda transformada se ajustan para una mejor identificación. Finalmente, las propiedades que permiten una mayor discriminación de espigas fueron usadas para la extracción de las distintas unidades. El agrupamiento posterior de las espigas separadas mediante este método fueron agrupadas de forma manual.

5.2.3. Clasificación de unidades

Las unidades fueron clasificadas en dos subtipos, células piramidales o interneuronas, de acuerdo a su localización (capa dentro de CA1) y otros criterios electrofisiológicos estándar (Csicsvari et al 1998) como la duración del evento unitario (>0.4 y <0.4 para piramidales e interneuronas respectivamente), la tasa de disparo media (<1 y >0.5 Hz), la relación con el ritmo theta (momento en el que el disparo de piramidales se ve disminuido e incrementa o no varía en el caos de interneuronas), patrón de disparo (aislados o en ráfagas), presencia de espigas compuestas (sólo en piramidales) y el disminución de los autocorrelogramas (más o menos rápido). El número total de unidades usadas en el análisis se ha visto limitado por el uso para el registro de multielectrodos lineares en lugar de tetrodos, siendo necesarios en nuestro estudio para la extracción de generadores de forma simultánea al registro de espigas aisladas.

5.2.4. Correlación cruzada

Si midió el índice correlación cruzada entre señales de un mismo hipocampo y entre ambos hemisferios, con el fin de comparar la activación intra e interhipocámpica, respectivamente, tras la activación de CA3.

$$r = \frac{c_{12}}{\sqrt{c_{11}c_{22}}}$$

,donde $\{C_{ij}\}$ es la matriz de covarianza. Se tomaron intervalos de 80s en cada uno de los generadores de Sch y se compararon los eventos sincrónicos.

5.2.5. Coherencia espacial

Para comparar las señales de ambos hemisferios también se ha llevado a cabo la coherencia espectral para ambas, para lo cual, al igual que en el capítulo 2 se ha utilizado la fórmula:

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

donde $\{P_{ij}(f)\}$ es la matriz de la densidad espectral de la potencia cruzada. Para poder unificar los valores de todos los animales se ha determinado el nivel de significación de la coherencia espectral mediante un test de surrogadas (Schreiber y Schmitz, 2000), de forma que ha mayor número de ellas, mejor y más fiable será el resultado del análisis (100 surrogadas). El nivel de significación ($\alpha = 0.05$) fue calculado para cada valor de frecuencia y la coherencia sobre ese nivel fue considerada estadísticamente significativa.

Con el fin de facilitar el análisis de los resultados se ha estudiado la significación en bandas discretas de frecuencia de forma que se ha podido valorar la contribución parcial de cada una de ellas. Las bandas elegidas para la distribución de frecuencias han sido elegidas entre 0-4, 4-10, 10-30, 30-70 y 70-150Hz.

5.2.6. Detección de eventos

Este apartado se restringe al caso de los eventos presentes en el generador de Sch, por ser aquellos a los que el análisis del Kernel ha sido optimizado. Dichos eventos ajustados a la frecuencia gamma se han detectado y analizado de forma independiente permitiendo la cuantificación de su duración y amplitud. Para ello, como se había mostrado en el capítulo 2, hemos usado la transformada *Wavelet* de $v(t)$:

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int v(t) \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt,$$

donde ψ es la onda madre Haar, adecuada para la detección de pulsos cortos en una señal, a la escala de tiempo y b la localización en el tiempo. En ella se rectificaron los coeficientes de onda usando la siguiente ecuación:

$$C(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \max\{W(a, b), 0\}$$

Con ellos se ha podido asociar los distintos puntos en el plano (b, a) con eventos singulares del LFP. En consecuencia el máximo local de $C(a, b)$ evaluado como máximo sobre el grupo de suficientemente

pequeños dominios $\{w_k\}$ definen los instantes de tiempo de los μ EPSPs ($t_k = b_k - a_k/2$), su duración (a_k) y amplitud ($A_k = C(a_k b_k)$).

$$(a_k, b_k) = \underset{(a,b) \in w_k}{\operatorname{argmax}} C(a, b)$$

Una vez que se detectaron los distintos eventos que forman la activación del generador de Sch en cada una de las posiciones de registro, se identificaron los eventos sincrónicos entre pares de localizaciones (ya fuesen intra o interhemisféricas) mediante comparación temporal. Los eventos fueron considerados pareados o sincrónicos si su punto de inicio coincidía dentro de un intervalo de tolerancia que incluye el retraso de conducción axónica hasta el hemisferio contralateral. Para seleccionar la tolerancia de la detección consideramos solapamiento mínimo como el intervalo mínimo de solapamiento que se debe encontrar entre eventos de dos generadores Sch para considerarlos simultáneos. De esta forma, los eventos tendrían un intervalo de solapamiento, cuantificable mediante el índice:

$$\Omega = 2 \frac{\Delta_{\text{solapamiento}}}{d_1 + d_2}$$

,donde $\Delta_{\text{solapamiento}}$ es el intervalo de tiempo de solapamiento de dos eventos cercanos en el tiempo, mientras que d_1 y d_2 son las duraciones de cada evento. Así eventos con $\Omega > \text{solapamiento mínimo}$, son considerados simultáneos.

Para optimizar la detección de los eventos pareados, tras la detección automática se llevó a cabo una rectificación manual realizada mediante un método de doble ciego que permitió la agrupación exclusiva y sin contaminación de eventos pareados para su posterior análisis. Dichos análisis se realizaron en tres periodos de 10s en cada animal.

5.2.7. Estadística de los eventos correlacionados

Una vez detectados los eventos pareados se llevó a cabo una clasificación en base a la diferencia de duración entre eventos. Es decir, que si tomamos como referencia los eventos ipsilaterales y anteriores (D1) al hemisferio en el que se produce la estimulación de Sch, podremos tener con respecto a los ipsilaterales posteriores o los contralaterales (D2) una diferencia de duraciones positiva o negativa, según si el evento de referencia es de mayor duración o menor, respectivamente, agrupando los eventos en $D2 > D1$ ó $D1 > D2$. Otras clasificaciones que se han llevado a cabo se han basado en los tiempos de inicio, de máxima amplitud del evento o de tiempo final del evento.

De las representaciones entre los distintos grupos de eventos se ha obtenido la recta de regresión ortogonal (errores considerados en ambas variables) y el ajuste de la misma (r).

Las comparaciones entre duración y amplitud de los eventos se habrán llevado a cabo tanto para los eventos pareados como para los no pareados. Además, el programa de análisis ha permitido la obtención de promedios de los mencionados grupos de eventos.

5.2.8. Correlaciones triples

Con el objetivo de relacionar una espiga unitaria con los eventos pareados de los generadores de Sch bilaterales se han de seleccionar las espigas que sean disparadas en una ventana precisa después de los eventos, lo que relacionaría el disparo de CA3 que queda reflejado por el potencial recogido en los generadores bilaterales de Sch con la espigas disparadas por las células piramidales de CA1 de ambos hemisferios.

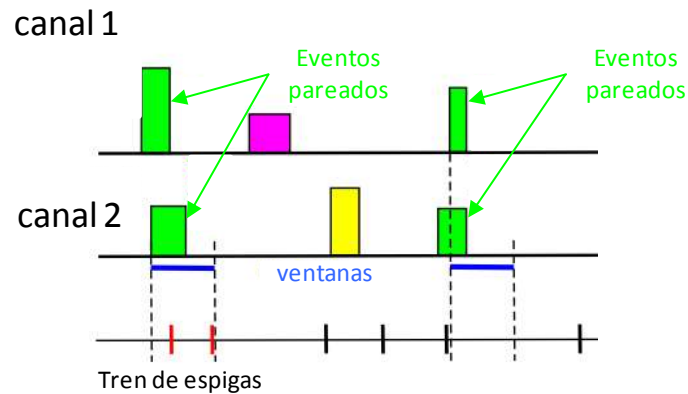


Fig. 17. Ventana de correlación triple. Ejemplo de la ventana elegida para seleccionar los disparos unitarios asociados a los eventos bilaterales del generados de Schaffer. El encontrar un evento pareado que solape en el tiempo será considerado imprescindible para marcar una ventana a partir de su aparición en la que buscar las espigas de las neuronas individuales.

Las espigas en las representaciones han sido consideradas como referencia temporal y en los ejes se dispondrán los intervalos de tiempo de los eventos de los generadores, siendo la densidad marcada en color el número de eventos triples.

5.2.9. Lesión

Por último, para comprobar el efecto modulador de un hemisferio sobre el contrario se lesionó, de forma transitoria, la región de CA3 del hemisferio izquierdo, contralateral al estímulo, mediante la aplicación local de lidocaína (2%). Distintos periodos previos, simultáneos y posteriores a la lesión fueron analizados para comprobar el efecto y el alcance de los efectos de la droga.

5.3. Resultados

Como ha sido mencionado en la introducción del presente capítulo los dos hemisferios se mantienen conectados por las comisuras. En particular en el hipocampo las fibras que conectan las CA3 bilaterales

forman parte de la comisura ventral, estructura que resulta crítica para sincronizar la actividad del hipocampo. En particular se ha estudiado cómo el generador de Sch, que recoge toda la actividad producida desde CA3 y enviada a CA1 (ipsi y contralateral) varía entre hemisferios, es decir, si la actividad entre ellos es independiente o se mantienen en contacto formando una sola estructura funcional (Fig 18).

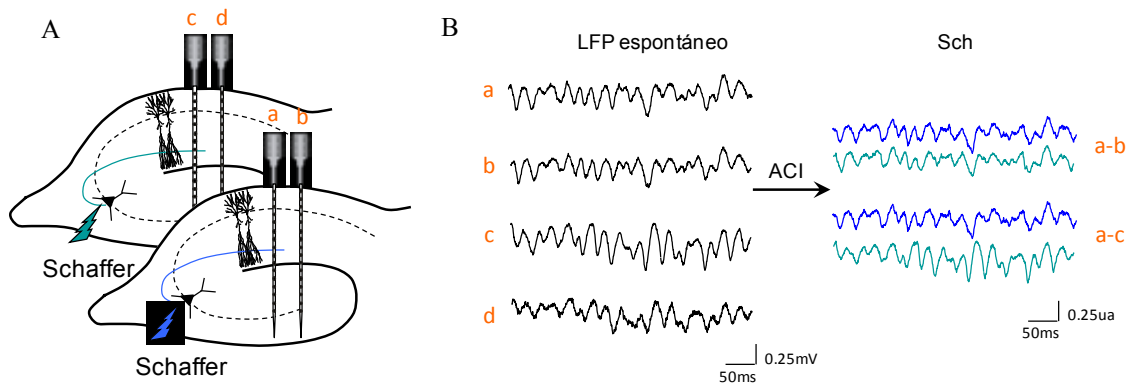


Fig. 18. Similitudes y diferencias bilaterales. A. Procedimiento experimental en el que se usó un multielectrodo de doble lanceta (2x16 canales) en cada hemisferio a lo largo del eje CA1-GD/CA3, proporcionando cuatro lugares de registro: dos en el hemisferio izquierdo (a y b) y otros dos en el derecho (c y d). Se utilizaron estímulos bilaterales ubicados en las células piramidales de CA3 para provocar PPs desde las colaterales de Sch. B. LFPs espontáneos registrados en cada una de las lancetas en el electrodo situado a la altura del estrato piramidal. C: AL obtener mediante ACI los correspondientes generadores de Sch para cada lanceta, observamos que se pueden detectar eventos semejantes y otros específicos de uno de los dos hemisferios.

5.3.1. Caracterización bilateral

Para abordar este objetivo se han realizado registros simultáneos intra e interhemisféricos y se ha extraído el generador de Sch en cada una de las posiciones. Entre los LFPs específicos se han observado en general, similitudes y alguna marcada diferencia.

Ante estado de semejanza parcial se ha decidido ahondar en las características que comparten y que hacen diferir a ambas señales. Una de ellas ha sido la coherencia espacial. Como ha quedado establecido, la frecuencia dominante en la aferencia que llega desde CA3 a CA1 es la que se encuentra comprendida entre 25-140Hz, conocida como gamma. Los eventos encontrados en el generador de Sch ipsilateral (intrahemisférico) mantienen dicha frecuencia en prácticamente todo su rango, comenzando a ser significativas las frecuencias más bajas (ondas lentas de 1-30Hz) hasta los 120Hz. En cambio cuando comparamos la coherencia con el generador de Sch contralateral, vemos que la significación ha disminuido notablemente, manteniéndose únicamente las frecuencias bajas hasta los 10Hz y una pequeña banda de 28-55Hz. Al descomponer el espectro de frecuencias en bandas concretas comprobamos cómo la diferencia entre la coherencia intra e interhemisférica disminuye significativamente, excepto para ondas lentas con frecuencia de menos de 4Hz.

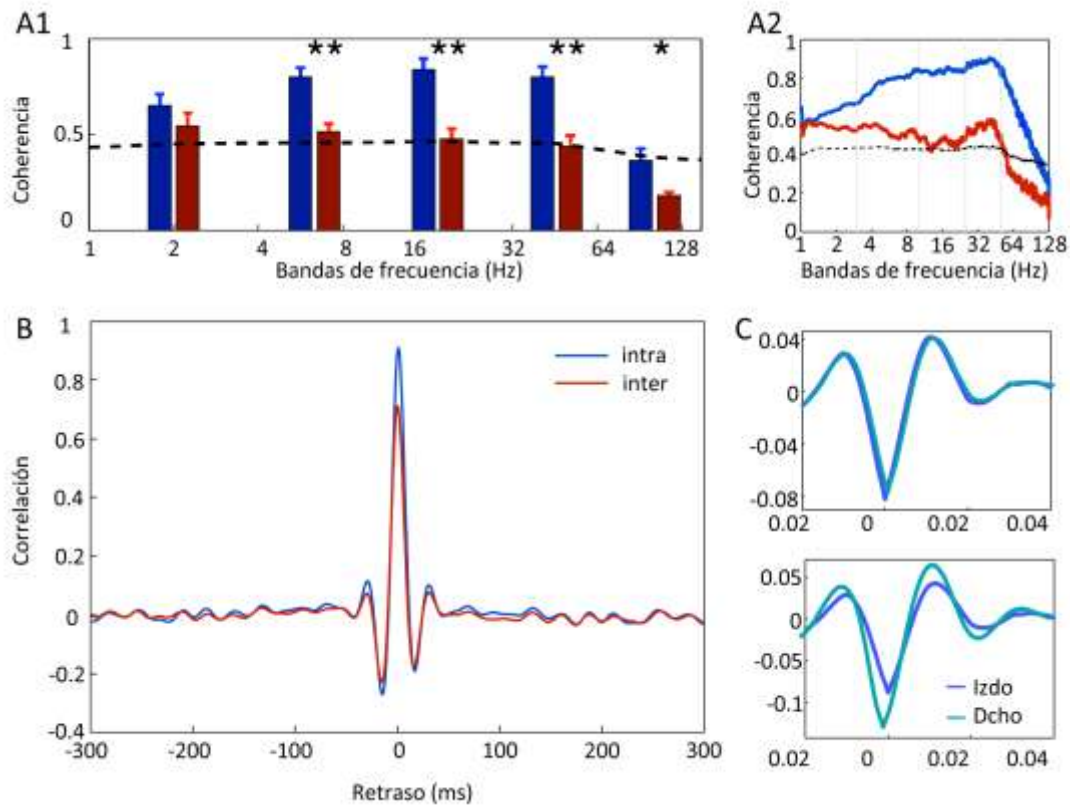


Fig. 19. Resultados de coherencias espaciales y espectrales tanto intra como interhemisféricas. A1. Coherencia espectral entre generadores de Sch del mismo (azul) y de ambos hemisferios (rojo). A2. Representación de los resultados estadísticos de la coherencia espectral perteneciente a cada banda de frecuencias: 0-4Hz, 4-10Hz, 10-30Hz, 30-70Hz y 70-150Hz. $n = 5$. La línea negra marca el nivel de significación estadística. Las barras representan la coherencia media en cada frecuencia de banda y el error estándar: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. B. Correlación cruzada entre señales durante intervalos de 80s. C. Promedio de eventos pareados intrahemisféricos (superior) y bilaterales (inferior).

En cuanto a la correlación cruzada entre señales de un mismo hipocampo y bilaterales se aprecia una ligera disminución, reduciéndose de 0.8 ± 0.06 a 0.6 ± 0.04 , respectivamente (Ver Fig. 19). Al apreciar esta alta correlación se ha procedido a buscar la existencia de alguna diferencia en las características, no sólo de la señal, sino de los eventos particulares que la forman. Al comparar entre eventos promediados de cada una de las señales se ha encontrado, que en el caso de la comparación de eventos contralaterales, hay una disminución en la amplitud (18.6 y $12.4 \mu V$), de forma que el hemisferio izquierdo contiene eventos de menor amplitud, de hasta un 50% menos que el derecho. Si observamos con detalle los promedios también podemos observar un marcado retraso de la señal del hemisferio izquierdo (azul). Así quedará reflejado que la activación de Sch del hemisferio derecho precede a la del izquierdo en 0.85 ± 0.25 ms. En el caso de la comparación de señales intrahipocámpicas el retraso ha resultado en 0.65 ± 0.4 , de forma que el registro anterior ocurriría previamente al caudal, como cabría esperar.

5.3.2. Estudios estadísticos de las señales

Al observar estas diferencias en las activaciones de Sch, se ha decidido estudiar más detalladamente la estructura de los eventos de Sch en ambos hemisferios. En primer lugar comprobamos si características como duración y amplitud mostraban alguna relación entre hipocampos. En los datos se ha encontrado

una correlación positiva en la variación de los dos generadores, ya sea de duración como de amplitud, lo que indica que los eventos mantienen sus cambios ligados. En el caso de la amplitud ($A2/A1$) encontramos un valor de r de 0.9 ± 0.04 y 0.6 ± 0.03 para eventos intra e interhemisféricos, respectivamente. Los resultados para el caso de la duración son similares, encontrando una r de 0.8 ± 0.03 entre señales correspondientes a un mismo hemisferio y 0.6 ± 0.04 para el caso de señales bilaterales.

Cuando se ha representado la diferencia de amplitudes ($A2-A1$) con respecto a la diferencia de los tiempos de inicio de los eventos ($D2-D1$) se ha obtenido una r mínima (0.06 ± 0.01 y 0.1 ± 0.02 para señales intra e interhemisféricas) por lo que no tendremos en cuenta ninguna correlación significativa entre la amplitud y la duración de los eventos. Sin embargo, los resultados encontrados en la comparación de las duraciones ($D2-D1$) y los tiempos ($T2-T1$) arrojan valores negativos de -0.4 ± 0.02 y -0.4 ± 0.01 . A raíz de estos datos podemos afirmar que los eventos de mayor duración siempre preceden al resto, más cortos, sea cual sea la posición de registro de la señal que hayamos tomado. Es decir, sean $D1$ ó $D2$ los eventos más duraderos, éstos siempre van a tener un comienzo previo a los eventos de menor duración, ya estemos hablando de señales inter o intrahipocámpicas.

Dado que la duración de los eventos detectados en los generadores de Sch ha sido la característica que mayor lateralización ha mostrado, se ha procedido al estudio pormenorizado de las diferencias entre los dos grupos en los que se han clasificado: $D2>D1$ y $D1>D2$. Se ha calculado el tiempo con que preceden los eventos de mayor duración en ambos casos ($T2-T1$), resultando en -0.36 ± 0.3 y 1.22 ± 0.5 para el caso de señales intrahipocámpicas y -2.04 ± 0.21 y 0.34 ± 0.3 en las bilaterales. En el caso del grupo $D2>D1$, en el que el número de eventos es notablemente menor que en $D1>D2$, observamos un retraso negativo puesto que los eventos de mayor duración ($D2$) preceden con el retraso indicado. Para los eventos $D1>D2$, eventos mayoritarios, la media positiva refleja, como ya se había indicado, que los eventos de mayor duración ($D1$ en este caso) preceden a los $D2$ (Ver Fig. 20).

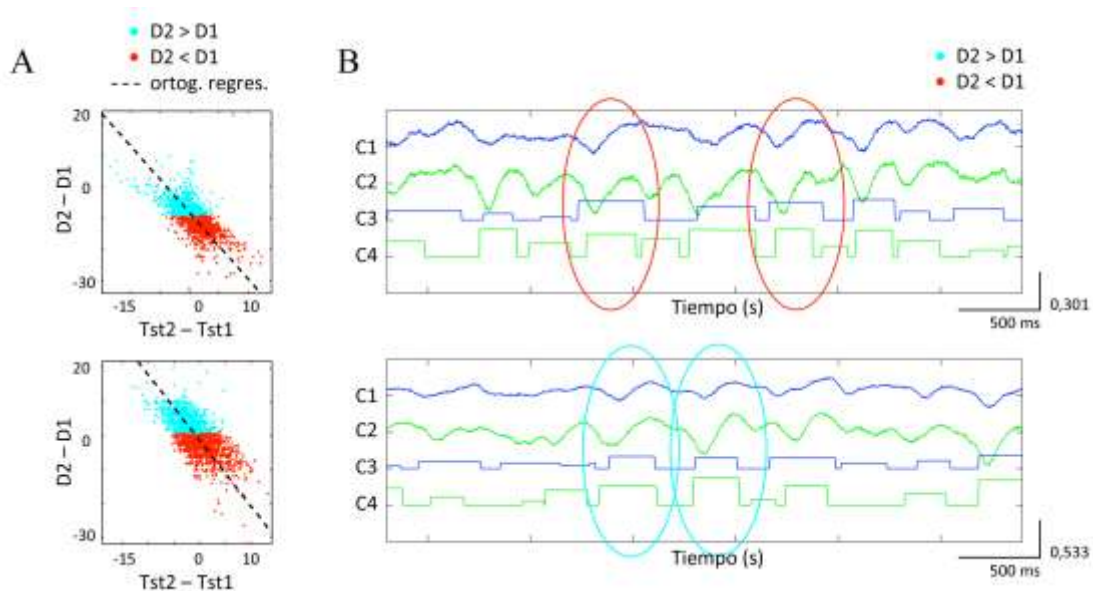


Fig. 20. Detección de eventos. A. Ejemplo de las dos agrupaciones de eventos realizadas $D1>D2$ (rojo) y $D2>D1$ (azul) en señales bilaterales. B. Relación entre la duración de los eventos pareados $D2-D1$ y la diferencia entre los tiempos de inicio de los eventos $Tst2-Tst1$. Observamos que los eventos de mayor duración preceden a los eventos más cortos tanto en eventos intrahemisféricos (superior) e interhemisféricos (inferior).

Al comprobar que los eventos de mayor duración preceden a los eventos más cortos, independientemente del origen que tengan, se ha buscado algún mecanismo por el que se regule la sincronización de ambos. Para ello se midió el retraso existente entre los tiempos de inicio, central y de final del evento entre las distintas ratas.

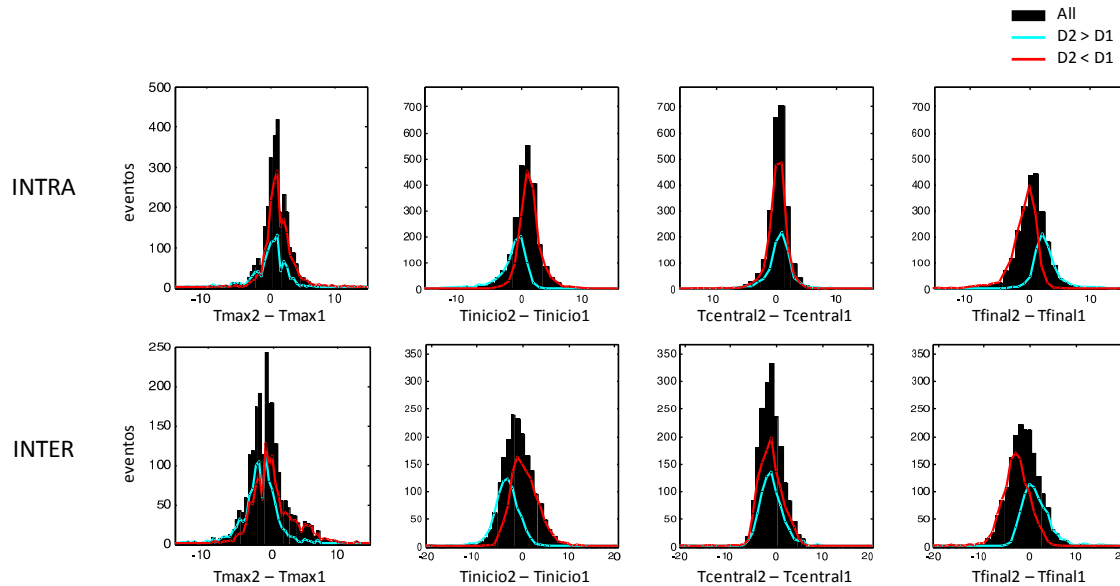


Fig. 21. Análisis temporal de los eventos bilaterales pareados. Ejemplo representativo de la estructura temporal de los eventos detectados en los generadores de Sch de un mismo hemisferio (representaciones superiores) y bilaterales (inferiores) para los dos tipos de eventos: $D2 > D1$ (azul) y $D2 < D1$ (rojo). T_{max} : tiempo de actividad máxima. T_{inicio} : tiempo de inicio del evento (ms), $T_{central}$: tiempo central (ms), T_{final} : tiempo en el que termina el evento (ms). El eje vertical representa el número de eventos encontrados para cada tiempo.

Como se observa en la tabla los eventos pareados, independientemente del grupo al que pertenezcan, mantienen su punto central marcadamente sincrónico a diferencia de los puntos de inicio y término de los mismos. De hecho estos últimos se ajustan para mantener comenzar antes y acabar después en los eventos de mayor duración sin perder punto fijo central, aunque no lo hagan de forma equilibrada a ambos lados del evento. Es decir, los T_{inicio} en los eventos de mayor duración siempre preceden, aunque si se trata de un $D2$ que corresponde al hemisferio derecho, en señales interhemisféricas, el retraso es mucho mayor (-2.7 ± 0.2), más que el doble que si lo hacen los eventos del hemisferio izquierdo ($D1$). En el caso de señales correspondientes al mismo hemisferio el retraso es similar, puesto que el axón que provoca el evento es el mismo en ambos casos. En cuanto al $T_{central}$ muestra independencia de la duración de los eventos puesto que el único condicionante parece ser la sincronía entre distintas señales. En los datos correspondientes al T_{final} los signos se mantendrán opuestos a los T_{inicio} para compensar el retraso, mantener el punto central sincronizado y conservar el grado de duración del evento.

5.3.3. Correlaciones triples

En lo referente a las correlaciones triples en las que, utilizando las espigas unitarias como referencia se han relacionado los eventos bilaterales coincidentes, se han encontrado diferentes modelos de aparición de los eventos específico para cada espiga disparada. Por lo general, no han aparecido patrones estables ni

diferencias apreciables entre los distintos hemisferios, sino que al parecer hay un amplio espectro de intervalos en que los eventos de Sch pueden preceder al disparo de la espiga asociada en CA1.

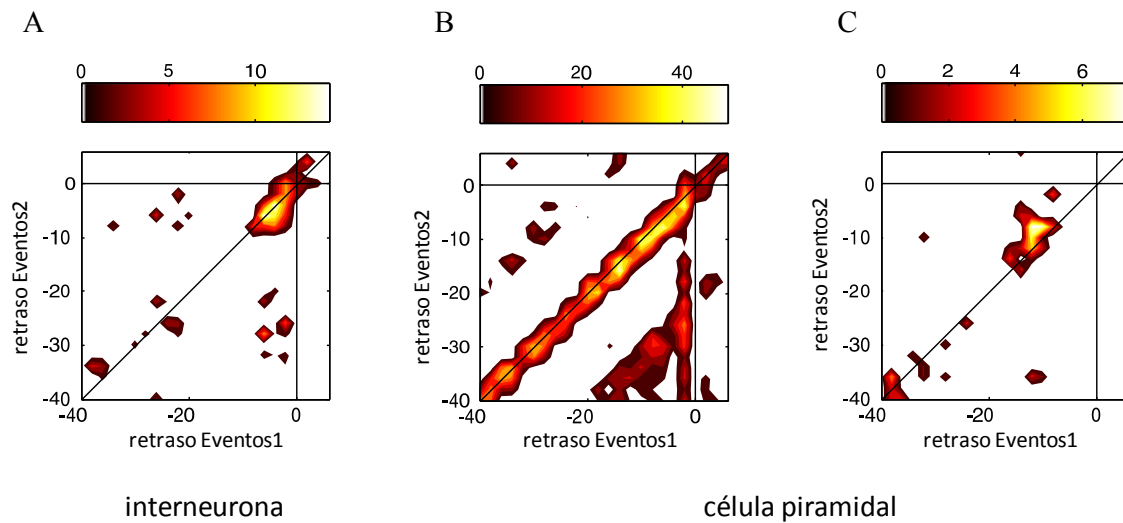


Fig. 22. Correlaciones triples. Ejemplos de los diferentes perfiles de correlaciones triples encontrados en los resultados. Se representan las coincidencias entre los eventos pareados detectados en los generadores de Sch de ambos hemisferios y un tren de espigas. Las espigas unitarias han sido registradas extracelularmente a partir del registro unitario en capa de somas de CA1 y son representadas como la referencia a 0ms. En los ejes x e y se encuentran los retrasos en tiempo de los eventos del canal 1 (hemisferio izquierdo) y 2 (hemisferio derecho) respectivamente. El color representa el número de eventos triples. La bisectriz sirva como referencia para saber qué hemisferio tiene más o menos retraso con respecto al disparo de la neurona, es decir, si los eventos triples aparecen bajo la línea bisectriz significa que los eventos coincidentes en el canal 2 tienen un retraso mayor (negativo) y aparecerán antes que aquellos del canal 1 siguiendo la secuencia Evento canal2→Evento canal1→Espiga. En los ejemplos se muestra el caso de una interneurona (A) y de una célula piramidal (B y C), en cuyo caso los perfiles aparecen con mayor variabilidad.

Los eventos pareados específicos de los Sch de ambos hemisferios podrán aparecer confinados a un pequeño periodo de tiempo, o extenderse hasta 40ms previos al disparo de las neuronas de CA1. Por el contrario, en el caso de las correlaciones triples realizadas con el disparo de interneuronas de CA1 como referencia, en lugar de las espigas de células piramidales, han mostrado un perfil más ajustado a los 5ms previos al disparo de la interneurona (Fig. 22). Es decir, que el disparo de las interneuronas de CA1 que actúan como diana de las colaterales de Sch que proyectan desde CA3, se mantiene más dependiente de la sincronía de los eventos bilaterales de Sch que las células piramidales. Sin embargo hay que tener en cuenta que la extracción de aquellas relaciones triples estadísticamente significativas resulta compleja, razón por la que no se ha podido llevar a cabo un análisis global de todas los disparos registrados y conlleva la falta de factor representativo de los resultados. A pesar de ellos, los datos reflejan el claro comportamiento dependiente de las neuronas de CA1 frente al disparo pareado de las CA3 bilaterales, aunque este se muestre diferencialmente en cada disparo.

5.3.4. Eventos no pareados

Al clasificar los eventos que forman los generadores de Sch en pareados y no pareados, según su identificación simultánea en las dos señales comparas (intra e interhemisféricas), hemos cuantificado la presencia de cada uno de ellos. Los resultados sitúan en 3.4 ± 1.9 y 3.6 ± 1.3 el porcentaje de eventos no

pareados al comparar las posiciones 1 (anterior) y 2 (posterior) de un mismo hipocampo. En cambio, en hemisferios diferentes hemos obtenido valores de 5.9 ± 1.3 y $10.9\pm 1.7\%$ en el hipocampo izquierdo (1) y derecho (2), respectivamente (Ver Fig. 23).

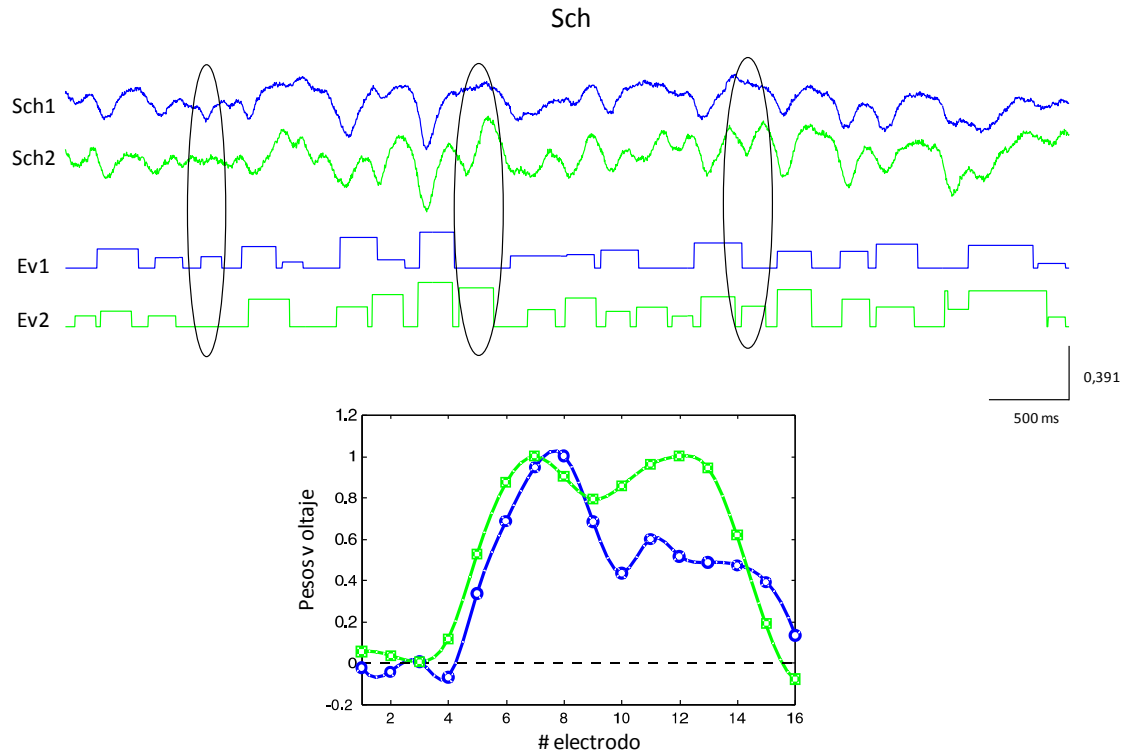


Fig. 23. Eventos no pareados. A. Ejemplo de un intervalo de tiempo representativo elegido al azar en el que se localizan eventos no pareados en ambos hemisferios detectados en los generadores de Sch. La activación representada en color verde corresponde al hemisferio izquierdo y el azul corresponde al hemisferio derecho. Las activaciones Sch1 y Sch2 son los cursos temporales de los correspondientes generadores de Sch. Ev1 y Ev2 mostrarán la aparición de los eventos detectados en cada uno de los hemisferios. B. Mapa espacial de los pesos de voltaje de los correspondientes generadores de Sch a lo largo del eje CA1-GD/CA3 del hipocampo.

Al estudiar las características de estos eventos se ha visto que frente a los 19.41 ± 0.61 ms y 19.68 ± 0.6 ms de duración de los eventos pareados en señales intrahemisféricas, los no pareados mantienen 13.1 ± 1.1 y 13.91 ± 0.5 ms. En cambio, en generadores bilaterales encontramos 18.36 ± 0.3 ms y 19.07 ± 0.6 ms en eventos pareados y 15.80 ± 0.7 y 15.71 ± 0.15 ms en los no pareados.

En cuanto a las amplitudes, 50.56 ± 5.9 μ V y 52.51 ± 6.7 μ V (señales 1 y 2 respectivamente) han sido los resultados obtenidos en eventos pareados y 25.32 ± 1.76 μ V, 26.91 ± 1.43 μ V en los no pareados, en señales de un mismo hipocampo, mientras que en diferentes hipocampos los valores se sitúan en 54.77 ± 7.6 y 77.93 ± 8.05 en eventos pareados y 35.56 ± 4.03 μ V y 52.31 ± 4.42 μ V en los no pareados.

5.3.5. Modulación unilateral

Con el fin de encontrar algún efecto modulador de un hemisferio sobre el otro se ha decidido provocar una lesión transitoria realizada mediante la aplicación local de lidocaína. La zona de inyección fue la

región de CA3 del hemisferio derecho que como vemos en la figura 24 causó un silenciamiento específico en el generador de Sch derecho mientras que el izquierdo continuó con su disparo en la frecuencia gamma habitual. Además el efecto de la droga queda patente en la autocorrelación en la que se aprecia una clara desorganización de la frecuencia espontánea (ver hemisferio izquierdo) y una marcada disminución de la amplitud del LFP específico. Así mismo es visible en el DFC como desaparecen las corrientes generadas por el CA3 lesionado, mientras que se mantiene algo de actividad proveniente del hemisferio contralateral (Ver DFC de la Fig. 24).

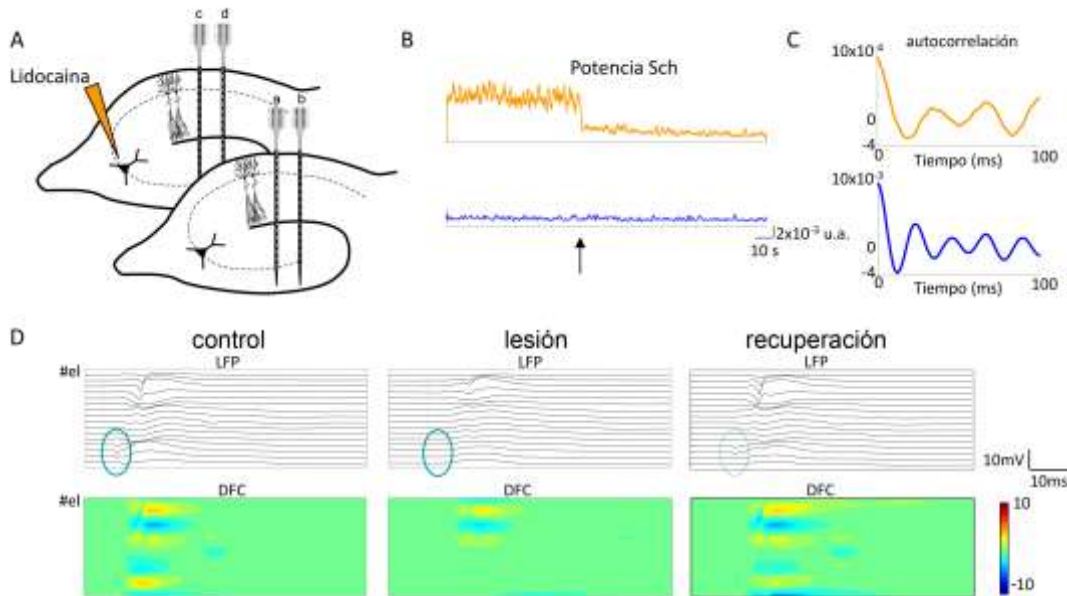


Fig. 24. Modulación unilateral llevada a cabo mediante la lesión transitoria con lidocaína localmente inyectada en CA3 del hemisferios derecho del hipocampo, provocando un estado epiléptico local visible en el generador correspondiente del área postsináptica. **A.** Procedimiento experimental en el que se registrará el LFP en cuatro posiciones (a,b,c y d), dos en cada hipocampo (2x16 canales). Cada una de ellas cubrirá las regiones CA1-GD/CA3 en posiciones caudal y rostral separadas 500:m. **B.** envoltura temporal de la potencia del generador de Sch de cada hipocampo (bin 0.2s) en las posiciones a (azul) y c (naranja). La flecha indica el momento de aplicación de la lidocaína. **C.** Correspondientes autocorrelaciones del generador de Sch de cada hemisferio. Se aprecia la caída de frecuencia en el hemisferio ipsilateral a la lesión y la disminución en su magnitud. **D.** Detalle de los análisis de DFC durante la lesión en el que se aprecia la desaparición de PP local en CA3 ocasionado por el bloqueo sináptico con lidocaína. El efecto es apreciable tanto en el LFP registrado como en la falta de corriente producida en la región de aplicación de la droga. Es destacable el carácter transitorio de la lesión.

Durante el efecto de la lidocaína se cuantificó la potencia del generador de Sch, que disminuyó a un 8% en el hemisferio lesionado y a un 73.9% en el contralateral (izquierdo). La amplitud de los eventos del generador se redujo de 65.6 a $24 \mu\text{V}$, mientras que la duración se mantuvo e incluso aumentó de 18.2 a 21ms. En el hemisferio izquierdo no se observaron cambios durante la lesión.

5.4. Discusión

En el hipocampo han sido identificadas numerosas asimetrías estructurales y funcionales. En el presente capítulo se ha tenido la oportunidad de aportar datos concretos y cuantificables de las diferencias encontradas en las fuentes del LFP, en particular del generador que tiene como origen la población de células piramidales de CA3. Se ha intentado esclarecer qué parte de la asimetría encontrada en el hipocampo puede ser atribuida a diferencias en los generadores de Sch mediante el estudio de sus componentes, analizando los diferentes tipos de eventos que los forman.

Entre las diferencias más evidentes entre hipocampos se encuentra la amplitud media de los eventos producidos en CA1 por las colaterales de Sch, siendo mayores los eventos pertenecientes al generador de Sch derecho. Dicha diferencia podría ser atribuida a un mayor grupo funcional de células presinápticas que disparasen presinápticamente, aunque en este caso sabemos que el grupo de neuronas en CA3 que disparan es el mismo, al tratarse de un evento pareado. Debido a esto supondremos que la variación en la amplitud se deberá a otros factores, intrínsecos al microcircuito de CA1 específico de cada hipocampo. Sin embargo, la amplitud y la duración entre eventos de distintos hemisferios mantiene una correlación positiva, por lo que la variación bilateral será proporcional entre hemisferios.

En general, a pesar de disminuir, la correlación cruzada se mantiene alta al comparar distintos hipocampos (valor de 0.6). Este resultado refleja el hecho de que la comisura está permitiendo la llegada de los axones de CA3 contralateral, de forma que los eventos bilaterales mantendrán un origen parcial común. Sin embargo hay que tener en cuenta que en el hemisferio contralateral (el derecho en el caso que nos ocupa) además de contar con las llegadas comisurales del hipocampo izquierdo, va a sumar las aferencias específicas de su CA3 ipsilateral. La llegada de septum a CA3 en principio será común para ambas regiones de CA3, sin embargo no resulta tan claro que las aferencias que provienen de las fibras musgosas se mantengan tan correlacionadas. De esta forma, la mezcla entre las fibras que sinaptan desde septum y los axones que proyectan a CA3 desde el GD podrían provocar los cambios en el disparo y en la formación de grupos funcionales en cada CA3, generando actividad específica a pesar de compartir un origen sináptico común.

Estas diferencias en la estructura de los eventos de Sch, así como los porcentajes de eventos no pareados encontrados, pueden ser explicados por diferencias intrínsecas de cada hipocampo. En la literatura se han descrito una gran número de asimetrías, entre las cuales se encuentran diferencias genéticas que conllevan distintos subtipos de receptores de glutamato (Kawakami et al., 2003; Shinohara et al., 2008; Kohl et al., 2011). Así, las espinas postsinápticas difieren en la composición de dichos receptores en base al origen hemisférico de las aferencias de CA3. Debido a esto, los autores encuentran que el CA3 izquierdo produce más LTP en sinapsis de CA1 como diferencia de la expresión de GluN2B, subunidad contenida en los receptores de NMDA, siendo los receptores NMDA/AMPA similares para las dos entradas. Otros estudios de asimetría muestran cómo las espinas postsinápticas de las piramidales de CA1 desde CA3 derecho, son mayores y tienen más altos niveles de GluA1 pero menos de GluN2B que las de CA3 izquierdo. Entre otros, también se han encontrado diferencias en genes involucrados en estructuras sinápticas, dendríticas y axonales que son esenciales en formación de sinapsis, diferenciación y estabilización (Yuste y Bonhoeffer, 2001; Matsuzaki et al., 2004; Matsuzaki, 2007) y representan el 15% de los genes modulados en el hemisferio derecho y 11 en el izquierdo. Además, genes para la síntesis de proteínas y su degradación, vías en señalización y transporte ya discriminados espacialmente (Robles et

al., 2003), genes para mecanismos epigenéticos se han encontrado también asimétricamente entre hipocampos. Este patrón de modulación génica apunta a un posible papel diferencial de la función de cada hipocampo. Hasta ahora estas asimetrías se han relacionado con el aprendizaje espacial, y en concreto han mostrado que el hemisferio derecho participa en la recuperación de la información espacial y localizaciones espaciales precisas mientras que el izquierdo puede ser necesario para adquisición óptima, para codificación y/o consolidación temprana.

La aparición de eventos no pareados en cada uno de los hemisferios es el principal factor que influirá en la pérdida de coherencia. De hecho se ha visto que durante las SPWs (*Sharp waves*) las oscilaciones gamma en CA3 y CA1 llegan a ser más coherentes entre los dos hipocampos, indicando una transitoria sincronización en todo el hipocampo dorsal que proviene de la activación masiva y conjunta de los dos CA3 bilaterales, sin dejar lugar a activaciones específicas durante ese intervalo. Las frecuencias lentas se ven mantenidas al tener como responsables cambios en DC (*direct current*) probablemente con origen en poblaciones conectadas o comunes a los dos hipocampos. Sumadas a estas frecuencias lentas hay una estrecha banda de frecuencias que también se mantiene entre hipocampos (28-55Hz) que corresponde a gamma lento. Sin embargo parece que su aparición no es significativa, aunque dado que cada hemisferio mantiene su ritmicidad en gamma no es de extrañar que se mantenga la frecuencia básica de aparición espontánea de los eventos de Sch.

Como ya se ha indicado previamente el hipocampo es esencial para la codificación y consolidación de la memoria episódica (Cohen y Eichenbaum, 1993). Para ello se ha detectado que la sincronización del gamma CA3-CA1 entre hipocampos es un componente central de la repetición de memoria despierta, sugiriendo que la transitoria podría actuar como un mecanismo marcapasos para permitir la reactivación coordinada de memoria a través de la red hipocámpica (Carr et al., 2012). Además, estudios detallados sobre la frecuencia Gamma (25-140Hz) han mostrado su participación en sincronización de células y formación de grupos funcionales de neuronas en estructuras corticales. En particular, la región de CA1 recibe dos entradas moduladas en gamma diferentes: una rápida (>65Hz), que llega desde la vía temporoamónica y sinapta en el estrato lacunoso-moleculare y otra más lenta (<50Hz) proporcionada por la entrada desde CA3 al estrato radiado (7), lugar al que mayoritariamente proyecta la CA3 bilateral (12), de ahí la alta correlación existente entre hipocampos. En realidad el ritmo gamma proveniente de CA3 ha demostrado representar un balance de corrientes sinápticas excitadoras e inhibitoras (14). De hecho, el aumento parcial del hemisferio derecho ocurre tanto en receptores glutamatérgicos como en terminales GABAérgicos (Shinohara et al., 2008, Fisahn et al., 1998; Mann et al., 2005b).

A pesar de la disminución en los valores de coherencia, el ritmo gamma se mantiene en cada hemisferio. Una muestra de ello son los resultados de la lesión generada en CA3 unilateral, en los que se muestra como, pese al silenciamiento selectivo de uno de los dos hipocampos (hemisferio izquierdo), el hemisferio opuesto mantiene su frecuencia en gamma. Parece que, aunque la entrada desde CA3 contralateral sea la preferente en algunos estratos de CA1, el mantenimiento de la frecuencia esencial de dicha entrada es específico de cada hipocampo.

Por otro lado, se ha visto que las neuronas que disparan en respuesta a la sincronización bilateral de eventos no poseen una lateralización específica, es decir, no disparan más células en respuesta al evento específico de un solo hipocampo, como se aprecia en el desplazamiento de los eventos significativos a uno u otro lado de la bisectriz. Además, el retraso con el que pueden disparar después de los eventos

tampoco sigue una relación establecido, al contrario que la mayoría de interneuronas registradas. En este último caso las correlaciones triples reflejan un tiempo más ajustado entre la aparición de los eventos en los generadores de Sch y su disparo.

En la literatura existen numerosas referencias a la relación de las interneuronas con las oscilaciones gamma en hipocampo. En particular las interneuronas en cesto que expresan parvalbúmina (PV), parece que juegan un importante papel en la generación del gamma hipocámpico y cortical (Bartos et al., 2007; Tukker et al., 2007; Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009). Este tipo de interneuronas recibe alrededor de 15000 sinapsis contralaterales (en su mayoría de glutamato) y 1000 simétricas (principalmente gabaérgicas y monoaminérgicas), mientras que las que contienen colecistoquinina (CCK) como marcador en lugar de PV reciben sólo 5000 asimétricas pero más de 2500 sinapsis simétricas. Con estos datos podemos hacernos una idea de la relación bilateral que mantienen las poblaciones inhibitorias que justificarían la dependencia tan ajustada que muestran en las correlaciones triples. Se ha visto además, que existe la conexión mediada por uniones gap de estas interneuronas (Deans et al., 2001, Galarreta y Hestrin) podría generar IPSPs detectables en neuronas excitadoras locales. Modelos computacionales han indicado que su actividad sincrónica es suficiente para producir oscilaciones de 20-80Hz, frecuencia que puede ser regulada mediante retroalimentación excitadora por parte de las neuronas piramidales. Sin duda el disponer de los ratones mencionados en la bibliografía en los que se pudiese suprimir la actividad de las interneuronas, sería un buen mecanismo para comprobar el efecto que poseen en la dinámica del generador de Sch y estudiar su contribución en ambos hemisferios.

En lo referente a las asimetrías encontradas en base a la duración de los eventos de Sch, podemos especular con un método de señalización por parte de los hemisferios. De esta forma actuarían como “marcador” de la llegada unilateral de un nuevo dato al hipocampo que a continuación sería comunicado al hemisferio contrario. Además, el hecho del mantenimiento del punto central del evento sugiere una sincronización intencionada, aunque podría ser únicamente una forma de asegurar de que el evento se encuentra bilateralizado. En realidad, la anticipación general mostrada por los eventos del hemisferio derecho, como se muestra en las correlaciones cruzadas, podría explicarse por la asimetría en receptores de glutamato, cuya función en CA1 potenciaría la respuesta ante un mismo estímulo generado desde CA3.

Sin duda el estudio de asimetrías en el hipocampo se mantiene hoy en día como un gran objeto de estudio en el que quedan pendientes por responder grandes cuestiones. Entre ellas es aún desconocido si son los dos hipocampos funcionalmente equipotentes, si mantienen un acoplamiento funcional actuando de forma sinérgica o si juegan papeles distintos y complementarios. Será necesario conocer los mecanismos y los detalles de los eventos específicos de cada hipocampo ya que pueden representar la especialización de cada hemisferio en sus tareas de procesamiento de la información.

**6. GENERADOR DE ACTIVIDAD INHIBITORIA
RECURRENTE EN EL LFP DE HIPOCAMPO
DURANTE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA**

6. GENERADOR DE ACTIVIDAD INHIBITORIA RECURRENTE EN EL LFP DE HIPOCAMPO DURANTE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

6.1. Introducción

La región de CA1 de hipocampo constituye una de las estructuras cerebrales más estudiadas debido a su estratificación bien definida y a los numerosos datos anatómicos con lo que cuenta la literatura. Se trata de una de las áreas corticales en las que más a fondo se ha trabajado en explicar la diversidad neuronal y la activación temporal de las distintas células que lo componen. Las células piramidales excitadoras codifican representaciones espaciales y otras memorias episódicas y proporcionan una salida glutamatérgica a diversas áreas corticales y subcorticales. Este tipo de células principales proyecta a más de 10 regiones cerebrales extrahipocámpicas. La relativa uniformidad de estas células está complementada por una amplia diversidad de interneuronas GABAérgicas que proporcionan un efecto inhibitorio y con ello una regulación temporal de la actividad de las piramidales. En la literatura se pueden encontrar estudios detallados en que se cuantifica la proporción de las distintos tipos de interneuronas en la región de CA1 de hipocampo, estudios que reflejan la baja proporción de interneuronas en comparación con otras zonas de la corteza (Aika et al., 1994). A pesar de ello hay datos que argumentan a favor de la dominancia de la inhibición sobre las corrientes excitadoras en la población espontánea (Hajos et al., 2000; Herreras et al., 1988; Oren et al., 2010), aunque las evidencias directas son escasas. Este predominio de las corrientes inhibitorias fue descrita en la actividad sináptica de fondo registrada desde membranas de piramidales corticales (Rudolph et al., 2005; Anderson et al., 2000, Borg-Graham et al., 1998) mostrando que en el hipocampo la tasa de disparo de las interneuronas es mucho mayor que el de las piramidales (Somogyi y Klausberger, 2005).

Casos particulares como el ritmo theta tienen un origen principalmente inhibitorio (Soltesz y Deschenes, 1993), mientras otros como las oscilaciones gamma (Csicsvari et al., 2002; Mann et al., 2005), ripples (Ylinen et al., 1995), y espigas del GD (Bragin et al., 1995) están aún bajo estudio. En concreto las oscilaciones gamma (30-80Hz), de las que ya se ha hablado en el capítulo anterior, están relacionadas con el comportamiento exploratorio (Soltesz y Deschênes, 1993, Bragin et al., 2005) y han sido relacionadas a la actividad rítmica de las células inhibitorias perisomáticas en base al ajuste de la fase de disparo de éstas últimas.

Las células inhibitorias perisomáticas del hipocampo inervan el soma, las dendritas proximales y el segmento inicial del axón (AIS) de las células principales, siendo ideales para asumir el control del patrón temporal de la salida de las células piramidales y para el control y selección de grupos funcionales (Klausberger y Somogyi, 2008). La acción de una sola célula inhibitoria perisomática puede sincronizar descargas de potenciales de acción en alrededor de 1000-2000 células (Freund, 2003). Se han encontrado distintos tipos de células inhibitorias perisomáticas especializadas en distintas ventanas temporales, estados comportamentales, frecuencias de oscilación o poblaciones celulares diana. En principio se han descrito tres tipos: dos de células en cesto y una axo-axónica o de candelabro, diferenciadas en base al disparo durante las SPWs hipocámpales. Las de candelabro inervan selectivamente el AIS y expresan el marcador PV. Además, pueden provocar IPSPs de gran amplitud en las células postsinápticas con un perfil indistinguible al causado por las interneuronas en cesto. Éstas últimas suman la mayoría de los terminales GABAérgicos y pueden ser de dos tipos, las más extendidas, que contienen PV, y las que

expresan VIP y/o CCK (Klausberger et al., 2005; Tukker et al., 2007). Se localizan invirtiendo el soma y las dendritas proximales de las células principales. En el caso de las que cuentan con PV como marcador disparan en modo *fast-spiking*, capaces de alcanzar frecuencias superiores a 100Hz, mientras que las CCK positivas disparan en modo más regular, con un máximo descrito en neocortex de alrededor de 40-50Hz (Tukker et al., 2007).

Para el acoplamiento eficaz del disparo de las células principales a la frecuencia gamma son requeridas uniones eléctricas y químicas. Las interneuronas PV positivas sinaptan entre sí y se mantienen conectadas también por uniones de tipo gap, formando una gran sincitio eléctricamente acoplado con precisión de milisegundos (Galarreta y Hestrin, 1999, Gibson et al, 1999). En cambio, las que poseen CCK no forman sincitios tan grandes. En cuanto a las candelabro se ha visto que no conectan unas con otras y tampoco forman sincitios interneuronales. Algunos estudios sugieren que los tipos de células inhibitorias perisomáticas que podrían estar involucradas en gamma debido a su acoplamiento sináptico y eléctrico, además de por la habilidad de disparar a altas frecuencias, son las células en cesto PV positivas. De hecho se ha visto que son la principal fuente de inhibición perisomática, enviando sus densas proyecciones axonales a la mayoría de las piramidales locales (Freund y Buzsáki, 1996). Aún así, una célula piramidal recibe inhibición perisomática de sólo un pequeño número de ellas (~10 interneuronas). De este modo se ha visto en modelos colinérgicos de gamma (Fishan et al., 1998; Traub et al., 2000; Mann et al., 2005; Hájos y Paulsen, 2009), que mediante un bucle de retroalimentación entre células piramidales e interneuronas (Freeman, 1968) la población de células en cesto puede contribuir a la frecuencia gamma en el LFP (Hájos et al., 2004; Oren et al., 2006).

En ciertos periodos de actividad, tales como las SPWs, Oren y colaboradores (2010) han visto que las corrientes sinápticas inhibitorias en el soma de las células piramidales causan la mayoría de corrientes que subyacen la oscilación de los LFPs (Oren, 2010). Estos autores sugieren que las fuentes de corriente inhibitoria es la mayor contribución al campo al encontrar una notable similitud entre las formas de onda de los IPSPs de las células piramidales y el LFP (Oren, 2010), además de haber podido identificar las fuentes de corriente perisomáticas durante las oscilaciones hipocampales a frecuencia gamma (Csicsvari et al., 2003; Mann et al., 2005b). Además otros autores también apoyan la teoría de que la estructura microscópica de la red y la naturaleza de los eventos sinápticos facilitarían que ciertas corrientes sinápticas inhibitorias puedan ser altamente visibles en la señal extracelular (Trevelyan, 2009). La visibilidad de tales corrientes puede ser amplificada si la conductancia del receptor y su *driving force* ($E_m - E_{GABA}$) son suficientemente grandes, como ocurre durante las SWPs, cuando las piramidales son eléctricamente permeables en ese momento por el bombardeo sináptico perisomático al que se ven sometidas. Así, pequeños grupos de actividad en cesto con disparo coordinado y sincrónico que invasen las mismas células piramidales podrían explicar la aparición de IPSCs detectables en las células principales de hipocampo.

El potencial de campo local contiene información temporal precisa de la entrada sináptica causada por todas las poblaciones aferentes que hacen contacto en una región particular, ya sean excitadoras o inhibitorias. Sin embargo, las corrientes sinápticas que integran el LFP se mezclan en el espacio extracelular y varios factores pueden actuar y enmascarar o potenciar la actividad de las poblaciones presinápticas. Mediante el método de ACI, que permite la separación y el seguimiento continuo de la actividad de diferentes poblaciones de neuronas aferentes a una misma región, intentaremos conocer cual es la visibilidad y el impacto de cada una de ellas al LFP hipocampal. De este modo y basándonos en la

discriminación espacial de las corrientes sinápticas generadas por las células diana de acuerdo a la estratificación de los axones aferentes, se ha intentado descompuesto el LFP original en lecturas paralelas e independientes de sus distintas fuentes sinápticas. Entre las principales, se ha buscado la identificación del generador correspondiente a las interneuronas locales perisomáticas cuyos contactos sinápticos se localizan en un estrato definido del eje somatodendrítico de las células piramidales. Gracias a registros en los que se ha favorecido la actividad recurrente mediante excitación antidrómica de las células piramidales de CA1, donde se ha podido comprobar la visibilidad real de la activación ejercida por la población de neuronas inhibitorias. En el presente capítulo se describe, por tanto, la contribución al LFP y la dinámica de una de las subpoblaciones interneuronales más estratégicas de la región CA1 del hipocampo, la que media la inhibición recurrente.

6.2. Material y métodos

Para la descripción del procedimiento experimental general y los análisis detallados remitirse a la sección Material y Métodos.

Mediante estimulación antidrómica (Ver tabla 1) de las células piramidales en rata anestesiada se ha favorecido la actividad inhibitoria recurrente en la región de CA1 de hipocampo en rata anestesiada. Los registros en el eje CA1-GD se ha realizado con multielectrodos lineares de 32 canales (50 μ m de separación) para cubrir con el mayor número de electrodos posibles el perfil de las células piramidales. Tras la aplicación del ACI se ha procedido a la cuantificación de la varianza y el estudio de la dinámica del generador específico obtenido.

Para los estudios comparativos llevados a cabo en distintas localizaciones del hipocampo dorsal (4, 5 y 6mm desde Bregma).

6.2.1. Correlación espacial y coherencia espectral

Para el análisis de la correlación cruzada y la coherencia espectral se siguió el mismo procedimiento que en el capítulo 4, comparando en este caso intervalos de 60s de duración. De esta forma, la comparación llevada a cabo entre dos lancetas de multielectrodos permitió cuantificar la similitud de ambas señales según el índice:

$$r = \frac{C_{12}}{\sqrt{C_{11}C_{22}}}$$

,donde $\{C_{ij}\}$ es la matriz de covarianza. Mientras que la coherencia espectral aportó datos acerca de las frecuencias significativas mantenidas entre el generador recurrente de las distintas localizaciones.

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

donde $\{P_{ij}(f)\}$ es la matriz de la densidad espectral de la potencia cruzada.

6.2.2. Farmacología

La confirmación de la naturaleza inhibitoria del generador se llevó a cabo mediante la aplicación local de un bloqueante específico de receptores de GABA (Bicuculina, Sigma-B6889), localizado en el estrato oriens de CA1. A través de la pipeta se inyectó una microgota (50-100 pL) mediante un Picospritzer (General Valve, Fairfield, NJ, USA). Los efectos se determinaron por el silenciamiento selectivo de los potenciales antidrómicos en las células piramidales (Canals et al. 2005).

6.2.3. Spike sorting

A partir de los registros extracelulares de electrodos contiguos se clasificaron las unidades según el método *wavelet-enhanced* (Pavlov et al. 2007), detallado en la (sección 5.2.2). Las características del componente principal extraído mediante este método se aplicaron al resto de unidades, utilizando aquellas propiedades que permitieron una mejor discriminación de las distintas formas de onda para la clasificación de los eventos registrados. Posteriormente se realizó una agrupación manual de los distintos grupos detectados de forma automática. Por último, se clasificaron las unidades en piramidales e interneuronas en base a sus características electrofisiológicas como el perfil de los autocorrelogramas, la tasa y el patrón de disparo y la duración de los eventos (Csicsvari et al., 1998).

6.3. Resultados

La actividad recurrente registrada en las células principales de hipocampo es un buen reflejo del potencial inhibitorio que generan las interneuronas perisomáticas en las células piramidales. Sin embargo, en el potencial registrado todas las corrientes causadas por los generadores principales estarán también presentes, por lo que en la mezcla del potencial extracelular durante la actividad espontánea del hipocampo resultará difícil saber qué corrientes pertenecen a cada una de las fuentes de actividad. Es por eso, que para la lectura de las activaciones de los generadores extraídos con el ACI, resultará imprescindible conocer la contribución específica de cada población presináptica, entre ellas las que ocasionan la inhibición perisomática.

6.3.1. Identificación del generador perisomático

Como en ocasiones anteriores, para reconocer el perfil que generan las distintas poblaciones, se ha recurrido a la activación provocada de potenciales mediante estímulos antidrómicos originados en los axones de las células piramidales que recorren el álveus del hipocampo. Mediante dicha activación, las fibras axónicas activarán las interneuronas perisomáticas que a su vez provocarán una salida o fuente activa en las células piramidales, correspondiente a la inhibición, flanqueada por sendas entradas pasivas a ambos lados del eje somatodendrítico. Tal perfil de corrientes es el observado al realizar un estudio de DFC en uno de los potenciales registrados (Ver Fig. 25), donde irá acompañado de las corrientes opuestas generadas por la excitación directa de la célula piramidal desde el axón. Cuando se comparó el DFC de

___ 6. Generador de actividad inhibitoria recurrente en el LFP durante actividad espontánea

un potencial provocado con el correspondiente del LFP virtual obtenido a partir del generador se vio que el perfil de corrientes perisomáticas inhibitorias se correspondía totalmente, reconstruyendo el perfil de la activación específica producida por las interneuronas. Pese a ello, la mezcla de corrientes va a poder ser separada por ACI como se puede ver en la Fig. 25. Pese a la coincidencia espacial de ambas corrientes, la activación temporal es ligeramente distinta al implicar, en el caso correspondiente a la inhibición, dos conexiones sinápticas que aumentarán el retraso entre la activación de la interneurona perisomática y la célula piramidal a la que proyecta. Este intervalo de tiempo será suficiente para que ACI descomponga los dos componentes de la espiga antidrómica, procesamiento del que obtendremos claramente disociados los generadores correspondientes a la activación directa excitadora y la posterior inhibición mediada por las interneuronas perisomáticas.

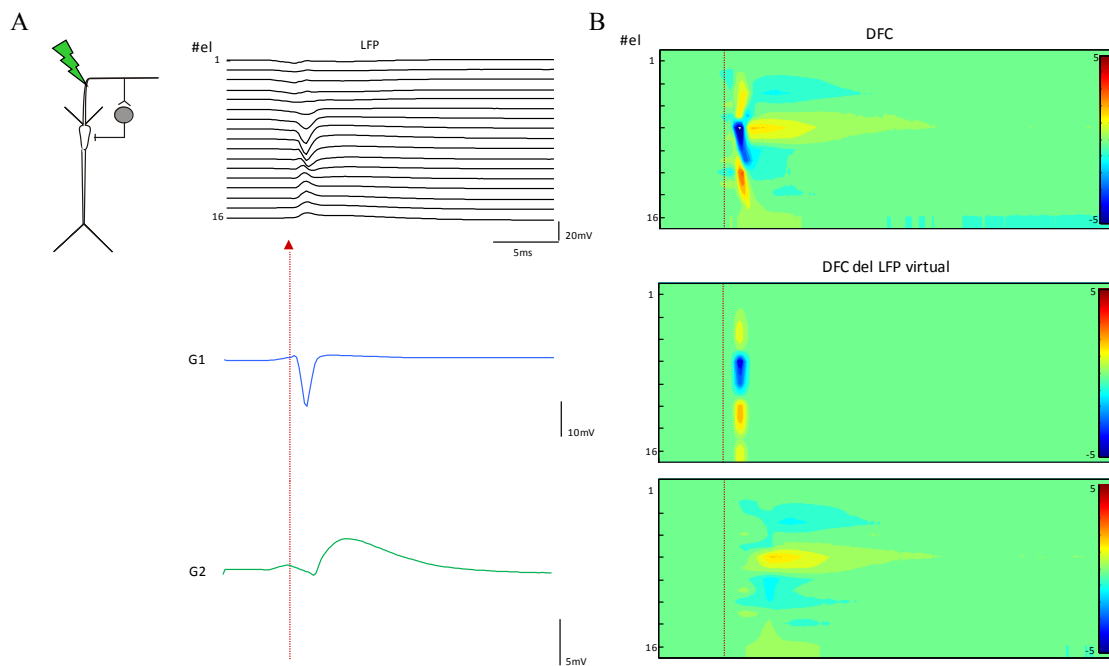


Fig. 25. Características espaciales de las corrientes inhibitorias producidas por la activación de células en cesto sobre las células piramidales de CA1 del hipocampo. A. Potencial antidrómico provocado mediante la estimulación en alveus de los axones de las células piramidales de CA1 de hipocampo y análisis de DFC correspondiente. Estimulando los axones de estas neuronas en el alveus obtenemos un LFP en el que podemos distinguir dos componentes segregables en el DFC, la espiga poblacional antidrómica (G1) y la envolvente sináptica inhibitoria recurrente perisomática (G2), cada uno de los cuales podrá ser identificado por su generador correspondiente. B. Los DFC del LFP virtual proporcionarán las corrientes específicas de cada población.

De hecho, se ha podido analizar el comportamiento de ambos generadores en paralelo para confirmar su diferente naturaleza y dinámica. Aplicando un tren de estímulos antidrómicos (2Hz) a intensidades crecientes se ha visto el aumento progresivo de ambos generadores hasta alcanzar el máximo de activación para cada uno de ellos. El generador correspondiente a la activación inhibitoria alcanza su máximo a $400\mu\text{A}$, mientras que la espiga aumenta de forma progresiva como queda reflejado en el generador específico hasta 1mA . Este comportamiento refleja una activación masiva de las células perisomáticas, que como ha sido descrito, alcanzan más fácilmente la activación máxima que las células piramidales, cuyos axones se ven proporcionalmente activados en relación al alcance espacial de la corriente activadora y por tanto a su intensidad (Ver Fig. 26).

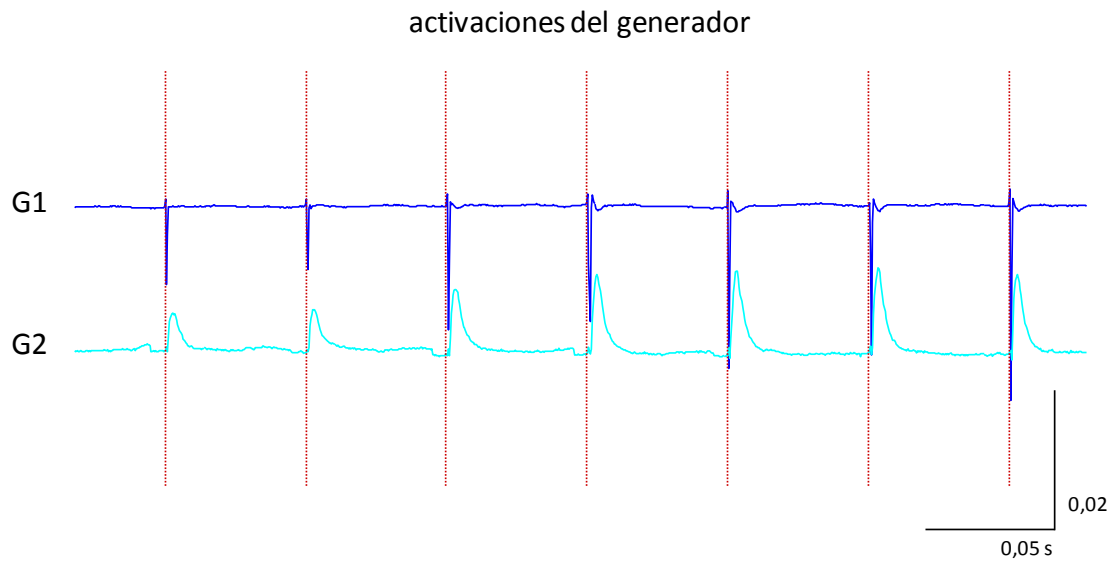


Fig. 26. Dinámica del generador recurrente. Tren de estímulos antidrómicos de intensidad creciente provocados en alveus. El generador que captura específicamente la actividad excitadora (G1) muestra el efecto de la activación directa de los axones de las células piramidales, que provoca el aumento progresivo de la espiga. El circuito recurrente activado por la estimulación directa de los axones de las células principales (G2) alcanza antes el máximo de activación, criterio característico de identificación de la población de interneuronas perisomáticas. (Intensidad incrementada 50: A cada 60ms)

Al estudiar en profundidad las características del generador se ha visto que la varianza con la que contribuye al LFP es mínima, menor de 0.03 ± 0.007 ($n=4$). Por otro lado, el perfil espacial que muestra el generador tiene un marcado máximo a la altura de somas y que cubre de forma específica la región perisomática del estrato piramidal (Ver Fig. 27). En lo referente al curso temporal del generador y a la dinámica del mismo, se puede apreciar la constante y baja amplitud de los eventos que lo forman. En el caso de la extracción del generador a partir de un LFP espontáneo vemos que las características obtenidas se mantienen, tanto para el patrón de la activación temporal como para el perfil espacial.

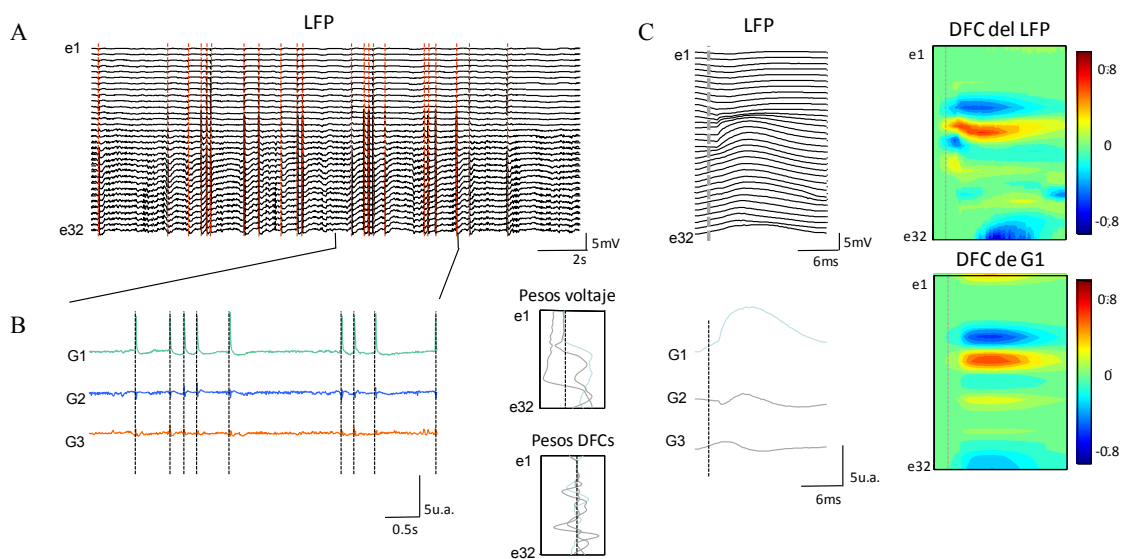


Fig. 27. Identificación del generador correspondiente a la inhibición recurrente en CA1 a partir del LFP espontáneo. A. Provocando eventos aleatorios antidrómicos, podemos discriminar y aislar la entrada sináptica inhibitoria correspondiente al circuito

___ 6. Generador de actividad inhibitoria recurrente en el LFP durante actividad espontánea

recurrente. **B.** El único componente ACI que contiene actividad asociada a los estímulos antidrómicos es el G1, cuya distribución espacial (Peso de Voltaje) y de corrientes (DFC) es fundamentalmente perisomática. **C.** Al hacer el DFC a partir del LFP reconstruido del generador recurrente se puede observar cómo el perfil de corrientes se mantiene, proporcionando incluso las fuentes y sumideros específicos de la inhibición, sin contaminación de corrientes espúreas que pudiesen interferir durante el potencial provocado mediante el estímulo.

Con el fin de confirmar la naturaleza química del generador perisomático se han realizado experimentos farmacológicos (Ver Fig. 28). Mediante la inyección local de BIC (bloqueante de receptores GABAérgicos utilizado en capítulos anteriores), se ha detectado una disminución del potencial y de las corrientes virtuales específicas del generador perisomático. De hecho la amplitud del potencial reflejado en el generador analizado disminuye de la misma forma, ratificando el carácter inhibitorio de las corrientes generadas por las interneuronas en esa región de las células principales. Además, el registro extracelular ha proporcionado actividades unitarias de células perisomáticas recogidas en el generador perisomático, que muestran un autocorrelograma que encaja con las características atribuidas al perfil inhibitorio según los criterios de Csicsvari (1998).

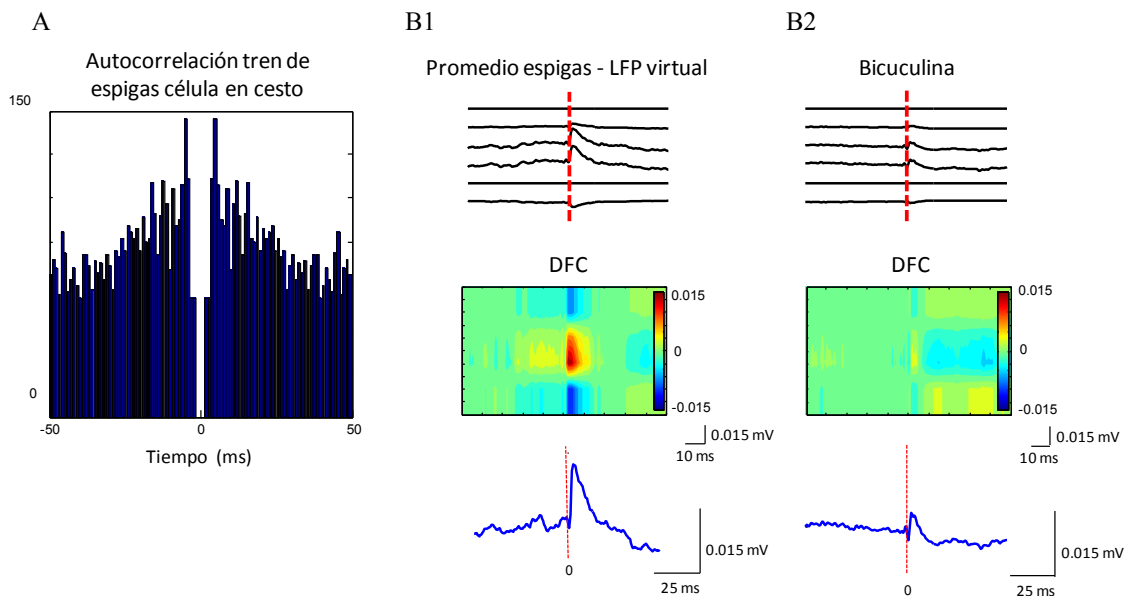


Fig. 28. Correspondencia unitaria presináptica y farmacología del generador LFP recurrente. **A.** Autocorrelograma de una célula en cesto con cuyo tren de espigas se construyó un promedio del LFP virtual recurrente. **B.** Perfil espacial, DFC y promedio de la activación en la capa somática de CA1 antes (1) y después (2) de la inyección local del bloqueante GABAérgico (BIC).

6.3.2. Caracterización espacial del generador recurrente inhibitorio

Al igual que hicimos para los principales generadores del hipocampo en el capítulo 4, se ha estudiado la correlación espacial y la coherencia espectral a lo largo del eje septo temporal del hipocampo. Los datos de cros-correlación obtenidos al comparar las posiciones 4-5, 5-5.5, 4-6 han sido 0.7, 0.5 y 0.1 respectivamente, con una Tau que cae de un ajuste absoluto (0s) a una total independencia (-260) (Ver Fig. 29A).

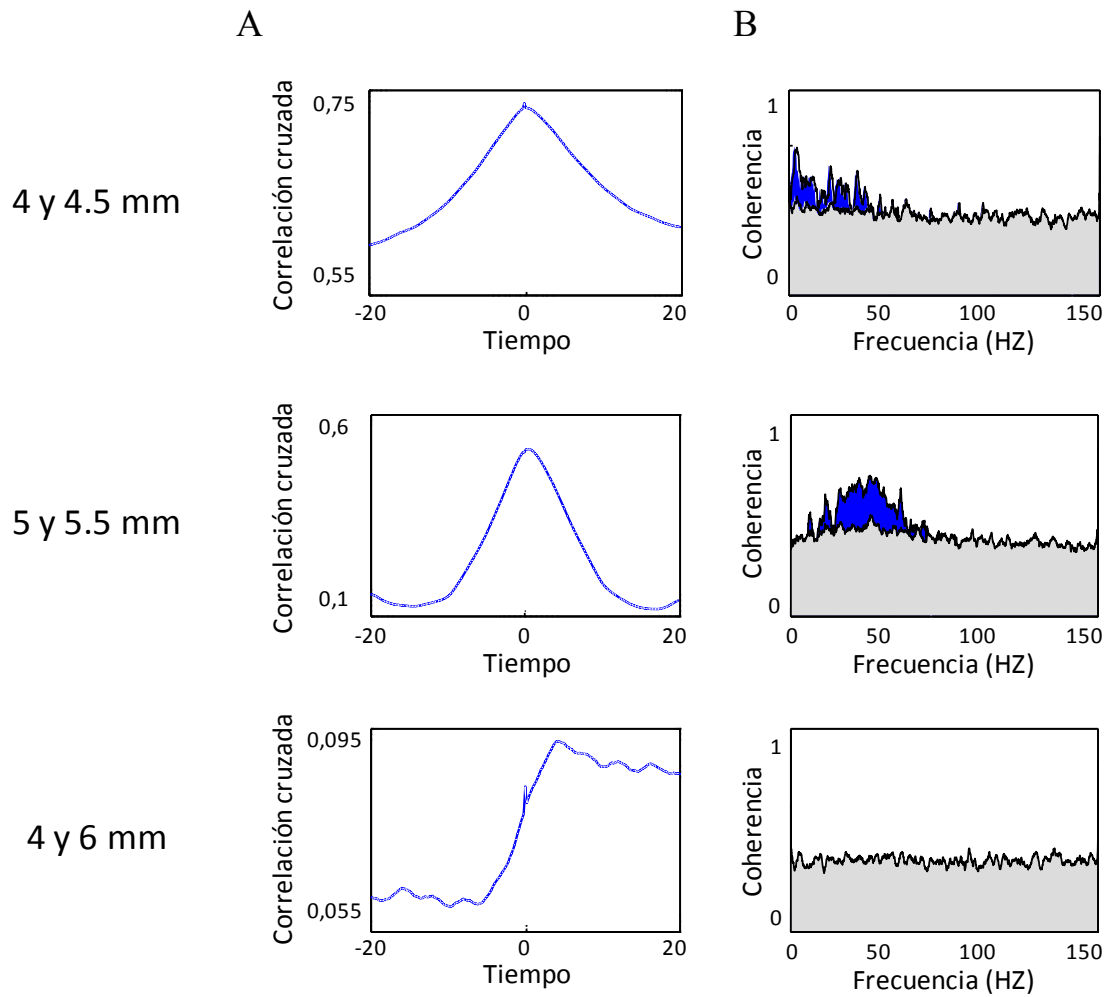


Fig. 29. Coherencia espacial y espectral del generador recurrente. Se ha comparado la activación del generador recurrente entre distintas posiciones del eje septo-temporal del hipocampo, lo que ha permitido calcular la correlación cruzada (A) y la coherencia espectral (B) entre distintas señales. Se han tomado como representativas las comparaciones realizadas entre las distancias 4 y 4.5mm, 5 y 5.5mm y entre 4 y 6mm desde Bregma.

Se ha encontrado cierta similitud entre las correlaciones y las coherencias, puesto que las frecuencias significativas han disminuido a medida que la distancia entre señales aumentaba. Es decir que, entre las coordenadas 4 y 5 se muestra una frecuencia coherente hasta 50Hz, que llega a valores de hasta 0.8, mientras que entre 4 y 6mm desde Bregma no se mantiene coherencia significativa para ninguna de las frecuencias del espectro. En el caso intermedio, señales registradas en coordenadas 5 y 5.5, vemos que se mantienen las frecuencias de 10-50 Hz (Ver Fig. 29B).

6.4. Discusión

En el presente capítulo se muestra la presencia de un generador inhibitorio perisomático responsable de la actividad recurrente en la región de CA1 de hipocampo. Su identificación ha permitido la cuantificación de la contribución de las poblaciones interneuronales al LFP espontáneo. La extracción del generador perisomático permitirá conocer cuál es la dinámica de la población presináptica inhibitoria y las

___ 6. Generador de actividad inhibitoria recurrente en el LFP durante actividad espontánea

relaciones que mantiene con otros generadores durante el procesamiento de la información. Hasta ahora se ha propuesto el papel modulador de las poblaciones inhibitoras dentro de los circuitos sinápticos, sin embargo no hay precedentes de la lectura de la actividad poblacional con la resolución temporal que ofrece la extracción de su generador específico mediante el ACI.

Las neuronas perisomáticas son las responsables del circuito recurrente que produce corrientes inhibitorias en las neuronas piramidales. Sin embargo hay descritas anatómicamente dos poblaciones de interneuronas que sinaptan en el soma y dendritas apicales de las células principales de CA1, las células en cesto y las axo-axónicas o candelabro en base a su disparo durante SPWs. Con los datos obtenidos hasta el momento no tenemos posibilidades de identificar una u otra población como origen del generador. Para ello habría que llevar a cabo una identificación mediante el registro de eventos unitarios de cada una de las poblaciones.

El generador identificado posee una distribución perisomática característica y su envolvente temporal responde a una farmacología GABAérgica por lo que se le puede considerar responsable de la actividad recurrente en CA1. Mediante su perfil de corrientes y localización espacial ha resultado contribuir de forma muy escasa al LFP total. En concreto, menos de un 0.05% del potencial extracelular está generado por la población de interneuronas perisomáticas de CA1, a diferencia de la alta varianza que muestran otros generadores inhibidores como el GC_{som} de GD. Estos resultados contrastan con el, no despreciable número de interneuronas en esa región y con su alta tasa de disparo, lo que llevaría a suponer una gran contribución al potencial generado en las células piramidales. Una posibilidad para explicar los datos obtenidos es que el potencial que generan no sea visible en eventos definidos, generados por grupos funcionales específicos como en el caso del generador de Sch, sino que las corrientes producidas generen corrientes DC que se traduzcan en un tono mantenido en todo el LFP, a modo de actividad tónica. En el laboratorio se han realizado modelos que han ayudado a entender el mecanismo por el que podría ser explicada esta actividad. En un LFP virtual, modelado a partir de tres generadores, dos de ellos inhibidores (GM1 y GM3) y un tercero excitador (GM2), situados en la región perisomática (GM1, 260Hz), a 250-400 μ m por debajo de somas (GM2, 43Hz) y a 350-500 μ m también por debajo de somas (GM3 a 80Hz). Teniendo en cuenta que GM1 provocaba un DC se calcularon las varianzas en el caso en que se mantuvo el DC y en el que éste se eliminó. Como se aprecia en la figura 30 la contribución del GM1 en cada caso disminuyó de 0.85% a 0.2%, dando una idea de la relevancia del potencial DC en el LFP total. A partir de este resultado podemos sugerir una nueva interpretación de la varianza cuantificada en el generador recurrente y es que podría tratarse de un generador que por su alta frecuencia de disparo generase básicamente corrientes DC, aportando en realidad mucha varianza al potencial total, quedando enmascarada por las limitaciones mediante multielectrodos que únicamente permiten un registro en AC. De hecho en las activaciones temporales se reconoce un patrón basado en eventos de pequeña amplitud, con una línea base plana y muy constante en el tiempo. Estos resultados indicarían una activación celular estable, formada por grupos funcionales que de existir no reunirían una alta cantidad de interneuronas que pudiesen generar corrientes de gran amplitud.

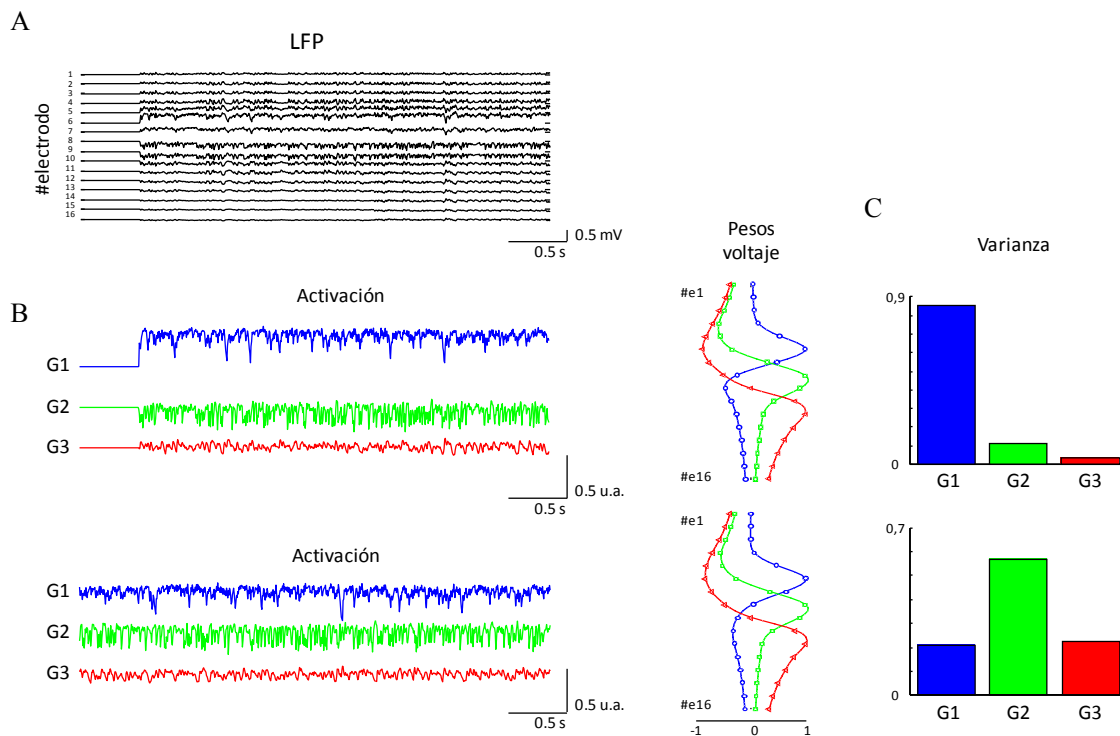


Fig. 30. Contribución del DC al LFP. **A.** Modelo en el que se ha construido un LFP en base a tres generadores. G1 inhibitorio perisomático (260Hz) al que se le ha introducido un componente DC que provoca un aumento en la línea base, G2 excitador a 250-400 μ m de distancia por debajo de la capa de somas (43Hz) y G3 inhibitorio a 350-500 μ m por debajo de somas (80Hz). **B.** Generadores extraídos mediante ACI, manteniendo la contribución DC visible en los cursos temporales correspondientes (1). Los mapas espaciales de Voltaje y de corrientes (2) muestran la localización del máximo que coincide con la entrada sináptica asignada a cada generador. En las varianzas se aprecia como el componente mayoritario es el correspondiente al G1, el que contiene el componente DC, contribuyendo en más de 0.85% al LFP total. **C.** Como contrapunto se muestra el caso en el que se ha eliminado el DC para la extracción de los generadores (1). Los mapas espaciales de Voltaje y corrientes se mantienen (2) al caso presentado en B. Sin embargo, las varianzas muestran que ha habido un cambio en las contribuciones de cada uno de los generadores. En este caso la varianza del generador perisomático ha disminuido a tan solo un 0.2%, dejando patente el efecto del DC que puede producir una población neuronal en el LFP.

En algunos trabajos se han descrito registros de IPSPs provocados por una células en cesto de CA1 (Glickfeld et al., 2009), identificada farmacológicamente y por la localización de su árbol axonal en el estrato piramidal. Por tanto se ha observado que le disparo de una sola célula en cesto de hipocampo puede generar un LFP detectable, aunque la razón por la que su actividad no suele ser reconocible en el potencial extracelular es porque las células no disparan potenciales aislados, sino que lo hacen a alta frecuencia y solapando sus árboles dendríticos, pudiendo generar un DC en la población postsináptica oculto en los registros habituales de LFP. Sin embargo harían falta más experimentos para corroborar esta hipótesis, en los que se pudiesen establecer relaciones directas entre el disparo de las interneuronas y los cambios en DC registrados mediante pipetas o multielectrodos por el momento no disponibles.

En principio podría resultar confuso la aparición de eventos de pequeña amplitud en la activación temporal del generador cuando se ha descrito la conexión entre interneuronas mediante uniones de tipo gap. Estas conexiones permitirían la mejor sincronización entre neuronas y por tanto la formación de grupos funcionales que al disparar ocasionaran eventos de mayor amplitud. A estos resultados se suman también los datos de correlación cruzada, que se mantienen altos (0.7) a distancias cortas (500 μ m) y caen

después abruptamente al aumentar la distancia, lo que indica un acoplamiento funcional pobre de las células presinápticas que dan lugar al generador. Sin embargo ya vimos en el capítulo 4, que existirían distintas posibilidades para explicar la baja correlación espacial, como la falta de sincronización de las neuronas postsinápticas o una proyección muy específica de cada una de las células que se manifestase en una activación independiente de cada una de las células postsinápticas. Este razonamiento podría aportar también explicación a la caída de coherencia a lo largo del eje septotemporal del hipocampo. Es en los análisis del rango de frecuencias cuando encontramos una clara relación con el ritmo gamma, sugerida ampliamente en la literatura. A distancias cortas las frecuencias hasta 50Hz son las únicas que se mantienen entre distintas localizaciones, aunque caen con la distancia hasta llegar a desaparecer al comparar señales separadas por 1.5mm. Resulta curioso el hecho de que las interneuronas con alta tasa de disparo compartan únicamente frecuencias en el rango del gamma bajo, más aún si se tiene en cuenta la posible formación de un sincitio entre la población de células perisomáticas. Sin embargo hay que tener en cuenta que diversos factores podrían intervenir en la sincronización esperada de una población conectada por uniones gap. Por un lado hay que considerar la baja varianza del generador responsable de la actividad recurrente, por lo que puede ser que estemos trabajando con una activación que no refleje la actividad real de la población presináptica con totalidad. De hecho, la actividad DC desaparece por los filtros aplicados durante el registro con multielectrodos, con lo que ya perderemos una fuente considerable de información. Es más, esa actividad DC puede ser la que, al ser común y estable en todo el hipocampo, sea originada por las uniones gap, creando un estado común de actividad tónica, complementada por otra más específica e independiente a frecuencias más bajas (<50Hz). Otra posibilidad es que, como ya se ha descrito en algunas ocasiones, las conexiones mediante uniones gap sean dependientes de algún estado fisiológico concreto, y sea entonces cuando las coherencias y potenciales sincronizados aparezcan. En cualquiera de estos casos los resultados obtenidos en este capítulo muestran cómo es posible la lectura de la activación de un generador cuya contribución al LFP espontáneo es mínima, gracias a la alta resolución temporal a la que tenemos acceso mediante el método de extracción con ACI.

**7. ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN
DE LA DEPRESIÓN DE LEÃO
DESDE EL ANÁLISIS DE GENERADORES
DE HIPOCAMPO**

7. ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE LA DEPRESIÓN DE LEÃO DESDE EL ANÁLISIS DE GENERADORES DE HIPOCAMPO

7.1. Introducción

Como ya hemos visto en capítulos anteriores, las fuentes neuronales del LFP de hipocampo pueden ser extraídas mediante su análisis basado en el ACI. Los resultados hasta ahora nos han aportado información acerca de la actividad sináptica y contribución de múltiples tipos neuronales al potencial extracelular con una resolución temporal sin precedentes. Es de preveer que la aplicación de los generadores a diversas patologías haga posible mejoras en el diagnóstico de las mismas o que ayude al entendimiento de disfunciones neuronales que hoy en día permanecen sin resolver. Su empleo en alteraciones tales como la migraña o el ictus cerebral, a los que se encuentra asociada la Depresión de Leao, podría representar un acercamiento a las bases neuronales que subyacen a tales trastornos cerebrales. En este capítulo se intentará abordar el estudio de la *Spreading depression* utilizando como herramienta los generadores conocidos hasta el momento, analizando su dinámica durante el paso de la onda por las distintas regiones de hipocampo.

7.1.1. *Spreading Depression* como modelo de despolarización propagada

La depresión de Leão o *Spreading depression* (SD) es una onda macroscópica lenta (~10mm/min) autopropagada, que causa una despolarización neuronal masiva de carácter transitorio, visible por la caída del DC del hipocampo. En el hipocampo, la SD se inicia con un tren de potenciales de acción sincronizados en células contiguas, constituyendo un frente de onda con espigas poblacionales (EPs) a una frecuencia característica, definida por un marcapasos de actividad subumbral (60-80 Hz). Esta onda está vinculada a patologías cerebrovasculares, como el ictus cerebral en el que causa la muerte neuronal, y a la migraña clásica, donde es responsable de la fase de aura (Leão, 1944; Marshall, 1959). Es por ello que ha suscitado gran interés en el campo de la neurociencia, especialmente en el desarrollo de estrategias dirigidas al bloqueo de su generación y propagación. Sin embargo sus bases biofísicas y celulares son poco conocidas y mecanismos como el de la sincronización celular en el frente de la onda aún no han sido esclarecidos, pese a que podría ofrecer claves acerca de su propagación. La despolarización que genera el evento suele abarcar de 1 a 2mm, espacio en el que se mantiene la frecuencia en el avance de la onda.

En el frente de onda de la SD se observa un tren de descargas poblacionales cuyo mecanismo de sincronización, aún desconocido, podría ofrecer algunas claves acerca de su propagación. Entre sus peculiaridades está la zona de inicio de los potenciales, ya que se originan en las dendritas proximales de las células piramidales de hipocampo y no en la región Soma/axón. Se ha observado también una actividad subumbral de tipo marcapasos que parece subyacer a la sincronización de los disparos unitarios. Este conjunto de potenciales sincrónicos se desarrolla a una frecuencia estable de 60-80 Hz.

En principio se postularon diversos orígenes para la despolarización, como los niveles de K^+ , canales a los que se les atribuía la generación de la SD, o los de Glutamato, aunque los primeros quedaron descartados al comprobar que la despolarización ocurría antes que el aumento de K^+ y los segundos al

encontrar que mediante su bloqueo con DNQX y CPP la SD no era eliminada (Herreras et al., 1986). También las ondas lentas de excitabilidad glial (Nedergaard, 1991) o propagaciones mediadas por vasoconstricción se ha barajado como responsable del origen de la despolarización, pero hasta ahora los resultados no han sido concluyentes. Datos experimentales previos, además de modelos, indican la presencia de canales iónicos aún desconocidos cuyas características cinéticas y funcionales no han sido descritas hasta el momento (Makarova, 2010) y que podrían explicar el particular comportamiento de las neuronas durante este evento masivo. De hecho, identificar los iones que fluyen por estos canales (permeabilidad y selectividad) y definir su localización en la membrana celular de las neuronas ayudaría a esclarecer el mecanismo electrogénico de la onda SD y abrir paso a la intervención farmacológica. A día de hoy, además de descartar la transmisión sináptica química, se han encontrado evidencias de una participación de uniones electrotónicas tipo gap como elemento sincronizador.

La SD está caracterizada por la pérdida de la homeostasis iónica celular y por la drástica redistribución de los iones que se genera entre los compartimentos extra e intracelular (5,42). El incremento en la conductancia de la membrana que se origina durante la SD provoca cambios en el tejido, que llega a hincharse, dificultando técnicamente los registros del potencial de membrana mediante *patchclamp* (Cummins et al., 1991; Haddad et al., 1990; Haddad et al., 1990; Krnjevic y Leblond, 1989). Un examen más exhaustivo sólo podría lograrse mediante técnicas de análisis con mayor resolución temporal, por ello, junto al estudio de la propagación de la SD se ha llevado a cabo el análisis de los generadores de la actividad neuronal en hipocampo cuyos resultados han aportado importantes resultados acerca de la conectividad entre las diferentes poblaciones neuronales. Este análisis tendría una directa aplicación en el estudio de la SD puesto que la recuperación de la masiva despolarización que conlleva la onda de depresión puede arrojar datos acerca de cómo y en qué orden tiene lugar el establecimiento de conexiones y de la localización de los generadores subcelulares o entradas sinápticas que tienen lugar en las células principales durante la despolarización.

Hasta ahora, utilizando la combinación de ICA/CSD hemos conseguido aislar los principales generadores del LFP de hipocampo, permitiendo a su vez su lectura en paralelo durante la actividad de las múltiples poblaciones neuronales de origen. Así pues, habiendo podido aplicar esta nueva técnica en registros de actividad espontánea, estaremos en disposición de obtener resultados durante eventos específicos del LFP como la SD. De hecho, a pesar de la propagación generada en las EPs del frente de onda, podremos comprobar no sólo su perfil de corrientes en la células postsináptica, sino su población de origen. Por tanto, mediante el análisis de la estructura espaciotemporal de las espigas somatodendríticas, las fuentes de corriente subcelular y los cambios de la dinámica de los generadores se ha abordado el estudio del frente de la onda SD, así como su propagación a lo largo del hipocampo dorsal y su paso por las distintas regiones de dicha estructura.

7.2. Material y métodos

Para la descripción del procedimiento experimental general y los análisis detallados acerca de la obtención de generadores y densidad de las fuentes de corriente, remitirse a la sección Material y Métodos de la página (Sección 2).

Para los experimentos realizados se ha utilizado un modelo de SD *in vivo*, en rata anestesiada. Las ondas de despolarización se provocaron mediante la inyección local de microgotas de una solución de KCl 1M en diferentes estratos del perfil somatodendrítico de las células piramidales de hipocampo. Los registros extracelulares fueron obtenidos con multielectrodos Michigan de 32 canales (50 μ m de separación) que se localizaron en el eje CA1-GD del hipocampo dorsal.

En los experimentos en los que se ha combinado la aparición de la onda SD con la frecuencia Theta para observar interacciones, se ha provocado un ritmo a 4Hz sostenido mediante la inyección intraperitoneal de fisoestigmina. También para comprobar interacciones entre distintas frecuencias se han utilizado estímulos antidrómicos provocados desde alveus.

7.3. Resultados

El empleo de registros extracelulares en el análisis de modelos de SD *in vivo*, ha permitido obtener datos acerca de su frente de onda. La generación de la SD viene precedida por el disparo de un tren de EPs a una frecuencia definida de entre 60-80Hz que dan paso a la despolarización masiva de las neuronas que quedan al paso de la propagación. Los detalles de las espigas que marcan la llegada de la onda propagada aportarán información del mecanismo de sincronización y origen de la despolarización.

En primer lugar se ha detallado la estructura y morfología de las EPs del frente de la onda SD mediante análisis de fuente de corriente. Si observamos el frente de EPs completo vemos que el flujo de corrientes tiene forma triangular, de forma que, manteniendo la frecuencia durante todo el frente, la amplitud de los eventos y por tanto la despolarización de las neuronas es mayor en el punto central, mientras que el inicio del mismo serviría para hacer entrar a las células en la frecuencia establecida, despolarizarlas y posteriormente dejar paso a la despolarización masiva (Fig. 31). En los perfiles obtenidos para el caso de eventos aislados, observamos un origen somatodendrítico con un sumidero muy marcado que precede a las salida pasiva de corriente que flanquea la entrada principal de iones. No hay datos farmacológicos que indiquen cual sería la corriente activa en este perfil, aunque la aparición previa del sumidero en somas a las fuentes circundantes indicaría que la entrada de corrientes, debida a la excitación de las células piramidales, sería la responsable del tren de potenciales del frente de la SD. Además, esta entrada de corrientes a la célula se ve acompañada de una inhibición posterior perisomática, cuyas responsables serían las interneuronas involucradas en el circuito recurrente, activadas por las mismas células piramidales (Fig. 31).

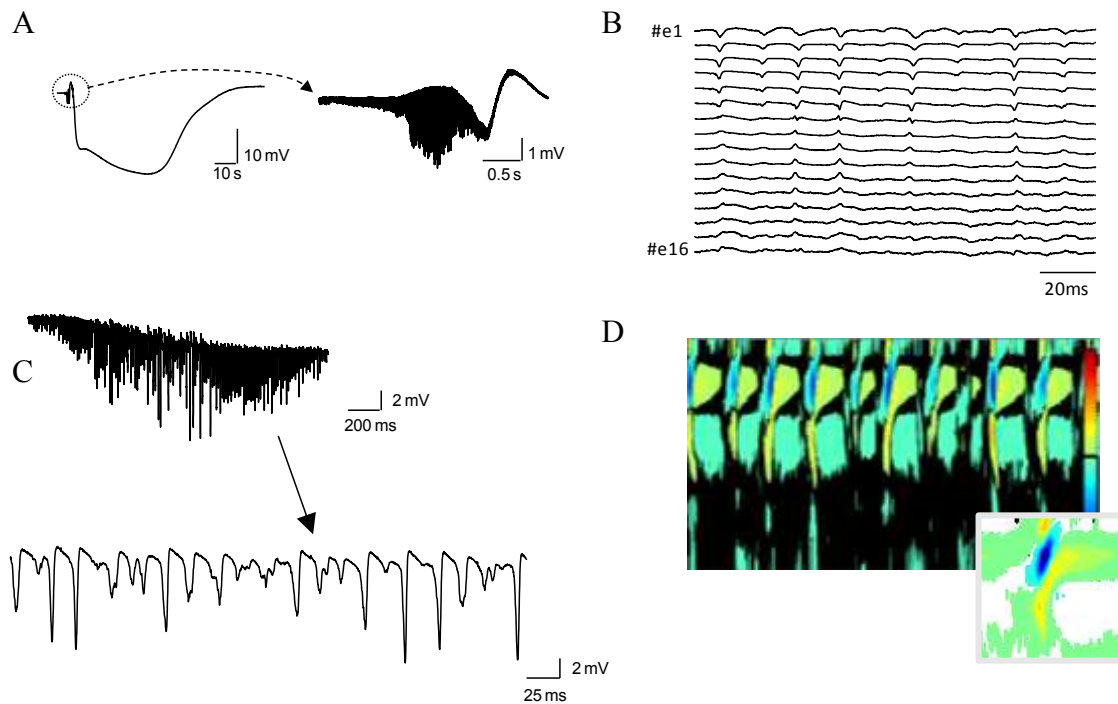


Fig. 31. Spreading Depression. A. Registro de un LFP registrado en DC durante la SD con detalle de la actividad presente en el frente de onda. B. Detalle de las EPs que preceden a la despolarización a una frecuencia mantenida (85Hz). C. Registro en AC de una SD a lo largo del eje somatodendrítico de una célula piramidal de CA1 de hipocampo. D. Detalle del frente de onda y DFC ejemplo de los EPs.

La frecuencia constante a la que aparecen los distintos eventos del frente que precede a la despolarización puede resultar un elemento clave para la propagación, puesto que parece preparar al tejido para entrada masiva de iones en las células. Según los resultados obtenidos existe cierta relación inversa ($r^2=0.24$) entre la amplitud y la duración (W50). Además, las EPs más pequeñas desenmascararon componentes a modo de espiguillas de amplitud menor a 1mV que no estuvieron presentes en EPs de amplitud máxima (Fig. 32).

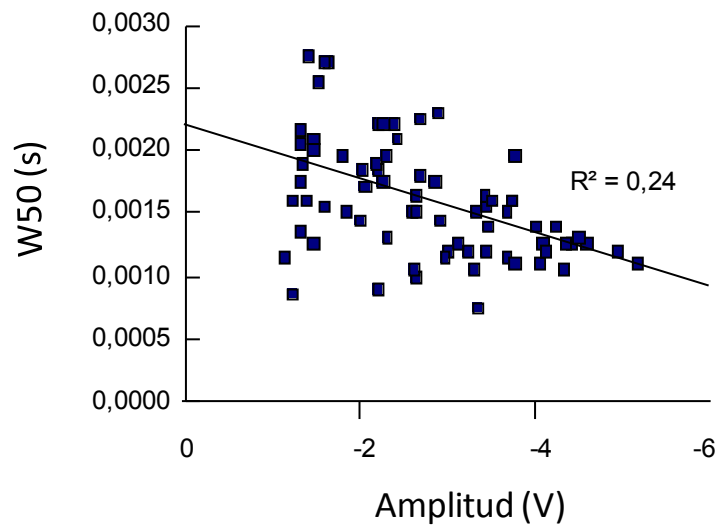


Fig. 32. Caracterización del frente de onda. Representación de la duración W50 en relación a la amplitud de las EPs.

A partir de estos datos se ha investigado el comportamiento de los distintos generadores durante la SD. Su dinámica durante la despolarización podría dar información de cómo se comportan las neuronas de las distintas regiones del hipocampo al paso de la onda propagada. Ante una SD provocada en el estrato oriens de CA1, reconocible desde el hemisferio contralateral, la onda se propaga a radiado, después a CA3 y más tarde a la hoja superior de fascia (por limitaciones en la longitud de los multielectrodos no se ha conseguido el registro simultáneo de la región de oriens y la hoja inferior de GD). Esta propagación a través de las distintas regiones del hipocampo queda reflejada en los generadores, que sufren un silenciamiento al paso de la SD. En primer lugar se silencia el generador de Sch y a continuación los correspondientes a Fisura (LM) y Fascia (GC_{som}) (Fig. 33). A continuación, la onda pasa a la región de CA3 y cuando las células piramidales quedan silenciadas, las espigas del frente de la SD no son recogidas por él, sino por otro generador que aparece a más profundidad, un generador desconocido cuya identificación celular no se ha llevado a cabo. Al aparecer 200 μ m por debajo de la región perisomática de CA3 podrían ser las dendritas apicales de las células piramidales, que al igual que ocurre en CA1 ese espiguelo va a pasar al hemisferio contralateral (Fig. 33). Además de este nuevo generador, el resto de fuentes de GD: CA3, Perforante y GD_{som} parece que son los primeros en recuperarse (en 30-40s), mientras que el generador de Sch y fisura permanecen silentes durante minutos.

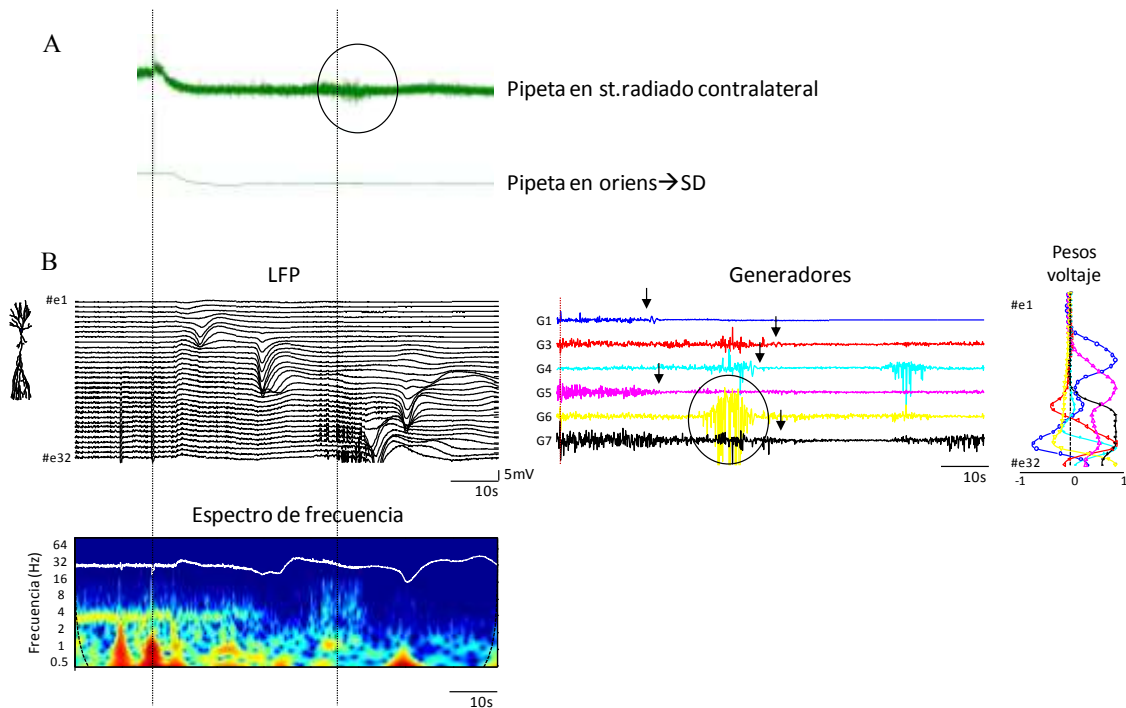


Fig. 33. Generadores de SD. A. Registros del LFP en DC durante SD. En el trazo superior se muestra el registro contralateral de la onda mediante una pipeta situada en el estrato radiado. La caída del DC confirmará que la SD ha tenido alcance bilateral. El registro inferior se ha llevado a cabo mediante la pipeta que provocó la SD, situada en el estrato oriens de la región de CA1 de hipocampo. B. Registro del LFP en AC de cada uno de los 32 canales del multielectrodo utilizado para mapear el eje CA1-GD/CA3 de hipocampo. En él se refleja la despolarización de distintas regiones: comienza en oriens de CA1 (25s) y continúa por radiado (38.5s), CA3 (61s) y finalmente se propaga a la hoja superior del GD (69s). Las flechas indican el silenciamiento en cada generador al paso de la despolarización.

Por último, se ha realizado el mismo experimento durante un estado de ritmo theta estable. En este caso las oscilaciones de 4 Hz se muestran de forma específica en el generador LM. En el momento de la llegada de la onda SD a la región de radiado y del estrato lacunoso-moleculare, vemos que la frecuencia theta desaparece tanto del LFP como del generador (Figura 33).

7.4. Discusión

La onda SD es un evento masivo que inactiva amplias regiones de tejido. La despolarización que genera ha sido utilizado como herramienta de silenciamiento específico, puesto que su propagación recorre estratos definidos que pueden posteriormente ampliarse en el espacio o desaparecer. Los factores que influyen en la onda de depresión son muy variados, aunque el origen real de su aparición y los estados que permiten su propagación son aún desconocidos.

En este trabajo se ha abordado el estudio de la SD en modelos de rata anestesiada mediante la aplicación de ACI, utilizando la información que nos proporcionan los generadores para entender cómo actúan las distintas poblaciones de neuronas ante su propagación. Además, la caracterización del frente de onda podrá dar pistas para entender cómo se genera la sincronización que precede a la despolarización y qué poblaciones son las que la dirigen.

Mediante análisis de fuentes de corrientes hemos obtenido información sobre la sincronización neuronal en el frente de onda. En los resultados se muestra una relación inversa entre la amplitud y la duración de los eventos, sumado a la observación de que aparecen eventos truncados a la frecuencia constante de 85Hz en el frente de la SD, incluso cuando la EP no ha sido disparada. Estos datos podrían sugerir un doble mecanismo de sincronización con acoplamiento variable, uno que organizaría la formación de grupos funcionales y un segundo que sincronizaría estos grupos. Estos resultados representan la primera prueba experimental de la existencia de grupos funcionales de células piramidales, anteriormente sólo detectada por acoplamiento de colorante (Herreras et al., 1986).

En los CSDs construidos a partir de los potenciales que aparecen en el frente de la onda a frecuencia fija aparece en primer lugar un sumidero marcado perisomático acompañado de una inhibición posterior. Esta inhibición perisomática viene originada por la activación de las células piramidales del circuito recurrente, puesto que si la activación de interneuronas y células principales tuviese lugar simultáneamente por las proyecciones de una misma población presináptica las corrientes se cancelarían al ocurrir en el mismo momento. De este hecho concluimos que la despolarización viene provocada por la población de origen que sinapta únicamente con las células principales y que las interneuronas perisomáticas no ejercerían función de sincronización de las primeras, es decir, no se les podría atribuir el papel de marcapasos en el frente de la SD.

Hasta el momento, la pequeña ventana temporal en la que se puede afectar el frente de onda (1-2s) ha supuesto ciertas limitaciones metodológicas, por lo que en un futuro será necesario hacer un barrido completo de frecuencias. Aún así, los experimentos realizados con trenes de potenciales antidrómicos han mostrado que al aumentar la amplitud de los potenciales exógenos se fuerza al sistema natural a seguir la frecuencia impuesta artificialmente. El disparo forzado será más potente que el intrínseco del frente de onda, obligándole mediante despolarizaciones de la membrana a alterar el marcapasos que sincroniza las

células. No obstante será necesario un barrido de frecuencias para encontrar aquella que pudiese desactivar el frente de la SD y resetear el circuito.

La aplicación del método de ACI en la SD nos ha proporcionado varios generadores reconocibles. Cada uno de ellos se silencia al paso de la onda de despolarización que sigue un recorrido definido. En primer lugar, al ser la SD originada en oriens de CA1, se limita a dicho estrato, para más tarde invadir radiado por el que llega a la región de CA3. Desde las células piramidales pasará a las granulosas para completar su paso por todo el hipocampo. Cuando la SD llega propagada a Fascia no sabemos si se continúa propagando antidrónicamente por los axones de la vía perforante hasta corteza entorrinal o si por el contrario se debilitaría. Ambos casos serán posibles y se necesitarán más experimentos para seguir la despolarización en otras estructuras. Como hemos observado, el lugar donde más claramente han aparecido los EPs del frente de la onda ha sido en CA3, habiendo sido incluidas en un generador no identificado hasta el momento. Por los datos obtenidos a partir de los CSDs, podemos afirmar la naturaleza excitatoria de las corrientes de las EPs y por tanto al generador. Además, dada la localización perisomática podemos especular con el origen del generador, siendo las células piramidales de CA3 las mejores candidatas a producir tales potenciales. Otro dato que apoyaría esta idea es la identificación de las EPs en el hemisferio contralateral, únicamente en el momento en que la SD recorre CA3, lo que ocurriría gracias a la comisura que conecta los dos hemisferios.

Por último, un resultado que ha llamado nuestra atención ha sido la desaparición de la frecuencia Theta cuando la SD ha ocupado el estrato radiado, cuando hasta ese momento las oscilaciones habían sido contenidas en el generador LM. Si hacemos un seguimiento de la frecuencia de 4Hz, o ritmo Theta, vemos que posee un marcado predominio en el LFP hasta que la SD es generada en oriens. En ese momento su potencia cae hasta que desaparece por completo en el momento que la onda ocupa el estrato radiado y el lacunoso-molecular. Estos resultados señalarían a las interneuronas O-LM como posibles participantes en la generación del ritmo Theta, puesto que el silenciamiento de sus somas (estrato oriens), estaría relacionado con una disminución en las oscilaciones y la despolarización de sus dendritas (estrato lacunoso-molecular) se podría asociar a la total desaparición de la frecuencia de 4Hz característica.

En conclusión, se ha mostrado que la onda de despolarización SD puede ser utilizada como herramienta de despolarización selectiva de diferentes regiones de hipocampo y de cómo el análisis de la dinámica de sus generadores al paso de la despolarización podrá aportar claves para el estudio de sincronizaciones en las poblaciones presinápticas estudiadas. Este será un claro ejemplo de la aplicabilidad de los generadores de hipocampo al estudio de patologías asociadas a hipocampo, aportando un nuevo concepto al estudio de las alteraciones neurofisiológicas.

8. DISCUSIÓN GENERAL

8. DISCUSIÓN GENERAL

La codificación y el procesamiento de información en el SN se realizan en base a la actividad de grupos neuronales de composición rápidamente cambiante, y localizados en distintas regiones y estructuras. La convergencia de diferentes vías anatómicas en cada población es una constante en el diseño estructural y operativo. Hasta ahora, la activación conjunta de varios grupos neuronales ha representado un problema a la hora de obtener conclusiones concretas y firmes sobre la identidad de las poblaciones aferentes que la motivaron, aunque su estudio sigue siendo ineludible para abordar la actividad cerebral. En ese sentido el desarrollo tecnológico ha permitido avances en el campo de la fisiología, creando nuevos dispositivos que facilitan el registro de un número cada vez mayor de neuronas. Algunas técnicas no invasivas, basadas en el estudio de imágenes funcionales, están facilitando enormemente la obtención de mapas de conectividad funcional que permiten visualizar los grandes flujos de información y las estructuras implicadas en cerebro intacto asociados a tareas comportamentales o cognitivas. Sin embargo, los resultados obtenidos no alcanzan la resolución espacial o temporal suficiente para describir con la precisión necesaria los mecanismos de integración de señales y cómo se elaboran otras nuevas a partir de aquellas, que constituye en esencia el objetivo final de la Neurofisiología. Casi siempre, el problema se puede reducir a una carencia de resolución espacial o temporal y es una constante que las técnicas con mayor capacidad espacial tienen escasa resolución temporal y viceversa. La combinación de técnicas de nueva creación y otras más robustas como la Electrofisiología, sigue siendo una opción aventajada para el estudio de la Neurociencia. Los dispositivos de registro electrofisiológico presentan dos grandes ventajas. Por un lado, miden la variable de interés de forma directa, sin magnitudes interpuestas sobre las que haya que realizar tediosas calibraciones y transformaciones complejas que a menudo requieren conocer el propio sistema que se pretende estudiar (e.g la señal *bold* en FMRI, las señales de calcio intracelular, las imágenes de luminancia intrínseca). Por otro, tienen resolución temporal suficiente para captar hasta los cambios más pequeños y rápido de relevancia fisiológica. Es por ello que el estudio macroscópico de las poblaciones neuronales con técnicas tradicionales aún mantiene su popularidad, e incluso se potencia gracias a los nuevos métodos para manipularla (manipulación génica, optogenética, etc) y la acumulación gradual de conocimientos que permiten la elaboración de modelos matemáticos con gran detalle morfológico y funcional, importantes para el entendimiento de sus bases biofísicas y las relaciones entre los distintos niveles de organización. En esta Memoria nos hemos centrado en una de las variables clásicas que reflejan, quizá como ninguna otra, la complejidad y el dinamismo de la actividad neural. ¿Será por tanto, el estudio del EEG y de los LFPs quien pueda aportar los mecanismos necesarios para conciliar estudios comportamentales con la biología molecular?

Las dificultades técnicas e incertidumbres teóricas alrededor de esta variable ya fueron comentadas en la Introducción. Todas giran en torno al carácter volumétrico de los potenciales generados por la actividad sincrónica de grupos neuronales y por la dificultad en separar las contribuciones independientes de forma que puedan ser adscritas a vías sinápticas conocidas. Baste el ejemplo de las diferencias y similitudes que se encuentran en los LFPs registrados simultáneamente a lo largo del hipocampo. Sin duda, estos problemas han supuesto, hasta el momento, un obstáculo insalvable para el uso estandarizado del EEG. Para sortear este obstáculo, en la presente Memoria se ha planteado un estudio con una orientación estratégica opuesta a la habitual. En lugar de explorar los rasgos comunes espaciales o temporales del LFP con los que encontrar puntos de encuentro con otros medidores de la actividad neuronal, se ha dirigido el foco precisamente a sus heterogeneidades, que lejos de dificultar la interpretación de los

registros, nos ha ayudado a descifrar algunas claves del LFP en términos de aferencias sinápticas. Lógicamente, esta empresa que hasta hace pocos años pudiera parecer inabordable, ha sido posible gracias a la incorporación de nuevas y potentes herramientas de registro y de análisis. La extracción de las fuentes neuronales o generadores del LFP y la posibilidad experimental de estimar su extensión espacial variable a lo largo del tiempo harán del potencial extracelular, a su vez, una herramienta para estudiar los fundamentos del procesamiento y codificación de señales en el hipocampo.

El análisis matemático empleado en la extracción de los generadores del LFP hipocámpico opera sobre grupos de señales, los registros simultáneos, todas ellas constituidas por mezclas de origen espacial diverso, y busca maximizar la independencia espacial entre los componentes de la mezcla. A partir del grupo de señales originales genera otras que denominamos componentes y que están presentes en todos los registros con un peso diferente pero de variación proporcional en el tiempo (Choi 2005; Hutchinson et al., 1985; Makeig et al., 1997). Esta característica de proporcionalidad coincide plenamente con la distribución en el espacio de un campo eléctrico generado desde una fuente cualquiera. En principio, el número de fuentes eléctricas posibles sería el de grupos de sinapsis o unidades sinápticas elementales (Elul, 1972), que sería no mucho menor que el número de neuronas, pero la promediación en el tiempo reduce el número de componentes a tan solo unos pocos en los que se concentra actividad espacial bien diferenciada. Como hemos mostrado en algunas secciones, estos componentes van a coincidir con el campo eléctrico global producido por las entradas sinápticas que generan la mayor varianza del conjunto de señales analizado y que coinciden de forma natural con las principales vías sinápticas principales del hipocampo (Makarova et al., 2011). El hipocampo presenta conexiones anatómicas y funcionales estables y bien estratificadas entre las distintas subregiones que lo conforman. El conocimiento exhaustivo de estas vías, así como elementos específicos de cada una ellas, ha permitido una caracterización de las principales subpoblaciones del hipocampo y de las vías aferentes. Pero no todas han tenido una representación en forma de generador LFP.

Hasta ahora, los conocimientos establecidos acerca del LFP se basaban en la comparación de eventos de campo con registros unitarios, que, en ocasiones, permitían una correlación genérica, y no excesivamente informativa, con ciertos estados fisiológicos y en ciertas regiones especialmente favorables. Sin embargo, con el trabajo presentado en esta Memoria hemos tratado de profundizar en el entendimiento de los campos extracelulares para trasladarlo a un marco donde cada señal pueda ser seguida a lo largo del tiempo y del espacio con facilidad, conociendo qué factores son los que van a influir en nuestros registros, en definitiva, conocer el LFP en sus bases biofísicas y celulares como para poder saber qué información se espera obtener de cada registro en cada punto del hipocampo, que vías sinápticas convergen ahí, y con qué pesos. La profundidad con la que se han conseguido estos objetivos para algunas vías, avala la potencia y resolución del método con el que se ha trabajado, hasta el punto de no esperar un cambio en el LFP, sino de poder predecirlo en base al conocimiento de la dinámica de la población de origen, su contribución cuantitativa, su extensión a lo largo del hipocampo y su influencia sobre otras fuentes que participan en la formación del potencial extracelular.

Sin embargo es imprescindible tener muy presente las limitaciones, en primer lugar del propio LFP como objeto de estudio, y en segundo, las metodológicas, los problemas intrínsecos al registro de una estructura neuronal. Por un lado se ha de recordar que el LFP no refleja toda la actividad de la población neuronal, sino sólo aquella fracción que resista al promediado espacial, esto es a la cancelación de corrientes extracelulares de polaridad opuesta. En este apartado es importante destacar que la reconstrucción de

LFPs virtuales específicos de vía permite “rellenar” una parte de esas corrientes que fueron canceladas por coincidencia espaciotemporal con otras de polaridad opuesta y generadas por otra vía sináptica. Otro factor de incertidumbre proviene de la complejidad de las cancelaciones internas de corriente durante coincidencia de varias entradas sinápticas, que puede alterar la distribución espacial de las corrientes en el espacio extracelular. Es importante recordar que no todas las vías sinápticas están distribuidas en la arborización dendrítica de una forma espacialmente propicia para al acúmulo de corrientes extracelulares y su interferencia con otras que sí, puede alterar la distribución espacial de esta última y hacerla no reconocible al cotejarla con la distribución conocida de la vía anatómica. Otras fuentes de incertidumbre provienen de factores citoarquitectónicos, tales como las curvaturas de la población diana, que pueden dar lugar a amplificaciones o aniquilaciones del LFP y al desplazamiento de su epicentro con respecto a la fuente generadora, lo que puede llevar a confusión sobre el tipo celular responsable e incluso de la vía sináptica que lo genera (Fernández-Ruiz et al 2013). En definitiva, a pesar de las grandes posibilidades que ofrece el estudio de las fuentes del LFP, será necesario examinar con cautela los resultados, siempre teniendo en cuenta que no todas las corrientes generadas por las membranas neuronales serán capturadas por el LFP.

Como se ha expuesto en esta Memoria, los factores que pueden influir en la visibilidad de las corrientes neuronales en forma de LFP son variados. Desde la geometría y patrón tridimensional de los árboles dendríticos, el patrón de ramificación axonal, la actividad de poblaciones de neuronas moduladoras, o la sincronía y frecuencia de los disparos de las células y poblaciones aferentes, todos pueden ser decisivos a la hora de aportar visibilidad a cada una de las poblaciones que dan lugar al LFP. Hasta ahora no había sido posible abordar el papel de las contribuciones de cada población aferente, objetivo que hoy resulta más plausible gracias al empleo del método de ACI. Los generadores que proporciona esta metodología preconizan una nueva era en el uso de los registros extracelulares, que pasarán de ser considerados una entidad única en forma de fluctuaciones temporales del potencial eléctrico a ser vistos como una suma de elementos cuantificables. Ya se ha comentado que un único registro de LFP no aportará datos acerca del sistema por ser un potencial generado por múltiples corrientes iniciadas en sitios distintos durante eventos sinápticos diferentes. En este sentido, es necesario un cambio importante de mentalidad a la hora de diseñar experimentos con registros de LFP, pues sabiendo que el registro simultáneo en varios puntos ya permite la obtención de información precisa sobre las fuentes, no hay motivo para seguir utilizando registros aislados de los cuales apenas se puede extraer sino unos pocos marcadores de actividad útiles solo como referencia temporal para otros parámetros de actividad neural. Utilizando informaciones complementarias no redundantes es como podremos acercarnos a la verdadera dinámica de las distintas poblaciones hipocámpicas y a su interacción.

Hasta el momento, el método de ACI nos ha permitido describir las características espaciotemporales y cuantificar la contribución específica de las poblaciones presinápticas al LFP espontáneo durante actividad irregular. Su aplicación ha resultado exitosa incluso para la extracción de algunos generadores sinápticos débiles, cuya actividad suele quedar enmascarada por la presencia de otros generadores más potentes sin que ello suponga una menor relevancia funcional de la población. A este respecto hay que remarcar las capacidades cuantitativas que ofrece la extracción de generadores LFP, que permite tener en cuenta todas aquellas poblaciones neuronales cuya actividad no es visible a simple vista en el LFP espontáneo.

La discriminación mediante ACI de los generadores sinápticos principales del LFP hipocámpico, ha proporcionado resultados que en algunos casos podían haber sido deducidos de la estructura axónica de algunas poblaciones neuronales, como es el caso de la aferencia de Schaffer o de la vía Perforante (VPM y VPL). Sin embargo, su reflejo funcional sólo había sido comprobado mediante eventos específicos como las SPWs y potenciales provocados. No existía lectura directa de su activación temporal aislada a partir de un LFP espontáneo. Ni siquiera hasta era posible una cuantificación de la contribución de dichas aferencias al potencial extracelular. Además de las conexiones sinápticas extrínsecas cuya participación podía ser más evidente, han sido discriminadas aferencias de origen inhibitor correspondientes a la activación de interneuronas situadas en la FD y a la red inhibitora perisomática de CA3. La cautela a la que nos hemos referido anteriormente se manifiesta en uno de los generadores más potentes encontrados en este estudio, el generador LM, con origen en el estrato lacunoso molecular de las células principales de CA1. Este generador muestra una naturaleza química dual sólo explicada por una activación mixta de neuronas excitadoras e interneuronas cuya separación no ha sido posible hasta el momento. Los resultados en experimentos crónicos han validado el proceso de separación de generadores y lo confirman como una poderosa herramienta para explorar la función computacional de los circuitos neuronales en tiempo real.

La potencia cuantitativa de este estudio se manifiesta en la posibilidad de extraer el curso temporal de la activación de diversas poblaciones neuronales, que pese a ser numerosas y tener una alta tasa de disparo contribuyen aparentemente en muy baja medida al potencial extracelular. Este es el caso del generador descrito para la actividad recurrente inhibitora sobre las células piramidales de CA1, con origen probable en las células en cesto, y cuya actividad supone tan sólo un 0.03% de contribución al potencial de campo. Mediante el análisis con ACI se ha podido extraer su activación específica a partir del LFP espontáneo, estudiando así su coherencia espacial y espectral. Con la ayuda de un modelo computacional se han descrito las claves que explican la escasa visibilidad de este generador en registros estándar realizados mediante amplificadores acoplados en AC, que eliminan los componentes más lentos del LFP. Esto nos permitió compatibilizar la alta tasa de frecuencia reportada para las interneuronas inhibitoras en cesto con su escasa participación en el LFP, al determinar que su contribución da lugar a un componente DC que refleja fundamentalmente la tasa de actividad en la población postsináptica. De este modo, lo que parecía ser un componente de varianza reducida, indica una contribución significativa y mantenida en el tiempo, que queda oculta en los registros en AC, limitación que poseen las adquisiciones con dispositivos multielectrodo actuales. Ante estos resultados deberán plantearse nuevos procedimientos experimentales en un futuro, con el fin de detallar la función de este generador dentro de hipocampo y poder registrar su activación en toda su magnitud.

Hasta ahora, para estudiar las conexiones que existen en el hipocampo entre las distintas poblaciones neuronales se ha recurrido a mapas anatómicos contruidos en base a la disposición de sus dominios dendríticos y de sus axones. Sin embargo en esta Memoria queda patente la influencia que otros factores pueden tener en la formación del LFP, no siempre obvios anatómicamente. Dado que el potencial extracelular va a depender de la sincronización de la actividad aferente, todas aquellas alteraciones o modulaciones del disparo de la población aferente tendrán su reflejo en la formación del potencial de campo. La extensión espacial, amplitud y polaridad de los LFPs están influenciados por la combinación de factores, entre los que se incluyen los patrones de territorios sinápticos en las células diana, la mezcla dependiente de tiempo de las corrientes sinápticas y la topología de las conexiones. La elaboración de los mapas anatómico-funcionales ha desenmascarado el carácter modular de las poblaciones presinápticas

que contribuyen a la formación del LFP en hipocampo. Hemos descrito casos que van desde una coherencia estable y mantenida a lo largo del eje septotemporal del hipocampo, como el del generador GCsom, hasta otros de coherencia espacial muy reducida como el VPM. Este rango de coherencias espaciales mínimas tan diverso da una idea de la complejidad de la composición de fuentes en un LFP, y de cómo las distintas poblaciones ejercen su influencia sobre las células principales del hipocampo mediante la segregación modular de sus proyecciones axónicas.

A tenor de los resultados obtenidos en el análisis de la coherencia espacial a lo largo de uno de los hemisferios del hipocampo se ha decidido llevar a cabo el estudio detallado de uno de los generadores en ambos hipocampos, pues su constancia ipsilateral facilitaba la cuantificación comparada en ambos sitios. Se conocen ciertas asimetrías bilaterales en el hipocampo, estudiadas ampliamente desde el punto de vista molecular y comportamental. Sin embargo, la caracterización funcional no se ha podido abordar con profundidad, en parte debido a la falta de métodos que permitiesen la discriminación entre activaciones específicas de un hipocampo o compartidas por ambos hemisferios. El estudio bilateral del generador de Sch ha revelado elementos comunes, que se coordinan a través de la comisura ventral, y otros específicos de cada hemisferio. La caracterización de los eventos presentes en cada hipocampo ha permitido reconocer diferencias como la amplitud de los eventos o la duración de los mismos. El estudio anatómico de las comisuras ha sido abordado desde hace décadas, pero esta es la primera vez que se aportan datos cuantificables de las señales bilaterales con origen en CA3.

Por último se buscó la aplicación del estudio de los generadores a un evento neuronal asociado a patologías como el ictus cerebral o la migraña. La onda denominada *Spreading Depression* y su despolarización asociada se propagan por el tejido neuronal causando el silenciamiento transitorio de la población que queda a su paso. En hipocampo, el frente de la onda es reconocible por un tren de espigas poblacionales lo que facilita su seguimiento en el espacio. Los mecanismos de propagación de esta onda han permanecido elusivos durante décadas y esperamos que el análisis en profundidad de los generadores sinápticos alcanzados por la despolarización y que intervienen en la actividad previa generen información relevante para diseñar estrategias encaminadas a bloquear su movimiento. La aplicación de la descomposición de generadores en neuropatología es una de las avenidas naturales por las que el presente estudio podría caminar en un futuro. Resultados preliminares no presentados en esta Memoria confirman la capacidad de aplicar los conocimientos aquí descritos en Clínica, tales como determinar patrones de actividad alterada en poblaciones neuronales concretas a partir de los generadores LFP, que pasarían desapercibidos en registros de LFP nativo, lo que permite albergar esperanzas de aplicación para detectar estadios tempranos sin manifestación fenotípica.

Los resultados plasmados en la presente memoria abren el camino a nuevas líneas de investigación en las que el estudio de los generadores LFP contribuirá de forma crítica a dilucidar los mecanismos celulares del procesamiento de la información por parte del hipocampo. En un futuro sería necesario realizar estudios crónicos que permitiesen la asociación de los LFPs específicos de cada vía con estudios comportamentales, que podrían aportar un correlato funcional entre la actividad poblacional local y su reflejo en la actividad espontánea del sistema. Por el momento hemos demostrado la capacidad de un método matemático basado en el análisis con ACI con el que es posible descomponer el LFP del hipocampo en los constituyentes que lo forman, cuantificarlos y tener una lectura temporal de cada uno de ellos en paralelo, incluso en fluctuaciones temporales de actividad que no se observaban en el LFP. Además, el estudio de la coherencia espacial intra e interhemisférica mediante varias lancetas paralelas en

cada hipocampo se vislumbra como la preparación experimental más completa y eficiente para hacer un seguimiento de las variaciones de actividad de cada población representada en el LFP por toda la estructura, reconociendo las diferencias en los registros que aportan información acerca de las mismas y cuales con sus causas. Completamos así un estudio neurofisiológico en el que se identifican y caracterizan los elementos que dan lugar al LFP hipocampal en base al estudio de sus generadores y que tiene como principal logro el constituir una base cuantitativa que promueva nuevos estudios.

9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

El presente trabajo, dedicado a descifrar la naturaleza y composición de los potenciales de campo local en el hipocampo y sus factores moduladores, ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- 1.** Los LFP espontáneos en el hipocampo están contribuidos por 6 generadores mayoritarios, en su mayoría específicos de vía, y con distinta cobertura espacial o territorio sináptico en dominios dendríticos de distintas poblaciones de células principales y subregiones. Tres son de carácter excitador, con poblaciones de origen en la región CA3 ipsilateral y cortezas entorrinal medial y lateral, respectivamente, y los restantes pertenecen a diferentes subredes inhibitorias locales: dos del tipo de células en cesta en las regiones CA3 y FD, y otro de naturaleza sináptica mixta con proyección apical distal en la región CA1.
- 2.** Los generadores LFP presentan módulos espaciales de actividad coherente o sincrónica que delimitan la porción del territorio sináptico activada en cada instante. Cada generador presenta un módulo mínimo específico determinado por la combinación de factores estructurales y temporales, bien formados por la superposición de territorios sinápticos de células pertenecientes a un clúster funcional que comparten topología axónica, bien por solapamiento de territorios sinápticos no compartidos de células igualmente co-moduladas.
- 3.** La coherencia espacial, normalmente variable, puede ser interpretada para identificar patrones específicos de sincronización en la población aferente. Así, el generador excitador de Schaffer mostró módulos espaciales estereotipados que correspondieron con otras tantas modalidades de activación sincrónica de las células piramidales de CA3, en pequeños clústeres o grandes avalanchas.
- 4.** El segmento CA3-CA1 del hipocampo presenta un funcionamiento bilateral coordinado pero asimétrico a juzgar por la estructura de los paquetes excitadores que componen el LFP, que son mayores en el hipocampo derecho y preceden a los del izquierdo.
- 5.** El hipocampo podría funcionar bilateralmente, comparando la información que fluye diferencialmente en los respectivos segmentos CA3-CA1. Esta conclusión está basada en el hecho de que un pequeño porcentaje de los paquetes excitadores gamma en el LFP específico de Schaffer, en su mayor parte pareados en áreas homotípicas de CA1, sólo ocurrió en uno u otro hipocampo.
- 6.** El rimo gamma de la vía Schaffer no requiere de la conexión interhipocámpica con su homólogo y por tanto podría ser intrahipocámpico. La conexión comisural serviría para la coordinación temporal fina de las regiones CA3 en ambos hemisferios lo que permitiría abrir ventanas temporales de integración en la región CA1 para las entradas ipsi y contralateral en cada onda gamma.

- 7.** Los mismos tipos interneuronales pueden generar LFPs de gran amplitud en una región y casi imperceptibles en otra. Es el caso de la inhibición perisomática en las regiones de FD y CA1. A falta de experimentos definitivos, la caracterización de este generador permite señalar a la población de interneuronas en cesto como fuente de un generador de potencial DC o ultralento.
- 8.** La utilización de ondas autopropagadas de despolarización masiva u ondas de Leão como método de ablación transitoria de dominios dendríticos permite el estudio de la dinámica de los generadores en la red hipocámpica a la vez que aporta información acerca de su frente de onda, que puede resultar útil para su desactivación o bloqueo, de importancia en la patología isquémica.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Amaral DG. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*. Dec 15;182(4 Pt 2):851-914.

Amaral DG, Witter MP. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3):571-91.

Andersen P. (1960a) Interhippocampal impulses. II. Apical dendritic activation of CA1 neurons. *Acta Physiol Scand*. Mar 18;48:178-208.

Andersen P. (1960b) Interhippocampal impulses. III. Basal dendritic activation of CA3 neurons. *Acta Physiol Scand*. Mar 18;48:209-30

Andersen P. (1961). [Functional properties of pyramidal cells of the cerebral cortex]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. Apr 15;8:427-30

Andersen P, Andersson SA, Lomo T. (1966). Patterns of spontaneous rhythmic activity within various thalamic nuclei. *Nature*. 1966 Aug 20;211(5051):888-9.

Andersen P, Gillow M, Rudjord T. (1966). Rhythmic activity in a simulated neuronal network. *J Physiol*. 1966 Jul;185(2):418-28.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. (1971) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*. 13(2):208-21.

Andersen P, Bland HB, Myhrer T, Schwartzkroin PA. (1979) Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res* Apr 6;165(1):13-22.

Andersen P, Lomo T. (1966) Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites. *Exp Brain Res*. 2(3):247-60.

Arieli A, Shoham D, Hildesheim R, Grinvald A. (1995). Coherent spatiotemporal patterns of ongoing activity revealed by real-time optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex. *J Neurophysiol*. May;73(5):2072-93.

Belitski A, Gretton A, Magri C, Murayama Y, Montemurro MA, Logothetis NK, Panzeri S. (2008) Low-frequency local field potentials and spikes in primary visual cortex convey independent visual information. *J Neurosci*. May 28;28(22):5696-709.

Bell AJ, Sejnowski TJ. (1995) An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Comput*. Nov;7(6):1129-59.

- Berger, H. (1929) Über das Elektrenkephalogramm des Menschen (En el EEG de humanos) *Archive für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*.
- Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* Jul;232(2):331-56.
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. (1995) Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 15:47–60
- Burgess N, O'Keefe J. (1996) Cognitive graphs, resistive grids, and the hippocampal representation of space. *J. Gen Physiol.* Jun;107(6):659-62.
- Buzsáki G, Leung LS, Vanderwolf CH. (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain res* 287: 139-171.
- Buzsáki G. (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex.* Mar-Apr;6(2):81-92.
- Canals S, López-Aguado L, Herreras O. (2005) Synaptically recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol.* Feb;93(2):909-18.
- Castellanos NP, Makarov VA. (2006) Recovering EEG brain signals: Artifact suppression with wavelet enhanced independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 158: 300-312.
- Choi, S., Cichocki, A., Park, H. M., & Lee, S. Y. (2005). Blind source separation and independent component analysis: a review. *Neural Information Processing - Letters and Reviews*, 6,1–57.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G. (1998) Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron.* Jul;21(1):179-89.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron.* Jan 23;37(2):311-22.
- Delorme A, Makeig S. (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *J Neurosci Methods.* Mar 15;134(1):9-21.
- Diesmann M, Gewaltig MO, Aertsen A. (1999). Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature.* Dec 2;402(6761):529-33.
- Einevoll GT, Pettersen KH, Devor A, Ulbert I, Halgren E, Dale AM. (2007) Laminar population analysis: estimating firing rates and evoked synaptic activity from multielectrode recordings in rat barrel cortex. *J Neurophysiol.* Mar;97(3):2174-90.
- Elul R. (1971) The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol.* Jul;15:227-72

- Escudero J, Hornero R, Abásolo D, Fernández A, López-Coronado M. (2007) Artifact removal in magnetoencephalogram background activity with independent component analysis. *IEEE Trans Biomed Eng.* Nov;54(11):1965-73.
- Fernández-Ruiz A, Herreras O. (2013) Identifying the synaptic origin of ongoing neuronal oscillations through spatial discrimination of electric fields. *Front Comput Neurosci.* 2013;7:5.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Benito N, Herreras O. (2012) Schaffer-specific local field potentials reflect discrete excitatory events at gamma frequency that may fire postsynaptic hippocampal CA1 units. *J Neurosci.* Apr 11;32(15):5165-76.
- Freeman JA, Nicholson C. (1975) Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol.* Mar;38(2):369-82
- Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:186–89
- Freeman WJ. (1968) 85. Relations between unit activity and evoked potentials in prepyriform cortex of cats. *J Neurophysiol.* May;31(3):337-48
- Freund TF. (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* Sep;26(9):489-95.
- Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. (2001). Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291(5508):1560–63
- Fujita Y, Sakata H. (1962) Electrophysiological properties of CA1 and CA2 apical dendrites of rabbit hippocampus. *J Neurophysiol.* Mar;25:209-22
- Golarai G, Sutula TP. (1996). Functional alterations in the dentate gyrus after induction of long-term potentiation, kindling, and mossy fiber sprouting. *J Neurophysiol.* Jan;75(1):343-53.
- Goto T, Muraoka H, Kodama K, Hara Y, Yako T, Hongo K. (2010) Intraoperative Monitoring of Motor Evoked Potential for the Facial Nerve Using a Cranial Peg-Screw Electrode and a "Threshold-level" Stimulation Method. *Skull Base.* 2010 Nov;20(6):429-34.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF. (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci.* Sep;12(9):3239-49.
- Hajos N, Paulsen O. (2009) Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. *Neural Netw.* 2009 Oct;22(8):1113-9

- Herreras O, Solís JM, Herranz AS, Martín del Río R, Lerma J. (1988a) Sensory modulation of hippocampal transmission. II. Evidence for a cholinergic locus of inhibition in the Schaffer-CA1 synapse. *Brain Res. Oct 4;461(2):303-13.*
- Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J. (1988b) Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapses. *Brain Res. Oct 4;461(2):290-302.*
- Herreras O. (1990) Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol. Nov;64(5):1429-41.*
- Hjorth-Simonsen A. (1973). Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J Comp Neurol. Jan 15;147(2):145-61.*
- Hyvärinen A, Oja E. (1997). Simple neuron models for independent component analysis. *Int J Neural Syst. Dec;7(6):671-87.*
- Hyvärinen A, Oja E. (2000) Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Netw. May-Jun;13(4-5):411-30*
- Iriarte J, Urrestarazu E, Valencia M, Alegre M, Malanda A, Viteri C, Artieda J. (2003) Independent component analysis as a tool to eliminate artifacts in EEG: a quantitative study. *J Clin Neurophysiol Jul-Aug;20(4):249-57.*
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol. May 22;295(4):580-623.*
- Jarrard LE. (1978) Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training. *J Comp Physiol Psychol. Dec;92(6):1119-27.*
- Jung KY, Kim JM, Kim DW, Chung CS. (2005) Independent component analysis of generalized spike-and-wave discharges: primary versus secondary bilateral synchrony. *Clin Neurophysiol. Apr;116(4):913-9*
- Jung TP, Makeig S, McKeown MJ, Bell AJ, Lee TW, Sejnowski TJ. (2001) Imaging Brain Dynamics Using Independent Component Analysis. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng. Jul 1;89(7):1107-1122.*
- Kreiman G, Hung CP, Kraskov A, Quiroga RQ, Poggio T, DiCarlo JJ. (2006) Object selectivity of local field potentials and spikes in the macaque inferior temporal cortex. *Neuron. Feb 2;49(3):433-45.*
- Kocsis B, Bragin A, Buzsáki G. (1999) Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. *J Neurosci. Jul 15;19(14):6200-12.*

- Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O. (2010) Minor contribution of principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol.* Jul;104(1):484-97.
- Leung LW. (1979) Orthodromic activation of hippocampal CA1 region of the rat. *Brain Res.* Oct 26;176(1):49-63.
- Li CL, Cullen C, Jasper HH. (1956) Laminar microelectrode analysis of cortical unspecific recruiting responses and spontaneous rhythms. *J Neurophysiol.* Mar;19(2):131-43.
- Lømo T. (1971) Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Exp. Brain Res* 12: 18–45.
- Logothetis NK, Pfeuffer J. (2004). On the nature of the BOLD fMRI contrast mechanism. *Magn Reson Imaging.* 2004 Dec;22(10):1517-31
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. (1990) Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* Apr;70(2):453-511
- López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. (2001) Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience.*108(2):249-62.
- López-Aguado L, Ibarz JM, Varona P, Herreras O. (2002) Structural inhomogeneities differentially modulate action currents and population spikes initiated in the axon or dendrites. *J Neurophysiol.* Nov;88(5):2809-20.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology*, 46, 113-177.
- Lorente de Nó R (1947) Analysis of the distribution of action currents of nerves in volume conductors. In: *A Study of Nerve Physiology*, New York: The Rockefeller Institute, part2. vol. 132, p. 384–477.
- Magee JC, Johnston D.(1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science.* Apr 14;268(5208):301-4.
- Makarov VA, Makarova J, Herreras O. (2010) Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comput Neurosci.* Dec;29(3):445-57.
- Makarova J, Makarov VA, Herreras O. (2010) Generation of sustained field potentials by gradients of polarization within single neurons: a macroscopic model of spreading depression. *J Neurophysiol.* May;103(5):2446-57
- Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O. (2011) Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci.* 5:77

- Makeig S, Jung TP. (1996). Tonic, phasic, and transient EEG correlates of auditory awareness in drowsiness. *Brain Res Cogn Brain Res*. Jul;4(1):15-25.
- Makeig S, Westerfield M, Townsend J, Jung TP, Courchesne E, Sejnowski TJ. (1999) Functionally independent components of early event-related potentials in a visual spatial attention task. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jul 29;354(1387):1135-44.
- Makeig S, Westerfield M, Jung TP, Covington J, Townsend J, Sejnowski TJ, Courchesne E. (1999). Functionally independent components of the late positive event-related potential during visual spatial attention. *J Neurosci*. Apr 1;19(7):2665-80.
- Makeig S, Jung TP, Bell AJ, Ghahremani D, Sejnowski TJ (1997) Blind separation of auditory event-related brain responses into independent components. *PNAS* 94:10979-10984.
- Makeig S, Debener S, Onton J, Delorme A. (2004) Mining event-related brain dynamics. *Trends Cogn Sci*. May;8(5):204-10.
- Mann EO, Paulsen O. (2005) Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. *Prog Biophys Mol Biol*. Jan;87(1):67-76.
- Marconi D, Manenti R, Catricalà E, Della Rosa PA, Siri S, Cappa SF. (2012). The neural substrates of inferential and referential semantic processing. *Cortex*. Aug 28.(12)00236-5.
- McNaughton BL. (1980). Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Res*. Oct 13;199(1):1-19.
- Mitzdorf U. (1985) Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev*. Jan;65(1):37-100.
- Montemurro MA, Rasch MJ, Murayama Y, Logothetis NK, Panzeri S.(2008) Phase-of-firing coding of natural visual stimuli in primary visual cortex. *Curr Biol*. Mar 11;18(5):375-80
- Montgomery SM, Betancur MI, Buzsáki G. (2009) Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J Neurosci*. Feb 4;29(5):1381-94.
- Morris JG, Owler B, Hely MA, Fung VS. (2007). Hydrocephalus and structural lesions. *Handb Clin Neurol*. 2007;84:459-78
- Mouraux A, Iannetti GD. (2008) Across-trial averaging of event-related EEG responses and beyond. *Magn Reson Imaging*. Sep;26(7):1041-54.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. Jun 24;297(5868):681-3.

- Muller RU, Kubie JL. (1987) The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci.* Jul;7(7):1951-68.
- Muller RU, Kubie JL, Saypoff R. (1991) The hippocampus as a cognitive graph (abridged version). *Hippocampus* Jul;1(3):243-6.
- Nunez PL, Srinivasan R (2006) *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*. 2nd edition. New York: Oxford University Press.
- O'Keefe, J., Nadel L. (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford.
- Okada K, Hamata M, Kotani I, Murakami M, Seki T, Kobayashi S. (1997). Case of Wernicke's encephalopathy complicated with Marchiafava-Bignami syndrome. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* Oct 10;86(10):1969-71
- Oren I, Mann EO, Paulsen O, H-jos N. (2006). Synaptic currents in anatomically identified CA3 neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci.* 2006 Sep 27;26(39):9923-34.
- Oren I, Paulsen O. (2010) Currents in space: understanding inhibitory field potentials. *J Physiol.* 2010 Jun 15;588(Pt 12):2015-6
- Oren I, Hajos N, Paulsen O. (2010). Identification of the current generator underlying cholinergically induced gamma frequency field potential oscillations in the hippocampal CA3 region. *J Physiol.* Mar 1;588(Pt 5):785-97
- Paulsen O, Moser EI. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* Jul;21(7):273-8.
- Pesaran B, Pezaris JS, Sahani M, Mitra PP, Andersen RA. (2002) Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci.* Aug;5(8):805-11.
- Pettersen JA, Hill MD, Devor A, Ulbert I, Dale AM, Einevoll GT. (2006) Current-source density estimation based on inversion of electrostatic forward solution: effects of finite extent of neuronal activity and conductivity discontinuities. *J Neurosci Methods.* 2006 Jun 30;154(1-2):116-33.
- Ramón y Cajal, S. (1902). Sobre un ganglio especial de la corteza esfeno-occipital. *Trab del Lab de invest Biol Univ Madrid*, 1, 189-201.
- Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H. (1981) Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pflugers Arch.* Jan;389(2):159-70.
- Rasch MJ, Gretton A, Murayama Y, Maass W, Logothetis NK. (2008) Inferring spike trains from local field potentials. *J Neurophysiol.* Mar;99(3):1461-76

- Shapiro ML, Eichenbaum H. (1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*. 9(4):365-84.
- Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R. (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19498-503
- Sloviter RS, L[−]mo T. (2012). Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front Neural Circuits*. Dec 10;6:102
- Somogyi P, Klausberger T. (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. Jan 1;562(Pt 1):9-26.
- Tanskanen JM, Mikkonen JE, Penttonen M. (2005) Independent component analysis of neural populations from multielectrode field potential measurements. *J Neurosci Methods*. Jun 30;145(1-2):213-32
- Traub O, Hertlein B, Kasper M, Eckert R, Krisciukaitis A, H[−]lser D, Willecke K. (1998). Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells. *Eur J Cell Biol*. Dec;77(4):313-22.
- Trevelyan AJ. (2009) The direct relationship between inhibitory currents and local field potentials. *J Neurosci*. Dec 2;29(48):15299-307
- Treves A, Rolls ET. (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*. Apr;2(2):189-99.
- Tucker DM, Williamson PA. (1984). Asymmetric neural control systems in human self-regulation. *Psychol Rev*. 1984 Apr;91(2):185-215
- Tukker JJ, Fuentealba P, Hartwich K, Somogyi P, Klausberger T. (2007) Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J Neurosci*. Aug 1;27(31):8184-9.
- Vanderwolf CH. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Apr;26(4):407-18.
- Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O. (2000) Macroscopic and subcellular factors shaping population spikes. *J Neurophysiol*. Apr;83(4):2192-208.
- Vigario RN. (1997). Extraction of ocular artefacts from EEG using independent component analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Sep;103(3):395-404.
- Vigario R, Sarela J, Jousmaki V, Hamalainen M, Oja E. (2000) Independent component approach to the analysis of EEG and MEG recordings. *IEEE Trans Biomed Eng* 47: 589–593.

Vinogradova OS. (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*. 11(5):578-98.

Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG. (1995) Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*. Feb 16;373(6515):612-5

Wilson MA, McNaughton BL. (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*. Aug 20;261(5124):1055-8.

Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sik A, Buzsáki G. (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci*. Jan;15(1 Pt 1):30-46.

Zhou W, Zhou J, Zhao H, Ju L. (2005) Removing eye movement and power line artifacts from the EEG based on ICA. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 6:6017-20.

11. APÉNDICE

Spatial Modules of Coherent Activity in Pathway-Specific LFPs in the Hippocampus Reflect Topology and Different Modes of Presynaptic Synchronization

N. Benito¹, A. Fernández-Ruiz¹, V.A. Makarov², J. Makarova¹, A. Korovaichuk¹ and O. Herreras¹

¹Department of Systems Neuroscience, Cajal Institute, CSIC, Madrid 28002, Spain and ²Department of Applied Mathematics, Faculty of Mathematics, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

N.B. and A.F.-R. have contributed equally to this work.

Address correspondence to Oscar Herreras, Cajal Institute, CSIC, Av. Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain. Email: herreras@cajal.csic.es

Ongoing network activity often manifests as irregular fluctuations in local field potentials (LFPs), a complex mixture of multicellular synaptic currents of varying locations and extensions. Among other conditions, for synchronously firing presynaptic units to generate sizable postsynaptic LFPs, their axonal territories should overlap. We have taken advantage of anatomical regularity of the rat hippocampus and combined multiple linear recordings and spatial discrimination techniques to separate pathway-specific LFPs with enough spatial resolution to discriminate postsynaptic regions of varying activation, and to investigate their presynaptic origin, chemical nature, and spatial extension. We identified 6 main excitatory and inhibitory LFP generators with different synaptic territories in principal cells and hippocampal subfields matching anatomical pathways. Some recognized pathways did not contribute notably to LFPs. Each showed different septo-temporal spatial modules over which the field potential fluctuations were synchronous. These modules were explained by either the strong overlap of synaptic territories of coactivated afferent neurons (e.g., CA3 clusters for CA1 Schaffer LFPs), or widespread coalescence of postsynaptic territories (granule cell somatic inhibition). We also show evidence that distinct modes of afferent synchronization generate stereotyped spatial patterns of synchronous LFPs in one pathway. Thus, studying spatial coherence of pathway-specific LFPs provides remote access to the dynamics of afferent populations.

Keywords: correlated activity, independent component analysis, LFP generators, ongoing activity, spatial modules

Introduction

Correlated firing of neurons is often associated with shared synaptic inputs (Diesmann et al. 1999), which manifest as fluctuations of the local field potential (LFP; Bach and Kruger 1986; Arieli et al. 1995). This mesoscopic variable is mostly contributed by the postsynaptic currents (Purpura 1959; Elul 1972; Nunez and Srinivasan 2006), and as such LFP constitutes a link between the ongoing activity of afferent populations (distant and/or local) and the induced spatially distributed firing of postsynaptic neurons (Belitski et al. 2008; Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012).

It has long been hypothesized that spontaneous macroscopic field potentials have a multifoci origin made up by the group of currents injected in the extracellular space by synchronously activated synapses, so called “elementary synaptic units” (Elul 1972). Such groups of coactivated synapses are located on multiple postsynaptic neurons according to axonal branching and topology, making up multineuron sources of complex geometry. Whereas the theoretical foundations describing how the spread of currents in a volume conductor

raise field potentials of different magnitude and polarity are long established (Lorente de Nó 1947; Woodbury 1960; Plonsey 1969; Gloor 1985; Nunez and Srinivasan 2006), it was soon recognized that the geometrical complexity of these sources would be a handicap to decipher the cellular origins of LFP fluctuations. If axonal territories of synchronously firing presynaptic units overlap in the target postsynaptic region, the synaptic currents will have a chance to sum and raise sizable LFPs. However, due to variation in the spatial coverage of coactivated multineuron sources, the LFPs recorded at 2 nearby sites may be matched or different. The spatial extension, amplitude, and polarity of LFPs are influenced by a combination of factors including the patterns of synaptic territories of converging pathways, the topology of connections, and the time-dependent mixture of synaptic currents. We take the advantage of regular cytoarchitecture of the rat hippocampus, high-density recordings, and spatially discriminating analysis techniques (Bell and Sejnowski 1995; Choi et al. 2005) to address the pathway composition of ongoing LFPs and the time-varying spatial coverage of each component.

The hippocampus exhibits multiple naturally oscillating field potentials, including those displaying theta and gamma patterns (Buzsáki et al. 1983). These oscillations probably involve the synchronous activity of one or few synaptic pathways and have been widely used to study synaptic plasticity and the neuronal correlates of behavior (Paulsen and Moser 1998; Traub et al. 1998; Reichinnek et al. 2010). However, the physiological spectrum of ongoing LFPs contains a much wider collection of “irregular” activities that have been poorly studied and may provide valuable details as to the information arriving from multiple afferent populations to hippocampal principal neurons.

As it was demonstrated by the laminar analysis of evoked potentials (Andersen et al. 1971), the stratification of synaptic inputs into the discrete domains of postsynaptic cells produces distinct laminar field potential profiles upon activation of each afferent pathway (laminar dipoles). The difference between evoked and ongoing activities is in spatial extension of the activated postsynaptic region, occupying entirely, or in part, the synaptic territory of such input. We here asked whether the large irregular LFPs in the hippocampus arise as occasional spatiotemporal concurrence of synaptic currents from multiple independent presynaptic origins or they contain topographically determined modules of activity. If these modules exist, they should be related to anatomical pathways. Thus, we explored the existence of such spatial modules for different pathway-specific inputs (here termed as LFP generators) during ongoing activity by analyzing multiple

simultaneous recordings of the target populations in 3 steps. First, we determine all principal synaptic pathways that contribute to ongoing LFPs by separating their mixed contributions using multiarray linear recordings and analytical techniques, including independent component analysis (ICA; Makarov et al. 2010; Makarova et al. 2011). Secondly, we study their chemical nature and the neuronal populations of origin using local pharmacology and chemical manipulation of presynaptic nuclei. Finally, we explore their spatial coherence by comparing the time activations of each LFP generator in multiple sites along the septo-temporal axis and checked their stability upon different levels of presynaptic synchronization.

The results provide empirical evidence of the varying spatial extension of postsynaptic LFP generators brought about by the variable synchronization of presynaptic units. We found 6 main excitatory and inhibitory LFP generators in different subfields of the hippocampus, each corresponding to the postsynaptic activity elicited in distinct synaptic territories of principal pyramidal or granule cells by specific local and extrinsic afferent pathways. The septo-temporal extension over which each LFP generator was synchronous varied continuously during ongoing irregular LFP activity, reflecting the varying activation of presynaptic units with topographic projections. In some pathways such as the CA3 Schaffer input to CA1, we recognized different spatial patterns of synchronous postsynaptic activity that corresponded to stereotyped modes of presynaptic firing. Thus, the availability of spatial modules of pathway-specific activity allows the recognizable modes of functional organization to be identified in different segments of hippocampal networks.

Materials and Methods

Experimental Procedures

All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (86/609/EU) and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) regarding the use of laboratory animals, and the experimental protocols were approved by the Research Committee of the Cajal Institute. Adult female Sprague-Dawley rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, intraperitoneally) and placed in a stereotaxic device. Surgical and stereotaxic procedures were performed as described previously (Herreras et al. 1988; Canals et al. 2005). Concentric stimulating electrodes were placed in one or more of the following sites in order to activate specific pathways and subfields: Ipsilateral CA3 region, and medial and lateral perforant pathways. Multisite silicon probes (Neuronexus, Ann Arbor, MI, USA) of 16 or 32 linear recording sites organized in 1 or 2 shanks were used to record in multiple tracks at steps of 50 or 100 μm parallel to the main axis of the CA1 pyramidal cell region, also spanning the dentate gyrus (DG)/CA3 regions. In experiments using multiple shanks, these were located along the long axis of the dorsal portion of the hippocampus, roughly parallel to the midline (AP, 4.5–6.5 and L, 2.6–3.5 mm). In a subset of experiments, additional glass pipettes were used to simultaneously record from multiple points at more lateral and ventral levels guided by evoked potentials. Linear probes were soaked in 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) before insertion (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to assess their placement in histological sections postmortem. A silver chloride wire implanted in the skin of the neck served as a reference for recordings. Signals were amplified and acquired using MultiChannel System (Reutlingen, Germany), and Axon (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) hardware and software were used for multisite and glass pipette recordings (50 and 20 kHz sampling rate, respectively).

The excitatory/inhibitory chemical nature of LFP generators was studied by the local application of neurotransmitter blockers via glass

recording pipettes (7–10 μm at the tip). These were introduced at a 10° angle from the vertical and targeted loci within 300–500 μm of a linear probe at different strata of the CA1/DG subfields. Microdroplets (50–100 pL) were pressure injected by a Picospritzer (General Valve, Fairfield, NJ, USA) and adjusted to limit drug effects to within 500 μm , as determined by the selective modulation of evoked potentials in the desired group of recording sites (Canals et al. 2005). Bicuculline methiodide (BIC; Sigma, St. Louis, MO, USA) or 6,7-dinitro-quinoline-2,3-dione (DNQX; Tocris, Bristol, UK) were loaded into the pipettes to block gamma amino butyric acid-A (GABA-A) and non-n-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Glu receptors, respectively. Drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid at concentrations of approximately 50 times higher than those usually employed *in vitro*. A single injection ensured stable effects of the drug for at least 60 s. In some experiments requiring longer drug actions, successive microdroplets were injected at 5-min intervals, resulting in reasonable long-term stability witnessed by the steady effect on evoked potentials. In one set of experiments, BIC was injected from larger pipettes (10–12 μm at the tip) to achieve spatially extended hypersynchronous activity in neuronal populations projecting to recording loci (i.e., the afferent populations originating LFP components).

In a subset of experiments, recordings were obtained from awake animals implanted with a multishank device (92 recording sites in 6 parallel linear arrays). These data were obtained in the lab of G. Buzsáki using procedures for animal handling, surgery, and recording described previously (Montgomery et al. 2009).

At the end of each experiment, the animals were perfused through the abdominal aorta with phosphate buffer saline containing heparin (0.1%) followed by paraformaldehyde (4%), and the brains were processed for microscopic inspection. Sagittal sections (80 μm) were stained with bis-benzimide and examined by fluorescence microscopy for the assessment of the electrode positioning (Supplementary Fig. 1).

Independent Component and Current Source-Density Analyses of LFPs

ICA is routinely used to elucidate functional connectivity either in multisite scalp recordings or in functional magnetic resonance imaging, and it provides spatially stable components of coherent activity (Makeig et al. 1997; Van de Ven et al. 2004; Congedo et al. 2010; Hutchison et al. 2010). While the attribution of these ICA components to their source populations and pathways is difficult when recording from a distance, the in-source recording of intrahippocampal LFPs allows the thorough spatial inspection of active neurons down to the subcellular definition, and direct matching with the evoked potential profiles (Korovaichuk et al. 2010).

Detailed procedures have been previously described (Makarov et al. 2010; Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012), and both the mathematical validation and the interpretation of ICA components in laminated structures were performed using realistic LFP modeling (Makarova et al. 2011). Briefly, M simultaneously recorded LFP signals were represented as the weighted sum of the activities of N neuronal sources or LFP generators:

$$u_m(t) = \sum_{n=1}^N V_{mn} s_n(t),$$

where $\{V_{mn}\}$ is the mixing matrix composed of the so-called voltage loadings or spatial distributions of all LFP generators and $s_n(t)$, the time course of the n th LFP generator. Thus, the raw LFP observed at the k th electrode tip is a linear mixture of the electrical activity of several independent LFP generators describing transmembrane current source densities (CSDs) in principal cells. Then, the CSD loading for the n th LFP generator is given by $I_n = -\sigma \Delta V_n$, where σ is the conductivity of the extracellular space (Makarov et al. 2010). As the location of recording sites is known, the joint curve of spatial weights of an LFP generator equals to instant depth profiles of proportional voltage among sites, as during the laminar recording of standard pathway-specific evoked potentials. To perform the ICA, we employed the kernel density ICA algorithm (Chen 2006), which returns the activations $s_n(t)$ and spatial weights V_n of up to N LFP

generators. Usually, few generators (4–7) exhibited significant amplitudes and distinct spatial distributions in the hippocampus (Korovaichuk et al. 2010). The spatial stability of LFP generators within and across animals was estimated using the cluster analysis of spatial curves as in Makarov et al. (2010) (Supplementary Fig. 2), whereas their landmarks (e.g., maxima or zero crossings) were matched to anatomical boundaries using electrophysiological correlates (unit firing at cell body layers and evoked potentials) and histological verification. The mixing matrix can be made with any number of simultaneous recordings, whether belonging to a single or multiple parallel arrays. Although, in the latter case, $s_n(t)$ represents spatially averaged activity, the combined spatial curve of weights is fully reliable and was used to evaluate the relative power of a given LFP generator in different hippocampal sites. The temporal accuracy of LFP generators can be cross-checked by analyzing the same LFP epochs using different number of contiguous electrodes (Supplementary Fig. 3). This procedure also served to increase the relative variance of an LFP generator by discarding the recordings where other generators introduced heavy variance, hence increasing the temporal accuracy by minimizing cross-contamination (Makarova et al. 2011). Once extracted from the raw LFPs, each LFP generator can be analyzed independently by reconstructing virtual LFPs produced by a single generator, $u_j(t) = V_j s_j(t)$ and then evaluating the current density created by this generator, the spatial profile of which allows comparison with profiles obtained during specific activation of known pathways (Makarova et al. 2011).

Current source-density analysis (Freeman and Nicholson 1975; Rappelsberger et al. 1981) determines the magnitude and location of the net transmembrane current generated by neuronal elements within a small region of tissue. Accordingly, we used the 1-dimensional approach, which calculates the CSD from the voltage gradients along the cells axis (Herreras 1990):

$$\text{CSD} = -\sigma \Delta u = -\sigma \frac{u_{k-1}(t) - 2u_k(t) + u_{k+1}(t)}{b^2},$$

where b is the distance between recording sites. Admittedly, the spatial extent of current sources may not be large enough to fulfill the criterion of homogeneous activation in the XZ plane parallel to anatomical strata or laminae during asynchronous synaptic bombardment, thus tangential currents may introduce error in the amplitude estimate of sinks and sources (Leung 1979). Conveniently, the spatial distortion introduced by unbalanced tangential currents is effectively canceled out by time averaging of myriads microscopic currents as if they all were synchronously activated (Makarova et al. 2011). Thus, the curve of spatial weights for each LFP generator is accurate to the subcellular level. Although there is also a notable heterogeneity of tissue resistivity at the level of the st. pyramidale (López-Aguado et al. 2001), it introduces a negligible spatial distortion of depth profiles when active currents are located in distant dendritic loci. Thus, we have assumed homogeneous resistivity and used arbitrary units instead of CSD. In addition, we note that instant estimation of CSD along the entire anatomy of a cell generator (e.g., the CA1 pyramidal cell) does not render the balanced amount of inward and outward currents, while the CSD of reconstructed virtual LFPs for separated generators does (cf. in Fig. 1 of Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012). This is a valuable side effect of the ICA when applied to laminar profiles covering the entire anatomy of cell generators: The separated components necessarily contain spatially coherent activity at any instant. Thus, for “in-source” recordings, the ICA acts as a rejection device for volume-conducted currents (Makarov et al. 2010; these may, however, come up in other ICA components). Consequently, the second spatial derivative of the curve of spatial weights of LFP components extracted for ongoing activity matches to that of the CSD, which was verified for excitatory pathways using the corresponding evoked potentials (Korovaichuk et al. 2010).

Quantifications of LFP Generators

The evolution of the power of an LFP generator over time is described (in mV^2) by the following equation: $P(t) = \int H(t - \tau) v^2(\tau) d\tau$, where v

(t) is the virtual LFP at the electrode with maximal power and H , the appropriately scaled square kernel of the length Δ . The mean power is then defined for Δ extended to the complete time interval (~ 10 min in our experiments).

The spatial extent of LFP generators was determined by estimating the cross-correlation index of the time envelopes or activations (10 min epochs) obtained for each LFP generator in different recording shanks (simultaneous recordings). We applied an ICA separately over each shank and then evaluated the pairwise cross-correlation index over time activations of the same LFP generator in different shanks.

The macroscopic spatial boundaries of each LFP generator across the hippocampal subfields were visualized by contour plots that built from the spatial curves of LFP generators separated through a joint analysis of all 96 simultaneous recordings arranged in 6 parallel linear shanks, that is, using a single loading matrix with all recordings that rendered a unique set of LFP generators. In this case, the unique time activation obtained for each generator is averaged over large extensions and, thus, it may not reflect local activity, although this was irrelevant when determining the spatial distributions. Faulty recording sites can be eliminated without significant performance loss of the ICA.

In a subset of experiments, the dynamic changes in the spatial extent of the LFP generators were examined by comparing the fine temporal details (activity) of a single generator in up to 4 different locations. For simplicity, we chose the excitatory Schaffer input from CA3 to CA1 that we had previously analyzed in depth (Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012; Fernández-Ruiz, Makarov, Herreras 2012). The baseline activity of this generator is composed of a series of discrete field events or micro-field excitatory postsynaptic potentials (μ -fEPSPs). These are rhythmic excitatory packages in the gamma frequency that can be retrieved and quantified. We used the Wavelet Transform of $v(t)$:

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int v(t) \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt,$$

where ψ is the Haar mother wavelet (well suited for the detection of short pulses in a signal), a the time scale, and b the localization in time. We then rectified the wavelet coefficients using the following equation:

$$C(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \max[-W(a, b), 0],$$

The 2-dimensional (2D) surface obtained (Supplementary Fig. 4) describes the local linear fit of the Schaffer-specific LFP by the pulse-like function (Haar) at scale a and localization b . Large absolute values of $C(a, b)$ at a given time instant and scale correspond to abrupt pulse-like transitions in $v(t)$. Thus, we can associate such points in the (b, a) -plane with singular LFP events. Consequently, the local maxima of $C(a, b)$ evaluated as maxima over a set of small enough domains $\{\omega_k\}$

$$(a_k, b_k) = \arg \max_{(a,b) \in \omega_k} [C(a, b)],$$

define the time instants of μ -fEPSPs (given by $t_k = b_k - a_k/2$), their duration (given by a_k), and amplitudes (given by $A_k = C(a_k, b_k)$).

We next cross-correlated the μ -fEPSPs separately obtained in 2 locations and defined matching quanta for a time-window of ± 2 ms (Supplementary Fig. 5). The amplitudes of paired μ -fEPSPs in different shanks were further plotted and cross-correlated evaluating the index: $r = c_{12} / \sqrt{c_{11} c_{22}}$, where $\{C_{ij}\}$ is the covariance matrix.

Spectral coherence of the activity of an LFP generator in 2 different spatial positions was calculated by:

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

where $\{P_{ij}(f)\}$ is the matrix of crosspower spectral density. To determine the level of significance, we used the surrogate data test (Schreiber and Schmitz, 2000). Randomizing phase relations and keeping

other first order characteristics intact, we obtained surrogate time series from the original signals. For each experiment, we generated 1000 surrogates, and we evaluated spectral coherence. The significance level (at $\alpha=0.05$) was then calculated for each frequency value and coherence above this level was considered statistically significant.

Results

Subcellular and Regional Extension of Main Hippocampal LFP Generators

To answer the generic question of why LFPs recorded nearby match or differ we need to know which anatomical pathways make synaptic contact near recording points, when each one becomes active, and the geometry of the current sources. Conveniently, several anatomical pathways arrive in stratified domains of principal cells, and their activation produces spatially stable synaptic currents and potentials that are pathway specific (Andersen et al. 1971; Leung 1979; Herreras 1990; Golarai and Sutula 1996), producing laminar spatial distribution of ongoing LFPs. These can be isolated by spatially discriminating techniques. Figure 1 illustrates the problem under study and the methodological approach. LFPs were recorded simultaneously along 2 parallel tracks spanning the CA1 and DG of the dorsal hippocampus (16 recording sites each, 100 μm apart, 500 μm between shanks). Recording sites within a linear array parallel to the main axis of principal pyramidal or granule cells explore different domains of nearby neurons. Recordings sites in different arrays serve to explore the multicellular (longitudinal) coverage of inputs by comparing recordings at similar dendritic levels. LFPs recorded in nearby electrodes may be very similar or differ significantly

(Fig. 1A). In the illustrated example, while LFPs in the middle of the st. radiatum are nearly identical within and among arrays, those near the hippocampal fissure (hf) differ both in the vertical direction (i.e. different dendritic domains of nearby neurons), and in the horizontal plane (i.e. produced at the same dendritic level of multiple neurons in distant sites). Thus, the mixture of synaptic currents may already be hinted more complex and spatially restricted in some regions and neuron domains than in the others.

By inspecting multiple contiguous sites, bouts of activity of variable duration in stable spatial bands can be appreciated by the naked eye (Fig. 1B, boxed fragments). The stability of the group of electrodes showing similar activity indicates stable dendritic sites of synaptic activation by homogeneous afferent populations in accordance with anatomical data (Lorente de N3 1934; Hjorth-Simonsen 1973). However, these bouts are usually overlapping in time and also in space, making unfeasible to ascribe LFP fluctuations to postsynaptic currents generated in one or another dendritic band. The site-specific LFP activities can be disentangled by the ICA into spatially stable independent LFP components or generators (Makarov et al. 2010; Korovaichuk et al. 2010; Makarova et al. 2011; Fern3ndez-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012; Fern3ndez-Ruiz, Makarov, Herreras 2012; see Materials and Methods). The effectiveness of spatial separation can be appreciated by comparing the time courses of the raw LFPs with the activity of the first 3 LFP generators (Fig. 1B vs. C). Note that LFP fluctuations in the same group of electrodes at different moments were captured in the same LFP generator. Importantly, different procedures can prioritize either the spatial or temporal accuracy for specific components (see

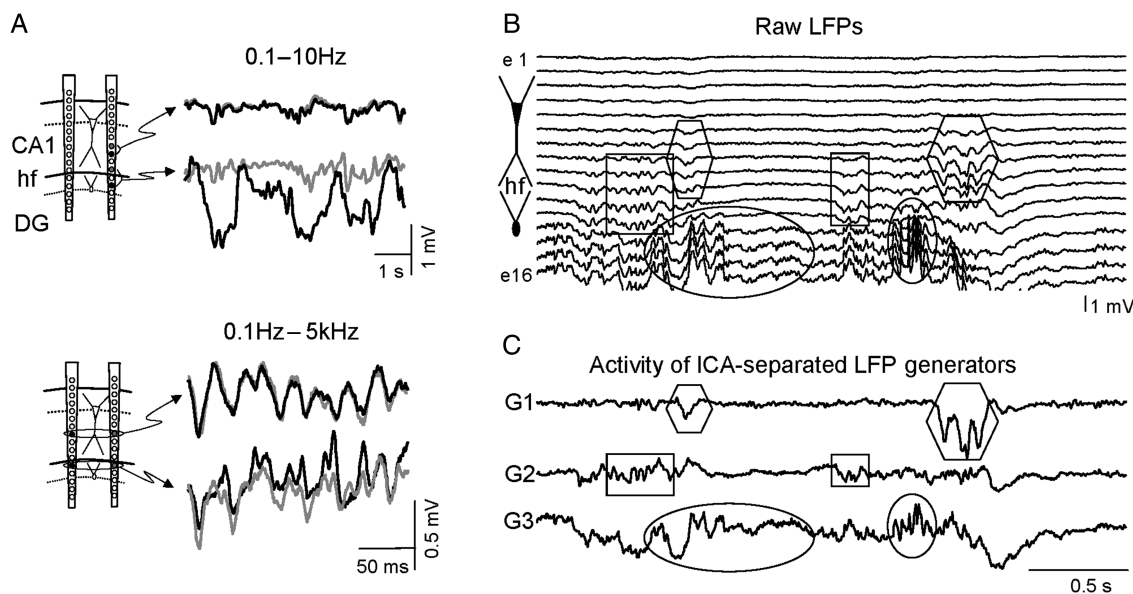


Figure 1. Hippocampal LFPs present laminar distribution and their multiple sources can be separated in domain-specific synaptic components. (A) Sketch of linear parallel 2×16 arrays spanning the CA1 and DG subfields, and examples of fragments of raw LFPs recorded in nearby positions (black or gray coding indicates the electrode positions and corresponding traces). LFPs can match or differ significantly at different positions and time points. The degree of similarity varies along the same vertical track (top panel) and within the same dendritic domain (bottom panel). For example, recordings from the CA1 stratum radiatum are strongly correlated in contiguous electrodes of the same array and between arrays, while significant differences are observed near the hf in both vertical and horizontal directions. Thus, the mixture of synaptic currents appears to be more complex and spatially restricted in some regions and neuronal domains than in others. (B) Representative recording of ongoing LFPs. Inset shows the location of the electrode array. Some bouts of activity spanning different groups of contiguous electrodes are shown in boxes to facilitate visual inspection. The spatial stability observed in the groups of electrodes with correlated activity indicates stable dendritic domains of the ongoing synaptic current sources. (C) Activity of 3 LFP generators separated by ICA from the LFP fragment shown in B. The effectiveness of the separated generators can be appreciated by visual comparison of the boxed bouts with their corresponding LFPs in B. If bouts in different generators overlap, then LFPs represent their weighted sum.

Materials and Methods), while the biophysical bases and limitations of the ICA when analyzing hippocampal LFPs have been thoroughly described elsewhere (Makarov et al. 2010; Makarova et al. 2011).

We first set out to define all primary stable dendritic domains of laminar LFPs. Except when indicated all results refer to anesthetized animals. We always chose epochs of irregular (nontheta) LFP activity for analysis as they contain a more balanced contribution of different synaptic inputs than macroscopic rhythms, in which one or few pathways may take most variance. We showed earlier that dominance of one input over others raises laminar LFPs that require additional signal handling as it reduces ICA performance on the weaker generators (Makarova et al. 2011).

We detected 6 main LFP generators that contained >99% of total variance in CA1/DG profiles and were stable in both anesthetized and awake animals (Figs 2 and 3). Gross classification was achieved by the cluster analysis of their curves of spatial weight obtained in 4–6 segments of 1 min in each animal (128–192 LFP components/animal; $n = 29$ animals in all experimental series; Methods and Supplementary Fig. 2). Only the generators that exhibited relative variance >1% in the complete CA1/DG (or CA1/CA3) profiles were examined, and the smaller generators that were detected but which exhibited very small or occasional activity were excluded from the analysis. Figure 2A shows raw LFPs along the axis of principal cells and the corresponding CSD profiles from a sample experiment. When generator-specific LFP (virtual) profiles were reconstructed (see Materials and Methods), each presented maximum activity in distinct dendritic domains of principal cells (4 sample generators are shown in Fig. 2A) and displayed only 1 maximum in a smooth spatial configuration. The LFP generators, G1 and G2, exhibited maximum power in the st. radiatum and lacunosum-moleculare (LM) of the CA1, respectively, although G2 also extended across the hippocampal fissure into the upper blade of the DG. Three more LFP generators (G3–G5) were located in the DG and their activity was strongest in the hilar region. Finally, an additional generator (G6) exhibited maximum variance in and around the CA3 pyramidal layer. Of all these generators the strongest were those located around the hippocampal fissure and dentate hilus (see population data for the relative variance and absolute power in Table 1).

The subcellular domains of each LFP generator can be approached by alignment of their respective spatial distributions to additional electrical landmarks, such as, for example, the population spikes in cell body layers. However, as LFPs extend beyond their current sources through volume conduction (Lorente de Nó 1947), we refined the subcellular location of active membranes by the CSD analysis of the depth profiles of LFPs that minimize the contribution of distant currents to recorded field potentials. This technique returns a spatial map of the transmembrane currents along the main axis of principal cells, which for the activation of a single pathway produces the laminated distribution of balanced inward (sinks) and outward currents (sources) circumscribed to the anatomy of the cell generator (Freeman and Nicholson 1975; Herreras 1990; see Materials and Methods). Due to the coactivation of multiple pathways, applying CSD to raw LFPs rendered an intricate mixture of currents (Fig. 2A). In contrast, the CSD obtained from the reconstructed generator-specific virtual LFPs (see Materials and Methods) rendered clean spatial maps with

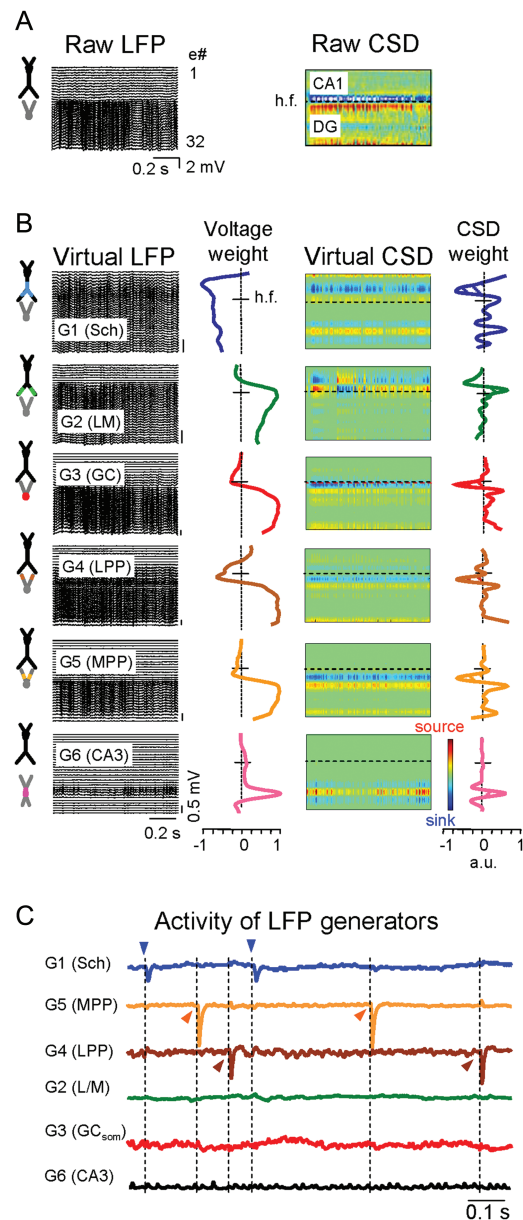


Figure 2. The subcellular localization of hippocampal LFP generators matches the termination zones of stratified synaptic pathways in discrete domains of principal cells. (A) Representative example of raw LFPs in a single electrode 1×32 array (left) and the corresponding CSD profile (right). The track spans from the CA1 soma layer to the inferior GC soma layer (pyramidal and granule cell dummies are represented to the left for spatial reference). Current sources are shown in red/yellow and sinks in blue. hf: hippocampal fissure. (B) Virtual LFP profiles and corresponding spatial weights reconstructed from ICA-separated LFP generators extend through discrete bands or strata with precise subcellular localizations. The CSD for each generator is restricted to a single cellular generator (CA1 or CA3 pyramidal cells, or granule cells). Except in one case (G2, in the CA1 st. lacunosum-moleculare; LM), all generators presented finite bands of inward or outward currents (no alternation in time) and smooth spatial profiles with only one maximum. Virtual CSD maps were obtained from virtual LFPs, and CSD weights (more noisy) are second spatial derivative of voltage weight curves. Hatched areas denote the dendritic bands where active (synaptic) currents were localized by local pharmacology (Fig. 4). CSD scale is in nonproportional arbitrary units to facilitate the visualization of weak currents. (C) Electric stimulation of major excitatory pathways produced evoked field EPSPs whose activity was selectively captured by the temporal activations of the respective LFP generators (scaled in proportional arbitrary units). Sch, medial perforant pathway (MPP), and lateral perforant pathway (LPP) stand for the Schaffer, medial and lateral perforant path generators, respectively. GC_{som}: granule cell soma generator. Colored triangles indicate stimulation times of the ipsilateral CA3, and the medial and lateral portions of the angular bundle. Note the negligible cross-contamination among generators. The vertical scale is shown in proportional arbitrary units.

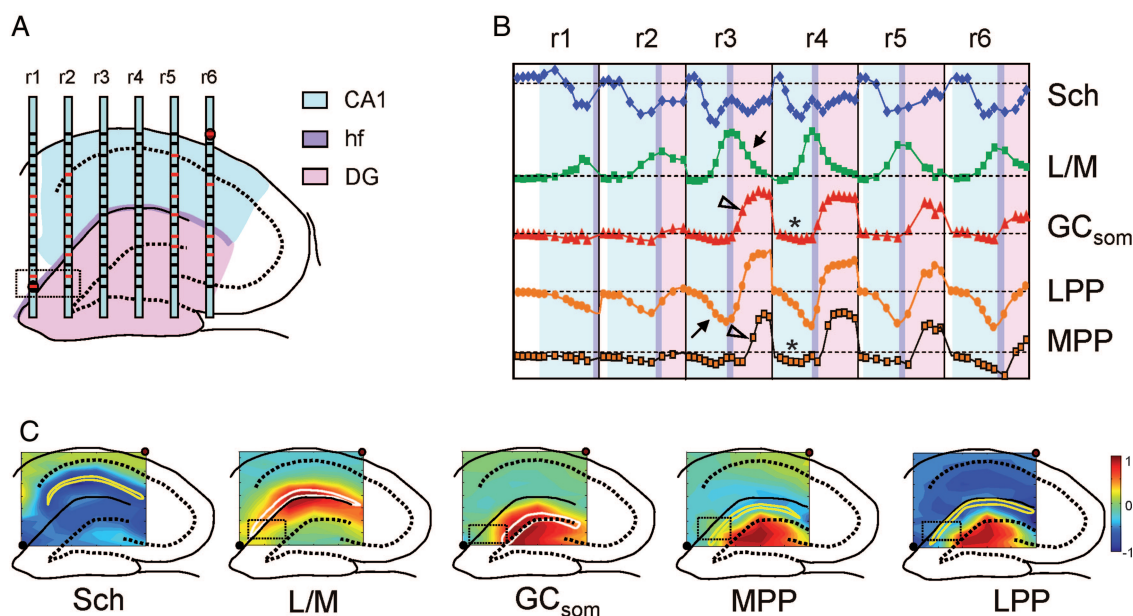


Figure 3. The regional distribution of LFP generators matches anatomical boundaries and hippocampal subfields. (A) Geometry of multiarray (r1–r6) chronic device showing the location of the recording shanks in hippocampal subfields (faulty electrodes are marked in red). (B) Representation of unfolded hippocampal subfields showing the spatial reconstruction of the relative weights corresponding to each isolated LFP generator. Note the repetitive spatial patterns and gradual shift of landmarks, such as the maxima or zero crossings, that remain at equivalent dendritic levels following the natural curvature of hippocampal layers. Black arrows indicate volume-conducted activity introduced in one subfield (CA1 or DG) by generators with active synaptic currents in distal dendritic domains of the other (LM, LPP). Generators with active currents in nondistal portions, such as the GC_{som} and MPP in the DG, generate little activity in remote areas (asterisks in CA1). Similar spatial profiles of some generators (GC_{som} and MPP) are efficiently discriminated by the abrupt shift in the spatial demarcation of the corresponding maxima (arrowhead) in the molecular layer of the DG. (C) Two-dimensional representation of virtual pathway-specific LFPs in hippocampal subfields indicating regional coverage, relative strength, and polarity (except for the LM generator in which polarity is unreliable). The active synaptic currents (identified by local pharmacology, see next figure) are defined by yellow or white lines, and the small squares indicate the zones of poor definition due to faulty electrodes.

Table 1
Relative variance and absolute power of ICA-separated LFP generators

LFP generator	Relative variance (%)	Mean power (mV^2)
Schaffer	10 ± 2	0.036 ± 0.01
Lac-Mol	23 ± 2	0.086 ± 0.02
MPP	7 ± 3	0.022 ± 0.01
LPP	32 ± 5	0.149 ± 0.04
GC_{som}	25 ± 5	0.116 ± 0.03
CA3	3 ± 1	0.017 ± 0.01

Note: The relative variance is measured as the percentage contribution among studied LFP generators found in profiles spanning the CA1 and DG. The mean power is estimated from reconstructed generator-specific LFP (virtual) profiles at the point of maximum weight in each generator. Values represent mean \pm SEM.

characteristic smooth and simple laminar distributions of currents circumscribed to either the CA1 pyramidal cells (G1 and G2), granule cells (G3–G5), or CA3 pyramidal cells (G6). The hatched areas in the curves of spatial weights for the CSD indicate the active synaptic zones as determined by local pharmacology (Fig. 2B, see below). LFP generators in the DG were duplicated in both the upper and lower blades with a mirrored spatial distribution, and they exhibited no current in the hilus (except for errors created by spatial smoothing of discrete recording points). These spatial profiles were consistent with standard potential and CSD profiles of evoked synaptic activation in granule cells (McNaughton 1980; Golarai and Sutula 1996; Canning and Leung 1997; Korovaichuk et al. 2010). The so-called Schaffer generator (G1), with a characteristic spatial pattern of excitatory current sinks in the st. radiatum, was previously identified as the excitatory input from CA3 to CA1

(Korovaichuk et al. 2010; Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012). The other CA1 LFP generator (G2 or LM generator), which extended across the hippocampal fissure, exhibited a temporal succession of current sinks and sources restricted to the st. LM. All 3 DG generators presented current sources in both granule cell layers and sinks in the corresponding molecular layers, albeit with distinct intensities and subcellular distribution. Thus, G3 (termed as GC_{som} generator) had strong sources in the granule cell layer, while G4 and G5 were characterized by strong narrow sinks in the medial and outer third of the molecular layer, respectively, and they were identified as the excitatory medial and lateral perforant path inputs to granule cells (medial perforant pathway [MPP] and lateral perforant pathway [LPP] generators; see distinct spatial curves in Fig. 3A) through the selective activation of the medial and lateral portions of the angular bundle, respectively (Fig. 2C). The LFP generator G6 was associated with strong current sources in the soma layer of CA3, and it was surrounded by sinks in both dendritic trees.

Next, we examined the regional extension of LFP generators. If LFP generators represent postsynaptic activity elicited by activity in distinct afferent populations, then each should exhibit regionalization in hippocampal subfields consistent with the spatial pattern of the axonal termination of that population. Therefore, we investigated the regional extension of the LFP generators in 2 awake animals in which multiarray electrodes were implanted (6 parallel shanks separated by 500 μm , Fig. 3A), and in 4 additional animals using single-array electrodes, plus numerous tracks in anesthetized animals. In awake animals, we analyzed recordings obtained

during nontheta behaviors (while still alert, as well as during consummatory tasks and slow-wave sleep), and spatially stable LFP generators across 6-shank arrays (Fig. 3A) were obtained by building a single matrix for analysis covering different dendritic levels and hippocampal subfields (77 of 96 useful channels in the experiment of Fig. 3). Analysis of the multiple segments of LFPs revealed identical sets of main generators to those found in multiple recording tracks in anesthetized animals. By representing the relative weights at each recording site we obtained combined spatial curves for all the arrays that revealed distinct spatial patterns fitting the anatomical boundaries of the hippocampal subfields. Each generator featured landmarks such as maxima and zero crossings that gradually shifted within the recording sites in parallel arrays matching the curved anatomy of the hippocampus such that they coincided at the same dendritic level (Fig. 3B, and see the 2D spatial configuration of the LFP generators illustrated in Fig. 3C). Note that LM and LPP generators whose active synaptic domains are located in the distal dendrites of CA1 pyramidal and granule cells, respectively, entered notable field potential into the adjacent subfield by volume conduction (Fig. 3B, black arrows), while this was not observed for MPP and GC_{som} generators (asterisks). It was also notable that there were dominant positive field potentials in the DG generators in the hilus generated through the volume conduction of currents from granule cell membranes. Despite the apparent similarity between MPP, LPP, and GC_{som} generators, these were readily discriminated by a persistent spatial shift in their respective distributions at the st. moleculare-granule cell border (e.g., arrowheads in r3, Fig. 3B; see additional evidence below).

Excitatory and Inhibitory LFP Generators

Using selective stimulation of principal extrinsic and associational pathways, we previously obtained data supporting the presynaptic origin of some excitatory LFP generators (Korovaichuk et al. 2010; see also Fig. 2C). Further evidence of the excitatory/inhibitory nature of all LFP generators was achieved by a local blockade of non-NMDA or GABA-A synaptic receptors using DNQX and BIC, respectively. As both excitatory and inhibitory synaptic inputs produce the loops of transmembrane currents with clearly discernible subcellular inward (sinks) and outward (sources) domains, we searched for the active bands (the site of synaptic contacts) by pharmacologically targeting each input. This was achieved by releasing a microdrop (50 nL) containing DNQX (1 mM) and DiI (4%) in the vicinity of the caudal shank of a 2-shank probe at the level of the CA1 st. radiatum (Fig. 4A). The Glu-R blocker selectively reduced the Schaffer-evoked fEPSP in the caudal shank, whereas no effects were observed on the rostral shank located 500 μ m away, in concordance with the extension of the dye. The spatially localized effect of the drug can be also appreciated in the curves of the spatial weights that reflect a selective decrease of variance at the Schaffer terminal zone in the group of electrodes associated with the caudal shank. Moreover, DNQX only reduced Schaffer-evoked fEPSPs and ongoing Sch-LFPs when administered in the st. radiatum, but not in the soma layer or st. oriens (Supplementary Fig. 6). This procedure allows the synaptic areas and chemical nature of all 6 LFP generators to be identified.

Accordingly, the mean power for each virtual LFP was estimated over 200-s segments before and after drug administration in the following regions: The CA1 st. radiatum and lac. mol. for the Sch and LM generators, respectively; the st. moleculare of the DG for the MPP and LPP generators, the granule cell layer for the GC_{som} generator, and the CA3 pyramidal cell layer for the CA3 generator (see representative results and the population data for the effective sites in Fig. 4B,C, respectively). DNQX dramatically dampened the activity of the Sch, MPP, and LPP generators ($29.2 \pm 9.9\%$; $15.7 \pm 6.5\%$; $7.5 \pm 3.0\%$; $P < 0.01$, Student's *t*-test), whereas the LM, GC_{som}, and CA3_{som} generators were affected by both BIC and DNQX, although a significant decrease in the GC_{som} generator was only observed in response to DNQX ($n = 4$, $**P < 0.01$, Student's *t*-test; Fig. 4C). While the antagonistic effect of BIC indicates a GABAergic origin, the reduction in power observed in the same LFP generator following Glu-R blockade indicates either a combination of 2 synaptic LFP generators (1 excitatory and 1 inhibitory), or a reduction in the excitatory drive of a single inhibitory pathway from local interneurons with somatodendritic bodies and axonal projections in the same spatial domain. The narrow domains of the active synaptic (outwards) currents produced by LM and GC_{som} generators are suggestive of inputs from subpopulations of interneurons with axon terminals at distal apical dendrites of CA1 pyramidal cells and granule cell somata, respectively.

Minimum Spatial Modules of Correlation for Pathway-Specific LFPs

The spatial correlation of LFPs (Fig. 1B) indicates the similarity of the time envelopes of postsynaptic currents at distinct loci. We first sought evidence of anatomical determinants that might underlie the spatial correlation by searching for the minimum modules in which pathway-specific LFPs remain invariant. For this purpose, we recorded LFPs simultaneously using 2 double-shank probes that were relocated in successive sessions (Fig. 5A). We then estimated the mean correlation coefficient between the temporal envelopes of the same LFP generator (1 min epochs) measured separately at different locations in a rostro-caudal gradient. For this purpose, we analyzed 2 excitatory (Sch and MPP) and 2 inhibitory (LM and GC_{som}) LFP generators.

As expected, the spatial correlation of all LFP generators diminished over distance, although at marked generator-specific rates. Superimposed fragments following GC_{som} activation (Fig. 5B) show a close correlation, even for distant loci (points 1 vs. 6), which contrasted with the strong divergence evident for the MPP generator (points 3 vs. 4), even at short distances (see the population data in Fig. 5C, $n = 3-10$ animals). At a distance of 1 mm, a strong spatial correlation was observed for the inhibitory LFP generators in both the CA1 (LM) and DG (GC_{som}), with a mean correlation of 0.6 ± 0.01 ($n = 4$) and 0.8 ± 0.01 ($n = 4$), respectively. A very strong correlation was maintained for the excitatory Sch generator at distances of up to 1.5 mm (0.75 ± 0.1 , $n = 5$: Excluding sharp-wave (SPW) events, the correlation never fell < 0.9), and this decayed gradually as the distances augmented. In contrast, a strong correlation was only observed for the MPP generator at 200 μ m (0.89 ± 0.1 ; $n = 4$), which fell abruptly at distances ≥ 500 μ m (0.33 ± 0.1 ; $n = 7$).

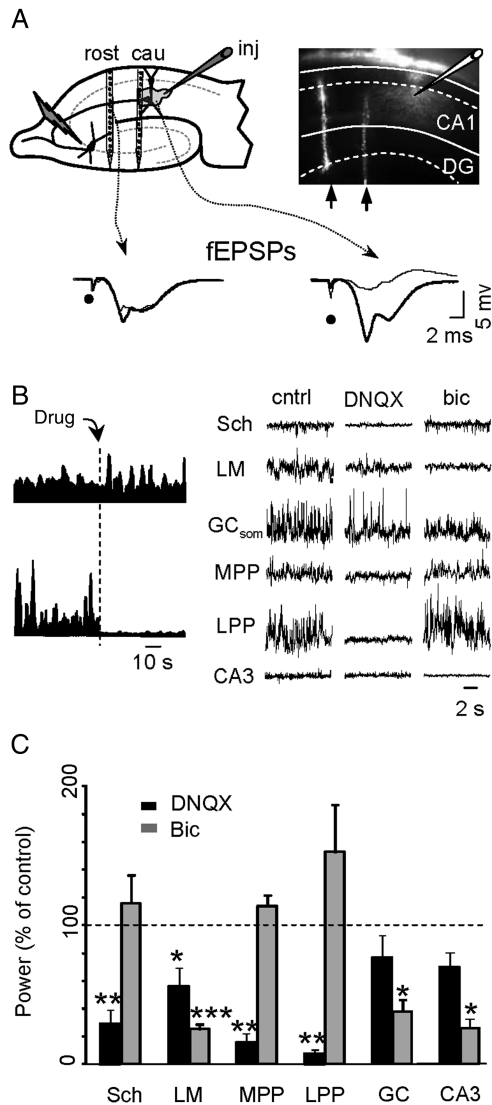


Figure 4. Chemical nature of hippocampal LFP generators. (A) Electrode arrangement and experimental procedure (left panel). Two-shank linear devices recorded in tracks $500\ \mu\text{m}$ apart, and a recording/injecting pipette was used to inject different neurotransmitter blockers within $500\ \mu\text{m}$ of one of the shanks at the desired dendritic level and subfield. The position of the recording arrays was verified by the Dil tracks revealed after histological processing, as well as the extent of injected volume in the st. radiatum of the CA1 field (right panel). The local effects of Dil were restricted to one of the arrays, with no effects observed at the second array. Note the selective reduction of Schaffer-evoked fEPSP in the caudal shank (bottom subplot). (B) Representative experiment showing the sustained and selective effect of BIC on 1 of the 2 LFP generators extracted from the same vertical profile (left). The plots correspond to time envelopes of the mean power at the site of maximal activity (sliding window of 0.5 s) for the Schaffer (upper) and LM (lower) generators. The effects of DNQX and BIC on the activation of different LFP generators are shown on the right. The vertical scale is shown in arbitrary units. (C) Population data showing the effect of neurotransmitter blockade on LFP generators. The data (mean \pm standard error of the mean [SEM]) represent the percentage of power in the drug-affected array relative to the unaffected array. $N = 4\text{--}10$ animals, except for CA3 generator ($n = 2$); Student's t -test: $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

The decay rate of the spatial correlation for the 4 selected LFP generators was studied (Fig. 5D, left) and, although the hippocampal curvature complicates the correct placement of the arrays in central and ventral positions, we could obtain long-distance correlations for the Sch generator by using single-channel raw LFPs recorded by a micropipette in a

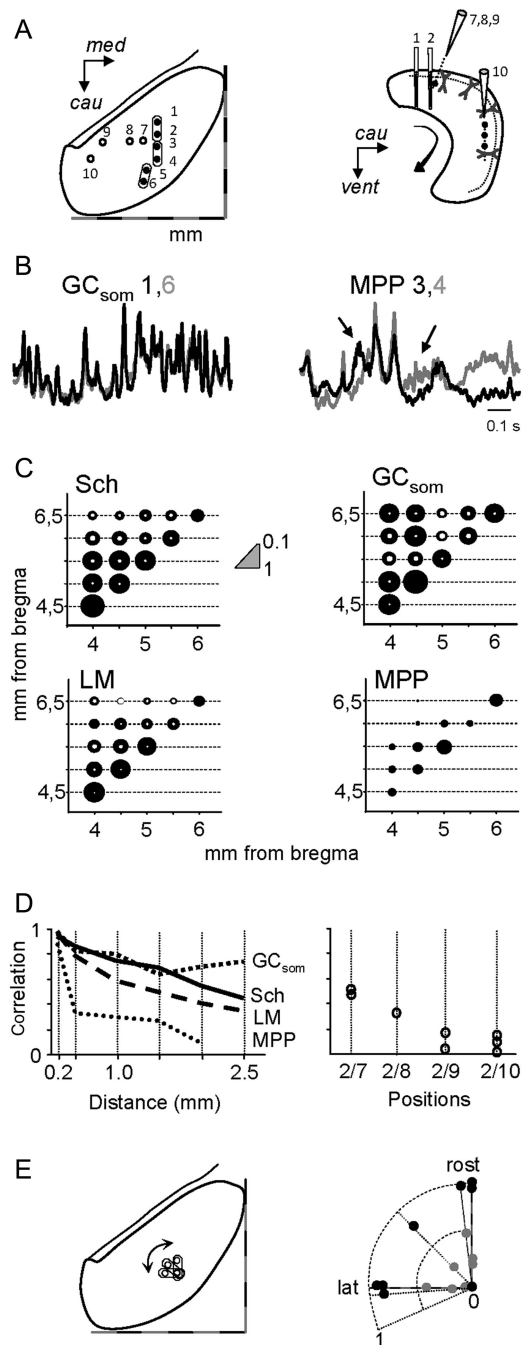


Figure 5. LFP generators show pathway-specific modules of spatial coherence. (A) Scheme showing the insertion points (left, dorsal view and right, lateral view) of parallel linear arrays (2 two-shank arrays inserted simultaneously) spanning the CA1 and DG (points 1–6), and the additional recording points in the CA1 st. radiatum (7–10). Two-shank arrays are enclosed in ovals. (B) Superimposed sample traces in 2 different arrays for the GC_{som} (left) and the MPP (right) generators. Note that distant positions (1 and 6) in the former exhibit nearly identical time courses, while nearby positions (3 and 4) in the latter differ significantly. (C) Cross-correlation coefficients for different LFP generators in positions roughly parallel to the midline (points 1–6; scale in absolute mm from bregma). Inner white circles represent the standard errors. (D) Left, comparative view of the degree of the spatial correlation for different LFP generators in loci parallel to the midline in a representative animal. Data are pooled according to the distances between the paired recording points (points 1–6). Right, additional comparisons for the Schaffer generator between the array at point 3 and single points in distinct ventro-lateral positions (data pooled from 3 animals). (E) Rotating the relative positions of the parallel arrays ($500\ \mu\text{m}$ separation) with respect to the midline does not noticeably modify the correlation. The data correspond to individual comparisons for the GC_{som} (black circles) and MPP (gray circles) generators pooled from 4 animals.

limited band in the st. radiatum in which we assessed that Sch-LFPs are poorly contaminated by distal LM sources (Supplementary Fig. 7). Thus, raw LFPs in these Schaffer-specific sites (Fig. 5A, right) were correlated with the time activation of the Sch generator in dorsal arrays (Fig. 5D, right). The correlation fell <0.2 for distances >2 mm and approached zero over longer distances, suggesting the existence of separate groups of activating presynaptic cells in the CA3 population.

In a separate set of experiments, we checked for the possible influence of diverse geometry and orientation of axonal terminal fields (Ishizuka et al. 1990; Somogyi and Klausberger 2005) by rotating 2-shank probes respect to the midline (Fig. 5E1). At least for the short distance tested (0.5 mm between shanks), we found identical high and low correlation for both the Sch (Fig. 5E, right, black circles) and MPP generators (gray circles), respectively ($n = 3$ animals).

Globally, these results indicate pathway-specific structural (anatomical) modules of invariant LFPs, which are largest for the granule cell somatic inhibitory input, very small for the excitatory MPP generator, and very large for the excitatory Schaffer generator only within strips parallel to the midline but decaying gradually along the longitudinal axis of the hippocampus.

The Match/Mismatch of Activity in LFP Generators Reveals Specific Topology and the Dynamics of Afferent Populations

A spatial module of correlated LFPs may be created by the synchronous firing of presynaptic units whose synaptic territories overlap heavily, or by joint modulation of the firing rate of presynaptic units whose projections do not necessarily overlap. We studied both these possibilities in the 2 LFP generators exhibiting large modules of strong spatial correlation, the excitatory Sch input to CA1, and the inhibitory GC_{som} input to DG, comparing the fine temporal structure of the fluctuations of each generator in site pairs (Fig. 6A1).

Time envelopes, estimated as instant variations in power, exhibited near identical patterns for the Schaffer generator at any 2 sites parallel to the midline (Fig. 6A2, points 1–2: Correlation 0.93 ± 0.02 , positions 4–4.5 mm posterior to bregma, $n = 7$ measurements in 4 animals), and this correlation only dropped significantly when distant sites were compared in which one of the recordings was near the subicular border (points 1–6: 0.35 ± 0.07 ; $n = 4$). This decrease was induced largely by the dissimilar spatial coverage of SPWs occurring at low rates in periods of irregular nontheta activity (common and site-specific SPWs are indicated with filled and empty triangles and arrows, respectively: Fig. 6A2, see the sample cluster of SPWs in Fig. 6A3). Cross-correlation between Schaffer activations in dorso-medial (points 2–3) and latero-ventral positions (points 7–8) fell to negligible values, irrespective of the SPWs (0.13 ± 0.02 , $n = 6$ comparisons in 2 animals: sample in Fig. 6A2, points 3 and 8), indicating that different groups of presynaptic CA3 cells project to laterally shifted (i.e., septo-temporal) CA1 sites.

Baseline Schaffer activity consisted of a gamma sequence of discrete field events in CA1 or μ -fEPSPs elicited by the sequential firing of CA3 neuronal assemblies (Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012; Fernández-Ruiz, Makarov, Herreas 2012). These excitatory quanta exhibited a steady rostro-caudal delay of 2.0 ± 0.22 m/s ($n = 9$) that roughly approached

the conduction velocity of Schaffer collaterals measured by evoked potentials (Andersen et al. 1971). In addition, there was a strong covariation in the amplitude of elementary μ -fEPSPs at sites parallel to the midline (Fig. 6B1), denoting a common set of presynaptic units (or functional assembly) that each generated a μ -fEPSP. The covariation index was estimated by linear regression between paired series of μ -fEPSPs independently obtained for each linear array and was 0.92 ± 0.3 between pairs of CA1 sites lying 4–6 mm posterior to the bregma (see sample in Fig. 6A1, A2, $n = 11$ measurements pooled from 4 animals), although it dropped to non-significant values as one of the recordings shifted laterally and ventrally ($r = 0.17 \pm 0.02$, $n = 6$ measurements pooled from 3 animals; Fig. 6B3). The percentage of paired μ -fEPSPs also dropped from $74.1 \pm 3.1\%$ to $46 \pm 0.8\%$ (~ 20 – 30% of non-paired events corresponded to noise-level events; see Materials and Methods). Finally, we evaluated the spectral coherence between pairs of recordings taken at different distances within the spatially correlated modules (see Materials and Methods). Analysis of 36 epochs (1 min each) in 4 animals rendered a smooth repeatable frequency profile in which the coherence was >0.8 for frequencies up to approximately 50 Hz and that decayed gradually to become nonsignificant beyond approximately 100 Hz (Fig. 6C, upper row).

When the GC_{som} was compared with the Sch generator, there were both similarities and notable differences within their respective modules of coherence. Both exhibited a dominant gamma succession of events (Figs 5B and 6B), although the GC_{som} exhibited no significant delay of paired elementary events recorded in different sites (0.09 ± 0.11 ms; $n = 16$ measurements pooled from 4 animals), indicating that spike conduction through the axonal arborization of presynaptic cells reached postsynaptic targets more synchronously. Furthermore, despite the strong global correlation between distant sites (up to 2.5 mm: Fig. 5C), the profiles of spectral coherence for the GC_{som} generator were more irregular between animals and varied in different epochs analyzed in the same animal (Fig. 6C, Experiment 3). Thus, while the spatial module of the coherence of the GC_{som} is compatible with a joint modulation of the firing rate of multiple presynaptic units projecting over the granule cell population (Whittington et al. 1995), the individual synaptic territories may not overlap significantly, permitting independent contributions to local LFPs according to processing demands.

Varying Synchronization of Presynaptic Units also Determines the Extent of Spatial Coherence

The aforementioned results indicate that anatomical constraints (e.g. overlapped postsynaptic territories of different Schaffer axons) may determine spatial coherence over large postsynaptic regions. However, naturally occurring variations in the synchronization of presynaptic units also determine the extent of spatial coherence. One such case is evident in the spatial coverage of basal and SPW activities in the Schaffer generator. Unlike elementary μ -fEPSPs, different SPW events covered variable portions of the dorsal CA1 (Fig. 6A3).

To further test this issue, we devised a functional test to externally modify the synchronization of firing in the afferent population/s. We checked 2 LFP generators with both high and low spatial coherence, the Schaffer and MPP excitatory generators, the activity of which is driven by the ipsilateral

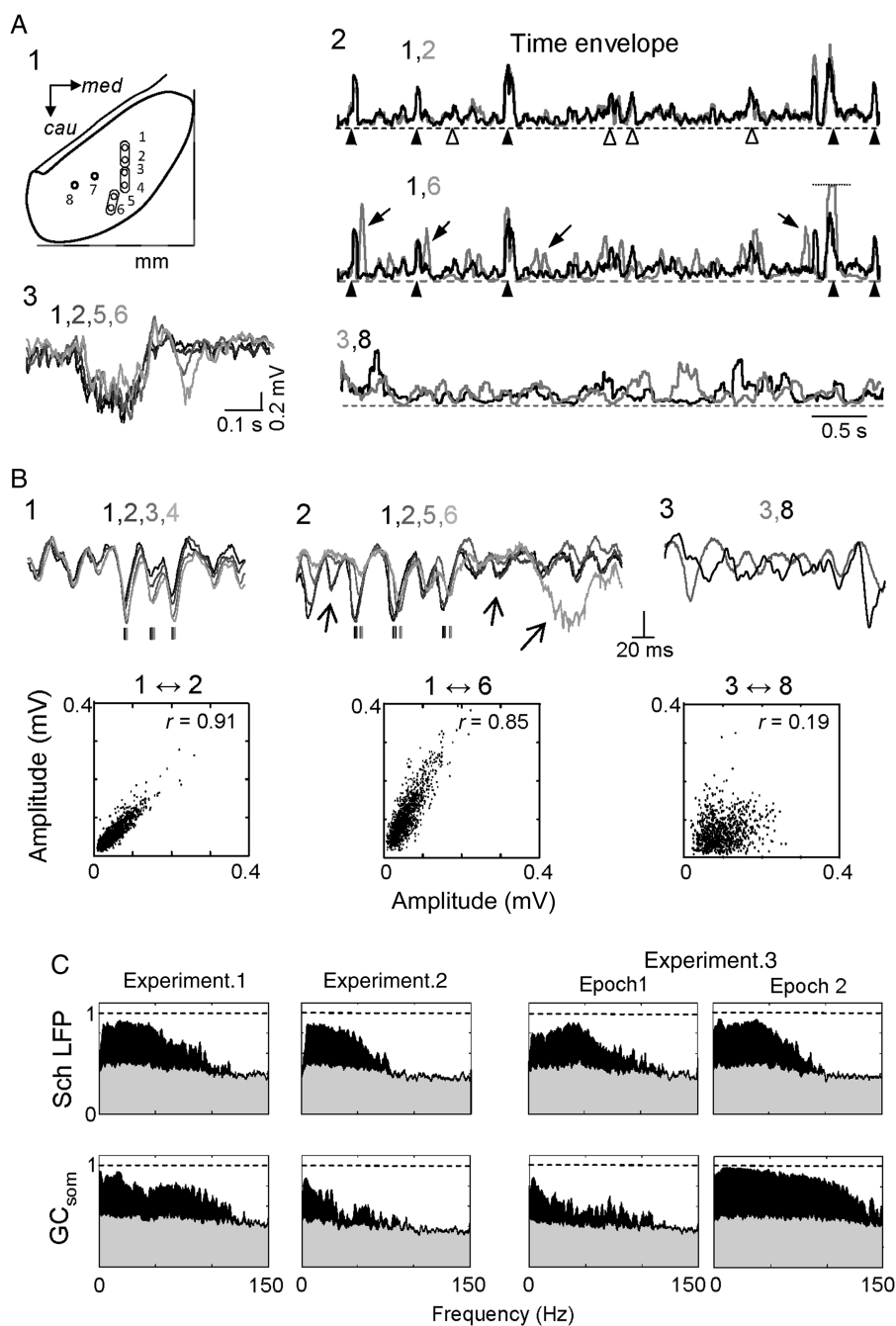


Figure 6. The fine temporal details within the modules of high spatial coherence indicate distinct mechanisms for the synchronous activation in different generators. (A) (1) Schematic showing the insertion points (dorsal view) of parallel linear arrays. (2) Time envelopes of instant power (sliding window of 0.1 s) for the Schaffer generator in different arrays, recording from loci parallel to the midline. Superimposed traces 1, 2 and 1, 6 belong to the same LFP epoch. The large bouts of activity correspond to SPWs. The spatial coverage of SPWs varied significantly, some reached the rostral end, while others did not (3). (B) Elementary μ -fEPSPs within the gamma frequency vary markedly within the series, but maintained proportional amplitude along large strips parallel to the midline, indicating a common origin and local substrate. The rostro-caudal delay matches spike conduction in Schaffer collaterals (vertical dashes indicate peak time and sequential activation). As recordings become more distant from one another (subplots 1–3), some of the quanta begin to exhibit amplitude differences (arrows), while the time course of SPWs differs normally. Comparisons between rostro-medial and ventro-lateral activations (3) are totally discrepant. The plots below show the amplitude covariation of paired quanta between arrays, where r is the cross-correlation coefficient for the paired data. These data indicate a heavy overlap of activated presynaptic axons as the substrate for the modules of high spatial coherence. (C) Comparative spectral coherence of 1 min epochs for the Schaffer (upper row) and GC_{som} (lower row) generators between pairs of electrode arrays separated by 0.5 mm in different experiments and epochs. Gray shading indicates the level of statistical significance (surrogate test). The Schaffer generator exhibits similar spectral profiles in all and for similar frequency ranges, while the GC_{som} inhibitory generator varied considerably even in different epochs of the same animal (t1 and t2 of Experiment 3). This discrepancy suggests the existence of different mechanisms underlying the high spatial coherence.

CA3, and medial entorhinal cortex, respectively. The average degree of ongoing synchronous firing in presynaptic units was enhanced by GABA blockade via local BIC administration

through a recording pipette (Fig. 7A). Epileptic spikes developed locally at sites in the afferent population (open arrows in traces of Fig. 7B) that evoked fEPSPs in postsynaptic sites

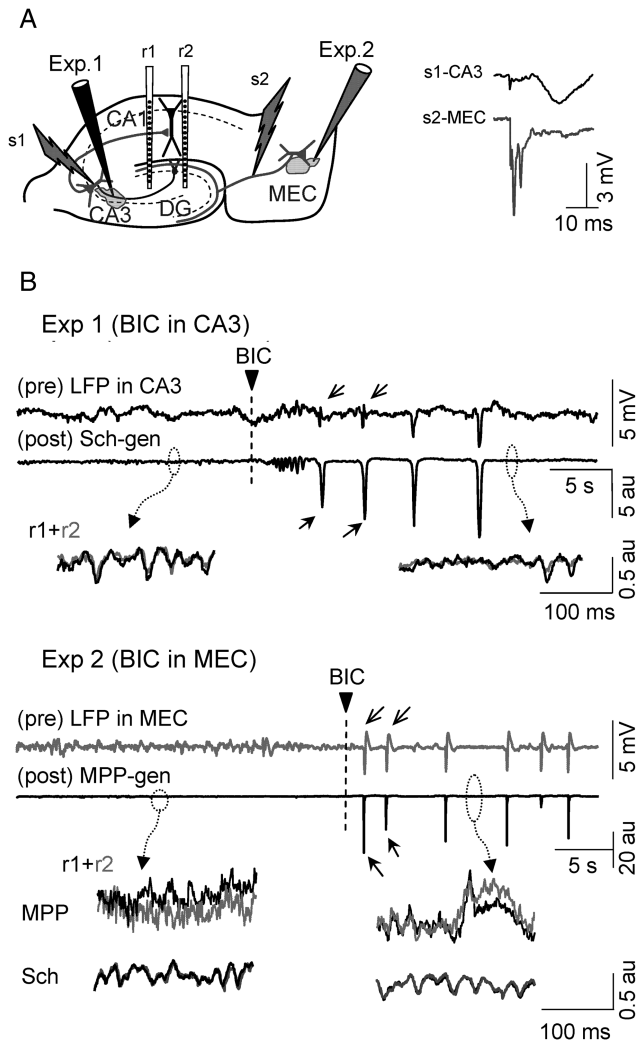


Figure 7. Spatial coherence of LFPs also depends on the synchrony of afferent populations. (A) The arrangement used for the experimental modulation of the spontaneous firing synchronism in presynaptic neurons that gives rise to hippocampal LFP generators. The Schaffer and MPP generators were obtained independently from LFP profiles in 2 parallel arrays (r1 and r2; 0.5 mm apart). Stimulating electrodes (S1 and S2) were placed in the ipsilateral CA3 and the medial portion of the angular bundle for the test activation of studied pathways. One injecting/recording pipette filled with BIC was placed in either the CA3 somatic layer (Experiment 1) or the MEC. MEC-evoked responses to the right were recorded from the injecting pipette and guided placement. (B) The long traces correspond to raw LFPs recorded by injecting pipettes at afferent populations (pre), and to simultaneous time activation of the LFP generators in postsynaptic regions (post). Upon microdrop injection of a GABA blocker (BIC), epileptic spikes developed locally in both experiments (open arrows in CA3 and MEC traces of raw LFPs), which produced large synaptic envelopes in LFP generators (arrows in Sch and MPP traces). However, the correlation of baseline activity in periods between epileptic spikes only increased in the MPP generator. Although increased synchrony occurred in both afferent populations, it is only reflected in the LFP generator whose minimal module of spatial coherence is smaller than the recording interdistance (the MPP). Thus, while the temporal pattern of Schaffer activities may change, the correlation between loci activated by the same axons is unaffected, if it was already synchronous in control conditions.

(closed arrows), ensuring topological connection between the 2 regions. If our hypothesis is correct, there should be no variation in the correlation of LFP generators between pairs of postsynaptic sites that already had a strong correlation due to structural constraints, while increased afferent synchronization would be expected when there is low spatial coherence

in control conditions. We examined postsynaptic sites 500 μm apart, and the instants of epileptic spikes were excluded. When BIC was injected into the CA3 (Fig. 7B, Experiment 1), local epileptic spikes developed in the raw LFP at the site of injection (pre-CA3 in Fig. 7B) that produced large fEPSPs in the postsynaptic CA1. Following ICA, these appeared selectively in the Schaffer LFP generator (post-CA1). The ongoing postsynaptic Schaffer gamma activity that was strongly correlated between pairs of sites in control conditions became distorted following the administration of BIC (enlarged traces below), although the intersite correlation remained high (0.88 ± 0.02 and 0.84 ± 0.01 in control and BIC conditions, respectively, $n = 6$ epochs). However, when BIC was injected into the medial entorhinal cortex (MEC; Fig. 7B, Experiment 2), the spatial correlation of the MPP generator obtained in pairs of postsynaptic DG sites increased notably (0.5 ± 0.02 and 0.77 ± 0.03 in control and BIC conditions, respectively).

Discussion

In general, it is difficult to interpret LFPs and their zonal divergence in situations where synaptic currents of different presynaptic origins combine. Using spatially discriminating techniques in the hippocampus, we have separated and analyzed up to 6 stable laminar LFP generators, each with distinct synaptic territories in specific domains of principal cells and hippocampal subfields, these matching known terminations of local and extrinsic presynaptic populations. LFP synaptic generators feature the minimum modules of spatial coherence that at least in one case (Schaffer) was modular-like and determined by the common topology of presynaptic units. Others are less regionalized and can be better explained by widespread coalescence of synaptic territories from presynaptic individual cell's axons, for example, the somatic inhibitory input to granule cells. We have shown that, for distant recordings separated more than the size of structural modules, the pathway-specific LFPs reflect the independent activity of distinct groups of units in the same presynaptic population, such that different modes of functional presynaptic firing can be recognized by the distinct spatial coverage of postsynaptic generators.

There is a general consensus that LFPs arise from synchronous currents in multicellular sources. While the theoretical bases of LFPs have been well described (Lorente de N3 1947; Elul 1972; Klee and Rall 1977; Gloor 1985; Varona et al. 2000), there exists certain lag in their experimental application over involved neuronal structures. While data contingent with specific LFP events (e.g., unitary activity, intracellular recordings: Buzs3ki et al. 1983) provides valuable hint on their cellular sources, the detailed information on the geometry and arrangement of unitary neuronal sources and activating inputs is required for a reliable and unambiguous identification. The ongoing activity involves the activation of individual cells or cell assemblies that may project to different parts of postsynaptic regions. Hence, the LFP activity generated by input from a single presynaptic population is not synchronous all over. Besides, different extrinsic and local populations have dissimilar axonal coverage of the dendritic domains in target cells, thus generating LFPs of different spatial distribution. The optimization of spatially discriminating techniques such as ICA enables the separation of LFPs in the hippocampus into individual generators with a constant spatial distribution

(Korovaichuk et al. 2010). By definition, pathway-specific generators exhibit full laminar coherence (as evoked potentials), which eliminates the inherent problems of varying polarity and amplitude when recording from different levels or strata. Accordingly, the time activation of the LFP generators can be used to establish their spatial extension by simple correlation of the activities recorded at different loci.

Most LFP Generators are Pathway Specific, but not all Synaptic Pathways Produce Observable LFPs

Like the evoked potential profiles generated by the specific activation of anatomical pathways (Andersen et al. 1971), ongoing LFP generators have smooth spatial distributions with a single maximum and a spatial distribution of inward/outward currents confined to the cellular axis of either the pyramidal or granule cells. Thus, the Schaffer, MPP, and LFP excitatory generators have active sinks in both the CA1 stratum radiatum and the middle as well as outer thirds of the molecular layer, respectively. As expected, the activity of all these generators is selectively depressed by blocking glutamate receptors. In turn, the sink/source profiles for the GC_{som} and CA3_{som} generators matched well with the expected profiles of somatic/perisomatic inhibitory synapses, and their activities were selectively abolished by GABA-R blockade. Therefore, these generators most likely correspond to basket-cell type inputs in each subfield. We obtained conflicting results for the strong LM generator, which was partially depressed by both Glu and GABA-A receptor blockades, and that displayed a temporal succession of sinks and sources. This dendritic domain may generate active sinks from perforant path activation (Leung and Peloquin, 2010) and active sources from Or-lac interneurons. One possible explanation is that the LM generator is a combination of 2 inputs that are difficult to separate by ICA, 1 excitatory and 1 inhibitory, which converge on the same dendritic domain at the distal tuft (Brankačk et al. 1993). The stability of all the LFP generators identified was confirmed by chronic recordings revealing the essentially identical subcellular and regional spatial distributions. Thus, we consider each LFP generator as a pathway-specific LFP component with populations of origin in the ipsilateral CA3, medial and lateral entorhinal cortices, and 3 different local inhibitory subnetworks: 2 of the basket type in CA3 and GC, and a distal-projecting subnetwork in the CA1 field.

It is noteworthy that the anatomical connections whose synchronous activation produce measurable evoked field potentials outnumber the hippocampal LFP generators described here. Among the unrepresented inputs are those from the septum, the contralateral (commissural) inputs to the CA1 and CA3, and a number of local inhibitory inputs in all subfields (Andersen et al. 1961; Amaral 1978; Buzsaki and Eidelberg 1982; Somogyi and Klausberger 2005). However, not all synaptic currents contribute significantly to macroscopic LFPs, rather only those that conform to the appropriate spatial structure and temporal pattern (Elul 1972; Makarova et al. 2011; Ho et al. 2012). Thus, poor laminar segregation of axonal arborization, or extreme levels of activity (too scarce or too frequent), would not generate a sufficient extracellular current or the required time fluctuation, but they are still essential for information processing and postsynaptic output.

Functional Implications of Pathway-Specific Structural Boundaries of LFP Coherence

The CA1 Schaffer and the MPP entorhinal inputs exhibit significantly different modules of spatial coherence in spite of the similar temporal structure of their respective ongoing activities with dominant excitatory quanta in gamma frequencies (Fernández-Ruiz, Makarov, Benito, et al. 2012; Fernández-Ruiz, Makarov, Herreras 2012). For these inputs, presynaptic neurons project axons that branch out and leave multiple buttons en passage, which should produce near-synchronous LFPs over an extended postsynaptic area. Therefore, the differential minimal spatial modules are probably due to additional anatomical factors, such as the degree of the spatial overlap of axonal territories of individual cells. Schaffer LFPs are highly coherent within 2×0.5 mm sheets that lie roughly parallel to the midline in the dorsal hippocampus, which is approximately the extension of a single CA3 pyramidal cell axonal arborization in the CA1 (Ishizuka et al. 1990), although they fall off sharply in the lateral direction beyond 0.5 mm. The covariance of the amplitude and the characteristic rostro-caudal delay of elementary μ -fEPSPs can only be explained by near-synchronous activation of multiple CA1 pyramidal cells by axons with dominant rostro-caudal orientation and a similar topology originating in groups of simultaneously firing CA3 pyramidal cells (Hjorth-Simonsen 1973; Li et al. 1994; Fig. 8A). For recording positions separated laterally by larger distances, the increasing divergence of Schaffer LFPs reflects the independent activity of distinct subsets of presynaptic CA3 neurons. Thus, the basal activity of the Schaffer generator is reminiscent of the lamellar concept proposed by Andersen et al. (1971), at least for this segment of the hippocampal network. However, the longitudinal CA3–CA1 communication that is also present (Li et al. 1994) may not be based on functional assemblies with overlapping topological projections. The Schaffer SPWs represent a notable nonlamellar exception that cover much larger and more variable zones of the CA1, which is slowly activated in spatial sequence without an apparent preferred direction, and that can stop suddenly at different sites. These features are compatible with a slow avalanche-like longitudinal activation of CA3 units over extended septo-temporal levels, possibly through the local recurrent network (e.g., Vincent et al. 2012). Thus, the differential spatial coverage of SPWs and μ -fEPSPs reflect 2 modes and degrees of synchronization in presynaptic CA3 units.

In turn, the extremely low spatial correlation of LFPs produced by the MPP is indicative of highly localized clusters of postsynaptic activity. Such a pattern may result from the spatial divergence of individual perforant pathway axons, while the strong curvature of the DG could further minimize extracellular clustering of synaptic currents, even for synchronous events (Fig. 8B). This implies that the use of different recording sites permits a more topological reading of the ongoing activity of presynaptic entorhinal cells. The obvious impractical consequence is that one-site recordings of the activity of the MPP generator cannot be taken as a representative of entorhinal population activity.

We have demonstrated that inhibitory inputs can act as strong LFP generators. Notably the inhibitory plexuses of individual interneurons extend over distances shorter than the size of coherent modules (Somogyi and Klausberger 2005). To reconcile these findings, we may suppose that multiple

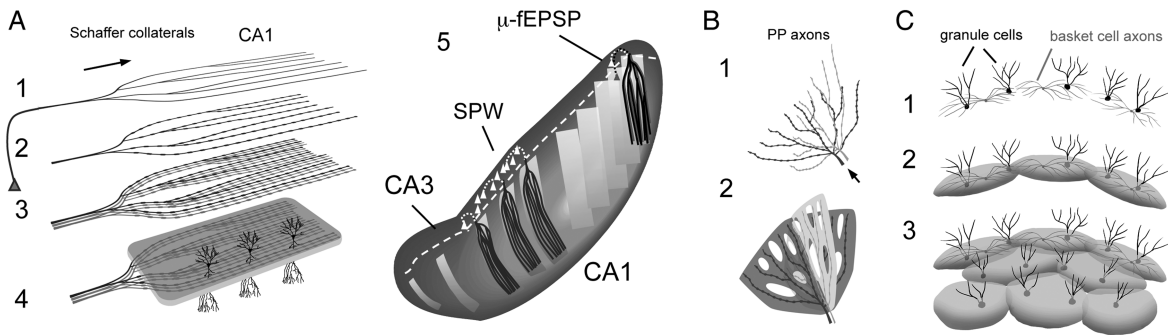


Figure 8. Proposed structural and functional determinants of spatial coherence for some hippocampal LFP generators. (A) Excitatory Schaffer input to CA1. Each CA3 pyramidal neuron sends axon that leaves multiple collaterals in CA1 with dominant parallel orientation (1) leaving synaptic buttons en passant (2) on numerous CA1 pyramidal cells. Functional CA3 pyramidal cell assemblies have similar axonal territories (3) and their joint activation produces near-synchronous synaptic currents on a narrow dendritic band of CA1 pyramidal cells (4) that conforms a strip-like spatial module of coherent LFP activity. The width of the strip is thus defined by the average coverage of individual cell's axon and the common topology of a functional CA3 assembly. Note that the same spatial module can be "occupied" by different CA3 assemblies as long as they have similar topology (e.g., sequence of μ -fEPSPs). The apparent "lamellar" organization (5) manifests at different septo-temporal levels of the CA1, but is broken up when afferent firing synchrony organizes differently, as during SPWs in which cofiring CA3 neurons extend over widespread septo-temporal levels. (B) Perforant path input. The LFP activity is poorly correlated in nearby sites, possibly because of the fanning of axon branches (1) and reduced spatial overlap of synchronous synaptic currents caused by excessive curvature. (C) Granule cell somatic inhibition (GC_{som} generator). The axonal plexus of basket-cell interneurons (in gray) may produce inhibitory currents in the somata of the large number of granule cells (in black). (2, 3) Synchronous modulation of basket-cell subpopulation produces the coalescence of basket-cell synaptic territories, thus spatial coherence of the GC_{som} generator extends much more than the extension of one cell's axonal plexus.

homogeneous interneurons forming functional subnetworks are jointly modulated by an external driver or are mutually synchronized. Accordingly, the inhibitory currents produced by axons from individual interneurons merge in large steady modules (Fig. 8C). This concept coincides with functional results that propose correlated activity in interneuron subnetworks (Whittington et al. 1995; Fukuda and Kosaka, 2000; Ho et al. 2012). Interestingly, we observed variations in the spectral coherence between 2 readings of the GC_{som} inhibitory generator despite a steady strong global correlation. We propose that this may be a manifestation of functional coupling/decoupling mechanisms of the units in the subnetwork according to the information-processing demands.

We presented evidence demonstrating that the more presynaptic neurons fire synchronously (as witnessed by the occurrence of local epileptic spikes following disinhibition), the greater the spatial correlation of LFPs in the postsynaptic region, presumably by blending together coactivated postsynaptic territories. As expected, this only occurs for the medial entorhinal cortex projections in the DG that normally exhibit low spatial correlation, but not for the Schaffer input to CA1 that has full coherence, at least within longitudinal strips. This result provides empirical evidence supporting the notion that both spatial (overlap of axonal territories) and temporal factors (their synchronous activation) play an important role in the generation of LFPs. Moreover, our findings highlight the peculiar transformation of synchronization in presynaptic units into postsynaptic coherence, that is, temporal into spatial features of activity, which is essential to interpret zonal LFP differences. Thus, firing synchronization of all afferent fibers in a pathway, as by electric shocks, produces the complete and nearly synchronous activation of the entire postsynaptic region, that is, full spatial coherence of the recorded field potential activity. However, during ongoing activity, only groups of afferent neurons fire correlated spikes, and their axons activate varying portions of the postsynaptic region according to the topology of connections; hence, spatial coherence of LFPs decreases. Since LFPs are the reflection of spiking activity in presynaptic populations, the found

stereotyped spatial patterns of LFP coherence, as seen in Schaffer μ -fEPSPs, or inhibitory GC_{som} potentials, denote the specific temporal patterns of the activation of presynaptic units.

The physiological relevance of spatial coherence is that it helps us discerning when 2 recording sites are capturing the same information from afferent neuron populations. Matching LFPs is either due to overlapping axonal territories of presynaptic units (whether firing synchronously or not) or to the synchronous firing of presynaptic cells (whether their axons overlap in target regions). However, differing LFPs necessarily indicates varying activity in presynaptic units. Naturally, this is only applicable to pathway-specific LFPs. In conclusion, the finding of pathway-specific modules of LFP activity serves not only to reveal the topology of connections, but also explains LFP differences in nearby recordings. This represents a necessary first step to mapping their temporal changes in activity and their correlations with full understanding of their biophysical bases.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>.

Funding

This work was supported by the former Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2010-19192/BFI and FIS2010-20054).

Notes

We thank S. Montgomery and G. Buzsáki for providing LFP recordings in awake animals, C. Dotti and G. Martín-Vázquez for helpful comments, R. Núñez and J. Delgado for technical assistance and help with graph art, and M. Sefton at BiomedRed for editorial support.

References

- Amaral DG. 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*. 182:851–914.
- Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK. 1971. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res*. 13:222–238.
- Andersen P, Bruland H, Kaada BR. 1961. Activation of the field CA-1 of the hippocampus by septal stimulation. *Acta Physiol Scand*. 51:29–40.
- Arieli A, Shoham D, Hildesheim R, Grinvald A. 1995. Coherent spatio-temporal patterns of ongoing activity revealed by real-time optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex. *J Neurophysiol*. 73:2072–2093.
- Bach M, Krüger J. 1986. Correlated neuronal variability in monkey visual cortex revealed by a multi-microelectrode. *Exp Brain Res*. 61:451–456.
- Belitski A, Gretton A, Magri C, Murayama Y, Montemurro MA, Logothetis NK, Panzeri S. 2008. Low-frequency local field potentials and spikes in primary visual cortex convey independent visual information. *J Neurosci*. 28:5696–5709.
- Bell A, Sejnowski T. 1995. An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Comput*. 7:1129–1159.
- Brankač J, Stewart M, Fox SE. 1993. Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Res*. 615:310–327.
- Buzsáki G, Eidelberg E. 1982. Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Res*. 237:283–295.
- Buzsáki G, Leung LS, Vanderwolf CH. 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*. 287:139–171.
- Canals S, López-Aguado L, Herreras O. 2005. Synaptically-recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol*. 93:909–918.
- Canning KJ, Leung LS. 1997. Lateral entorhinal, perirhinal, and amygdale-entorhinal transition projections to hippocampal CA1 and dentate gyrus in the rat: a current source density study. *Hippocampus*. 7:643–655.
- Chen A. 2006. Fast kernel density independent component analysis. *Lecture Notes Comput Sci*. 3889:24–31.
- Choi S, Cichocki A, Park HM, Lee SY. 2005. Blind source separation and independent component analysis: a review. *Neur Inf Process Let Rev*. 6:1–57.
- Congedo M, John RE, De Ridder D, Pritchep L. 2010. Group independent component analysis of resting state EEG in large normative samples. *Int J Psychophysiol*. 78:89–99.
- Diesmann M, Gewaltig MO, Aertsen A. 1999. Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature*. 402:529–533.
- Elul R. 1972. The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol*. 15:228–272.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2012. Schaffer-specific local field potentials reflect discrete excitatory events at gamma-frequency that may fire postsynaptic hippocampal CA1 units. *J Neurosci*. 32:5165–5176.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Herreras O. 2012. Sustained increase of spontaneous input and spike transfer in the CA3-CA1 pathway following long term potentiation in vivo. *Front Neural Circuits*. 6:71.
- Freeman JA, Nicholson C. 1975. Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol*. 38:369–382.
- Fukuda T, Kosaka T. 2000. Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci*. 20:1519–1528.
- Gloor P. 1985. Neuronal generators and the problem of localization in electroencephalography: application of volume conductor theory to electroencephalography. *J Clin Neurophysiol*. 2:327–354.
- Golarai G, Sutula TP. 1996. Bilateral organization of parallel and serial pathways in the dentate gyrus demonstrated by current-source density analysis in the rat. *J Neurophysiol*. 75:329–342.
- Herreras O. 1990. Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol*. 64:1429–1441.
- Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J. 1988. Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapses. *Brain Res*. 451:290–302.
- Hjorth-Simonsen A. 1973. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J Comp Neurol*. 147:145–162.
- Ho ECY, Strüber M, Bartos M, Zhang L, Skinner FK. 2012. Inhibitory networks of fast-spiking interneurons generate slow population activities due to excitatory fluctuations and network multistability. *J Neurosci*. 32:9931–9946.
- Hutchison RM, Mirsattari SM, Jones CK, Gati JS, Leung LS. 2010. Functional networks in the anesthetized rat brain revealed by independent component analysis of resting-state fMRI. *J Neurophysiol*. 103:3398–3406.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*. 295:580–623.
- Klee M, Rall W. 1977. Computed potentials of cortically arranged populations of neurons. *J Neurophysiol*. 40:647–666.
- Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2010. Minor contribution of principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol*. 104:484–497.
- Leung LS. 1979. Potentials evoked by alvear tract in hippocampal CA1 region in rats. II. Spatial field analysis. *J Neurophysiol*. 42:1571–1589.
- Leung LS, Péloquin P. 2010. Cholinergic modulation differs between basal and apical dendritic excitation of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Cereb Cortex*. 20:1865–1877.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G. 1994. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*. 339:181–208.
- López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. 2001. Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience*. 108:249–262.
- Lorente de Nó R. 1947. Analysis of the distribution of action currents of nerves in volume conductors. In: *A study of nerve physiology*. part 2, vol. 132. New York: The Rockefeller Institute, p. 384–477.
- Lorente de Nó R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol*. 46:113–177.
- Makarov VA, Makarova J, Herreras O. 2010. Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comp Neurosci*. 29:445–457.
- Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2011. Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci*. 5:77.
- Makeig S, Jung TP, Bell AJ, Ghahremani D, Sejnowski TJ. 1997. Blind separation of auditory event-related brain responses into independent components. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:10979–10984.
- McNaughton BL. 1980. Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Res*. 199:1–19.
- Montgomery SM, Betancur MI, Buzsáki G. 2009. Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J Neurosci*. 29:1381–1394.
- Nunez PL, Srinivasan R. 2006. *Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG*. 2nd ed. New York: Oxford University Press.
- Paulsen O, Moser EI. 1998. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 21:273–278.
- Plonsey R. 1969. *Bioelectric phenomena*. New York: McGraw-Hill.
- Purpura DP. 1959. Nature of electrocortical potentials and synaptic organizations in cerebral and cerebellar cortex. *Int Rev Neurobiol*. 1:47–163.

- Rappelsberger P, Pockeberger H, Petsche H. 1981. Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pfluegers Arch.* 389:159–170.
- Reichinnek S, Künsting T, Draguhn A, Both M. 2010. Field potential signature of distinct multicellular activity patterns in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 30:15441–15449.
- Schreiber T, Schmitz A. 2000. Surrogate time series. *Physica D.* 142:646–652.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol.* 562:9–26.
- Traub RD, Spruston N, Soltesz I, Konnerth A, Whittington MA, Jefferys GR. 1998. Gamma-frequency oscillations: a neuronal population phenomenon, regulated by synaptic and intrinsic cellular processes, and inducing synaptic plasticity. *Prog Neurobiol.* 55:563–575.
- van de Ven VG, Formisano E, Prvulovic D, Roeder CH, Linden DEJ. 2004. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. *Hum Brain Mapp.* 22:165–178.
- Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O. 2000. Macroscopic and subcellular factors shaping CA1 population spikes. *J Neurophysiol.* 83:2192–2208.
- Vincent K, Tauskela JS, Thivierge JP. 2012. Extracting functionally feedforward networks from a population of spiking neurons. *Front Comput Neurosci.* 6:86.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JGR. 1995. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature.* 373:612–615.
- Woodbury JW. 1960. Potentials in a volume conductor. In: Ruch TC, Fulton JF, editors. *Medical physiology and biophysics.* Philadelphia and London: WB Saunders Co. p. 83–91.