

**Estudio de la estructura dinámica de las
interacciones funcionales en el hipocampo
mediante procesamiento de registros
electrofisiológicos**

M^a Victoria Gabaldón López

Valencia, 2013

La investigación descrita en esta tesis ha sido llevada a cabo desde julio del año 2009 hasta septiembre del año 2012 en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universitat Politècnica de València y en el Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante).

Estudio de la estructura dinámica de las
interacciones funcionales en el hipocampo
mediante procesamiento de registros
electrofisiológicos

M^a Victoria Gabaldón López

Disertación presentada en
cumplimiento parcial de los requisitos
para el grado de

Doctor

Directores:

Dr. David Moratal Pérez

Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular
Universitat Politècnica de València

Dr. Santiago Canals Gamoneda

Instituto de Neurociencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- Universidad Miguel Hernández



Universitat Politècnica de València

"Every creative act is a sudden cessation of stupidity."

Edwin Land (1909–1991), US inventor and founder of Polaroid Corporation.

Forbes (June 1975)

Agradecimientos

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, han sido muchas las personas que he conocido y a las que debo agradecer que hayan contribuido de forma directa o indirecta en la realización de la misma.

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a mis dos directores de tesis: David Moratal y Santiago Canals por sus consejos y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años. Ha sido un placer trabajar a vuestro lado. Gracias por vuestra confianza y por darme esta valiosa oportunidad.

También quisiera agradecer al Dr. Valeri Makarov por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio y por los valiosos conocimientos que me transmitió durante la misma.

Quiero también expresar mi gratitud a mis compañeros del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universitat Politècnica de València, especialmente a Alex Rodrigo, Úrsula, Silvia, Alex Cosa, Sandra e Irene, por sus ánimos constantes y su apoyo incondicional.

Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante), especialmente a Efrén, por preparar con esmero todos los datos que han sido necesarios y atender siempre a mis dudas.

Mi agradecimiento va también a todos mis amigos de la carrera y a mis amigos de Requena, por su gran interés en mi trabajo, sus ánimos y su amistad.

Finalmente, como no puede ser de otro modo, gracias a mis padres, a mi hermana y a Jose, por su amor, su paciencia y el ejemplo de trabajo y humildad que me han transmitido a lo largo de mi vida. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

Contenido

Resumen	1
Abstract	4
Resum	6
Motivación	8
Objetivos y estructura	11
Capítulo 1. Introducción	13
1.1 Sistema nervioso central	13
1.1.1 El encéfalo	14
1.1.2 El lóbulo temporal	15
1.1.3 El hipocampo	16
1.2 Campos eléctricos presentes en el tejido cerebral	18
1.2.1 El potencial de campo local	18
1.2.2 Contribuciones a los campos extracelulares	19
1.3 Conectividad funcional entre áreas cerebrales	21
1.3.1 Las oscilaciones delta	23
1.3.2 Las oscilaciones theta	23
1.3.3 Las oscilaciones gamma	24
1.3.4 Acoplamiento entre las oscilaciones theta y gamma en el hipocampo	25
1.4 Problemas con la propagación de campos	26
1.4.1 Análisis de Componentes Independientes (ICA)	26
1.4.2 Registros múltiples	27
1.5 El uso de animales en la investigación neurocientífica	28
1.5.1 Razones del uso de la rata en laboratorios de investigación	28
1.5.2 El hipocampo de los humanos y de los animales	29
1.5.3 La rata Sprague Dawley	30
1.5.4 El uretano	31

Capítulo 2. Metodología	32
2.1 Adquisición de las señales	32
2.1.1 Sujetos estudiados y anestesia utilizada	32
2.1.2 Implantación de los electrodos y región de adquisición	33
2.1.3 Registro de los datos	35
2.2 Procesado de las señales	37
2.2.1 Ordenación de los canales	37
2.2.2 Diezmado y filtrado DC de los datos	38
2.2.3 Correlación y coherencia	39
2.2.4 Metodología específica utilizada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP obtenidas antes, durante y después de la potenciación sináptica, ipsilateral y bilateralmente (Apartado 3.3 de Resultados)	40
2.2.5 Metodología específica utilizada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP en theta, theta irregular y delta y entre sus respectivas componentes independientes (Apartados 3.4 y 3.5 de Resultados)	43
2.2.6 Metodología específica utilizada para calcular las matrices de correlación entre las componentes independientes de las señales de LFP tomando diferentes ventanas temporales para ver su variación con el tiempo (Apartado 3.6 de Resultados)	47
Capítulo 3. Resultados y discusión	49
3.1 Descripción de la estructura general de las gráficas	49
3.2 Análisis de la desviación típica en las medidas de correlación y coherencia	50

3.3 Análisis de los resultados ipsilaterales y bilaterales de correlación y coherencia	55
3.4 Comparativa entre los resultados de correlación y coherencia obtenidos a partir de las señales de LFP y entre sus componentes independientes	61
3.4.1 Comparativa entre las matrices de correlación entre las señales de LFP y entre sus componentes independientes	61
3.4.2 Comparativa entre los valores de coherencia entre las señales de LFP y entre sus componentes independientes	64
3.5 Efecto de la LTP sobre la coherencia entre las componentes independientes	67
3.6 Estudio de la estructura dinámica de las interacciones funcionales en el hipocampo	70
Capítulo 4. Conclusiones	85
Capítulo 5. Líneas futuras	89
Referencias	90
Publicaciones	100

Resumen

El hipocampo es una de las regiones del cerebro más ampliamente estudiadas, y es de interés para gran parte de los neurocientíficos, desde aquellos que estudian su estructura y funcionalidad hasta los que estudian su mal funcionamiento en diversas enfermedades y condiciones patológicas. El hipocampo tiene un papel fundamental, entre otras cosas, en la adquisición y consolidación de la memoria episódica, así como en la orientación espacial. De todas las propiedades de las sinapsis en el hipocampo, quizás la más atractiva, y seguramente la estudiada con mayor entusiasmo, es su habilidad de responder a patrones de activación específicos con aumentos o disminuciones de larga duración en la eficiencia sináptica. Esta propiedad plástica de las sinapsis en general, y de las del hipocampo en particular, es considerada por muchos neurocientíficos como la base celular del aprendizaje de ciertos tipos de recuerdos y memorias.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral, fruto de una estrecha colaboración entre el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València y el Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante), es aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos que regulan el flujo de información entre las distintas áreas del hipocampo y por tanto, contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos neurofisiológicos que subyacen al aprendizaje y la memoria mediante el análisis de señales adquiridas mediante registros electrofisiológicos de alta densidad, correspondientes a distintas partes del hipocampo y la corteza parietal asociativa, adquiridas en distintos instantes de tiempo antes y después de la potenciación sináptica a largo plazo.

Para ello, se ha desarrollado una metodología que nos ha permitido estudiar la actividad espontánea del sistema, y con la que hemos observado la dependencia espacial y temporal de la desviación típica tanto en los cálculos de correlación como en los de coherencia. Además, se ha trabajado tanto con los potenciales de campo locales (LFP por sus siglas en inglés), como con sus componentes independientes,

haciendo una comparativa entre los resultados obtenidos para cada caso, en cuanto a correlación y coherencia se refiere, utilizando fragmentos pertenecientes a diferentes etapas durante la potenciación sináptica a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés), para conocer los cambios que se dan en esta estructura tras dicha potenciación sináptica. En el caso de la coherencia, hemos podido observar los cambios que se producen debido a la potenciación sináptica en las diferentes bandas de frecuencia. Todos estos cálculos se han realizado de forma ipsilateral, comparando señales pertenecientes a un mismo hemisferio cerebral, y de forma bilateral, comparando señales pertenecientes a hemisferios cerebrales diferentes. Por último, a partir de la experiencia en el manejo de estos registros electrofisiológicos y de sus componentes independientes, se han identificado patrones de correlación interregional, que se suceden en el tiempo como entidades singulares y a los que hemos denominado “ministates” por su duración menor de un segundo. Dichos patrones, que aparecen de forma repetida en los registros, podrían estar asociados a eventos electrofisiológicos identificables en la señal y estar modulados por procesos de plasticidad sináptica.

Así, se ha desarrollado una metodología adecuada para el análisis de señales adquiridas mediante registros electrofisiológicos de alta densidad, mediante el cálculo de la correlación y la coherencia de estas señales electrofisiológicas y de sus componentes independientes, y se ha programado en entorno MATLAB.

Gracias a las herramientas desarrolladas y aplicadas hemos comprobado la dependencia temporal y espacial de la dispersión de los valores de correlación y coherencia y hemos analizado la estructura funcional en reposo de los circuitos de la formación hipocampal, obteniendo evidencias a favor de la existencia de dos vías de procesamiento paralelo e independiente en el sistema. Además, hemos hallado patrones de comunicación, a los que hemos denominado “ministates”, que se suceden en el tiempo en secuencias controladas por procesos de plasticidad sináptica, apareciendo repetidamente en las distintas fases estudiadas de nuestro modelo experimental de aprendizaje.

Aún nos encontramos lejos de poder describir cómo el aprendizaje modifica el ‘estado interno’ del cerebro. Entre las dificultades encontradas cabe destacar la

enorme variabilidad en las señales electrofisiológicas registradas en los distintos estados por los que, de forma espontánea, transcurre la actividad cerebral. De esta forma la huella del aprendizaje o la memoria se encuentra enmascarada por grandes fluctuaciones de actividad. Sin embargo, gracias a las herramientas desarrolladas hemos podido aportar datos nuevos sobre cómo tiene lugar la comunicación en la formación hipocampal y constatar que la plasticidad sináptica modula dicha comunicación.

Abstract

The hippocampus is one of the most widely studied brain parts, and it is of interest to most of the neuroscientists, from those who study its structure and function to those who study its malfunction in various diseases and pathological conditions. The hippocampus plays a key role, among other things, in the acquisition and consolidation of episodic memory, as well as on spatial orientation. Perhaps the most attractive property of the synapses in the hippocampus is its ability to reply to specific activation patterns with long-term increases or decreases in synaptic efficiency.

The main objective of this thesis, result of a close collaboration between Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular at Universitat Politècnica de València and Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales at Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) at San Juan (Alicante), is to provide new insights about the mechanisms of transfer of information between different areas of the hippocampus and thus contribute to a better understanding of neurophysiological mechanisms underlying learning and memory by analysis of signals acquired by high density electrophysiological recordings, corresponding to different parts of the hippocampus and associative parietal cortex, acquired at different time points before and after long term synaptic potentiation. To this end, we have developed a methodology that allowed us to study the system ipsilaterally and bilaterally, and we observed the spatial and temporal dependence of the standard deviation of the estimates of coherence and correlation. Furthermore, we have worked with the Local Field Potential channels and their independent components, and we made a comparative between the correlation and coherence results obtained for each case, using fragments from different stages, before, during and after the Long Term Potentiation, to learn about changes that occur in this structure after synaptic potentiation. With coherence, we have observed the changes that occur due to synaptic potentiation in different frequency bands. All these calculations were made ipsilaterally, comparing signals

from the same cerebral hemisphere, and bilaterally, comparing signals from different cerebral hemispheres.

Lastly, from the experience in handling these electrophysiological recordings and their independent components, we have identified interregional correlation patterns that occur through time as singular entities and we have called "ministates" for his duration of less than a second. These patterns, which appear repeatedly in the records, are associated with electrophysiological events identifiable in the signal, and are modulated by synaptic plasticity processes.

Thus, we have developed an adequate methodology for the analysis of signals acquired by high density electrophysiological recordings, by calculating the correlation and coherence of these electrophysiological signals and their independent components, and has been programmed in MATLAB environment.

Using the developed tools, we have verified the temporal and spatial dependence of the dispersion of the values of correlation and coherence and we have analyzed the resting functional structure of the hippocampal formation circuits, obtaining evidence for the existence of two parallel and independent processing pathways. Furthermore, we have found communication patterns, which we have called "ministates" that occur through time in sequences controlled by synaptic plasticity processes, appearing repeatedly in different studied stages of our learning experimental model.

We are still far from being able to describe how learning changes the brain 'internal state'. Among the difficulties encountered worth mentioning the huge variability in the electrophysiological signals recorded in the various states through which, spontaneously, the brain activity runs. Thus the footprint of the learning or memory is masked by large activity fluctuations. However, thanks to the tools developed, we were able to provide new data about how communication occurs in the hippocampal formation and find that synaptic plasticity modulates that communication.

Resum

L'hipocamp és una de les regions del cervell més estudiades, i és d'interés per a gran part dels neurocientífics, des d'aquells que estudien la seva estructura i funcionalitat fins als que estudien el seu mal funcionament en diverses malalties i condicions patològiques. De totes les propietats de les sinapsis en l'hipocamp, potser la més atractiva, i segurament l'estudiada amb més entusiasme, és la seva habilitat de respondre a patrons d'activació específics amb augments o disminucions de llarga durada en l'eficiència sinàptica. Aquesta propietat plàstica de les sinapsis en general, i de les de l'hipocamp en particular, es considera que representa la base cel·lular d'aprenentatge.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral, fruit d'una estreta col·laboració entre el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València y el Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante), és aportar nous coneixements sobre els mecanismes que regulen el flux d'informació entre les diferents regions de l'hipocamp i per tant, contribuir a un millor enteniment dels mecanismes neurofisiològics subjacents a l'aprenentatge i la memòria mitjançant l'anàlisi de senyals adquirits mitjançant registres electrofisiològics d'alta densitat, corresponents a diferents parts de l'hipocamp i l'escorça parietal associativa, adquirits en diferents instants de temps abans i després de la potenciació sinàptica a llarg termini.

Per això, s'ha desenvolupat una metodologia que ens ha permès estudiar l'activitat espontània del sistema, i amb la qual hem observat la dependència espacial i temporal de la desviació típica tant en els càlculs de correlació com en els de coherència. D'altra banda, s'ha treballat amb els canals de potencial de camp i amb els seus components independents, fent una comparativa entre els resultats obtinguts per a cada cas, per a correlació i per a coherència, utilitzant fragments que pertanyen a diferents etapes durant la potenciació sinàptica, per conèixer els canvis que es donen en aquesta estructura després d'aquesta potenciació. En el cas de la

coherència, hem pogut observar els canvis que es produeixen a causa de la potenciació sinàptica en les diferents bandes de freqüència. Tots aquests càlculs s'han realitzat de forma ipsilateral, comparant senyals pertanyents a un mateix hemisferi cerebral, i de manera bilateral, comparant senyals pertanyents a hemisferis cerebrals diferents. Finalment, a partir de l'experiència en l'ús d'aquests registres electrofisiològics i dels seus components independents, s'han identificat patrons de correlació interregional, que es succeeixen en el temps com a entitats singulars i als que hem anomenat "ministates" per la seva durada menor d'un segon. Aquests patrons, que apareixen de forma repetida en els registres, s'associen amb esdeveniments electrofisiològics identificables en el senyal i són modulats per processos de plasticitat sinàptica.

Així, s'ha desenvolupat una metodologia adequada per a l'anàlisi de senyals adquirits mitjançant registres electrofisiològics d'alta densitat, mitjançant el càlcul de la correlació i la coherència d'aquestes senyals i dels seus components independents, i s'ha programat en entorn MATLAB.

Gràcies a les eines desenvolupades i aplicades hem comprovat la dependència temporal i espacial de la dispersió dels valors de correlació i coherència i hem analitzat l'estructura funcional en repòs dels circuits de la formació hipocampal, obtenint evidències a favor de l'existència de dues vies de processament paral·lel i independent en el sistema. A més, hem trobat patrons de comunicació, als quals hem anomenat "ministates", que es succeeixen en el temps en seqüències controlades per processos de plasticitat sinàptica, apareixent repetidament en les diferents fases estudiades del nostre model experimental d'aprenentatge.

Encara ens trobem lluny de poder descriure com l'aprenentatge modifica l'estat intern del cervell. Entre les dificultats trobades cal destacar l'enorme variabilitat en els senyals electrofisiològics registrats en els diferents estats pels que, de forma espontània, transcorre l'activitat cerebral. D'aquesta manera l'empremta de l'aprenentatge o la memòria es troba emmascarada per grans fluctuacions d'activitat. No obstant això, gràcies a les eines desenvolupades hem pogut aportar dades noves sobre com té lloc la comunicació en la formació hipocampal i constatar que la plasticitat sinàptica modula aquesta comunicació.

Motivación

La formación hipocampal o hipocampo es una estructura cerebral localizada en el lóbulo temporal medial (LTM) que juega un papel fundamental en la memoria y el aprendizaje. A pesar de la importancia de la memoria en nuestras funciones cognitivas, la búsqueda de un correlato neurofisiológico directo de la misma ha demostrado ser muy difícil. En 1900, Müller y Pilzecker propusieron que el aprendizaje no induce memorias permanentes de forma instantánea sino que la memoria necesita un tiempo para ser fijada [1]. La acumulación de datos en las últimas décadas (para una revisión ver [2] y [3]) parecen sugerir que una traza de memoria se almacenaría inicialmente en el LTM (incluyendo el hipocampo, la corteza perirhinal, y cortezas perihipocámpicas) y que, posteriormente, las memorias se harían gradualmente independientes del LTM para establecerse en el neocórtex, en un proceso conocido como consolidación [2]. En todo este proceso, la sinapsis jugaría un papel central.

Una de las propiedades de las neuronas del hipocampo que ha sido más estudiada en el contexto de la búsqueda de correlatos fisiológicos de la memoria es la capacidad de sus sinapsis de expresar cambios duraderos de eficacia dependientes de la actividad. Las sinapsis hipocámpicas responden a patrones de activación específicos con aumentos o disminuciones de larga duración en los pesos sinápticos [4]. En base a una gran cantidad de literatura conocemos buena parte de los principios celulares y moleculares que subyacen al fenómeno de la plasticidad sináptica [5]. Sin embargo, sus consecuencias funcionales, es decir, a nivel de sistema son ampliamente desconocidas. En 2009, combinando técnicas de resonancia magnética funcional y electrofisiología, Canals *et al.* proporcionan la primera evidencia experimental de reorganización funcional de las conexiones de largo recorrido del hipocampo inducida por la LTP. Esto incluía un aumento de la comunicación interhemisférica del hipocampo, así como la comunicación con el neocórtex [6]. Estos resultados sugerían que los mecanismos de plasticidad sináptica podrían además controlar la transferencia de información entre regiones cerebrales.

Conocidos estos resultados obtenidos a partir del análisis de imágenes de resonancia magnética funcional, se presenta la necesidad de abordar la investigación desde el punto de vista de la electrofisiología. Entre las herramientas disponibles para estudiar la fisiología neuronal *in vivo*, las técnicas electrofisiológicas extracelulares son las más extendidas. Estas técnicas permiten tanto el registro de neuronas individuales (unidades o potenciales de acción), como la actividad integrada de poblaciones de sinapsis localizadas en la proximidad de los electrodos de registro, conocidos como potenciales de campo o LFP (del inglés Local Field Potentials). Los LFP obtenidos mediante registros multicanal de alta densidad nos proporcionan datos espaciotemporales que pueden ser utilizados para el estudio de las dinámicas del cerebro a nivel poblacional [7]. A partir de los registros de LFP, se pretendía conocer más acerca de la plasticidad sináptica comparando las señales adquiridas en diferentes ubicaciones e instantes de tiempo. Aquí se presenta la necesidad de recurrir a métodos matemáticos que nos permitan analizar las señales obtenidas con el objetivo de poder cuantificar los resultados obtenidos e interpretarlos finalmente desde el punto de vista biológico. Para poder llevar esto a cabo, se planteó hacer uso de diferentes técnicas de análisis de señal, optando finalmente por la correlación cruzada y coherencia espectral, al ser éstas unas técnicas muy utilizadas en la investigación sobre este tipo de señales.

El problema que se presenta es la separación de estos potenciales de campo en las fuentes de información originales. En los últimos años, el análisis de componentes independientes (ICA) ha ido tomando fuerza como método de separación ciega de datos en sus componentes subyacentes. En 2010, Makarov *et al.* concluyeron que el ICA permite separar las fuentes que contribuyen en el LFP y que los generadores obtenidos contienen información más específica que los potenciales de campo brutos [8].

En los últimos años, numerosos trabajos técnicos han realizado análisis acerca de la reorganización sináptica tras la potenciación sináptica o LTP (del inglés Long Term Potentiation), sin embargo, no se ha concretado cómo los cambios locales en la plasticidad sináptica del hipocampo influyen en el flujo de información entre las distintas regiones de la formación hipocampal, y en la comunicación entre el

hipocampo y la corteza. Este conocimiento básico sobre la estructura funcional del cerebro podría además ayudar a entender patologías neurológicas y psiquiátricas, así como su detección temprana y quizá ofrecer nuevas terapias para su tratamiento.

Objetivos y estructura

El objetivo final de esta tesis doctoral es el desarrollo de una metodología adecuada para el análisis de señales adquiridas mediante registros electrofisiológicos de alta densidad, correspondientes a distintas partes del hipocampo y la corteza parietal asociativa en el cerebro de rata, haciendo uso de diferentes técnicas de análisis de señal con el fin de obtener nuevos conocimientos acerca de los cambios que se producen en la formación hipocampal tras el aprendizaje.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Descripción de la estructura general de las correlaciones y coherencias, en cada una de las bandas frecuenciales consideradas, de las señales de LFP obtenidas en el hipocampo y la corteza parietal asociativa, ipsilateralmente (en un mismo hemisferio cerebral) y bilateralmente (en los dos hemisferios).

- Análisis de la desviación típica en las medidas de correlación y coherencia y su dependencia espacial y temporal.

- Estudio de los cambios producidos por la potenciación sináptica en los cálculos de correlación y coherencia entre las señales de LFP.

- Descripción de la estructura general de las correlaciones entre las componentes independientes de las señales electrofisiológicas correspondientes a un mismo hemisferio cerebral.

- Estudio de la evolución de la correlación y la coherencia entre las componentes independientes a lo largo del tiempo durante un mismo estado cerebral.

- Estudio de los cambios producidos por la potenciación sináptica en los cálculos de correlación y coherencia entre las componentes independientes.

- Comparativa entre los resultados obtenidos con las señales de LFP y los obtenidos con las componentes independientes.

Estructura de la tesis

Esta tesis doctoral está estructurada del siguiente modo:

El capítulo 1 es una introducción que describe los principales conceptos sobre los que se basa el trabajo realizado a lo largo de esta tesis. En primer lugar, se presentan las partes del sistema nervioso central sobre las que hemos trabajado. Después enumeramos los campos eléctricos presentes en el tejido cerebral para estudiar más tarde los problemas de propagación de estos campos. También describimos la conectividad funcional entre las diferentes áreas cerebrales y finalizamos este capítulo con un repaso al uso de animales en la investigación neurocientífica.

El capítulo 2 describe los materiales empleados y la metodología desarrollada a lo largo de esta tesis. Está dividida en dos partes: adquisición de señales y procesamiento de las mismas. En la parte de procesamiento se presenta la metodología utilizada para la obtención de los diferentes resultados alcanzados a lo largo de esta investigación.

En el capítulo 3 se exponen los resultados obtenidos al aplicar la metodología desarrollada y se discuten brevemente.

El capítulo 4 presenta las principales conclusiones de la tesis y en el capítulo 5 se citan las posibles líneas futuras a seguir.

1. Introducción

En este capítulo, se introducen los aspectos fundamentales del sistema nervioso central y se presentan los antecedentes y el estado actual del campo de investigación de la tesis.

1.1 Sistema nervioso central

El sistema nervioso se puede dividir en dos grandes componentes: el sistema nervioso central, que incluye las estructuras nerviosas del cerebro y la médula espinal situadas dentro del cráneo y conducto raquídeo respectivamente, y el sistema nervioso periférico, que a su vez involucra a todos los axones aferentes y eferentes del sistema nervioso central y a las neuronas localizadas por fuera de esas estructuras centrales.

El sistema nervioso central (figura 1.1) está protegido por el cráneo y la columna vertebral, y también por las meninges, unas membranas de tejido conectivo, que le aportan protección biológica y mecánica [9].

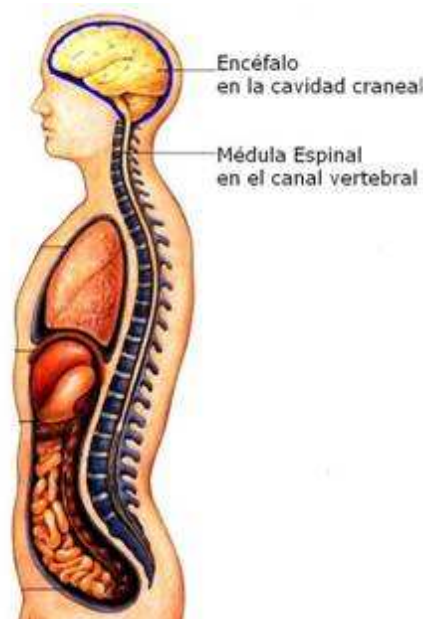


Figura 1.1. Sistema nervioso central (Imagen adaptada de [10])

1.1.1 El encéfalo

El encéfalo (figura 1.2) es el órgano rector del cuerpo humano: controla y coordina acciones y reacciones, nos deja pensar y sentir, y nos permite tener memoria y sentimientos. Es un órgano altamente complejo compuesto de varias partes. Años de estudio científico del encéfalo han hecho posible identificar las diferentes áreas del encéfalo y determinar sus funciones específicas. El encéfalo está protegido por una cubierta ósea llamada cráneo

El cerebro es la parte más grande del encéfalo y está situado en la parte delantera de éste. El cerebro se divide en dos hemisferios, el izquierdo y el derecho, que están conectados en la parte inferior. El hemisferio derecho está involucrado en las habilidades artísticas y la creatividad. El hemisferio izquierdo está implicado en la lógica y el pensamiento racional.

Los hemisferios cerebrales están divididos en lóbulos. Cada lóbulo es responsable de varias funciones corporales. Los lóbulos frontales están involucrados con la personalidad, el habla y el desarrollo motor. Los lóbulos temporales son responsables de la memoria, el lenguaje y el habla. Los lóbulos parietales están implicados con las sensaciones. Los lóbulos occipitales son los centros primarios de la visión. [11]

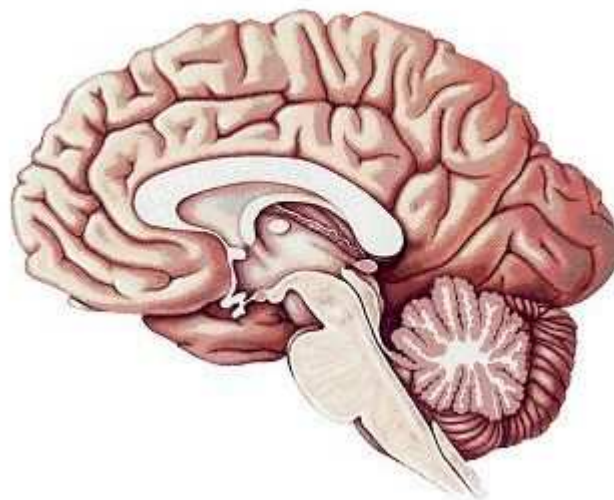


Figura 1.2. Encéfalo humano [12]

1.1.2 El lóbulo temporal

El lóbulo temporal es la parte del cerebro situada por debajo de la Cisura de Silvio (figura 1.3). El lóbulo temporal medial incluye un sistema de estructuras relacionadas anatómicamente que son fundamentales para la memoria declarativa (recuerdo consciente de hechos y eventos). Este sistema incluye la región hipocampal (los campos CA, el giro dentado y el complejo subicular) y las cortezas perirrinal, entorrinal y parahipocampal adyacentes [13]. El sistema de memoria del lóbulo temporal medial es necesario para enlazar los lugares de almacenamiento distribuidos en el neocórtex que representan el conjunto de la memoria. Sin embargo, el papel de este sistema es sólo transitorio. Conforme pasa el tiempo tras el aprendizaje, la memoria almacenada en el neocórtex se independiza gradualmente de las estructuras del lóbulo temporal medial [2].

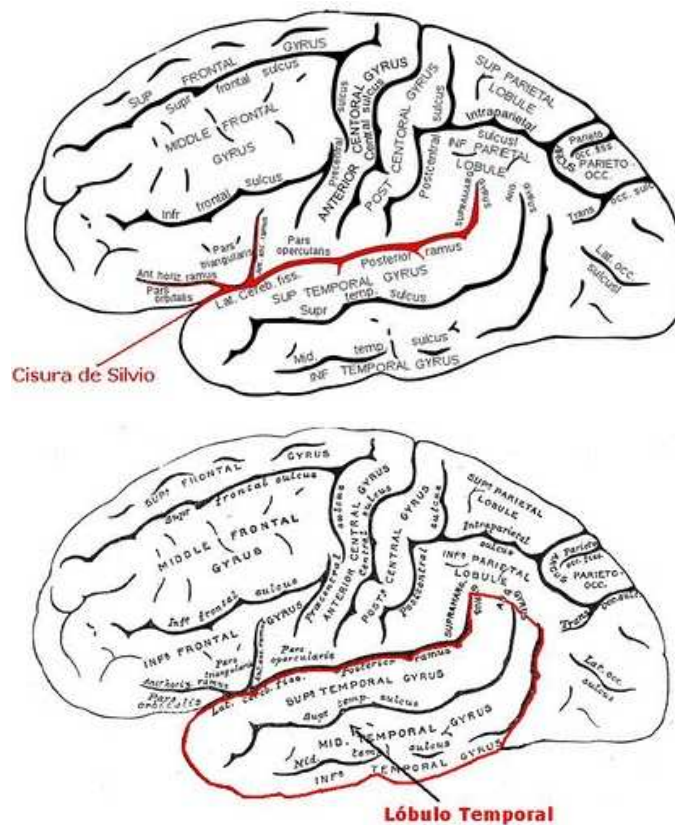


Figura 1.3. Cisura de Silvio y lóbulo temporal [14]

1.1.3 El hipocampo

Enclavado en el lóbulo temporal medial del cerebro humano, como se puede ver en la figura 1.4, se encuentra un grupo de neuronas organizadas en una red muy diferente de la que se encuentra en ninguna otra parte del sistema nervioso. La formación hipocampal es una estructura digna de estudio por derecho propio, pero también ha sido visto por muchos como un modelo de estructura para el estudio de la función cortical y la plasticidad en general.

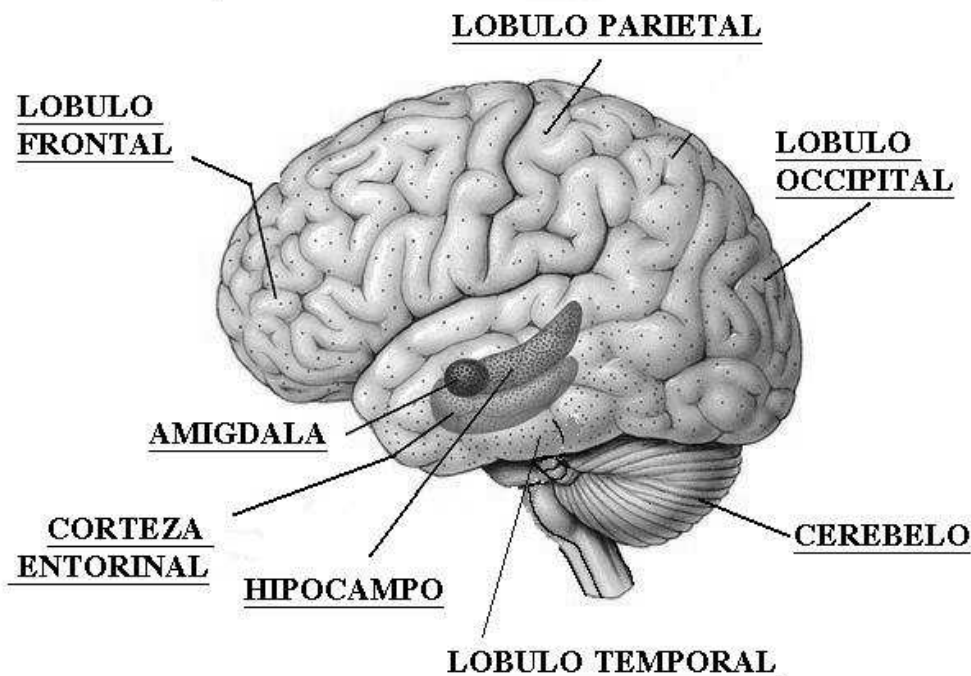


Figura 1.4. Ubicación del hipocampo en el cerebro [15]

Durante los últimos treinta años, las células piramidales del hipocampo han sido las más estudiadas en el cerebro. Como resultado, las circunstancias que provocan esta plasticidad sináptica son ahora conocidas, y empezamos a entender algo acerca de los mecanismos bioquímicos subyacentes. Son muchos los neurocientíficos que sospechan que la plasticidad sináptica es un mecanismo clave de la memoria. Otra característica excitante de la formación hipocampal es que la neurona granular del

giro dentado es uno de los tipos raros de neurona que se multiplica durante toda la vida.

Una de las características más cautivadoras del hipocampo es su neuroanatomía. La relativamente simple organización de sus principales capas celulares junto con la altamente organizada distribución de muchas de sus entradas ha impulsado su uso como un sistema modelo para la neurobiología moderna.

El hipocampo tiene cuatro subdivisiones: CA1, CA2, CA3 y CA4 (CA procede de cornus ammonis), tal y como se observa en la figura 1.5. Las otras regiones de la formación hipocampal incluyen el giro dentado, el subículo, el presubículo, el parasubículo y la corteza entorrinal [5].

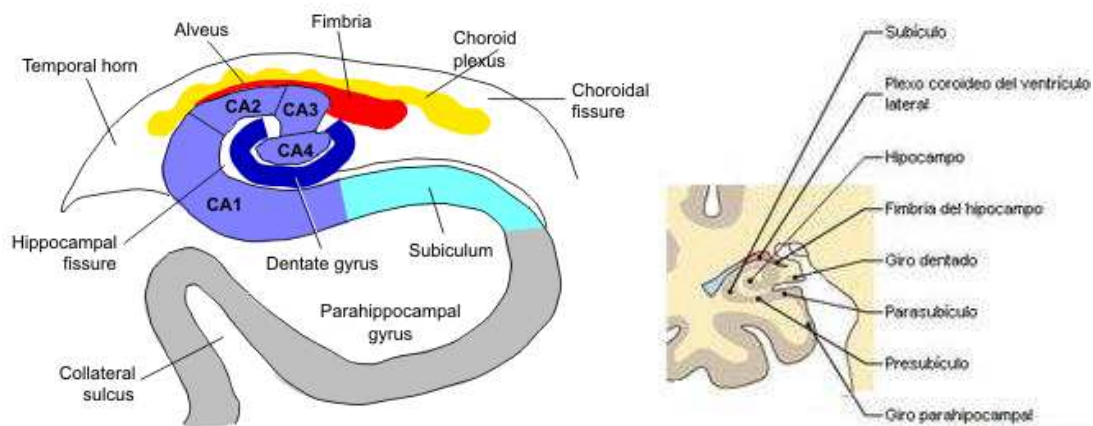


Figura 1.5. Regiones de la formación hipocampal [16] [17]

1.2 Campos eléctricos presentes en el tejido cerebral

Los campos eléctricos pueden ser monitorizados mediante electrodos colocados extracelularmente con una resolución temporal inferior a los milisegundos y se usan para interpretar diversas facetas de la comunicación neuronal. Las contribuciones eléctricas de todos los procesos celulares activos dentro de un volumen de tejido cerebral generan un potencial, V_e con respecto a un potencial de referencia. Históricamente, V_e ha hecho referencia al electroencefalograma (EEG) al registrarlo directamente del cuero cabelludo, al electrocorticograma (ECoG) al registrarlo por medio de electrodos subdurales en la superficie cortical, y al potencial de campo local (LFP) al registrarlo mediante un electrodo de pequeño tamaño situado en el cerebro. Cuando nos referimos al campo magnético inducido por la misma actividad hablamos del magnetoencefalograma (MEG).

Los avances recientes en la tecnología de los microelectrodos usando multielectrodos en silicona ofrecen nuevas posibilidades para estimar las funciones de transferencia entrada-salida *in vivo*, y los registros de alta densidad de los campos eléctricos y magnéticos del cerebro proporcionan ahora una cobertura espacial y una resolución sin precedentes de los procesos involucrados en la generación de campo extracelular. Estos nuevos avances han traído un mayor conocimiento de la relación entre la actividad de la red neuronal y el comportamiento cognitivo, y de los mecanismos de las patologías cerebrales [18].

1.2.1 El potencial de campo local

El potencial de campo local (LFP) es la actividad eléctrica integrada de un gran número de neuronas vecinas, y está compuesto por fluctuaciones de voltaje extracelular de baja frecuencia (entre 1 y 100Hz, habitualmente), reflejando una contribución principal de potenciales sinápticos así como contribuciones de señales relacionadas con potenciales de acción. El LFP es una medida electrofisiológica de interés creciente en la comunidad neurocientífica porque puede proporcionar un

valioso vínculo entre los registros de neuronas individuales y medidas globales neurofisiológicas tales como el EEG, la imagen por resonancia magnética funcional (fMRI) y el ECoG [19]. Los neurocientíficos lo han usado con mayor frecuencia en los últimos años para relacionar la actividad neuronal con la percepción y la cognición, incluyendo la codificación de los estímulos sensoriales, la atención y la memoria de trabajo [20-24].

Las señales de baja frecuencia pueden ser registradas a cierta distancia de su punto de origen dentro de un medio de filtrado como el cuerpo humano ya que estas señales se propagan más fácilmente que las de alta frecuencia que son más locales [25]. Cuando se pretende registrar potenciales de acción de neuronas individuales los estudios se centran en los datos adquiridos con electrodos de alta impedancia (1-5M Ω) [19], mientras que para registrar potenciales de campo local se utilizan electrodos de menor impedancia de modo que el ruido de baja frecuencia adquirido sea el menor posible [26].

1.2.2 Contribuciones a los campos extracelulares

Cualquier membrana excitable - ya sea una espina, una dendrita, un soma o un axón - y cualquier tipo de corriente transmembrana contribuyen al campo extracelular. Este campo es la superposición de todos los procesos iónicos, desde los rápidos potenciales de acción a las fluctuaciones más lentas en glia. Todas las corrientes en el cerebro se superponen en cualquier punto del espacio produciendo V_e en esa ubicación. Así, cualquier corriente transmembrana independientemente de su origen conduce a una desviación del voltaje tanto intracelular como extracelular. Las características de la forma de onda del LFP, tales como la amplitud y la frecuencia, dependen de la contribución proporcional de las múltiples fuentes y las diversas propiedades del tejido cerebral. Cuanto mayor sea la distancia del electrodo de registro a la fuente de corriente, el LFP medido contendrá menor información acerca de los eventos que ocurren en la ubicación(es) de la fuente(s). De este modo, las corrientes extracelulares pueden surgir de múltiples fuentes, siendo las corrientes sinápticas las que contribuyen la mayor parte del LFP

junto con las corrientes activas reclutadas por los potenciales sinápticos en su camino hacia el soma neuronal.

Actividad sináptica

En situaciones fisiológicas, la actividad sináptica es la fuente de flujo de corriente extracelular que más contribuye al LFP. La idea de que las corrientes sinápticas contribuyen al LFP surge al conocer que las corrientes extracelulares de muchos compartimentos individuales deben solaparse en el tiempo para inducir una señal apreciable, y esa superposición es más fácilmente alcanzable para eventos relativamente lentos, tales como las corrientes sinápticas.

Potenciales rápidos de acción

Los potenciales rápidos de acción generan corrientes a través de la membrana neuronal y pueden ser detectados como *spikes* en el medio extracelular. Por tanto, con los métodos apropiados, se puede extraer del LFP información valiosa acerca de la estructura temporal de los disparos neuronales en un contexto más amplio.

Las corrientes eléctricas de todas las membranas excitables contribuyen al voltaje extracelular. Además de las corrientes que surgen de la actividad sináptica y de los potenciales rápidos de acción, que ya se han citado, se dan con frecuencia importantes contribuciones de los picos de calcio, las corrientes y resonancias intrínsecas, los picos post-hiperpolarización, los efectos efápticos, las uniones gap y las interacciones neurona-glia.

El potencial extracelular puede ser reconstruido a partir de la monitorización simultánea de varias fuentes generadoras de corriente a través de la membrana neuronal, siempre que se conozcan detalles suficientes acerca de las fuentes y del medio extracelular. La reconstrucción de la señal de LFP a partir de las corrientes de las fuentes y de los sumideros podría, conociendo las propiedades del medio, proporcionar ideas para encontrar las corrientes sinápticas a partir de las medidas macroscópicas de LFP [18].

1.3 Conectividad funcional entre áreas cerebrales

La conectividad funcional describe la interdependencia de áreas cerebrales que están funcionalmente relacionadas e interconectadas, y representa una útil herramienta con la que investigar la organización de las redes neuronales distribuidas en el cerebro [27]. De un modo más práctico, podemos decir que la conectividad funcional se refiere al modo en que la actividad en una región dada está correlacionada con la actividad en otras áreas del cerebro [28]. Para medir esta actividad pueden utilizarse diferentes técnicas de adquisición de datos, ya sea por imagen (fMRI, PET, SPECT, NIRS) o por electrofisiología (EEG, MEG, LFP) [29]. En el campo de la adquisición por imagen, probablemente la más utilizada en la actualidad y una de las que ha proporcionado más avances en este campo es la imagen por resonancia magnética funcional o fMRI, una técnica que permite la exploración *in vivo* de las conexiones en el cerebro. Esta técnica se basa en que las regiones que están funcionalmente relacionadas muestran fluctuaciones de baja frecuencia correlacionadas con la señal obtenida por fMRI, que surgen de la señal dependiente del nivel de oxígeno en sangre o señal BOLD. Esta técnica ha sido usada para demostrar la conectividad entre regiones homólogas de los hemisferios derecho e izquierdo (corteza motora [30]) y entre otras regiones cerebrales relacionadas funcionalmente (tálamo e hipocampo [27]) [31]. En cuanto a las técnicas de electrofisiología, cabe señalar dos de ellas comentadas en el punto 1.2 de este documento: el EEG como técnica no invasiva y el LFP (apartado 1.2.1) como técnica invasiva. El EEG ha sido muy utilizado en la investigación neurocientífica a lo largo de la historia gracias a su naturaleza no invasiva, lo que ha permitido su uso en humanos. Esta técnica ha sido útil en hallazgos tales como el aumento del acoplamiento en las estructuras del LTM durante el estado interictal de los pacientes epilépticos [32].

Independientemente de la técnica de adquisición de señal utilizada, a la hora de medir la conectividad funcional existe una amplia variedad de herramientas: la correlación cruzada, la coherencia espectral, la coherencia temporal, métodos basados en la causalidad de Granger, la sincronía de fases y el Phase lag index,

entre otras. Las técnicas más utilizadas, que son las que se han utilizado en esta tesis, son la correlación cruzada y la coherencia espectral. Las hemos escogido aprovechando el conocimiento previo que teníamos ya de estas herramientas y la amplia bibliografía existente acerca de ellas debido a su amplia utilización.

La correlación mide el acoplamiento simultáneo entre dos series temporales y es de especial utilidad a la hora de observar la variación temporal de la dependencia entre ambas series.

La coherencia mide la relación lineal invariante con el tiempo que existe entre dos series temporales y es esencialmente el análogo espectral de la correlación.

Los análisis de datos de fMRI en el cerebro en reposo han mostrado correlaciones temporales en la señal BOLD de regiones cerebrales ampliamente separadas [30,33]. Se supone que estas correlaciones temporales reflejan la conectividad funcional intrínseca y han sido encontradas a través de varias redes diferentes que están implicadas en funciones críticas tales como la visión, la audición y el lenguaje. Los resultados obtenidos en el año 2009 por Greicius *et al.* demostraron que la conectividad funcional del estado de reposo refleja la conectividad estructural, es decir la estructura anatómica de las conexiones sinápticas [34].

En lo que a memoria se refiere, en 2002 Sirota *et al.* demostraron que las actividades neocortical e hipocampal están acopladas en escalas de tiempo largas y cortas durante el sueño de onda lenta, a partir de la correlación entre patrones obtenidos del neocórtex y del hipocampo [35]. En 2005 Ranganath *et al.* observaron un aumento de la conectividad funcional entre el hipocampo y algunas áreas corticales anatómicamente conectadas a la formación hipocampal en situaciones de formación de memoria. También se observó un aumento de la conectividad en las cortezas temporal lateral, parietal medial y occipital medial. Estos resultados demostraron que la formación de memoria está asociada con aumentos transitorios en la comunicación cortico-hipocampal [36]. Ya en 2009, Canals *et al.* evidenciaron que tras la potenciación sináptica se producen cambios duraderos en la actividad de todo el cerebro, muy probablemente provocados por modificaciones locales en la transmisión sináptica. Demostraron así que estos cambios en los pesos sinápticos

modulan la conectividad funcional del cerebro potenciando la comunicación interhemisférica de la formación hipocampal [6].

1.3.1 Las oscilaciones delta

Los distintos ritmos que encontramos en el cerebro de rata se encuentran dentro de varias bandas de frecuencia: delta (0-4Hz), theta (4-12Hz), beta (12-30Hz) y gamma (>30Hz). Además, algunos investigadores han descrito una banda alpha, que va de los 8 a los 12Hz, basada en la clasificación utilizada en los estudios de EEG en humanos [37].

Las oscilaciones delta son las frecuencias más lentas y son las dominantes durante el sueño. Es durante los periodos de sueño cuando se dan habitualmente los procesos de consolidación de la memoria [38].

1.3.2 Las oscilaciones theta

En estudios en humanos, ha sido tácitamente asumido que el ritmo theta es generado por el hipocampo [39-40]. Las oscilaciones theta en LFP son estudiadas habitualmente en la banda entre 4 y 12 Hz [41]. Las corrientes extracelulares que subyacen a las ondas theta son generadas principalmente por la entrada entorrinal, CA3 y las corrientes de Ca^{2+} en las dendritas de las células piramidales. Se cree que el ritmo es crítico para la codificación / decodificación temporal de agrupaciones de neuronas activas y para la modificación de los pesos sinápticos. Diversas observaciones sugieren la posible participación de las oscilaciones theta en la plasticidad sináptica [42].

Los deterioros patológicos del hipocampo más conocidos están asociados con el daño estructural de sus neuronas. Dado que la oscilación theta es el modo de funcionamiento principal del hipocampo, se espera que el deterioro funcional de este modo oscilatorio vaya en detrimento de la salud mental. Los estudios de Tesche y Karhu en el año 2000 concluyeron que las oscilaciones theta están

fuertemente asociadas con la memoria [43] y aportaron métodos no invasivos, clínicamente aplicables para examinar si este patrón se ve afectado, y en qué manera, en las enfermedades de Alzheimer, esquizofrenia y epilepsia entre otras [42].

1.3.3 Las oscilaciones gamma

Se han registrado ritmos gamma en diversas regiones del cerebro, a pesar de esto sus funciones y mecanismo siguen siendo tema de debate [44]. Aunque el ritmo gamma hacía referencia originalmente a la banda de frecuencia de 35-85 Hz, con el paso de los años su rango se ha extendido para cubrir las frecuencias de 90 a 140 Hz, banda conocida como gamma rápida [41]. En el cerebro intacto, los patrones de alta frecuencia son a menudo producto de diversas oscilaciones endógenas, siendo las más habituales los ritmos en el rango de las frecuencias gamma (30-90 Hz).

Los ritmos gamma se dan en ráfagas relativamente cortas y son bastante variables en frecuencia, asociados habitualmente con disparos estocásticos de las neuronas individuales [44].

1.3.4 Acoplamiento entre las oscilaciones theta y gamma en el hipocampo

La corteza cerebral genera multitud de oscilaciones a diferentes frecuencias, aunque se desconoce a qué eventos corresponden dichas oscilaciones, teniendo en cuenta que dichos eventos biofísicos no trabajan a una sola frecuencia. Analizando la relación entre la potencia de gamma y la fase de theta se confirmó que la potencia de la actividad gamma de baja frecuencia está asociada con la fase descendente de las oscilaciones theta en la capa piramidal de CA1 tanto en las fases REM (*Rapid Eye Movement*) como RUN (realización de tareas de comportamiento). En contraste, la potencia máxima de la gamma rápida se da en el centro del ciclo theta durante el estado RUN y se da en el pico durante el estado REM, reflejando en gran parte la probabilidad máxima de activación de las neuronas piramidales. Estos hallazgos señalan que los mecanismos por los cuales las distintas bandas de gamma están moduladas por theta son dependientes del estado en el que se encuentra [41].

En 1995, se demostró que las frecuencias de las oscilaciones theta y gamma están correlacionadas [45] y a partir de esto se comprobó que las frecuencias medias de las diferentes bandas de gamma (gamma_S [30-50 Hz], gamma_M [50-90 Hz]) dependen del periodo de las ondas theta, observando que la relación entre la frecuencia theta y la frecuencia gamma era más clara en gamma_M y más pronunciada en REM en comparación con RUN [41].

Explorando en la fisiología del hipocampo, se conoce que aunque las oscilaciones theta y gamma están presentes tanto en los estados RUN como REM, la sincronía de los ritmos theta y gamma en el giro dentado y en CA3 es significativamente mayor en estado REM frente al estado RUN. Por otro lado existen llamativas diferencias en sus distribuciones regionales. Por ejemplo, se ha observado que durante el sueño REM, las ondas theta de 6 a 8 Hz y las oscilaciones gamma de alta frecuencia dominan en el giro dentado, mientras que durante la actividad consciente, en esta región se observan ritmos theta de 8 a 10 Hz de menor amplitud y actividad gamma [46].

1.4. Problemas con la propagación de campos

Como se ha comentado en la sección 1.2, las corrientes eléctricas de todas las membranas excitables contribuyen al voltaje extracelular. Ante la propagación de campos de diferente naturaleza procedentes de distintas fuentes y ubicaciones que contribuirán en diferente medida al potencial de campo, es necesario desarrollar herramientas que nos permitan identificar las diferentes componentes de las que consta dicho potencial.

1.4.1 Análisis de Componentes Independientes (ICA)

El Análisis de Componentes Independientes (ICA) es una técnica matemática que permite revelar factores ocultos que subyacen en conjuntos de mediciones o señales [47]. Esencialmente, es un método para extraer señales individuales de mezclas de señales. Su poder reside en el supuesto físicamente realista de que procesos físicos diferentes generan señales no relacionadas [48]. ICA asume un modelo estadístico mediante el cual los datos multivariantes observados, dados normalmente como una gran base de datos de muestras, se supone que son mezclas lineales o no lineales de algunas variables latentes desconocidas. Los coeficientes de mezcla también son desconocidos. Las variables latentes son no-gaussianas e independientes entre sí, y se denominan como las componentes independientes de los datos observados. Mediante ICA, estas componentes independientes, también llamadas fuentes o factores, se puede encontrar. Así, ICA puede verse como una extensión del análisis de componentes principales (PCA) y del análisis factorial. En muchos casos, las mediciones se expresan como un conjunto de señales paralelas o series de tiempo. Ejemplos típicos son mezclas de sonidos simultáneos o voces humanas que han sido recogidos por varios micrófonos o mediciones de señales cerebrales a partir de múltiples sensores de EEG [47].

El Análisis de Componentes Independientes es una parte del procesamiento de señal que está recibiendo una atención creciente. En su forma más simple, el

problema es separar N fuentes estadísticamente independientes que han sido mezcladas en N canales de salida, sin ningún conocimiento acerca de sus distribuciones. Este también se denomina como un problema de separación ciega de fuentes. En 1995, Bell & Sejnowski publicaron un algoritmo de redes neuronales llamado “Infomax” que permitía separar las componentes estadísticamente independientes de las señales de entrada [49].

Para el trabajo con electroencefalograma, debido a la distancia entre el cráneo y el cerebro y sus diferentes resistencias, los datos electroencefalográficos obtenidos de cualquier punto del cuero cabelludo humano incluyen actividad generada dentro de una amplia zona cerebral [50]. ICA se postula como una prometedora herramienta de análisis para registros electroencefalográficos.

La actividad espontánea de las neuronas produce corrientes sinápticas que se mezclan en el volumen conductor. Esta actividad es recogida por los electrodos de registro intracerebrales como potenciales de campo [8]. Los algoritmos de ICA han sido capaces de aislar las fuentes de LFP generadas artificial y neuronalmente, cuyas contribuciones de LFP son máximamente independientes las unas de las otras. ICA es ampliamente usado hoy en día por la comunidad investigadora, tanto para detectar y eliminar artefactos como para separar biológicamente fuentes cerebrales cuyos patrones están claramente asociados con fenómenos de comportamiento [51]. En 2010, Makarov *et al.* concluyeron que el ICA permite separar las fuentes que contribuyen en el LFP y que los generadores obtenidos contienen información más específica que los potenciales de campo brutos [8].

1.4.2 Registros múltiples

En un sistema que trabaja en paralelo como el cerebro [52] [53], necesitamos obtener el mayor número posible de datos. Los multielectrodos de registro de potenciales extracelulares son una herramienta de gran utilidad para entender las dinámicas del cerebro a nivel poblacional. La señal eléctrica registrada en un lugar puede reflejar corrientes sinápticas procedentes de ubicaciones remotas debido a la propagación del campo eléctrico en el tejido. De este modo cada señal es una

mezcla de contribuciones procedentes de varias poblaciones activas al mismo tiempo [54]. Con la utilización de los multielectrodos se consigue registrar varias señales eléctricas a las que se podrá aplicar ICA para identificar las componentes independientes pertenecientes a diferentes fuentes cerebrales.

1.5 El uso de animales en la investigación neurocientífica

La experimentación en animales, o pruebas *in vivo*, es el uso de organismos modelo en sustitución de los humanos. Un organismo modelo en biología es una especie muy estudiada para entender fenómenos biológicos particulares, que puedan darnos una idea de cómo funcionan esos procesos en otros organismos. En particular, los organismos modelo son frecuentemente usados para analizar las causas de enfermedades humanas y los posibles tratamientos de éstas, ya que la realización de estas pruebas en humanos es contraria a la bioética [55].

1.5.1 Razones del uso de la rata en laboratorios de investigación

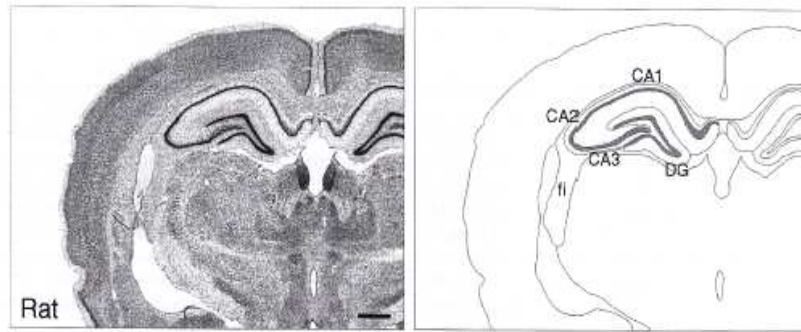
En las investigaciones realizadas con vertebrados, los ratones y las ratas son los más comúnmente utilizados debido a su disponibilidad, su tamaño (fáciles de manejar), su bajo coste, y la tasa de reproducción rápida. Esta última característica se pincela como esencial debido a la necesidad de tener una amplia población a considerar en un experimento con el fin de obtener resultados coherentes. Las ratas de laboratorio son consideradas un animal modelo y su uso abarca desde estudios de fisiología a etología o neurobiología. La velocidad de reproducción, la facilidad de manejo y muchas de sus similitudes fisiológicas con el ser humano han favorecido la utilización de la rata desde hace muchos años como sujeto de experimentos en los laboratorios de ciencias biológicas. Con ellas suelen ponerse a prueba los medicamentos que luego se aplican como tratamiento de las enfermedades humanas o se intenta lograr un diagnóstico precoz de las mismas (enfermedades degenerativas, por ejemplo); de igual modo, se llevan a cabo numerosos

experimentos relacionados con la genética, con el sueño y con muchos otros temas de la salud. También han resultado muy útiles en los estudios psicológicos acerca del aprendizaje y otros procesos mentales [56].

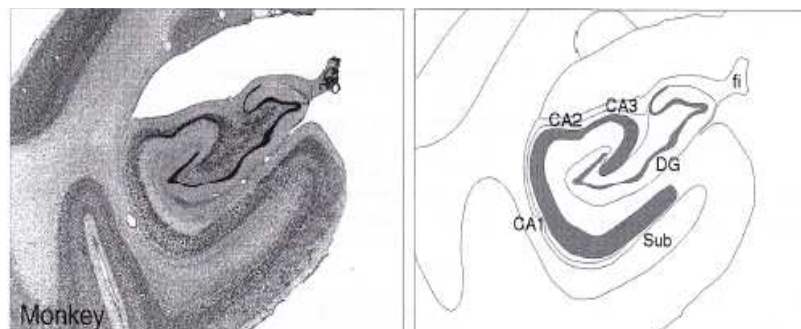
1.5.2 El hipocampo de los humanos y de los animales

Observando con detenimiento la apariencia neuroanatómica de la formación hipocámpal de la rata, no es difícil identificar cada una de las subdivisiones en la formación hipocámpal del mono o del humano. En la figura 1.6 se observan secciones cerebrales y dibujos de la organización general del hipocampo en la rata, el mono y el humano.

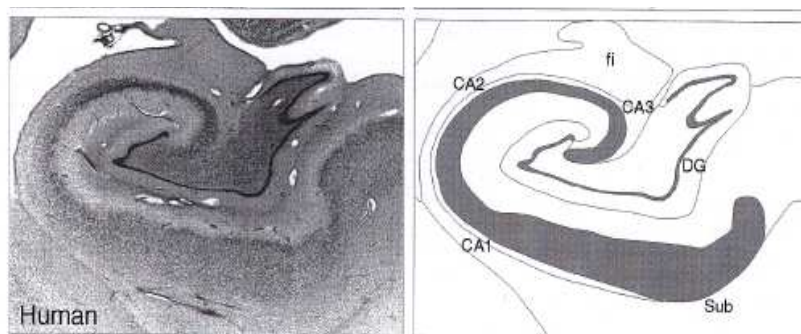
Aunque el volumen del hipocampo es alrededor de diez veces mayor en los monos que en las ratas y cien veces mayor en los humanos que en las ratas, la arquitectura hipocámpal básica es común a las tres especies. De cualquier modo, existen algunas llamativas diferencias entre especies. La compacta capa de células piramidales en la región CA1 de la rata, por ejemplo, es más gruesa y heterogénea en el mono y en el humano. La otra región que muestra diferencias es la corteza entorrinal. En la rata la corteza entorrinal está habitualmente dividida en dos principales subdivisiones. En el mono hay siete subdivisiones, y en el cerebro humano hay definidas veintisiete subdivisiones (aunque descripciones recientes reconocen solamente ocho subdivisiones, similar a lo observado en los monos). Aún con esto, no hay muestras de diferencias sustanciales entre especies [5].



(a)



(b)



(c)

Figura 1.6. Secciones cerebrales y dibujos que muestran la organización general del hipocampo en la rata (a), el mono (b) y el humano (c) [5]

1.5.3 La rata Sprague Dawley

Esta variedad de rata albina es usada en la investigación neurológica, oncológica, toxicológica y reproductiva entre otras, y es el modelo experimental estándar de aprendizaje y memoria. Este uso generalizado se debe a que estas ratas pueden ser

manejadas cómodamente, aprenden rápidamente y pueden ser fácilmente entrenadas con paciencia y perseverancia [57].

1.5.4 El uretano

El uretano es un anestésico muy popular ya que una sola inyección (habitualmente de 1.0 a 1.5 g/kg) proporciona inmovilidad para procedimientos quirúrgicos de larga duración (varias horas), y además existe una impresión generalizada de que el uretano produce cambios mínimos en la circulación y en la respiración, e interfiere en menor medida con las respuestas fisiológicas en comparación con otros anestésicos como el isoflurano, la ketamina o la α -cloralosa. Existe una experiencia considerable con este tipo de anestesia sobre ratas en experimentos electrofisiológicos *in vivo* en general y en experimentos de LTP en particular. Además, los experimentos de LTP en ratas despiertas moviéndose libremente sugieren que los conceptos principales sobre LTP son coherentes en los experimentos *in vivo* sobre animales despiertos y anestesiados, así como en los experimentos *in vitro* [58] [59].

2. Metodología

En este capítulo se presentan las diferentes metodologías relacionadas con la adquisición y el procesamiento de señal utilizadas. También se enumeran los materiales utilizados a lo largo de esta Tesis Doctoral.

2.1 Adquisición de las señales

2.1.1 Sujetos estudiados y anestesia utilizada

Las señales electrofisiológicas con las que se ha trabajado a lo largo de este estudio han sido obtenidas de ratas Sprague Dawley macho con una masa cercana a los 300g (figura 2.1). Estas señales fueron adquiridas por el personal del Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante).



Figura 2.1. Ejemplar de rata Sprague Dawley [57]

Para la obtención de las señales deseadas, los sujetos fueron anestesiados con uretano, un anestésico de uso común en experimentos electrofisiológicos en rata.

Todos los experimentos han sido aprobados por el comité ético del Instituto de Neurociencias (CSIC-UMH) y han seguido las directrices de la Comunidad Europea (EUVD 86/609/EEC) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

2.1.2 Implantación de los electrodos y región de adquisición

Para la adquisición de las señales electrofisiológicas se han utilizado electrodos en silicio tipo Michigan con 32 contactos de iridio espaciados $100\mu\text{m}$ de Neuronexus Technologies (Ann Arbor, Estados Unidos de América). Estos electrodos han sido usados satisfactoriamente en animales anestesiados. Sus reducidas dimensiones y sus múltiples lugares de registro los hacen ideales para muestrear señales electrofisiológicas en múltiples áreas del cerebro y capas de la corteza con el mínimo daño en el tejido. En estos electrodos se utiliza una oblea de silicio y una de las grandes ventajas que esto supone frente a los “*microwires*” (electrodos que consisten en unos finos cables de 20 a $50\mu\text{m}$ de diámetro cuya área de registro expuesta en la punta es de unas $100\mu\text{m}^2$) es la posibilidad de tener electrónica integrada en el propio electrodo eliminando la necesidad de cables. En la figura 2.2 podemos ver uno de estos electrodos junto a un esquema de la lanceta.

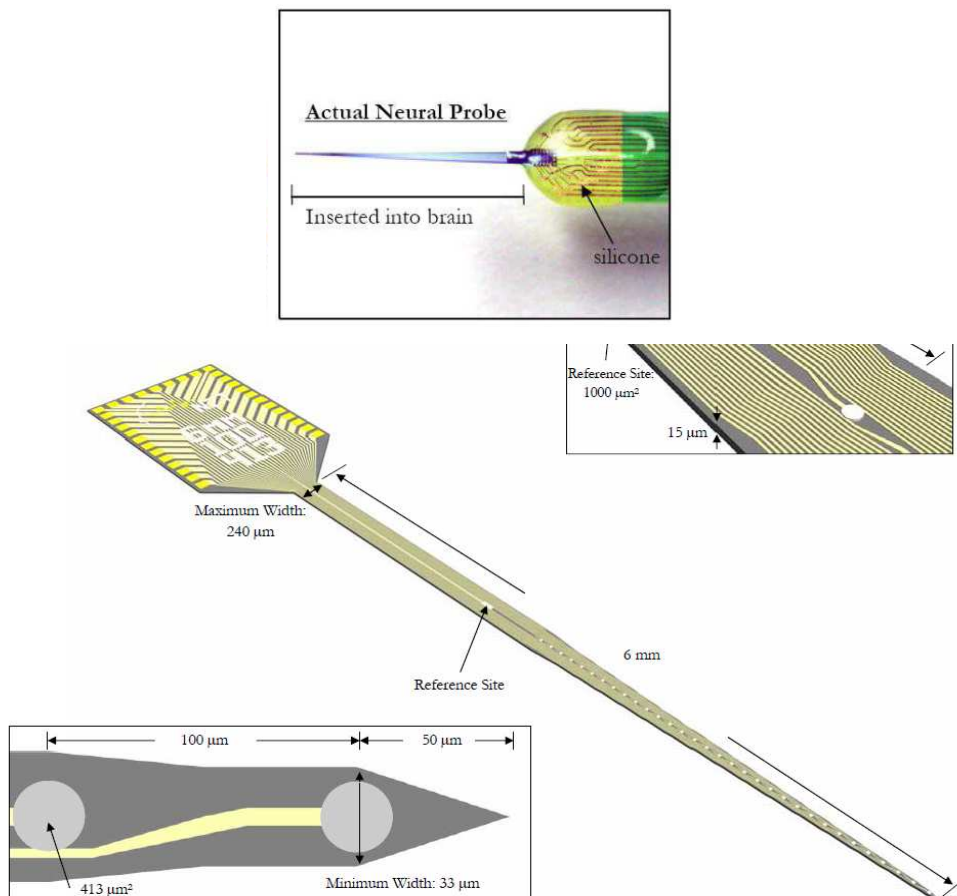


Figura 2.2. Multielectrodo Michigan. Fotografía (parte superior), partes y esquema de la lanceta (parte inferior) [60]

Otro de los temas que resaltan la superioridad de estos electrodos se basa en el mínimo desplazamiento o daño de la zona de tejido cerebral que produce (zona muerta). La efectividad de los electrodos Michigan para lecturas neuronales ha sido demostrada en muchos estudios; éstos tienen las características necesarias para ser implantados cerca de neuronas activas y obtener su respuesta [59] [61].

Para la colocación de los electrodos de estimulación y registro se han seguido los procedimientos quirúrgicos y estereotáxicos estándar. Un electrodo bipolar concéntrico (300 μ m de diámetro, 10-12k Ω) fue implantado en la vía perforante medial para la estimulación del giro dentado y del hipocampo. Sus coordenadas son: con respecto a LAMBDA, 0mm AP; +/- 4.1mm ML; entre 2.3 y 2.7mm ventral desde la superficie del cerebro, introduciendo los electrodos con un ángulo de 30° hacia delante en el plano sagital. Los electrodos de registro utilizados fueron los multielectrodos Michigan de 32 canales, citados anteriormente, colocados en las siguientes coordenadas: con respecto a BREGMA, -3.5mm anteroposterior (AP); +/- 2.6mm mediolateral (ML); 3.3mm ventral desde la superficie del cerebro. Se implantaron 2 multielectrodos de registro bilateralmente para poder comparar las señales registradas en ambos hipocampos. Además se colocó un cable de tierra Ag/AgCl en contacto con la piel del animal.

En la figura 2.3 se observa una rata anestesiada colocada en un estereotáxico con los electrodos ya implantados.

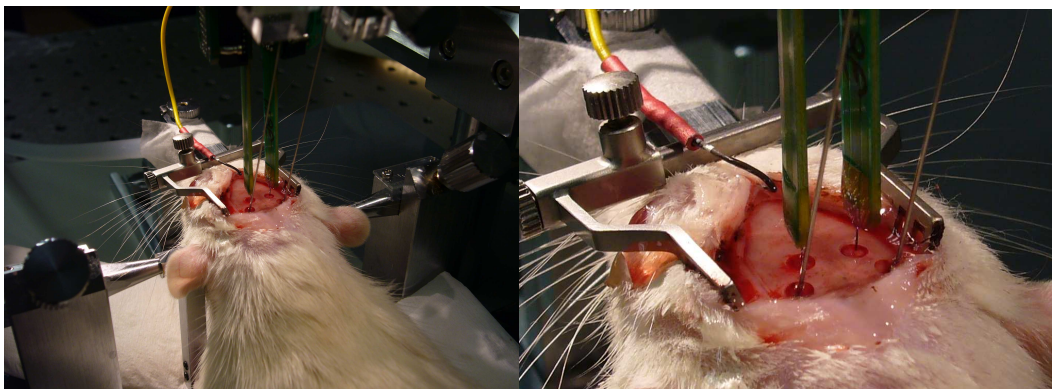


Figura 2.3. Rata anestesiada en un estereotáxico con un electrodo implantado en la vía perforante medial para la estimulación del giro dentado y del hipocampo y dos electrodos de registro implantados bilateralmente para poder comparar las señales registradas en ambos hipocampos. Imagen ampliada a la derecha.

La ubicación final de los electrodos de estimulación y registro fue ajustada para generar y registrar una respuesta poblacional máxima en el giro dentado. Antes de insertar los electrodos en el tejido los bañamos en un colorante fluorescente (DiI). Tras el experimento los animales son perfundidos y sus cerebros procesados para comprobar la correcta ubicación de los electrodos en el tejido. En la figura 2.4 se observa el cerebro del animal teñido con bis-benzimida (marcaje azul de los núcleos celulares) y el tracto dejado por el electrodo y teñido con DiI (fucsia) [59].

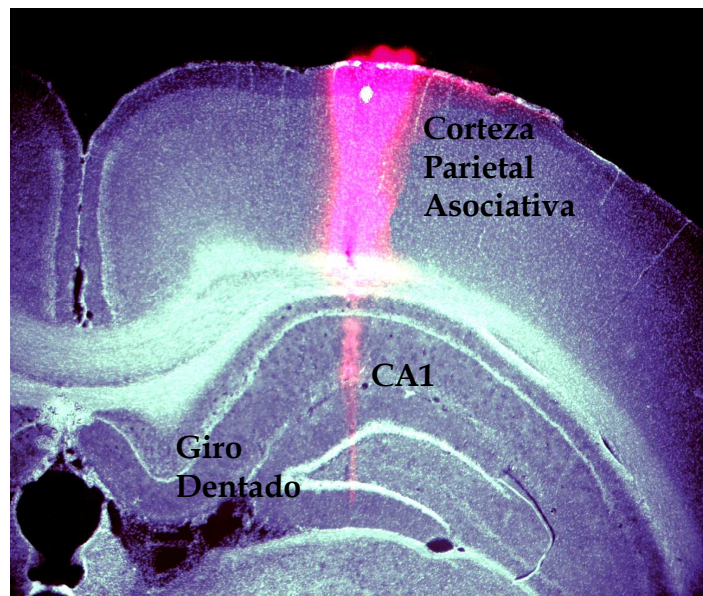


Figura 2.4. Ejemplo de un corte histológico mostrando la posición de los electrodos. Se realizaron cortes histológicos para cada uno de los animales empleados. Las histologías fueron realizadas por el personal del Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (CSIC-UMH) de San Juan (Alicante).

2.1.3 Registro de los datos

Tras su amplificación (100x) y filtrado (0.1 Hz pasa-alto) las señales electrofisiológicas son digitalizadas (20kHz) y almacenadas (sistema de registro Multichannel System, Reutlingen, Alemania). Antes de empezar con la recolección de datos espontáneos, se generaron curvas de entrada-salida estándar del giro dentado mostrando la amplitud de la espiga poblacional en el potencial de campo

evocado, inducido por shocks en la vía perforante con una intensidad de corriente aplicada de 0,1 a 1 mA. La espiga poblacional en el hilio del giro dentado fue medida como la amplitud desde la cresta positiva precedente, y el pico negativo. El potencial excitatorio postsináptico fue medido como la máxima pendiente del potencial creciente que precede a la espiga poblacional.

La LTP fue inducida por estimulación a alta frecuencia de la vía perforante con episodios de seis trenes de pulsos (cada tren liberado a 200 Hz, 40 ms, con cuatro pulsos por tren y con los trenes liberando cada 10 segundos). Para la generación de estos pulsos se utilizó el Generador de pulsos STG 2004 de Multi Channel Systems (Reutlingen, Alemania) que nos permitió configurar previamente los trenes de pulsos.

Para cada roedor, además de los potenciales evocados, se registraron 20 minutos antes de inducir la LTP (control), 20 minutos justo tras inducir la LTP (LTP) y 20 minutos pasadas 3 horas tras la inducción de la LTP (LTP+3h) como se ilustra en la figura 2.5. Cada una de estas señales, para cada uno de los roedores, fue registrada con el Sistema de registro multicanal PGA64 de Multichannel Systems (Reutlingen, Alemania).

Quedaron registrados así los potenciales de campo de los animales anestesiados antes y después de la LTP (de la transmisión sináptica en el hipocampo). Estos datos, obtenidos directamente del PGA64, están muestreados a 20 kHz y a partir de ellos se conformaron los archivos “multicondición” con los que hemos trabajado. Cada uno de los archivos “multicondición” corresponde a un experimento, a un animal en concreto, y contiene fragmentos convenientemente seleccionados de dicho experimento, correspondientes a las fases de control, LTP y LTP+3h. De este modo hemos trabajado con los fragmentos temporales más representativos de cada fase y de cada experimento.

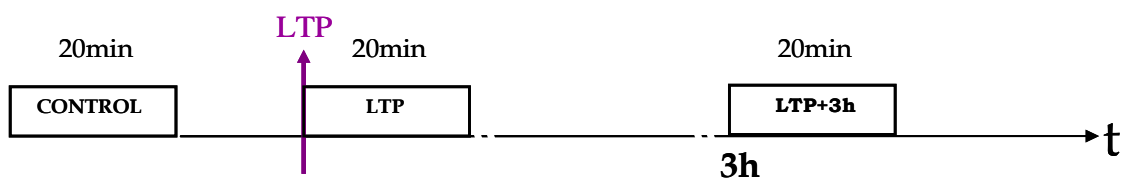


Figura 2.5. Ubicación de cada una de las etapas registradas con respecto al instante en que se produce la potenciación sináptica

2.2 Procesado de las señales


Los diferentes pasos llevados a cabo para el procesado de las señales electrofisiológicas se describen en esta sección. Todos ellos han sido desarrollados en entorno MATLAB[®] R2009b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, Estados Unidos de América). Como su nombre indica, MATLAB está especialmente diseñado para operar con matrices y posee una gran capacidad para el desarrollo de gráficos en dos y tres dimensiones. MATLAB satisface los requisitos necesarios para superar el desafío que supone trabajar con ramas de la ciencia tan aparentemente distantes como lo son el cálculo numérico y la neurociencia. Una de las razones primordiales para su uso es la ubicuidad de su software en el campo de la neurociencia [62].

2.2.1 Ordenación de los canales

Una vez registrados los canales, el programa de adquisición y análisis de datos de Multi Channel Systems, MC_Rack, nos proporcionó los datos obtenidos por los electrodos de registro en un archivo .mcd. Para convertir este archivo en un archivo .mat con el que poder trabajar en entorno MATLAB hicimos uso del software para análisis de señales de LFP's desarrollado por el Dr. Valeri Makarov (Departamento de Matemática Aplicada, Universidad Complutense de Madrid) quien trabaja en estrecha colaboración con el Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Miguel Hernández) de San Juan (Alicante). La información principal de este archivo está almacenada en una matriz cuyas filas (canales) contienen los valores de potencial de campo (LFP) a lo largo del intervalo de registro para cada uno de los electrodos del multielectrodo Michigan utilizado. Como ya se ha indicado anteriormente (apartado 2.1.3), para este estudio se seleccionaron 20 minutos de cada condición experimental. Estos canales no vienen ordenados según su ubicación en el multielectrodo, por lo que para conocer exactamente de dónde obtenemos cada señal y poder analizar así las relaciones de correlación y coherencia

entre los diferentes electrodos, es fundamental que ordenemos los canales según su ubicación en el multielectrodo, siguiendo la correspondencia entre los electrodos y los canales del MC_Rack que se muestra en la figura 2.6.

CONFIGURACIÓN MULTIELECTRODOS MICHIGAN 32



N° ELECTRODO	CANAL DONDE SE MONITORIZA 1-32
1	1
2	32
3	3
4	30
5	5
6	28
7	7
8	26
9	2
10	31
11	6
12	17
13	4
14	29
15	9
16	18
17	8
18	27
19	11
20	19
21	10
22	25
23	13
24	20
25	12
26	24
27	15
28	21
29	14
30	23
31	16
32	22

Figura 2.6. Correspondencias electrodos-canales del MC_Rack

2.2.2 Diezmado y filtrado DC de los datos

Tras ordenar los canales, se aplicó un diezmado a los datos para poder trabajar más rápido y aliviar, en cierto modo, la gran carga computacional con la que se ha trabajado. Como se ha indicado anteriormente, los datos originales proporcionados directamente por MC_Rack estaban muestreados a 20 kHz; se llevó a cabo un

diezmado a cada una de las matrices de registro para alcanzar una tasa de 5 kHz. Una vez diezmados los datos de los canales, se llevó a cabo el filtrado de cada uno de ellos para eliminar la componente continua.

2.2.3 Correlación y coherencia

Una vez alcanzado este punto, ya tenemos preparadas las señales para afrontar las diferentes partes de nuestro estudio: el cálculo de la correlación y la coherencia entre las señales de potencial de campo tomadas en diferentes partes del hipocampo y la corteza prefrontal, el cálculo de la correlación y la coherencia entre sus componentes independientes y el cambio que sufren ambas tras inducir LTP en el giro dentado, y por último, el cálculo de matrices de correlación correspondientes a tramos temporales de distinta longitud para observar con más detalle la variación de las correlaciones entre las componentes independientes a lo largo del tiempo. A continuación se explican las metodologías utilizadas a lo largo de esta tesis. Éstas se han aplicado sobre un total de nueve ratas Sprague Dawley macho (250-300g), correspondientes a los experimentos 010210, 030210, 030610, 090610, 120710, 160710, 200710, 010910 y 030910.

	Resultados 3.2 y 3.3	Resultados 3.4 y 3.5	Resultados 3.6
010210			X
030210			X
030610			X
090610	X		
120710		X	
160710	X		
200710		X	
010910	X	X	X
030910			X

Tabla 2.1. Distribución de la toma de datos de los animales en los experimentos correspondientes a los diferentes apartados del capítulo de resultados

2.2.4 Metodología específica utilizada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP obtenidas antes, durante y después de la potenciación sináptica, ipsilateral y bilateralmente (Apartado 3.3 de Resultados)

En este caso, quisimos hacer uso de los 32 canales de LFP a la hora de realizar los cálculos de correlación y coherencia, para poder tener una visión global de cómo se comportan las correlaciones y las coherencias en las diferentes áreas registradas. Para ello, se llevó a cabo la división de las señales en ventanas de diferentes tamaños (10, 6, 5, 3 y 1s), se calcularon las matrices de correlación y coherencia en cada una de las ventanas y se realizó el promedio de estas matrices para obtener las matrices medias en el tiempo de registro y la desviación típica de estos valores de correlación para cada tamaño de ventana, que representamos también en forma de matriz. Los resultados de desviación indicaron que la desviación disminuía con el tamaño de ventana (3.2 Resultados), por lo que los resultados analizados son los obtenidos con una ventana de 10s.

Correlación

Para el cálculo de la matriz de correlación se programaron dos funciones haciendo uso de la función *corrcoef* de MATLAB entre otras. Esta función nos proporciona los coeficientes de correlación cuya expresión se muestra a continuación:

$$R(i, j) = \frac{C(i, j)}{\sqrt{C(i, i)C(j, j)}}.$$

Una de las funciones desarrolladas se utilizó para conocer y mostrar la correlación para los canales de un mismo multielectrodo y la segunda para calcular y mostrar la correlación entre los canales del primer electrodo y los del segundo. La primera función nos proporciona la matriz de correlación para los canales de la matriz de registro. Se aplicó este cálculo para cada una de las ventanas de tiempo con los datos correspondientes al electrodo número 1. El electrodo número 1 es el electrodo que registra en el hemisferio derecho, que es en el que inducimos la LTP y el

electrodo número 2 es el que registra en el hemisferio izquierdo. Tras el cálculo de las matrices de correlación para cada una de las ventanas, se calculó la media de las mismas para cada electrodo, obteniendo así las matrices de correlación para los canales del electrodo 1 así como información sobre la dispersión de la medida. La segunda función nos proporciona la matriz de correlación entre dos matrices de registro, una de cada hemisferio cerebral. Se aplicó este cálculo para cada una de las ventanas de tiempo de las matrices de registro del electrodo número 1 y del electrodo número 2, y después se calculó la media de las matrices obtenidas como resultado de la función para obtener la matriz de correlación entre los canales del electrodo 1 y los del electrodo 2.

Estos cálculos se llevaron a cabo para los tres animales, y para las diferentes etapas de registro individualmente (control, LTP, LTP+3h) obteniendo las correspondientes gráficas de las matrices de correlación. En el apartado 3.1 (Resultados) se describe una de estas matrices para su correcta comprensión.

Coherencia

Para el cálculo de la coherencia en las diferentes bandas de frecuencia se programaron también dos funciones haciendo uso de la función *mscohere* de MATLAB, entre otras. Esta función nos proporciona la coherencia espectral, cuya expresión se muestra a continuación:

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

Una de las funciones desarrolladas se utilizó para conocer y mostrar la coherencia para los canales de un mismo multielectrodo y la segunda para calcular y mostrar la coherencia entre los canales del primer electrodo y los del segundo. La primera función nos proporciona una matriz que contiene en sus elementos la media del valor de la coherencia entre las señales de los canales de la matriz de entrada en la banda de frecuencias deseada. Se aplicó este cálculo para cada una de las ventanas de tiempo de la matriz registrada con el electrodo número 1 y después se calculó la media de las matrices obtenidas para obtener una matriz que contenía la coherencia

entre las señales de los canales de la matriz de entrada en la banda de frecuencias señalada. Al igual que para la correlación, también se obtuvieron medidas de la dispersión de la coherencia por bandas de frecuencia. La segunda función utiliza dos matrices de registro, cada una perteneciente a un electrodo, y nos proporciona una matriz que contiene en sus elementos la media del valor de la coherencia entre las señales de los canales de las matrices de registro en la banda de frecuencias indicada. Se aplicó este cálculo para cada una de las ventanas de tiempo de las matrices de registro del electrodo número 1 y del electrodo número 2, y después se calculó la media de las matrices (y su desviación típica) obtenidas para obtener una matriz que contenía la coherencia entre las señales de los canales de las matrices de entrada (canales del electrodo 1 y del electrodo 2).

Todos estos cálculos se llevaron a cabo para todos los animales, para las diferentes etapas de registro individualmente (control, LTP, LTP+3h) y para tres bandas de frecuencia diferentes de uso habitual en neurociencias, obteniendo las correspondientes gráficas de las matrices de coherencia que se muestran en el apartado 3.1 (Resultados). Las bandas con las que hemos trabajado han sido: Banda Delta (0-4 Hz), Banda Theta (4-8 Hz) y Banda Gamma (32-64 Hz).

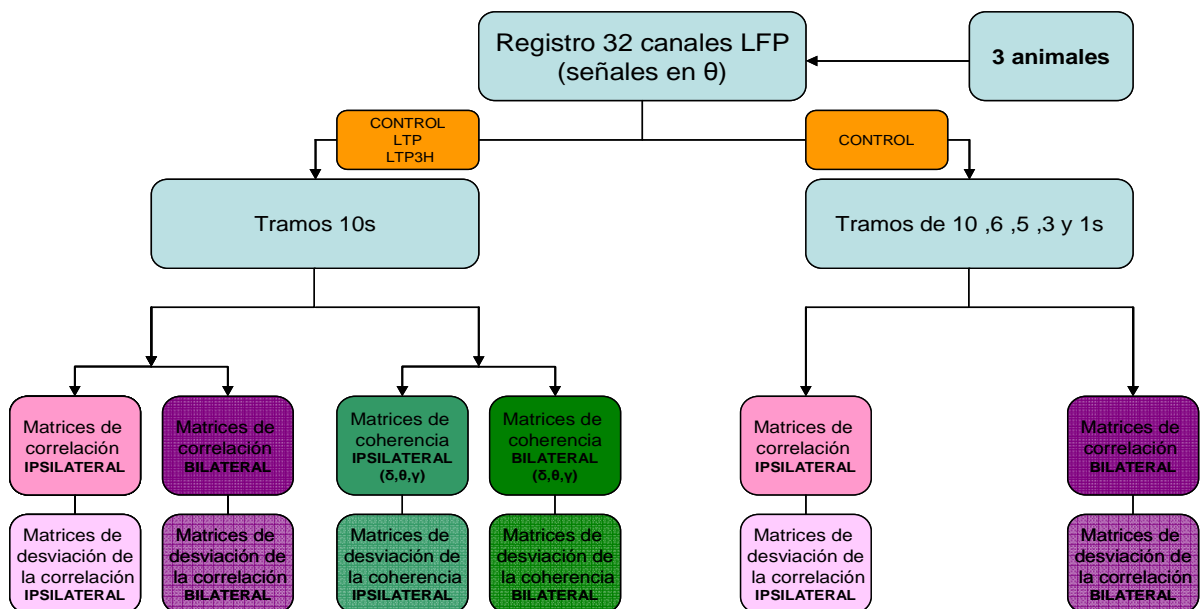


Figura 2.7. Esquema resumen de la metodología específica empleada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP obtenidas antes, durante y después de la potenciación sináptica, ipsilateral y bilateralmente.

Todos los detalles en el texto del apartado 2.2.4.

2.2.5 Metodología específica utilizada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP en theta, theta irregular y delta y entre sus respectivas componentes independientes (Apartados 3.4 y 3.5 de Resultados)

Debido al problema de la propagación de campos citado en el apartado 1.4 de la introducción, por el que señales que llevan información de origen diferente se mezclan espaciotemporalmente, aplicamos a las señales de LFP un análisis de componentes independientes y realizamos cálculos de correlación y coherencia entre estas componentes independientes. Para poder comparar estos resultados con los obtenidos mediante el cálculo directo de la correlación y la coherencia de los canales de LFP, se escogieron canales de LFP representativos. Para ello, se seleccionó por cada generador el canal de registro en el que la contribución de dicho generador a la varianza total es máxima. Las señales de LFP registradas en los canales seleccionados se consideraron representativas y se emplearon para realizar las comparaciones.

Antes de realizar los cálculos de correlación se llevó a cabo el Análisis de Componentes Independientes (ICA) que nos permitió extraer las componentes independientes de las señales de potencial de campo registradas en cada experimento. Este análisis se llevó a cabo utilizando de nuevo el software para análisis de señales de LFP's desarrollado por el Dr. Valeri Makarov (Departamento de Matemática Aplicada, Universidad Complutense de Madrid). Una vez obtenidas las componentes independientes para cada uno de los experimentos nos quedamos con las cuatro componentes de mayor varianza excluyendo las de origen cortical; estas cuatro componentes nos aportan mayor información para nuestra investigación y representan elementos precisos de la red del hipocampo. Anatómicamente y funcionalmente, la primera componente se corresponde con los axones que mandan las neuronas piramidales de CA3 a las neuronas piramidales de CA1 (Generador Schaffer colateral), la segunda con la oscilación theta dominante en el radiado de CA1 (Generador CA1), la tercera con la Vía Perforante (Generador

Granule Cells) y la cuarta con el Hilus del Giro Dentado (Generador del Hilus) (Ver figura 2.8).

Una vez realizado el análisis de componentes independientes, realizamos los cálculos de correlación y coherencia como se comenta a continuación. Estos cálculos se llevan a cabo tanto con los canales de LFP representativos como con los generadores obtenidos tras el ICA.

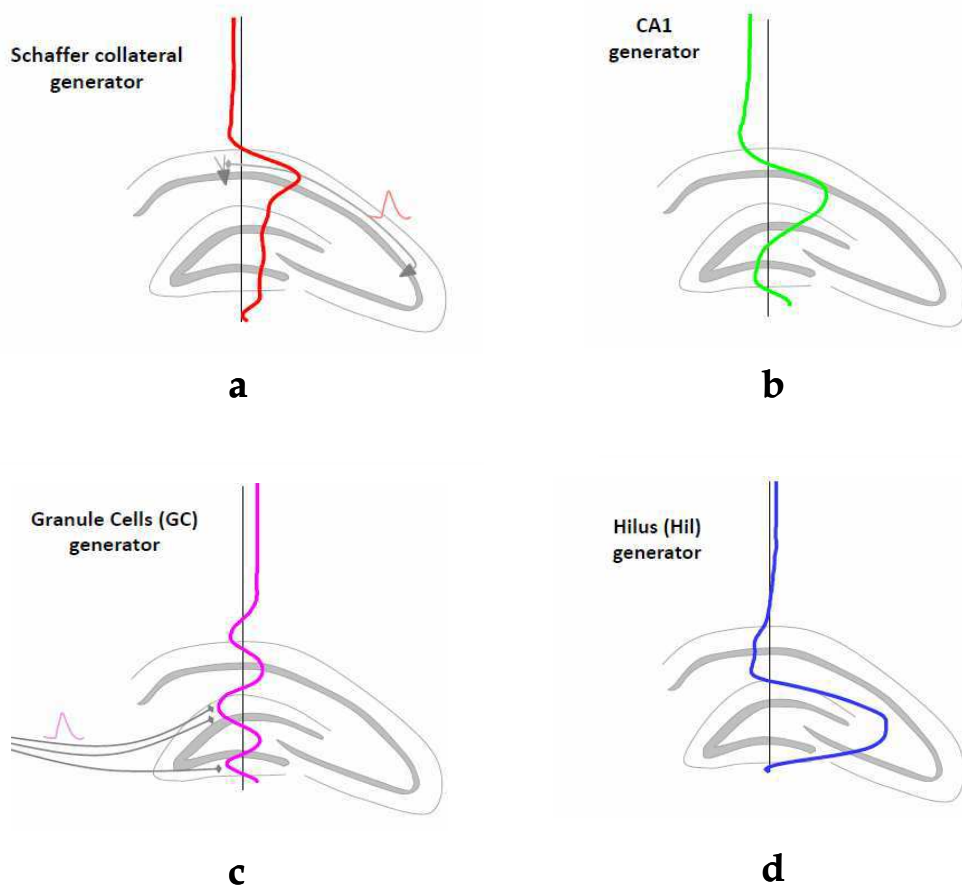


Figura 2.8. Loadings de las componentes independientes que señalan las correspondencias anatómicas de las mismas. Generador Schaffer colateral (a), generador CA1 (b), generador de las células granulares (c) y generador del Hilus (Cortesía de Efrén Álvarez, del Laboratorio de Plasticidad de las Redes Neuronales del Instituto de Neurociencias [CSIC-UMH])

El nuevo programa para calcular las matrices de correlación se programó utilizando la función *xcorr* en lugar de *corrcoef* de MATLAB. Esta función, cuya expresión se muestra a continuación, nos proporciona la correlación cruzada.

$$\hat{R}_{xy}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-m-1} x_{n+m} y_n^* & m \geq 0 \\ \hat{R}_{yx}^*(-m) & m < 0 \end{cases}$$

De este modo, se calculó para cada par de generadores o canales representativos la correlación cruzada, y de todos los valores de esta curva nos quedamos con el valor máximo que es el que representa la mayor correlación entre el par de curvas que se consigue al desplazar los datos de entrada. En este caso, los cálculos fueron bilaterales y se obtuvieron a partir de los cuatro generadores del electrodo número 1 y de los cuatro generadores del electrodo número 2. El electrodo número 1 es el electrodo que registra en el hemisferio derecho, que es en el que inducimos la LTP y el electrodo número 2 es el que registra en el hemisferio izquierdo. En segundo lugar se realizaron estos mismos cálculos de correlación cruzada a partir de los cuatro canales de LFP representativos de cada uno de los hipocampos. Con estos valores, se representaron las matrices de correlación por un lado de las componentes independientes y por otro lado de los canales de LFP, pudiendo así comparar los resultados obtenidos por ambas vías.

Para el cálculo de la coherencia se emplearon de nuevo las componentes independientes de ambos hemisferios en primer lugar, y los canales de LFP representativos de las componentes independientes de ambos hemisferios en segundo lugar.

Para dar significación estadística a nuestros resultados, tanto en correlación como en coherencia, se estimó un umbral de significación por encima del cual no hubiera dependencias de fase entre canales, es decir, que nuestros datos fueran significativos, para un nivel de significancia de $p = 0.05$. Para hacer esto, se usó el denominado *surrogate data test*, un método por el cual transformamos la señal al dominio de la frecuencia por medio de una transformada de Fourier y multiplicamos cada amplitud por $e^{i\phi}$, donde ϕ es un valor escogido de forma aleatoria para cada frecuencia del intervalo $[0, 2\pi]$. Realizamos entonces la

transformada de Fourier inversa, haciendo simétricas las fases de modo que $\phi(-f) = \phi(f)$. La transformada inversa es el dato que sustituye al original y que tiene la misma potencia espectral, pero fases aleatorias [63]. Creamos un número concreto de *surrogates* (sustitutas) de nuestras señales temporales (en nuestro caso se crearon 250 señales *surrogates*), y se calculó la correlación cruzada o la coherencia, según el caso, entre estas señales y la señal frente a la cual queríamos hacer el cálculo. Realizamos un histograma acumulativo con todos los valores obtenidos, para cada uno de los casos, con todos estos valores. Normalizamos la curva obtenida con el histograma, de modo que tome valores entre 0 y 1, y conseguimos así la función de distribución. Establecemos un nivel de significancia, en nuestro caso $p = 0.05$, y obtenemos de esta manera nuestro valor umbral, cumpliéndose que la probabilidad de que un valor cualquiera de correlación, o coherencia, sea mayor que este valor umbral es igual a 0.05.

En nuestros resultados de correlación, representados en las matrices de correlación, todos los resultados son significativos. En el caso de los resultados de coherencia, hemos representado la coherencia menos la coherencia crítica con el fin de poder ver con claridad en qué lugares la coherencia era significativa. Cuando no lo es, el valor representado es 0.

Una vez comparados los resultados de coherencia obtenidos a partir de las componentes independientes y los obtenidos a partir de los canales representativos de LFP, utilizamos la coherencia ipsilateral y bilateral entre las componentes independientes para las etapas de control, LTP y LTP+3h con el fin de estudiar el efecto de la LTP (Apartado 3.5 de resultados).

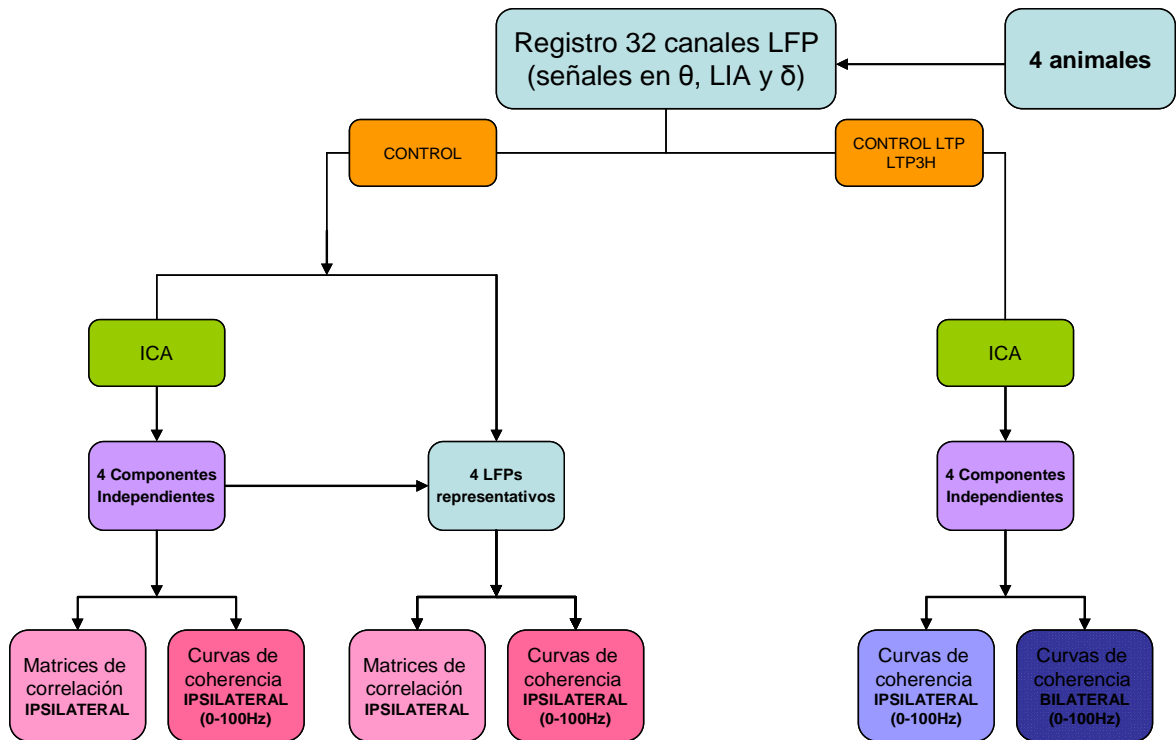


Figura 2.9. Esquema resumen de la metodología específica empleada para los cálculos de correlación y coherencia entre señales de LFP en theta, theta irregular y delta y entre sus respectivas componentes independientes. Todos los detalles en el texto del apartado 2.2.5.

2.2.6 Metodología específica utilizada para calcular las matrices de correlación entre las componentes independientes de las señales de LFP tomando diferentes ventanas temporales para ver su variación con el tiempo (Apartado 3.6 de Resultados)

Una vez obtenidas las cuatro componentes independientes a utilizar para cada uno de los experimentos, nuestro objetivo fue calcular las matrices de correlación entre dichas componentes independientes para cada caso y para seis tamaños diferentes de ventana temporal. A partir de estas matrices de correlación se definieron unos vectores a los que llamamos curvas de correlación y que representan las correlaciones entre las componentes independientes. Todo el procedimiento viene explicado en el apartado 3.6 (Resultados) acompañado de las gráficas obtenidas.

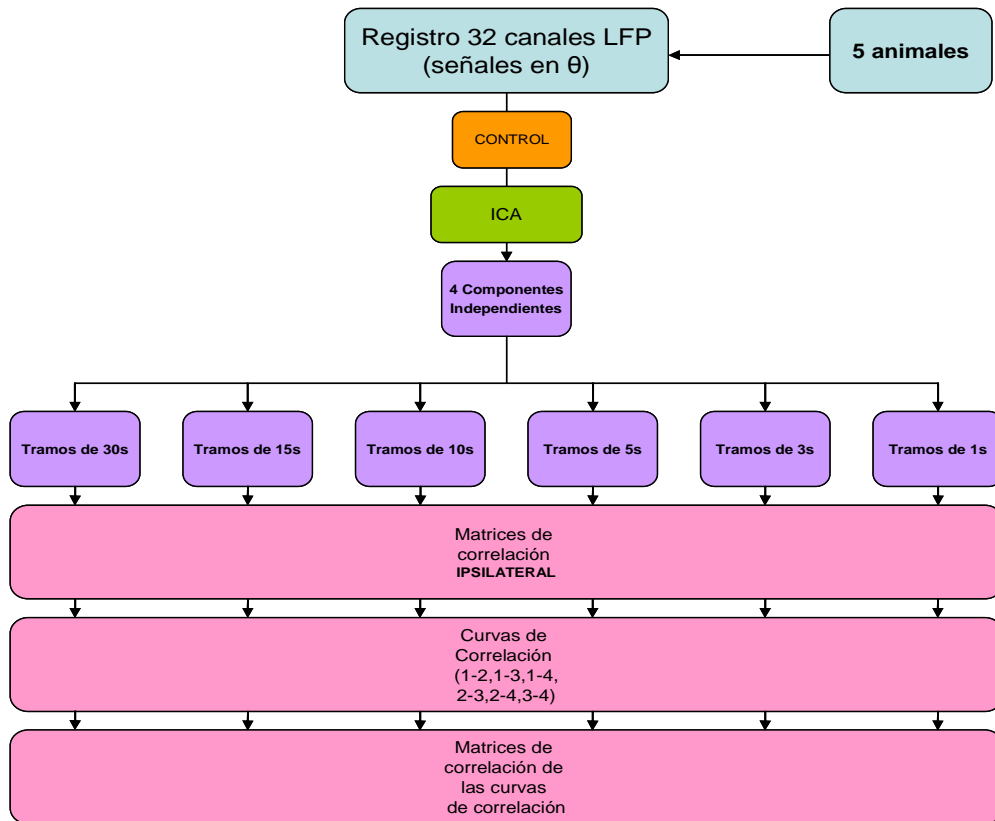


Figura 2.10. Esquema resumen de la metodología específica empleada para calcular las matrices de correlación entre las componentes independientes de las señales de LFP tomando diferentes ventanas temporales para ver su variación con el tiempo. Todos los detalles en el texto del apartado 2.2.6 y en el apartado 3.6 de resultados.

3. Resultados y discusión

En este capítulo, se muestran los resultados obtenidos al aplicar las metodologías descritas en el capítulo anterior. En primer lugar se muestra una descripción de la estructura general de las gráficas obtenidas con el fin de facilitar la comprensión de lo que representan las matrices de correlación y coherencia que se muestran a lo largo de esta sección. En segundo lugar se expone un análisis de la desviación típica en los cálculos de correlación y coherencia. A continuación, se muestra una comparativa entre los resultados que nos proporcionan los cálculos de correlación y coherencia a partir de las señales de LFP y a partir de las componentes independientes. Analizamos entonces los resultados ipsilaterales y bilaterales de correlación y coherencia obtenidos haciendo uso de los 64 canales de LFP registrados. Seguidamente observamos el efecto de la LTP sobre la coherencia entre las componentes independientes, ipsilateral y bilateralmente. Finalmente, a partir de las componentes independientes, se estudia la estructura dinámica de las interacciones funcionales en el hipocampo.

3.1 Descripción de la estructura general de las gráficas

Todas las gráficas que mostramos y que representan las matrices de correlación y coherencia obtenidas tienen una forma muy similar debido a que la implantación de los electrodos se realiza siempre en los mismos lugares, salvo un pequeño error experimental, como se ha indicado anteriormente. En la figura 3.1 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas donde se indica la localización de las zonas cerebrales con respecto a los canales de registro, que están representados en ambos ejes. En esta gráfica de ejemplo se representa la correlación cruzada máxima que se obtiene entre cada par de canales al desplazarlos un determinado número de muestras.

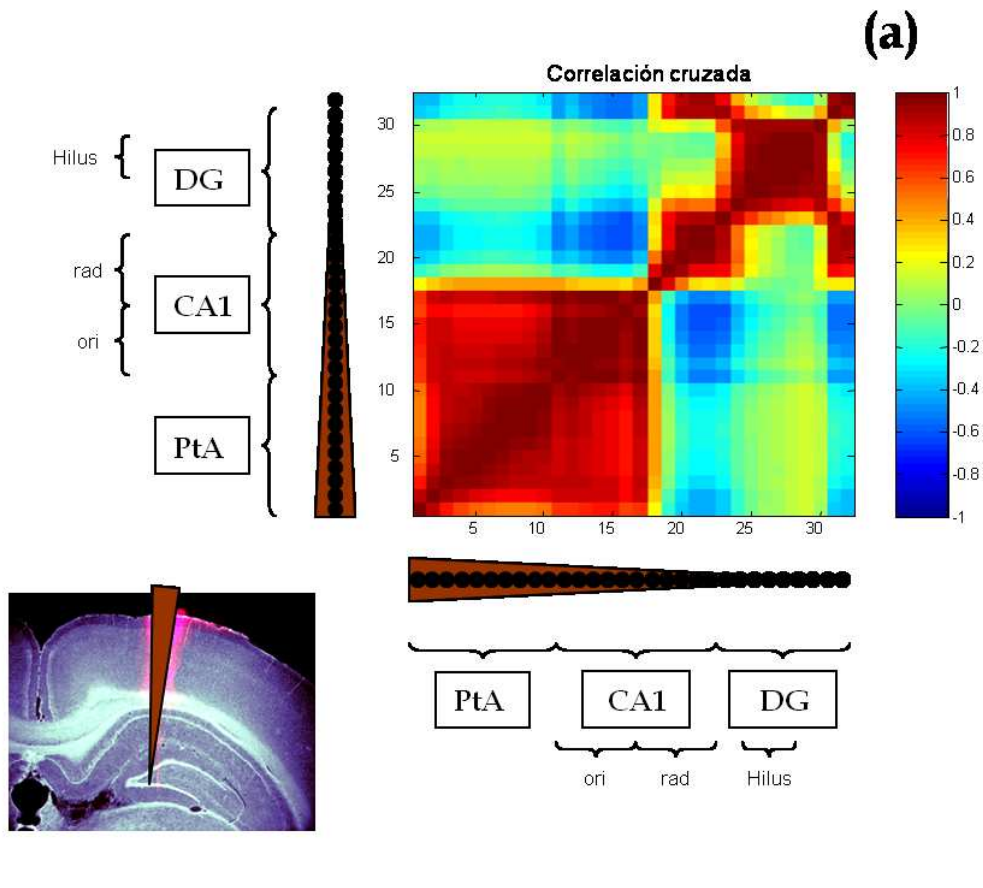


Figura 3.1. (a) Localización de las zonas cerebrales en las gráficas obtenidas. Pta es la corteza parietal asociativa, CA1 es la región 1 del Cuerno de Ammon, constituida por oriens (ori) y radiado (rad) (las señales eléctricas que se registran en oriens y radiado siempre tienen polaridad opuesta) y DG es el giro dentado. El hilus es una parte del giro dentado. (b) Ubicación del multielectrodo en el cerebro.

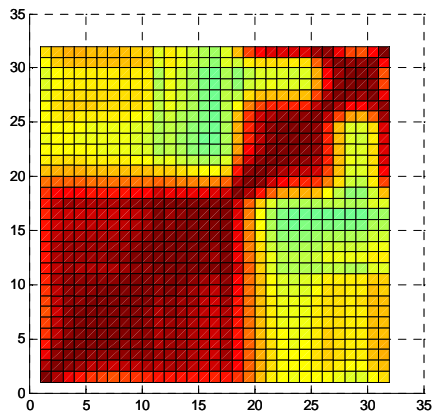
3.2 Análisis de la desviación típica en las medidas de correlación y coherencia

Con el fin de determinar la ventana temporal óptima sobre la que realizar los análisis de correlación y coherencia, estudiamos la dispersión de dichas medidas en función del tamaño de ventana. Hemos trabajado con cinco tamaños de ventana: 10, 6, 5, 3 y 1 segundos, así se dividieron las señales en ventanas y se calculó la matriz de correlación para cada ventana. Después se calculó la matriz de correlación media

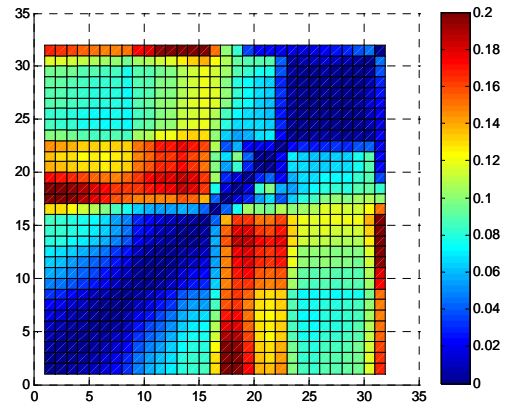
de estas matrices y su matriz de desviación correspondiente. Todo esto para cada tamaño de ventana. Así, mostramos en la figura 3.2 la matriz que representa la media de la correlación y la matriz de desviación típica de la correlación entre señales de un mismo hipocampo para los tamaños de ventana citados anteriormente, y se puede comprobar cómo varía la dispersión de estos valores dependiendo del tamaño de ventana elegido. Una vez obtenidas estas matrices de desviación, se realizó un promedio de las 32×32 desviaciones típicas de cada una de las matrices calculadas para las distintas ventanas temporales, y para cada una de las etapas (CTRL, LTP y LTP3H), obteniendo los valores más bajos de dispersión media al trabajar con ventanas de tiempo lo más grandes posible como podemos observar en la tabla 3.1.

Desviación Típica CORRELACIÓN	1s	3s	5s	6s	10s
CONTROL	0.1209	0.0781	0.0621	0.0622	0.0455
LTP	0.1558	0.0952	0.0784	0.0665	0.0663
LTP3H	0.1348	0.0995	0.0905	0.0839	0.0697

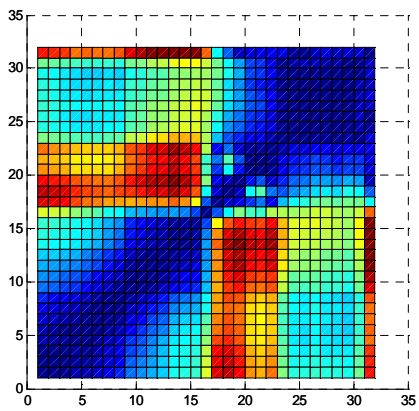
Tabla 3.1. Promedio de las 32×32 desviaciones típicas de la correlación para las distintas ventanas temporales en las etapas de CONTROL, LTP Y LTP3H.



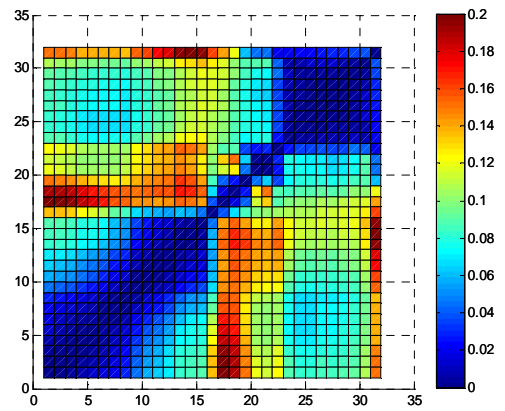
(a)



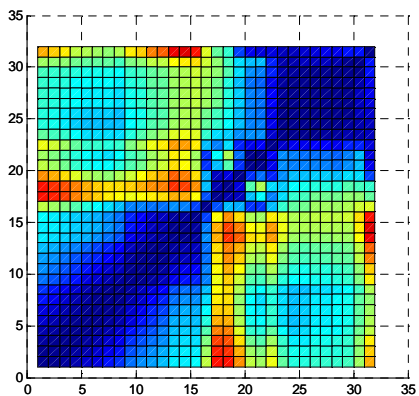
(d)



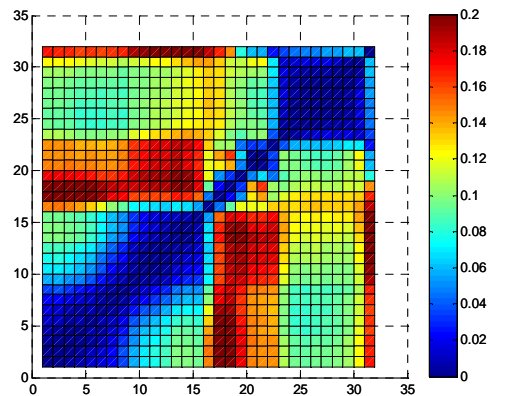
(b)



(e)



(c)



(f)

Figura 3.2. Matriz de correlación entre señales de un mismo hipocampo (a) y desviación típica de la correlación para ventanas de 10s (b), 6s (c), 5s (d), 3s (e) y 1s (f).

Esta dependencia temporal también se manifestó para la desviación típica de la coherencia media calculada a partir de las matrices de coherencia de cada una de las ventanas, como se muestra en la figura 3.3 para los tamaños de ventana anteriores y para el caso de la banda theta. Al igual que con la correlación, se realizó un promedio de las 32×32 desviaciones típicas de cada una de las matrices calculadas para las distintas ventanas temporales, para cada una de las etapas (CTRL, LTP y LTP3H) y para las bandas de frecuencia delta, theta y gamma, obteniendo también en este caso los valores más bajos de dispersión media al trabajar con ventanas de tiempo lo más grandes posible como podemos ver en la tabla 3.2. De este modo, en el futuro, y siempre que la carga computacional de los datos nos lo permita, trabajaremos con ventanas de tiempo del mayor tamaño posible.

Desviación Típica COHERENCIA		1s	3s	5s	6s	10s
DELTA	CONTROL	-	0.1521	0.1246	0.1186	0.0650
	LTP	-	0.1142	0.1066	0.1024	0.0614
	LTP3H	-	0.1545	0.1436	0.1276	0.0720
THETA	CONTROL	0.1686	0.1223	0.1055	0.1153	0.0713
	LTP	0.1824	0.1017	0.1127	0.0906	0.0564
	LTP3H	0.1976	0.1294	0.1104	0.1155	0.0735
GAMMA	CONTROL	0.0659	0.0374	0.0294	0.0268	0.0198
	LTP	0.0669	0.0344	0.0264	0.0249	0.0188
	LTP3H	0.0591	0.0312	0.0259	0.0254	0.0189

Tabla 3.2. Promedio de las 32×32 desviaciones típicas de la coherencia para las distintas ventanas temporales en las etapas de CONTROL, LTP Y LTP3H para las bandas delta, theta y gamma.

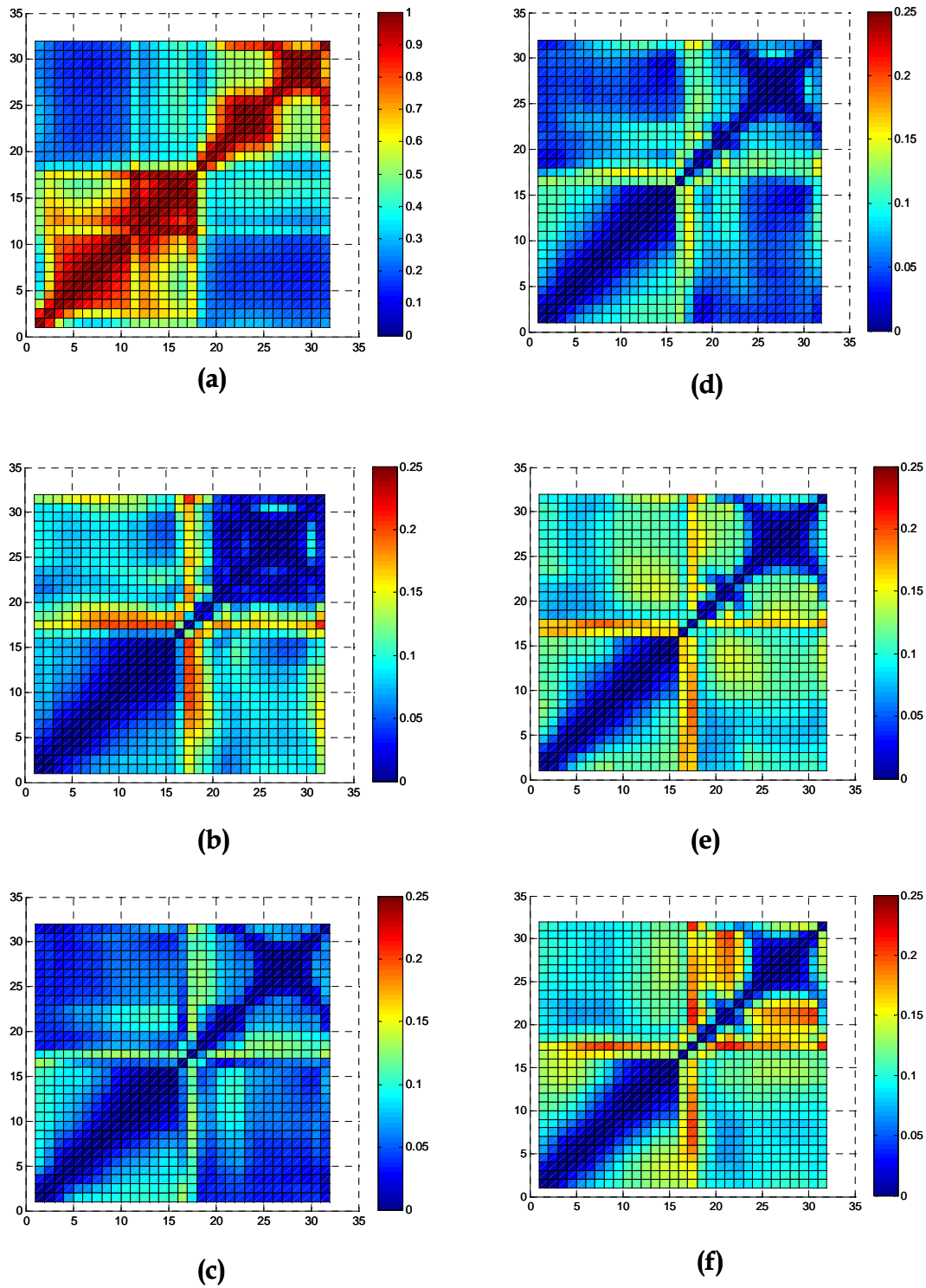


Figura 3.3. Matriz de coherencia entre señales de un mismo hipocampo (a) y desviación típica de la coherencia media en theta entre señales de un mismo hipocampo para ventanas de 10s (a), 6s (b), 5s (c), 3s (d) y 1s (e).

3.3 Análisis de los resultados ipsilaterales y bilaterales de correlación y coherencia

Análisis ipsilateral

Pasamos ahora a describir los resultados de correlación y coherencia obtenidos entre las distintas estructuras hipocampales, así como su posible significado en el contexto biológico. Empezamos por los resultados obtenidos a partir de las señales pertenecientes a un mismo hemisferio cerebral, en las que podemos observar un patrón muy definido y estereotípico de correlaciones y coherencias. En base a dicho patrón, y sin necesidad de recurrir a conocimientos neuroanatómicos previos, pudimos delimitar la zona de registro en áreas funcionales. Dichas áreas, como muestra la imagen de la figura 2.4 y las matrices de correlación y coherencia en la figura 3.4, coinciden a la perfección con el sustrato anatómico y la conectividad en el circuito trisináptico del hipocampo (ver Introducción). Así, los altos niveles de correlación y coherencia nos muestran los límites entre el DG, hilus, CA1 (donde incluso diferenciamos radiado y oriens) y la corteza cerebral (ver esquema en la figura 3.1). Si bien esta observación no aporta nuevos conocimientos sobre el sistema, ilustra a la perfección la potencialidad de nuestra estrategia experimental y el método analítico desarrollado durante esta tesis doctoral. No sólo predecimos a partir de un registro electrofisiológico la estructura anatómica del sistema, sino también la funcional.

Encontramos una alta correlación (0.97 ± 0.02) entre las señales de la capa granular del DG (canales 23-24) y las del radiado de CA1 (canales 19-22) (figuras 3.4a y 3.5a), mientras que la misma medida entre la región contigua del hilus (canales 25-30) y CA1 es mucho menor (0.08 ± 0.11). Esta peculiaridad en la comunicación en el hipocampo también se manifiesta en los valores de coherencia entre las señales en las bandas delta (figuras 3.4b y 3.5b) y theta (figuras 3.4c y 3.5c). Por el contrario, y de forma muy específica, la coherencia a altas frecuencias (gamma, figuras 3.4d y 3.5d) entre la capa granular del DG y CA1 es muy baja (0.17 ± 0.09).

La visión clásica del flujo de información en el hipocampo establece el DG como punto de entrada de la actividad al hipocampo, y un procesamiento secuencial de la misma del DG a CA3, CA1, subículo y finalmente de nuevo a corteza cerebral [5] [64]. De forma más reciente ha aparecido otra visión según la cual existirían dos flujos de información en el hipocampo. Ambos serían relevantes para el aprendizaje y la memoria y confluirían en CA1. El segundo flujo partiría de CA3 llevando información comisural y asociativa al DG a través del hilus y de ahí se distribuiría bilateralmente a CA1 por medio de las células musgosas y/o interneuronas (neuronas inhibitorias). Nuestros resultados aportan soporte electrofisiológico a esta segunda visión y además sugieren que (1) la confluencia de ambos flujos de información en CA1 podría estar de hecho segregada en radiado y oriens y por tanto sujeta a distintas modulaciones, y (2) ambos flujos de información parecen emplear bandas diferenciales de frecuencia. La comunicación $DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$ transcurriría a bajas frecuencias (delta y theta) mientras que en $CA3 \rightarrow Hilus \rightarrow CA1$ dominarían las altas frecuencias (gamma). Esto es consistente además con la existencia de un tipo de interneurona (célula responsable mayoritariamente de las altas frecuencias en el cerebro) cuyo soma y dendritas se encuentran en el hilus recibiendo sinapsis de CA3 y cuyo axón se arboriza en CA1 [65]. Por tanto, ambos flujos podrían representar un procesamiento paralelo de la información en el hipocampo. Esta posibilidad es especialmente atractiva en el hipocampo al que se atribuyen funciones tan diversas como la generación de mapas espaciales para la navegación, la memoria y el aprendizaje. Otras investigaciones previas también sugieren la existencia de diversas formas de procesamiento paralelo en el hipocampo [66-68].

En la figura 3.4a observamos además altos valores de correlación entre la PtA (canales 1-13) y el oriens de CA1. Estos altos niveles de correlación también se ven reflejados en la matriz de coherencia en la banda delta (figura 3.4b), y aunque disminuyendo con la frecuencia, también están presentes en las matrices de coherencia en las bandas theta (figura 3.4c) y gamma (figura 3.4d). Dicho resultado es de gran interés, pues refleja la comunicación entre la formación hipocámpal y el neocórtex, concretamente con una zona de la corteza cerebral

(PtA) relacionada con la integración multisensorial. Este tándem hipocampo-PtA podría jugar un papel esencial en la codificación y/o almacenamiento de las distintas modalidades sensoriales que componen una memoria episódica. No obstante, como ya se introdujo en esta tesis, el fenómeno de propagación de volumen de las señales electrofisiológicas recomienda que este resultado deba tomarse con cautela y se busque soporte experimental adicional.

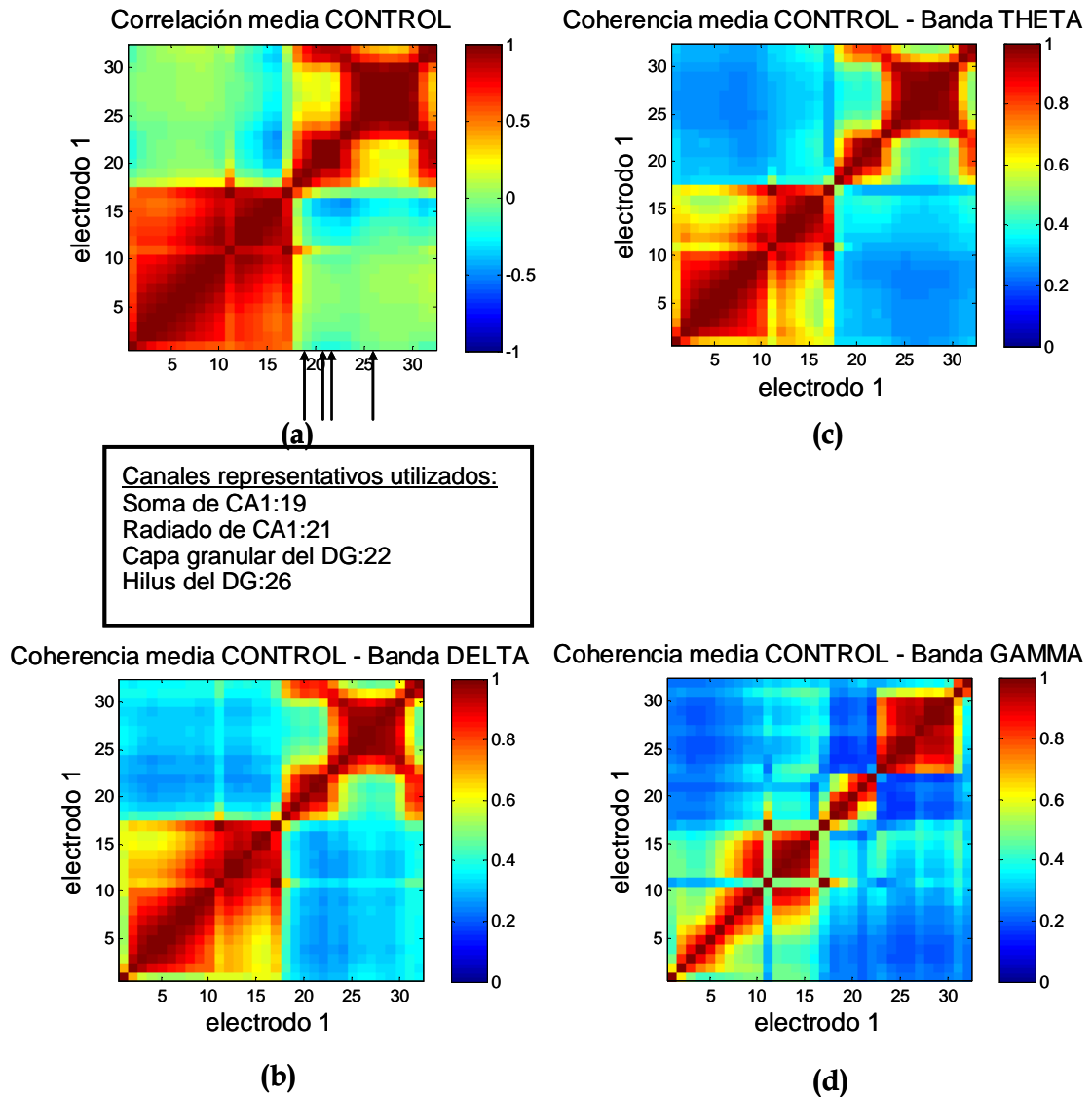


Figura 3.4. Correlación (a) y coherencia en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d) entre señales pertenecientes a un mismo hemisferios cerebrales. En (a) se indica la posición de los 4 canales representativos usados para sacar las medias de grupo que se muestran en la figura 3.5. 1) Soma de CA1; 2) Radiado de CA1; 3) Capa granular del DG; 4) Hilus del DG.

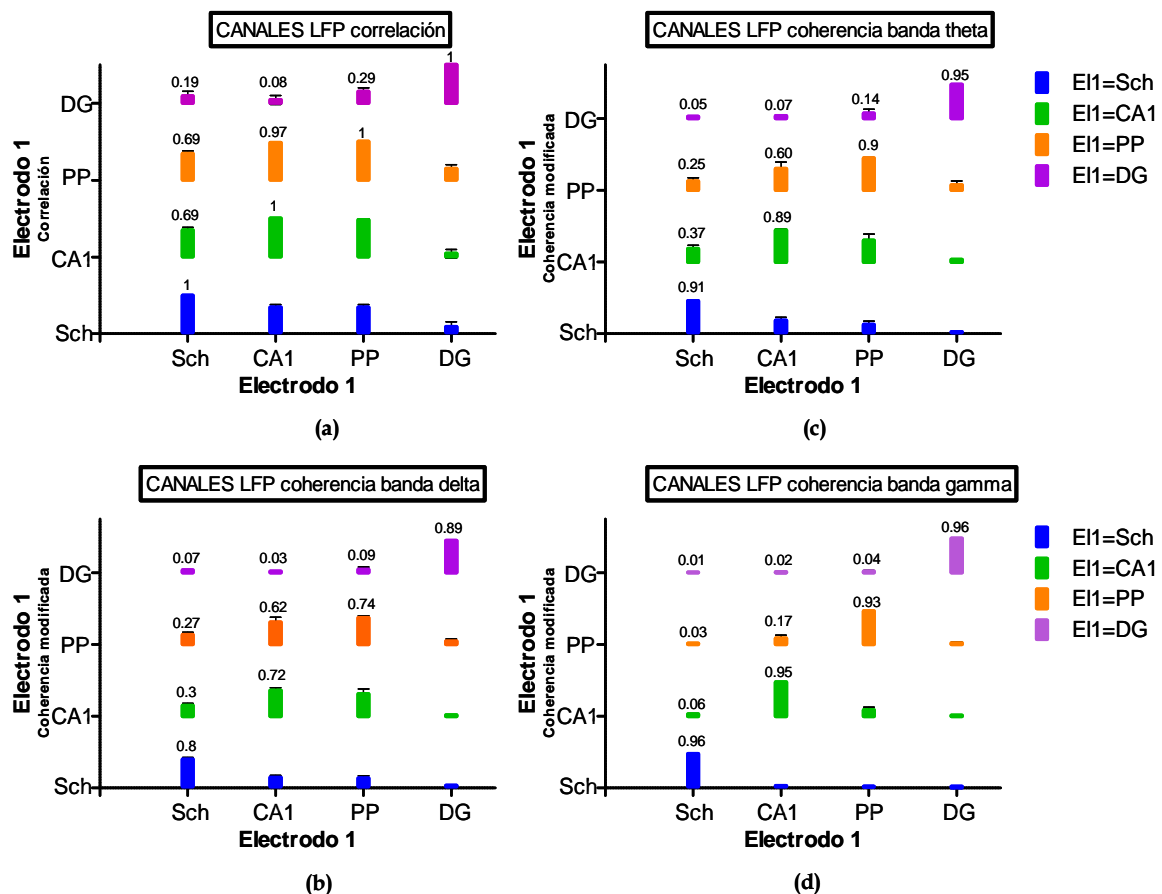


Figura 3.5. Histogramas con las medias de grupo de la correlación (a) y de la coherencia modificada en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d) entre señales de LFP seleccionadas por su posición anatómica y pertenecientes a un mismo hemisferio.

Análisis bilateral

En segundo lugar, pasamos a describir algunas de las gráficas correspondientes a las matrices de correlación y coherencia obtenidas a partir de señales pertenecientes a hemisferios cerebrales diferentes. En estas gráficas podemos observar que, a excepción del hilus, los mayores valores de correlación y coherencia se observan entre regiones homotópicas del cerebro (DG vs. DG, CA1 vs. CA1 etc.). Esta observación es consistente con lo reportado por otros investigadores [69] y sugiere un alto grado de interconexión en el sistema y una escasa especialización (parcelación) funcional entre ambos hipocampos. A diferencia de los estudios previos, el uso en nuestro caso de matrices de electrodos implantados bilateralmente nos permite analizar simultáneamente la

comunicación homo- y heterotópica. De este modo encontramos valores altos en la correlación entre los dos CA1 (0.93 ± 0.01) y entre el CA1 y la capa granular del DG (0.91 ± 0.02) (figuras 3.6a y 3.7a), y valores altos en la coherencia entre las regiones citadas en la banda delta (0.89 ± 0.01 entre los dos CA1 y 0.73 ± 0.03 entre el CA1 y la capa granular del DG) (figuras 3.6b y 3.7b) y en la banda theta (0.79 ± 0.02 entre los dos CA1 y 0.51 ± 0.04 entre el CA1 y la capa granular del DG) (figuras 3.6c y 3.7c). Resultan destacables los valores bajos de correlación (figuras 3.6a y 3.7a) y de coherencia en todas las bandas (figuras 3.6b, 3.6c, 3.6d, 3.7b, 3.7c y 3.7d) observados entre los dos hilus (ver flecha en figura 3.8d) y entre el hilus y cualquiera de las regiones estudiadas. Esta estructura de correlaciones y coherencias, desconocida hasta la fecha, parece sugerir un alto grado de independencia bilateral en el hilus y por tanto, en el procesamiento de la información en la vía $CA3 \rightarrow$ Hilus \rightarrow CA1.

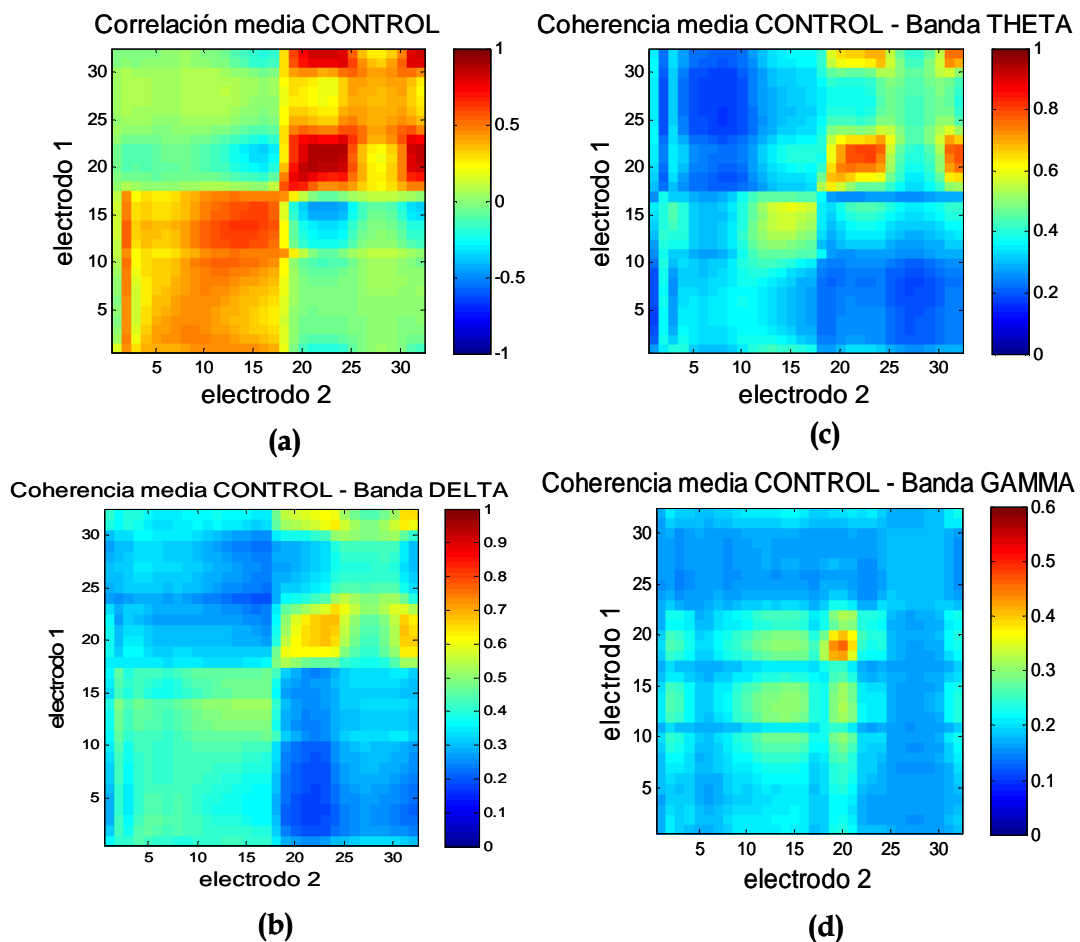


Figura 3.6. Correlación (a) y coherencia en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d) entre señales pertenecientes a los dos hemisferios cerebrales

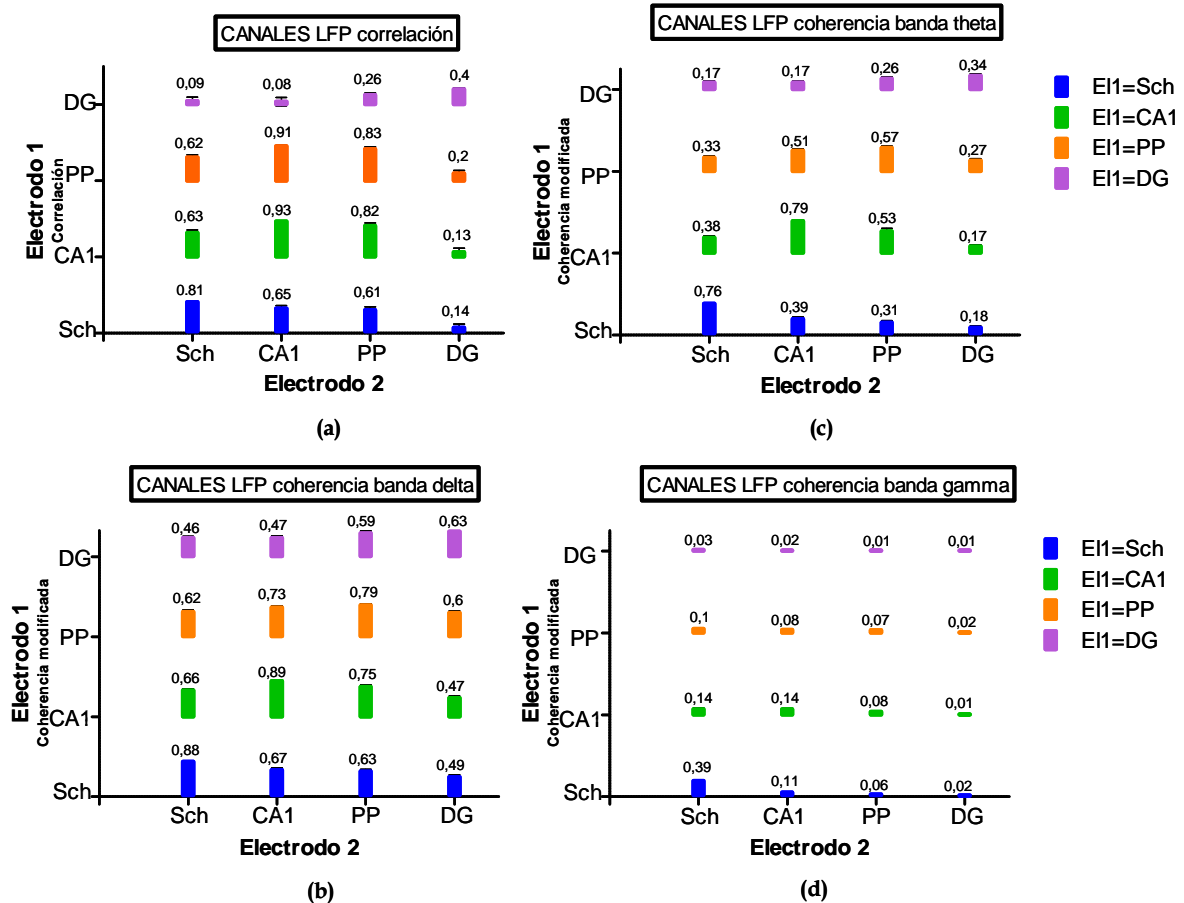


Figura 3.7. Histogramas con las medias de grupo de la correlación (a) y de la coherencia en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d) entre señales de LFP pertenecientes a hemisferios cerebrales diferentes y representativas de los generadores.

Estos resultados favorecen una vez más la tesis del procesamiento paralelo en el hipocampo. La vía clásica $DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$, por su parte, muestra un alto grado de funcionamiento coordinado entre los dos hemisferios. Dicha coordinación se manifestaría incluso en la generación de eventos rápidos en CA1, conocidos como “sharp-wave-ripple complexes” [70] como muestra la figura 3.6d. Para facilitar la comparación de los resultados de coherencia ipsi- y contralaterales se representan de forma conjunta en la figura 3.89. Resultará muy interesante en el futuro investigar si estas dos vías potenciales de procesamiento paralelo en el hipocampo tienen realmente un reflejo funcional, es decir, si distintos tipos de información se codifican de forma independiente en ambas vías.

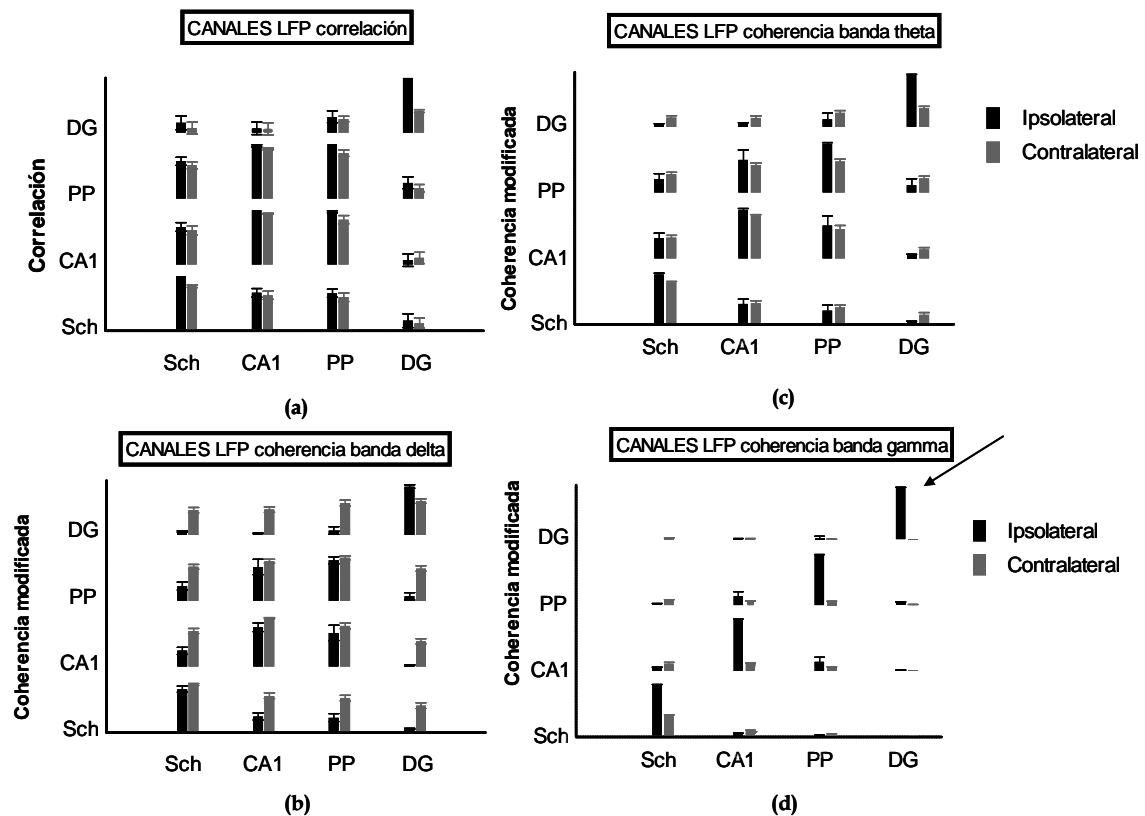


Figura 3.8. Comparación de los valores de correlación y coherencia modificada entre estructuras hipocámpales del mismo hemisferio cerebral y del hemisferio contralateral. Correlación (a) y coherencia en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d).

3.4 Comparativa entre los resultados de correlación y coherencia obtenidos a partir de las señales de LFP y los obtenidos a partir de sus componentes independientes

3.4.1 Comparativa entre las matrices de correlación entre las señales de LFP y entre sus componentes independientes

El Análisis de Componentes Independientes (ICA) ha demostrado tener múltiples ventajas sobre el Análisis de Componentes Principales (PCA) para el estudio de algunas señales electroencefalográficas [71]. El ICA no presupone la ortogonalidad de las fuentes, sino su independencia en sentido estadístico. Dos

componentes son independientes si el conocimiento sobre una no implica nada sobre la otra [72]. Mediante este análisis, y a partir de los registros electrofisiológicos de alta densidad, correspondientes a distintas partes del hipocampo y el PtA, adquiridos en distintos instantes de tiempo antes, durante y después de la potenciación sináptica obtenemos varias componentes independientes (su número varía según el experimento). En cualquier caso, trabajaremos con las 4 componentes independientes cuyo sustrato biológico (región cerebral) podemos identificar, como ya se ha indicado en el apartado 2.2.4, y que explican más del 90% de la varianza total de la señal. En la figura 3.9 se muestran las cuatro componentes independientes obtenidas para los primeros 15 segundos del experimento "030910 Multicondición 2", para uno de los electrodos (electrodo 1).

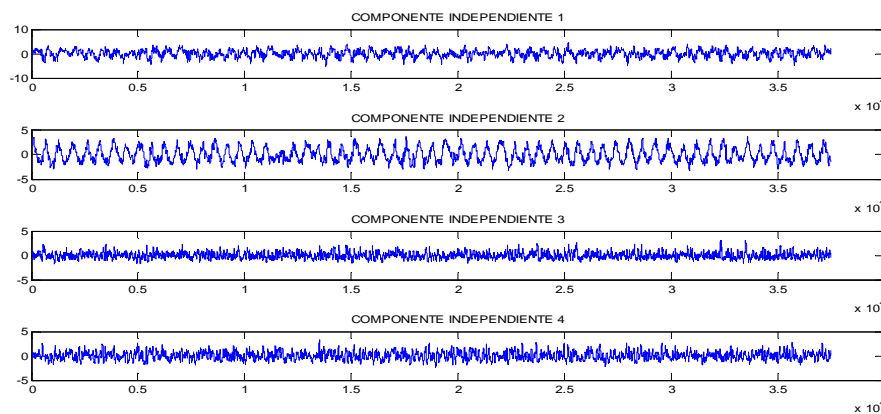
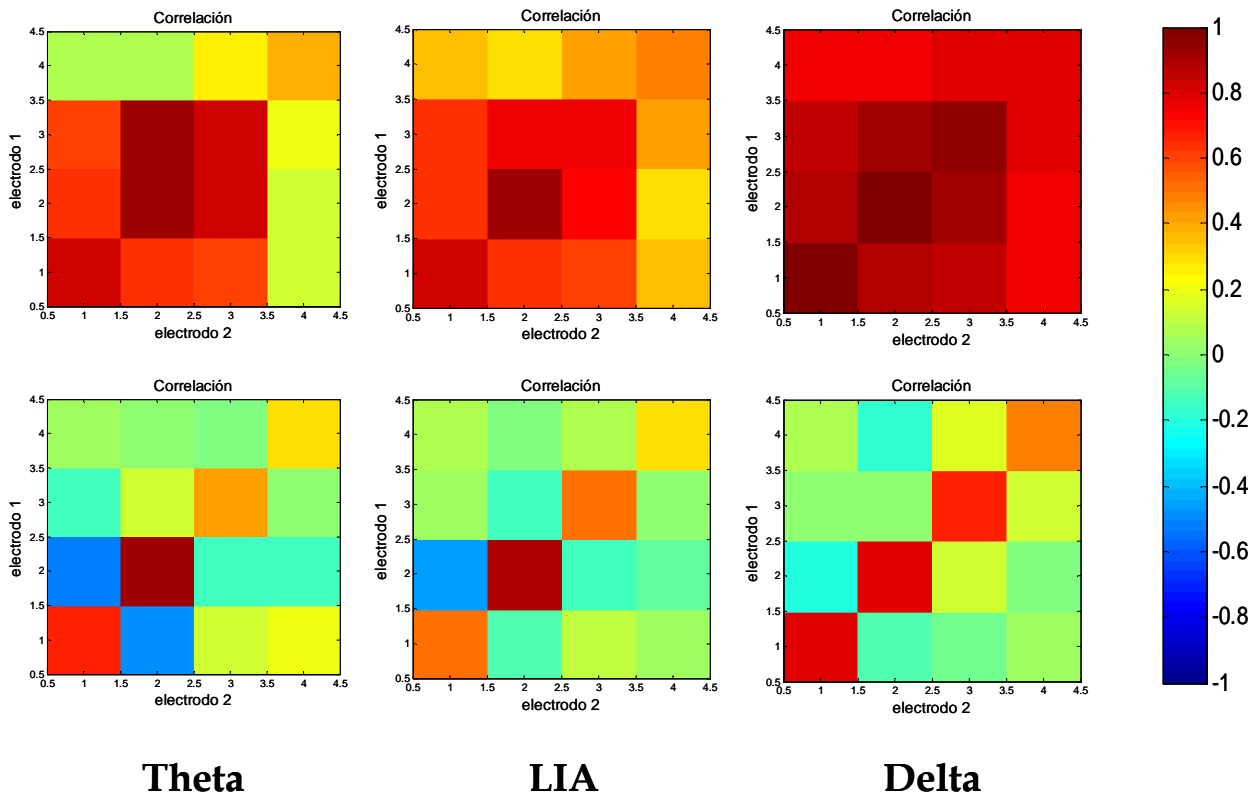


Figura 3.9. Componentes Independientes obtenidas para los primeros 15 segundos del experimento 030910 Multicondición 2

Para comparar los valores de correlación obtenidos a partir de ambas señales, LFP y componentes independientes, seleccionamos registros bilaterales y calcularemos la correlación cruzada entre los electrodos 1 y 2. De este modo, estamos calculando la correlación entre las componentes independientes de señales pertenecientes a dos electrodos (hemisferios cerebrales) diferentes, por lo que no podemos asumir que estas señales sean independientes y podemos calcular de forma matemáticamente correcta la correlación entre ellas. En la figura 3.10 se muestran las matrices de correlación obtenidas para las señales de LFP representativas de cada componente independiente y para dichas componentes

independientes en cada uno de los estados cerebrales: theta, theta irregular (LIA por sus siglas en inglés Large Irregular Activity) y delta.



Theta **LIA** **Delta**

Figura 3.10. Matrices de correlación entre los dos hipocampus para las señales de LFP (parte superior) y para sus componentes independientes respectivas (parte inferior). Señales en theta, señales en theta irregular y señales en delta. En el eje de abscisas se representa el electrodo 2 y en el eje de ordenadas el electrodo 1. En ambos ejes: 1=generador Schaffer; 2=generador de CA1; 3=generador de la vía perforante (PP); 4=generador de DG.

Como podíamos esperar, al calcular la correlación entre las componentes independientes los valores bajan de forma importante con respecto a los obtenidos directamente con los potenciales de campo. Esto es debido a que al aplicar ICA estamos eliminando la "contaminación" que se produce por la propagación de campos de unas zonas a otras de la formación hipocampal y el córtex circundante. Dicha contaminación es responsable, en promedio, del 50, 79 y 88% de la correlación estimada entre regiones heterotópicas bilaterales, para cada uno de los estados cerebrales estudiados (theta, LIA y delta, respectivamente).

Este efecto se da en menor medida para las zonas homotópicas de ambos hemisferios (disminución de 23, 28 y 24% para theta, LIA y delta, respectivamente), lo que nos permite afirmar que existe un acoplamiento funcional entre dichas zonas que es de origen biológico. Dicho acoplamiento funcional es muy elevado entre los generadores de Schaffer y CA1. Además, el análisis de correlación de componentes independientes evidencia en forma de correlación negativa el cambio de fase en la oscilación de 4-8 Hz, durante el ritmo theta, entre el oriens/capa piramidal de CA1 y el radiado de la misma región [73-75]. Dicha reversión en la fase del ritmo theta sólo se detecta en el LFP en capas más superficiales del oriens (ver por ejemplo correlación entre los canales 15-16 vs. 19-22 en figura 3.4a) y evoluciona con una progresión gradual de fase hasta los 180° que alcanza aproximadamente en la zona ventral del *stratum radiatum*. Dicha progresión de fase es interpretada como un efecto de propagación de campo entre dos generadores theta discretos, segregados en el eje dorso-ventral de las pirámides de CA1, en buena sintonía con los resultados ofrecidos por registros intracelulares [73]. Nuestros resultados basados en ICA son consistentes con esta interpretación y muestran la potencia del método para identificar generadores celulares de actividad espontánea.

3.4.2 Comparativa entre los valores de coherencia entre las señales de LFP y entre sus componentes independientes

Comparamos ahora los resultados de coherencia obtenidos con las componentes independientes y los obtenidos con las señales de LFP de los canales más representativos, enfrentando ambos hemisferios cerebrales. Para ello confrontamos las diferencias obtenidas entre la coherencia y la coherencia crítica para ambos casos. Seleccionamos algunas comparaciones de un total de 96 curvas obtenidas [16 (curvas) x 2 (señales LFP e ICA) x 3 (estados cerebrales)] en las que podemos observar al comparar las medias (obtenidas a partir de LFP e ICA) de todos los experimentos utilizados que ambas curvas tienen la misma forma y sus máximos y mínimos se dan aproximadamente en las mismas frecuencias. Sin

embargo, en todos los casos, en las bajas frecuencias los valores de coherencia entre las señales de LFP son mayores que entre las componentes independientes, mientras que en las altas frecuencias ocurre lo contrario (ver figuras 3.11, 3.12 y 3.13). Este resultado se puede explicar en base a la propagación de señales. En un medio extracelular no homogéneo la atenuación que sufren las distintas componentes frecuenciales de las señales es diferente, siendo las frecuencias bajas las que sufren una menor atenuación y se propagan con más facilidad [76]. El ICA nos ayuda así a seleccionar mejor las señales, evitando la "contaminación" que puedan propagar señales procedentes de lugares cercanos al lugar de registro. En algunos casos, observamos que la coherencia en las frecuencias altas aumenta al calcularla a partir de las componentes independientes. Se podría pensar que los valores mayores de coherencia se obtendrían a partir de la señal de LFP, ya que ésta contiene toda la información, sin embargo, la coherencia es una medida no lineal y el hecho de tener una señal de LFP muy "sucia", con información no relevante para este cálculo, puede hacernos obtener un menor valor de coherencia. En estos casos el ICA nos ayuda a obtener una señal más "limpia" con la que calcular la coherencia. En la figura 3.14 se muestran todos los valores de correlación y coherencia obtenidos a partir de las señales de LFP en theta y de sus componentes independientes y que apoyan lo discutido en este apartado.

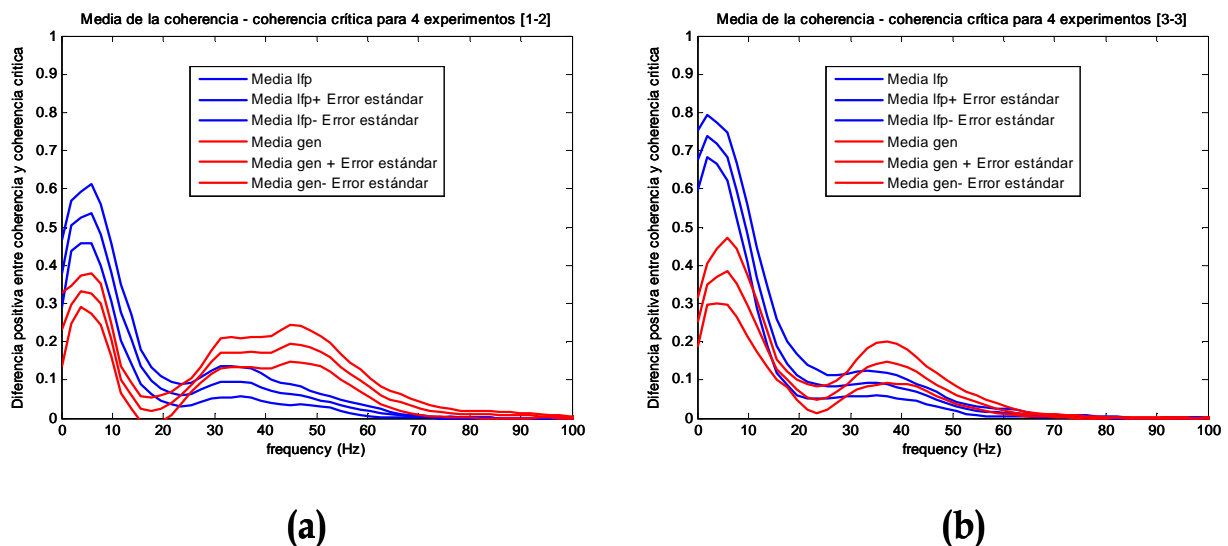
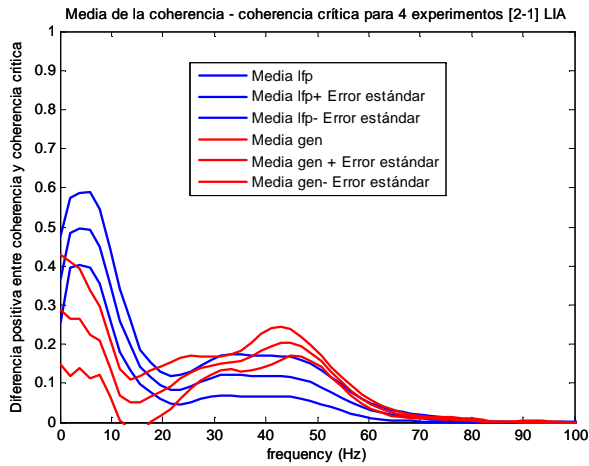
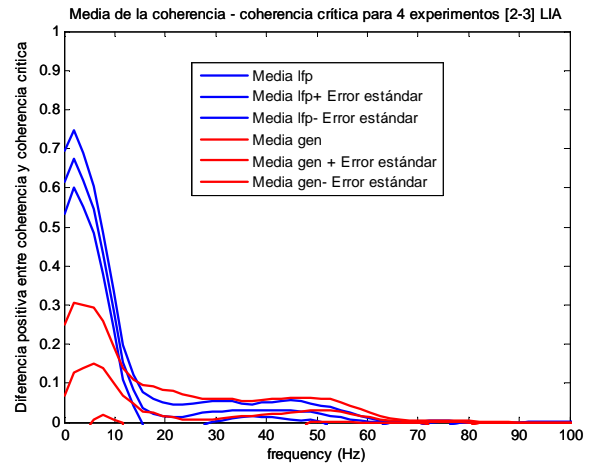


Figura 3.11. Coherencia entre los dos hipocampus para las señales de LFP y para sus componentes independientes respectivas. Señales en theta. Generadores 1(electrodo1) y 2(electrodo2) (a) y generadores 3 y 3 (b)

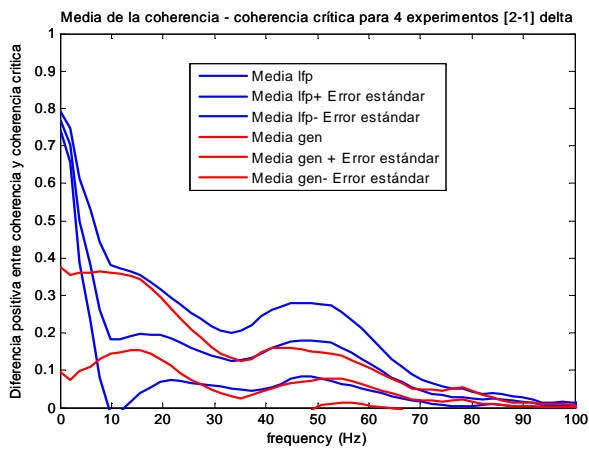


(a)

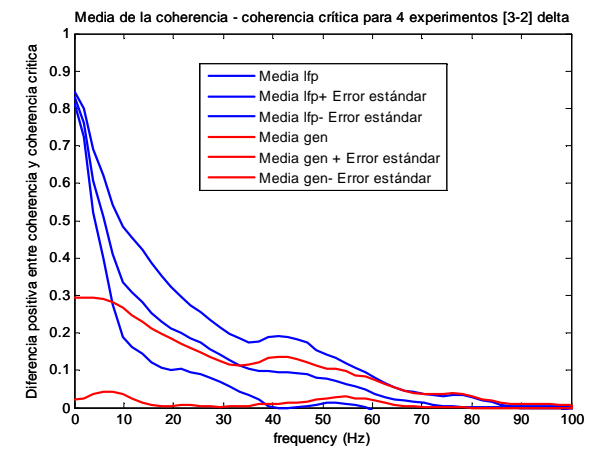


(b)

Figura 3.12. Coherencia entre los dos hipocampos para las señales de LFP y para sus componentes independientes respectivas. Señales en theta irregular. Generadores 2(electrodo1) y 1(electrodo2) (a) y generadores 2(electrodo1) y 3(electrodo2) (b)



(a)



(b)

Figura 3.13. Coherencia entre los dos hipocampos para las señales de LFP y para sus componentes independientes respectivas. Señales en delta. Generadores 2(electrodo1) y 1(electrodo2) (a) y generadores 3(electrodo1) y 2(electrodo2) (b)

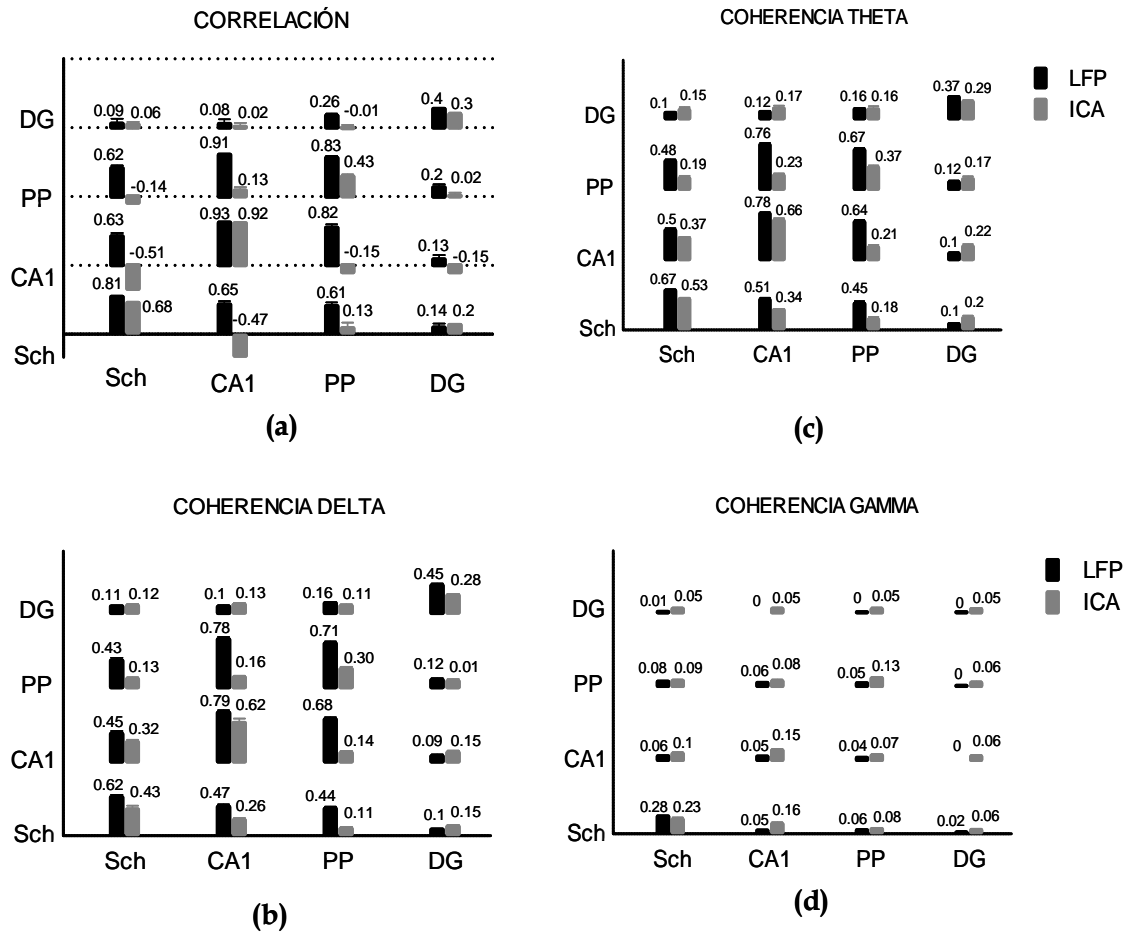


Figura 3.14. Comparación de los valores de correlación y coherencia modificada entre estructuras hipocampales de los dos hemisferios cerebral a partir de las señales de LFP en theta y de sus componentes independientes. Correlación (a) y coherencia en las bandas delta (b), theta (c) y gamma (d).

3.5 Efecto de la LTP sobre la coherencia entre las componentes independientes

Estudios previos de fMRI sugieren que la plasticidad sináptica unilateral en la vía perforante induce una reorganización funcional del hipocampo que incluye un aumento en la comunicación inter-hipocampal [6]. Dicha conclusión se alcanzó en base a los resultados de propagación de actividad inducidos por un estímulo eléctrico. Dicho diseño experimental impone una alta sincronización en el input entorrinal del hipocampo, muy lejos de lo que puede suceder en condiciones fisiológicas. Teniendo eso en cuenta y los prometedores resultados obtenidos en el

estudio de actividad espontánea bilateral basado en ICA, decidimos estudiar la comunicación bilateral en el hipocampo mediante un análisis de correlación y coherencia entre las componentes independientes quisimos ver cómo la potenciación sináptica afecta a la coherencia de dichas componentes independientes de los dos hipocampos. Para ello, calculamos dichos parámetros en 3 etapas diferentes: estado basal (control), inmediatamente después de inducir la potenciación sináptica (LTP), y 3 horas tras la inducción (LTP+3h). La comparación estadística entre las distintas etapas se realiza para la banda de frecuencia theta (4-8 Hz) y dos gamma, una de baja (32-45 Hz) y otra de alta (45-60 Hz) frecuencia. Para ello se emplea un test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas considerando significativas las diferencias con un valor corregido de $p < 0.05$. Mostramos los resultados en la figura 3.15, donde podemos observar como la coherencia en theta y en gamma alta entre ambos generadores Schaffer disminuye

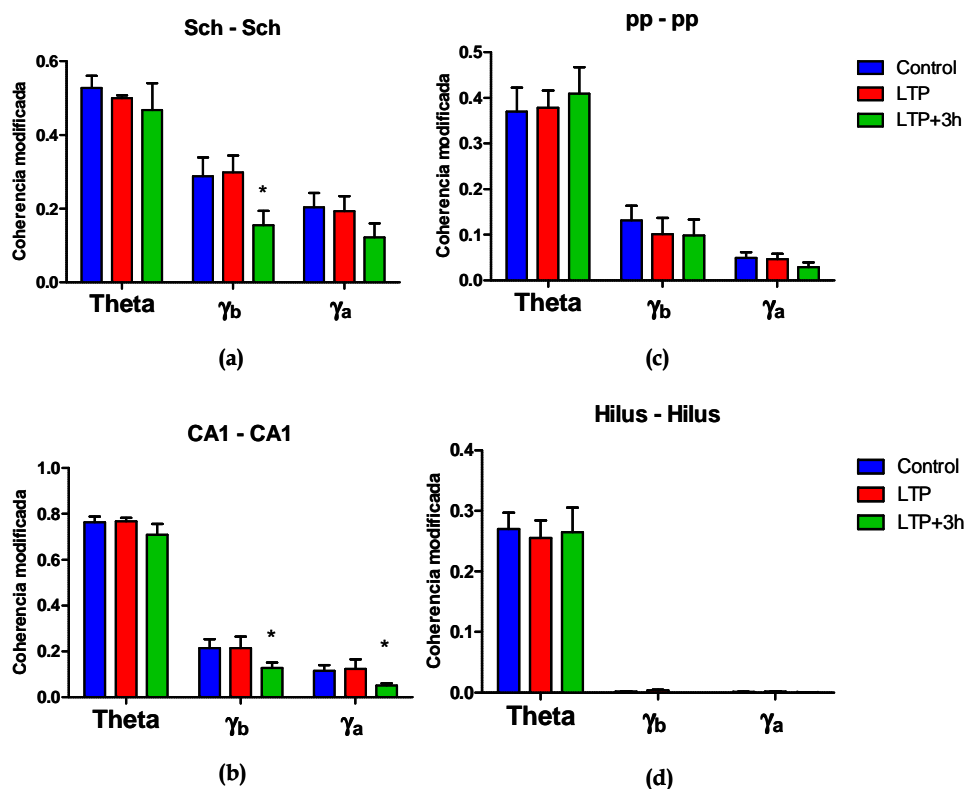


Figura 3.15. Histograma con las medias de la coherencia modificada obtenidas en Control, LTP y LTP+3h entre los dos generadores Schaffer colateral (a), entre los dos generadores de CA1 (b), entre los dos generadores PP (c) y entre los dos generadores del Hilus (d).

con la LTP, y también transcurridas 3 horas. La coherencia en las tres bandas de frecuencia escogidas entre ambos generadores CA1 disminuye transcurridas las 3 horas. En el caso de los dos generadores PP, la coherencia disminuye en LTP, y en LTP+3h para las dos bandas de gamma, mientras que en la banda theta aumenta. Por último, vemos cómo la coherencia entre los generadores hilus disminuye en LTP y vuelve a aumentar en LTP+3h. En las figuras 3.16 y 3.17 podemos ver la media de la coherencia modificada a lo largo de la frecuencia entre los generadores de regiones homotópicas de ambos hemisferios.

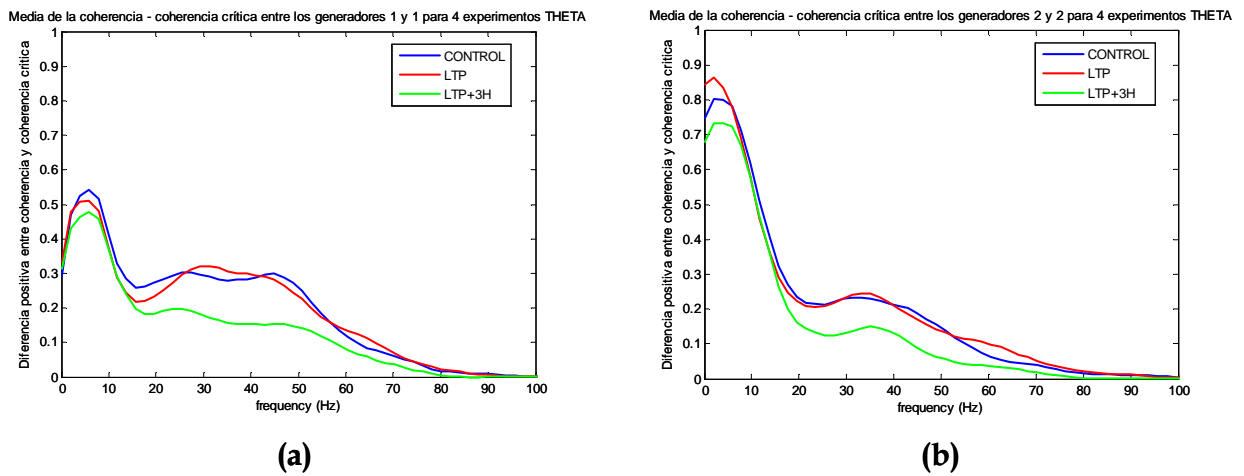


Figura 3.16. Coherencia entre las componentes independientes correspondientes a los generadores Schaffer colateral (a) y a los generadores de CA1 de ambos hipocampo (b) durante control, LTP y LTP+3h

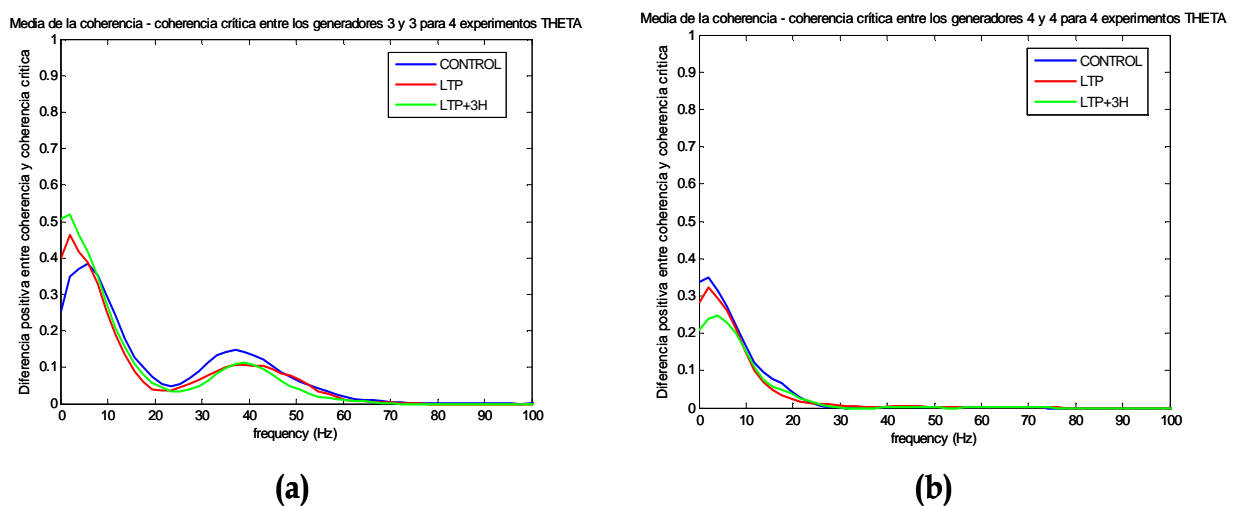


Figura 3.17. Coherencia entre las componentes independientes correspondientes a los generadores PP (a) y a los generadores Hilus de ambos hipocampo (b) durante control, LTP y LTP+3h

Los resultados obtenidos no nos permiten concluir que la potenciación sináptica en la vía perforante inducida de manera ipsilateral tenga un efecto muy relevante en la comunicación bilateral espontánea del hipocampo. Así mismo sugiere que el resultado obtenido con fMRI [6] refleja más probablemente un aumento en la propagación contralateral de la actividad neuronal evocada. Resulta interesante la reducción observada en la sincronía bilateral a altas frecuencias entre los generadores de Schaffer y CA1 bilaterales, en tanto en cuanto puede reflejar una modulación plástica de la vía asociativa. Será necesario, en cualquier caso, proporcionar un soporte experimental más robusto a esta observación, por ejemplo, registrando en animales no anestesiados ejecutando tareas comportamentales que dependan del hipocampo.

3.6 Estudio de la estructura dinámica de las interacciones funcionales en el hipocampo

En el apartado 3.4.1 hemos comentado cómo podíamos calcular la correlación entre componentes independientes de forma correcta al pertenecer éstas a señales de LFP procedentes de hemisferios cerebrales diferentes. En este apartado, hemos calculado la correlación entre componentes independientes de un mismo hemisferio. Esto no es formalmente correcto, pero lo hemos realizado a modo exploratorio para poder observar patrones repetitivos en la señal que van más allá de los valores de correlación que obtenemos con este procedimiento. Existen antecedentes en el uso de este cálculo, como es el caso del estudio de la conectividad funcional por fMRI en estado de reposo basado en correlación de componentes independientes [77].

Así, para el cálculo de la correlación entre las componentes independientes pertenecientes a un mismo hemisferio, dividimos estas componentes independientes en tramos de una determinada duración para ver el progreso de esta matriz de correlación a lo largo del tiempo de registro. Para este estudio se optó, en un principio, por utilizar seis tamaños diferentes de tramo: 30, 15, 10, 5, 3

y 1 segundos. La función programada para el cálculo de los coeficientes de correlación entre las componentes independientes nos proporciona la matriz de correlación a partir de una matriz que contiene las componentes independientes. Antes de presentar los resultados, en la figura 3.18 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas para su mejor comprensión. En esta gráfica se muestran los valores de la matriz de correlación de las cuatro componentes independientes mostradas en la figura 3.6. Tanto en el eje vertical como en el horizontal se sitúan dichas componentes pertenecientes a un mismo hemisferio, por lo que todas estas matrices son simétricas y con valor 1 en su diagonal, ya que se refiere a la correlación de cada componente independiente consigo misma. El resto de valores se sitúan entre -1 y 1, como corresponde a los cálculos de correlación, siguiendo la barra de colores situada en el lateral derecho.

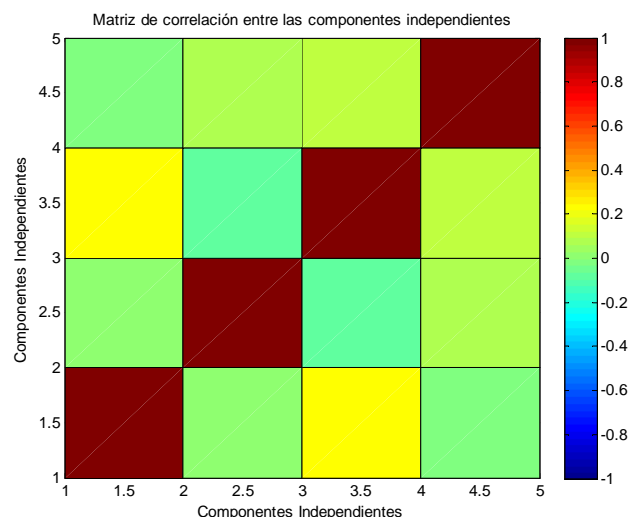


Figura 3.18. Matriz de correlación entre las componentes independientes obtenidas al aplicar ICA sobre los registros de LFP del experimento 030910 *Multicondición 2*. Tanto en el eje de abscisas como en el de ordenadas se representan dichas componentes.

Veamos ahora las matrices de correlación entre las componentes independientes resultantes del análisis de los registros tomando tramos de duración variable, tal y como se ha comentado anteriormente. En la figura 3.19 se muestra un ejemplo tomando tramos de 1s. Al observar las matrices de correlación de los diferentes

tramos, observamos como las correlaciones entre las componentes independientes cambian con el tiempo y que existen patrones que se repiten en tramos diferentes y que representan eventos identificables en la señal (ver flechas en la figura 3.19).

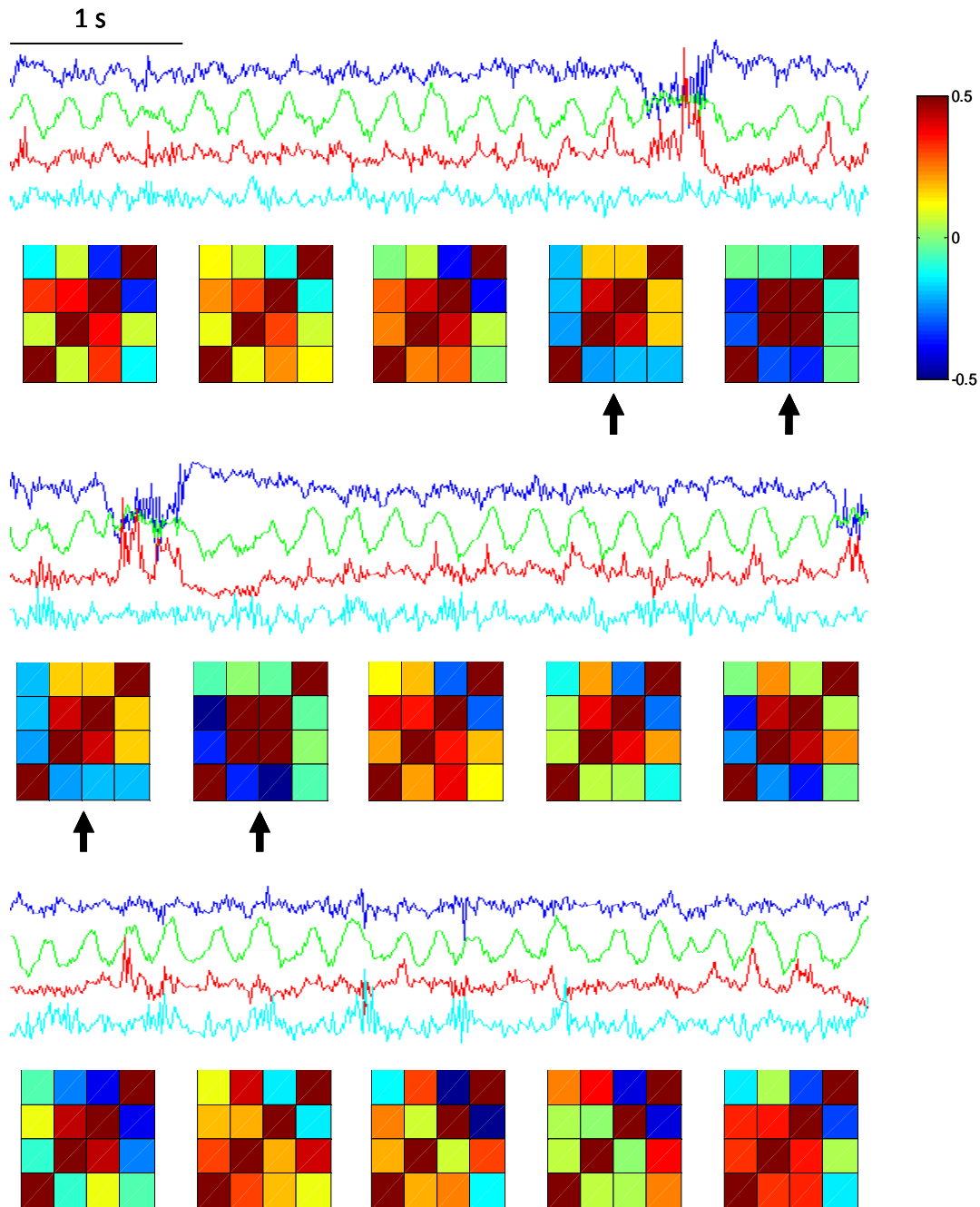


Figura 3.19. Señales de las 4 componentes independientes con las que trabajamos y las matrices de correlación entre dichas componentes independientes para tramos de 1s.

Observando las gráficas correspondientes a los tramos de 30, 10, 5, 3 y 1 segundos para los distintos experimentos comprobamos la existencia de patrones (correlaciones entre diferentes componentes independientes) que se repetían a lo largo del tiempo. Esto se observaba mejor al tomar tramos de menor tamaño, por lo que se decidió continuar el estudio para los cinco experimentos considerando tramos de 10, 5, 3 y 1 segundos aunque por las características de este documento es inviable mostrar todas las gráficas calculadas para los diferentes tamaños.

Al trabajar con tiempos de registro en torno a los 200 segundos, buscar semejanzas y diferencias entre las matrices de correlación de los diferentes tramos (de 10, 5, 3 y 1 segundos) a simple vista es poco eficaz. Por esta razón, y para poder definir el comportamiento de las correlaciones entre las componentes independientes para un determinado intervalo temporal, se definieron unos vectores de seis elementos que se corresponden con las correlaciones entre las componentes independientes (CI) por este orden:

[CI1-CI2, CI1-CI3, CI1-CI4, CI2-CI3, CI2-CI4, CI3-CI4]

A estas curvas las denominamos curvas de correlación y toman valores de correlación, es decir, entre -1 y 1 a lo largo del eje vertical. En la figura 3.20 se muestran las curvas de correlación obtenidas para el experimento "030910 *Multicondición 2*". Cada una de las curvas corresponde a los valores de correlación (valores mostrados en la matriz de correlación) entre las componentes independientes para cada uno de los veintiún tramos de 10s de dicho experimento.

Vectores que muestran las correlaciones entre las IC's para cada tramo temporal (10s) 030910 Multicondición 2.mat

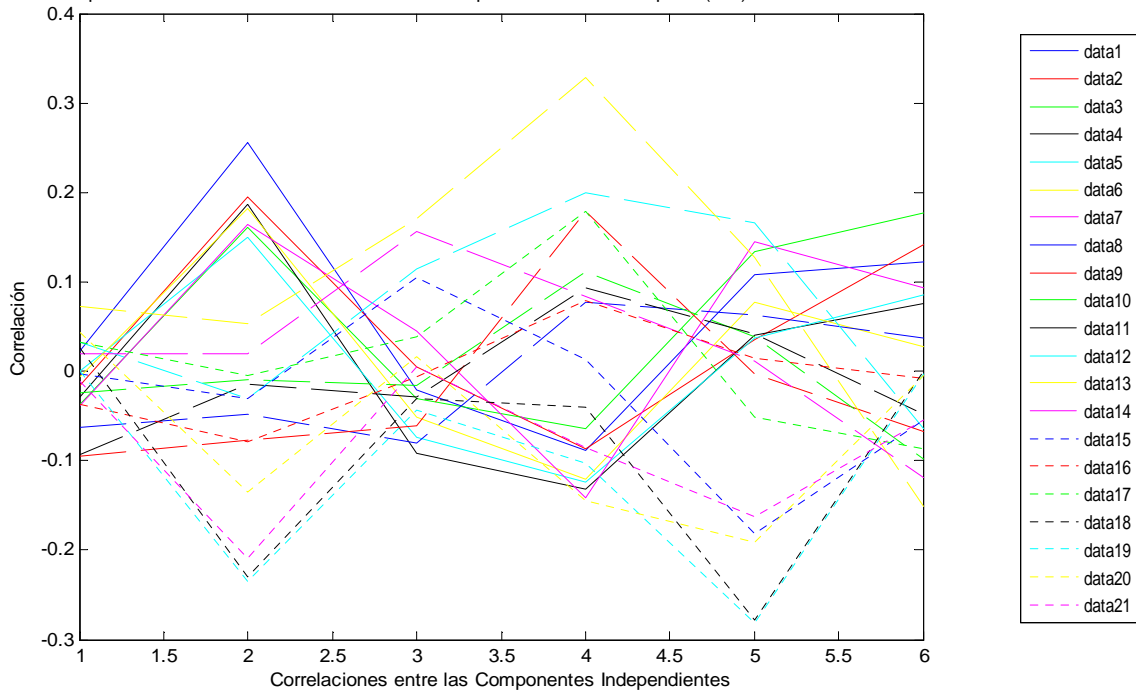


Figura 3.20. Vectores que muestran las correlaciones entre las Componentes Independientes para cada tramo temporal de 10s. Cada uno de los *datas* representa las correlaciones entre las componentes independientes, para uno de los tramos establecidos, representadas en las matrices de correlación

Observamos que las curvas se agrupan según su forma, es decir, que para distintos tramos la correlación entre sus componentes independientes aumenta y disminuye del mismo modo. Por un lado encontramos similares las curvas de los tramos 1, 2, 3, 4 y 5, y por otro lado, también podemos encontrar semejanzas entre las curvas de los tramos 18, 19 y 21. Podemos comprobar estas semejanzas en la figura 3.21, donde se muestran las matrices de correlación de algunos de los tramos identificados como similares a partir de las curvas de correlación de la figura 3.20. (Tramo1 vs. Tramo5; Tramo 18 vs. Tramo21) y en la figura 3.22 donde se muestran las curvas de correlación correspondientes a dichos tramos separados dos a dos, para poder identificar mejor el parecido entre ellas.

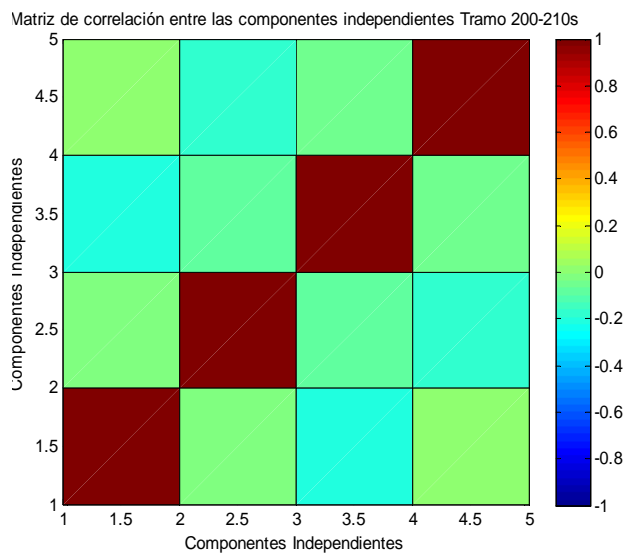
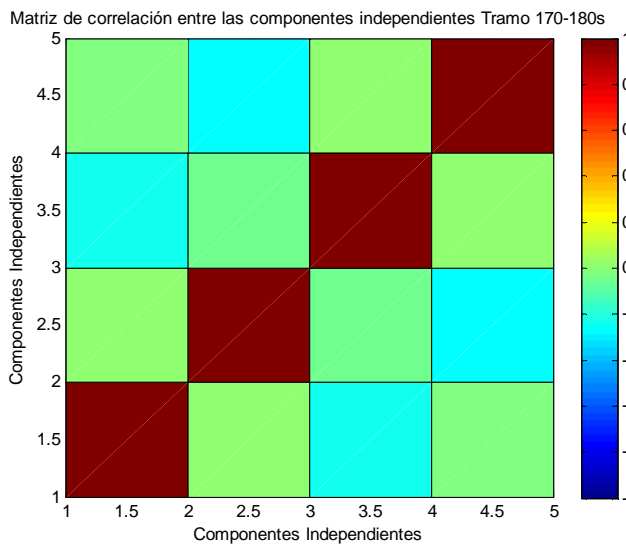
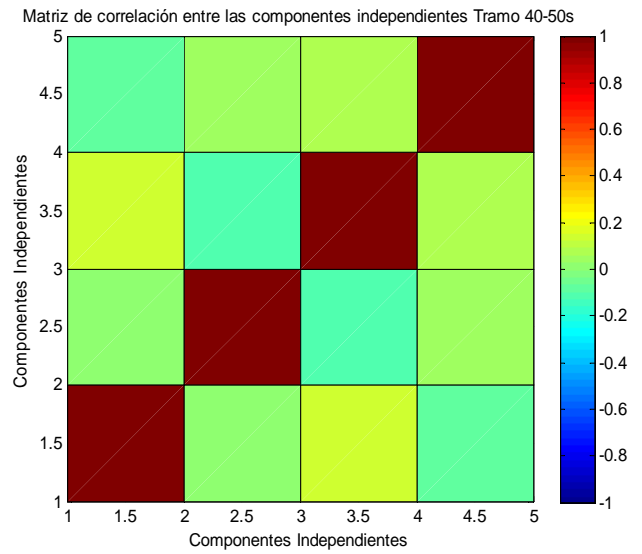
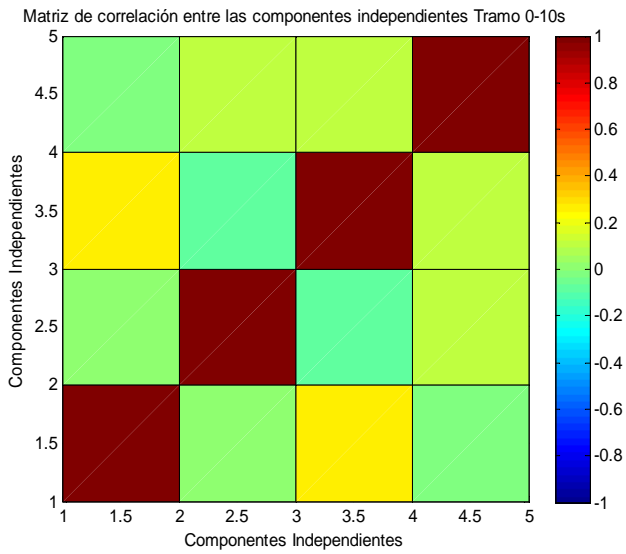


Figura 3.21. Matrices de correlación de distintos tramos temporales de 10s del experimento "030910 Multicondición 2" similares entre sí

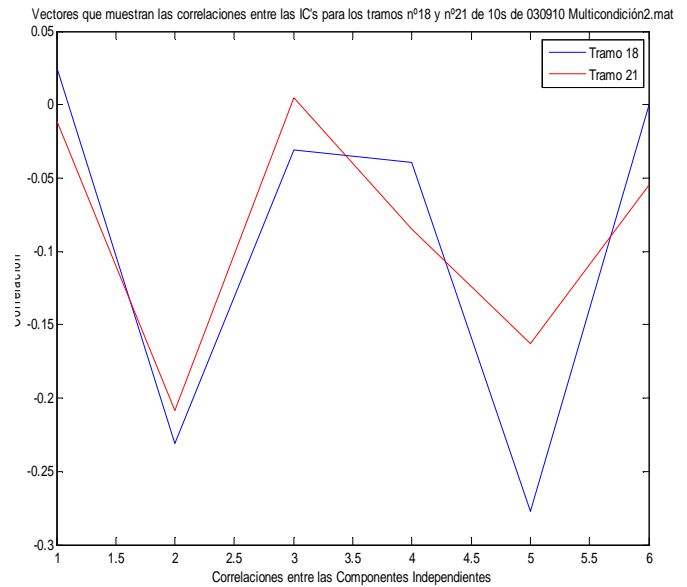
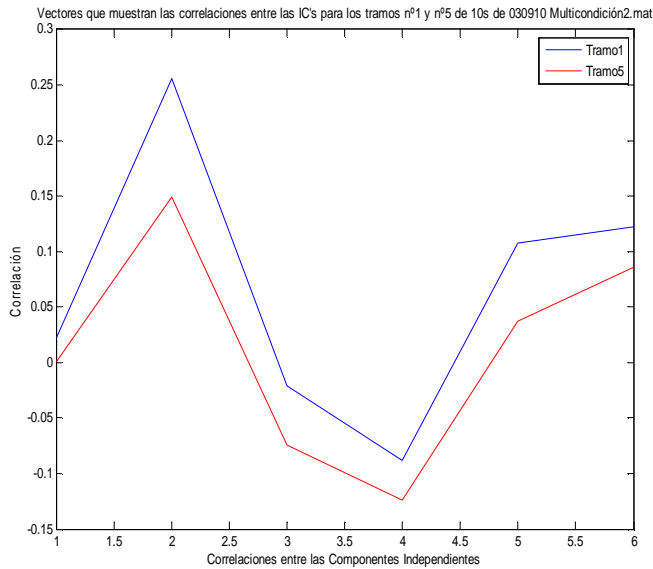


Figura 3.22. Curvas de correlación correspondientes a las matrices de correlación de la figura 3.23 (Tramo1 vs. Tramo5; Tramo 18 vs. Tramo21) Tramos de 10s de "030910 Multicondición 2"

Estos resultados, llevados al terreno biológico, demuestran que la actividad neurofisiológica registrada en distintas regiones del hipocampo, o módulos, pasan por estados funcionales discretos definidos en base a sus correlaciones cruzadas. Es decir, parece existir una sucesión de modos de funcionamiento diferenciados que bien podrían corresponderse con aspectos definidos del procesamiento neuronal.

Aunque las curvas de correlación nos han ayudado a encontrar semejanzas entre matrices de correlación correspondientes a diferentes tramos de un modo más útil que la simple observación de estas matrices, al obtenerlas comprobamos que encontrar semejanzas entre estas curvas a simple vista no es trivial y que era necesario encontrar un procedimiento más rápido y eficaz. Por ello, decidimos utilizar de nuevo la correlación para averiguar qué curvas de correlación son más parecidas entre sí y así conocer qué matrices de correlación son similares a lo largo del tiempo de registro. Empleamos nuevamente matrices de correlación, las cuales van a tener una forma muy similar a las obtenidas al calcular la correlación entre las componentes independientes (véase figura 3.18). En la figura 3.23

mostramos esta matriz para el caso que estamos estudiando, es decir, para las curvas mostradas en la figura 3.20. En los ejes vertical y horizontal se representan los veintidós tramos de 10s correspondientes a este experimento, y la correlación va de -1 a 1 siguiendo la representación que se indica en la barra de colores lateral.

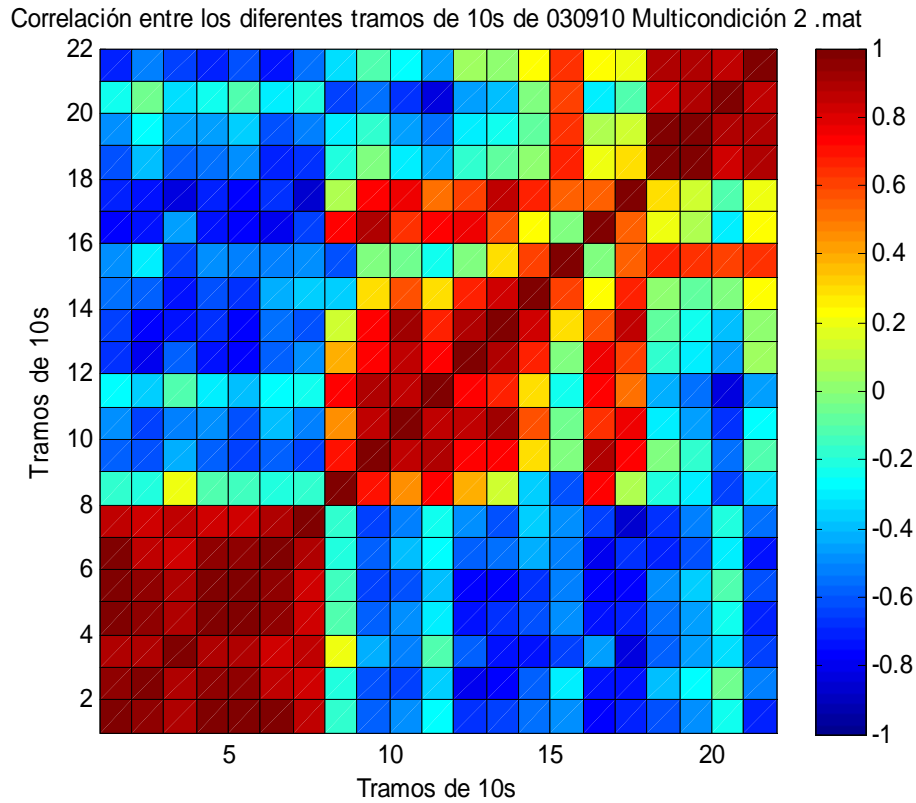


Figura 3.23. Correlación entre los tramos de 10s de "030910 Multicondición 2.mat"

Con la ayuda de esta figura y conociendo la distribución de las etapas de control, LTP y LTP+3h en este experimento (Control [1-70s] LTP [71-135s] LTP+3h [136-210s]) podemos conocer de un vistazo cómo se relacionan las curvas de correlación entre sí. Así, comprobamos la gran similitud existente entre todas las curvas pertenecientes a la etapa de control (Tramos 1-7); por otro lado la semejanza entre algunas curvas pertenecientes a la etapa de LTP+3h (Tramos 18-21); y también entre curvas pertenecientes a etapas diferentes, en este caso, LTP y LTP+3h (Tramos 8 y 16).

Una vez recorrido todo este proceso para el primer experimento y todos los tamaños de tramo temporal acordados para este trabajo y citados anteriormente, seguimos los mismos pasos con el resto de experimentos. De este modo, en la figura 3.24 mostramos las curvas de correlación para los otros cuatro experimentos, también tomando tramos temporales de 10s.

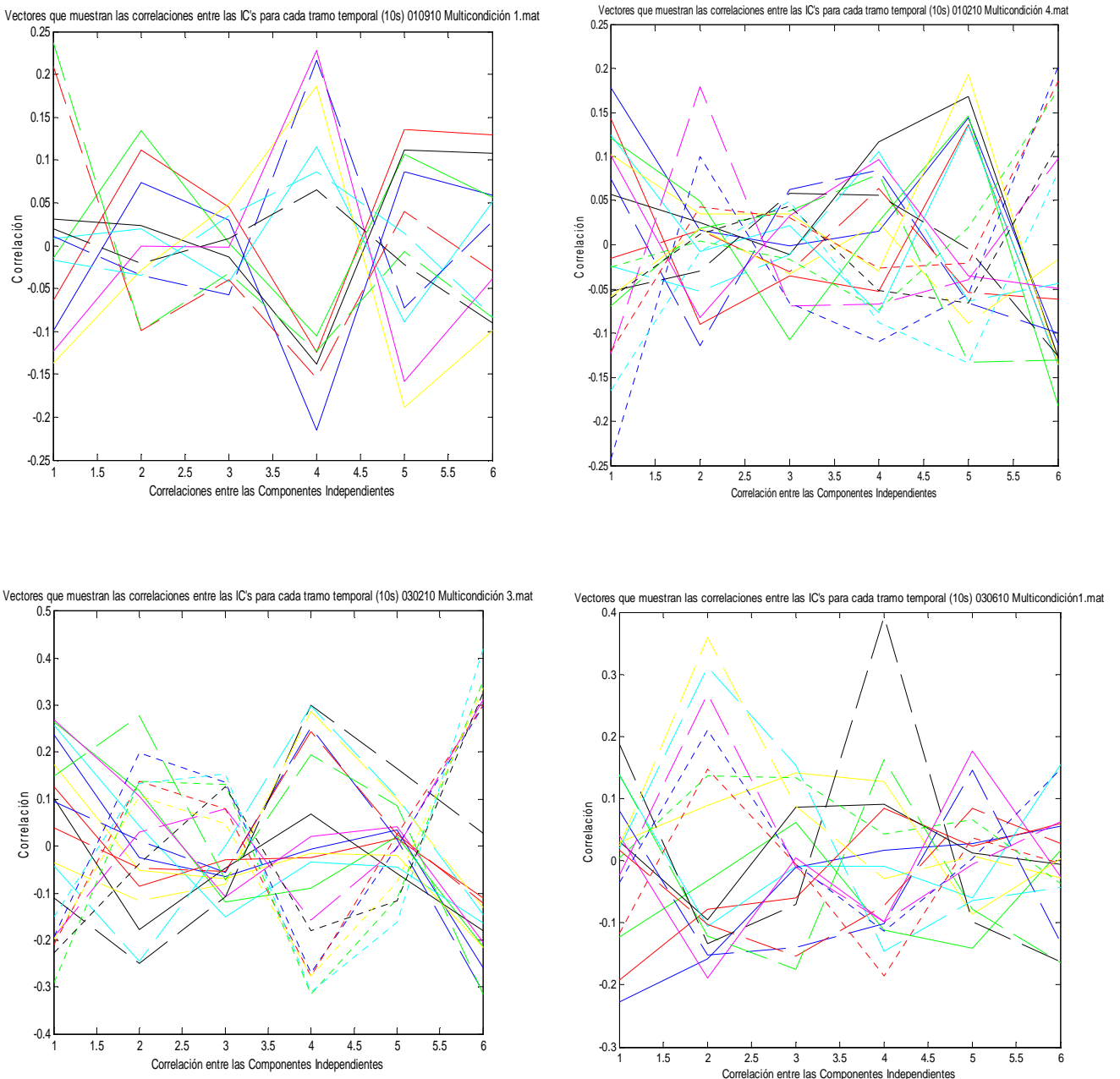


Figura 3.24. Vectores que muestran las correlaciones entre las Componentes Independientes para cada tramo temporal de 10s

Vemos que en todos los experimentos existen curvas de correlación correspondientes a diferentes tramos, que tienen un comportamiento similar. En la figura 3.25 se muestran las matrices de correlación de dichas curvas y podemos observar con más claridad cómo se distribuyen las semejanzas entre estas curvas de correlación para los cuatro experimentos restantes ("010910 Multicondición 1", "010210 Multicondición 4", "030210 Multicondición 3" y "030610 Multicondición 1").

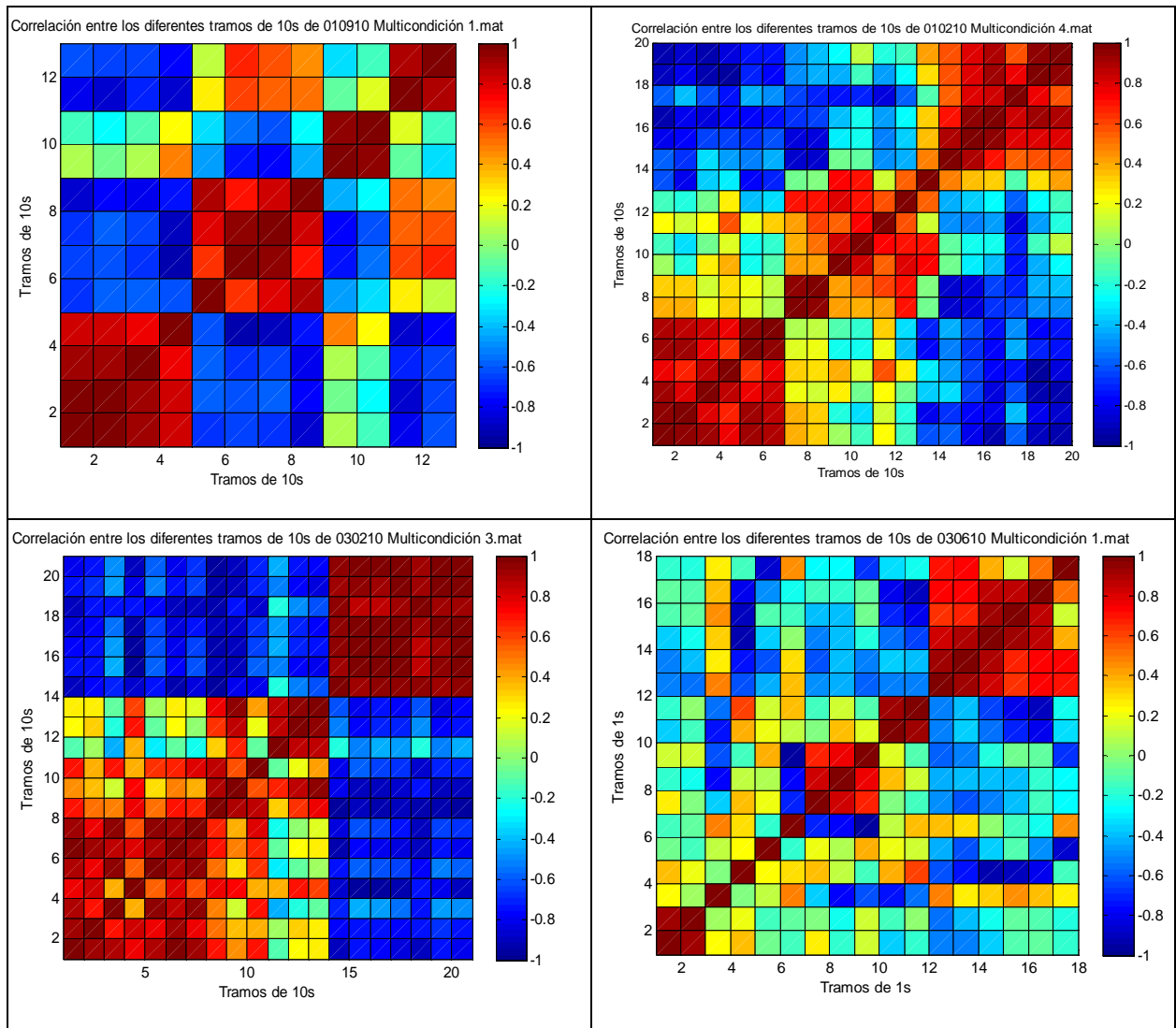


Figura 3.25. Matrices de correlación entre las curvas de correlación de los tramos de 10s de los experimentos "010910 Multicondición 1"(40s/40s/40s), "010210 Multicondición 4"(60s/65s/65s), "030210 Multicondición 3"(70s/60s/70s) y "030610 Multicondición 1"(62s/45s/63s). Entre paréntesis se indica la duración de cada una de las etapas para cada experimento.

En las figuras 3.23 y 3.25 observamos que tomando tramos de 10s, las curvas de correlación suelen ser similares entre sí cuando pertenecen a una misma etapa (Control, LTP y LTP+3h), aunque también encontramos casos aislados de similitud entre curvas pertenecientes a diferentes etapas. Siguiendo con el razonamiento biológico anterior, este resultado confirma la existencia de estados o mapas funcionales discretos, que se alternan en el tiempo y cuya frecuencia de aparición estaría determinada por procesos de plasticidad sináptica.

Para seguir profundizando en el comportamiento de las curvas de correlación, tomamos ahora tramos de menor tamaño, como se ha comentado antes, de 5, 3 y 1 segundos. En las figuras 3.26, 3.27 y 3.28 se muestran las curvas de correlación obtenidas para dichos tamaños de tramo para el experimento "030910 Multicondición 2". Podemos ver en estas gráficas que, al igual que para los casos anteriores en los que tomábamos tramos de 10s, existen curvas de correlación muy similares que se agrupan en lo que denominamos familias de curvas.

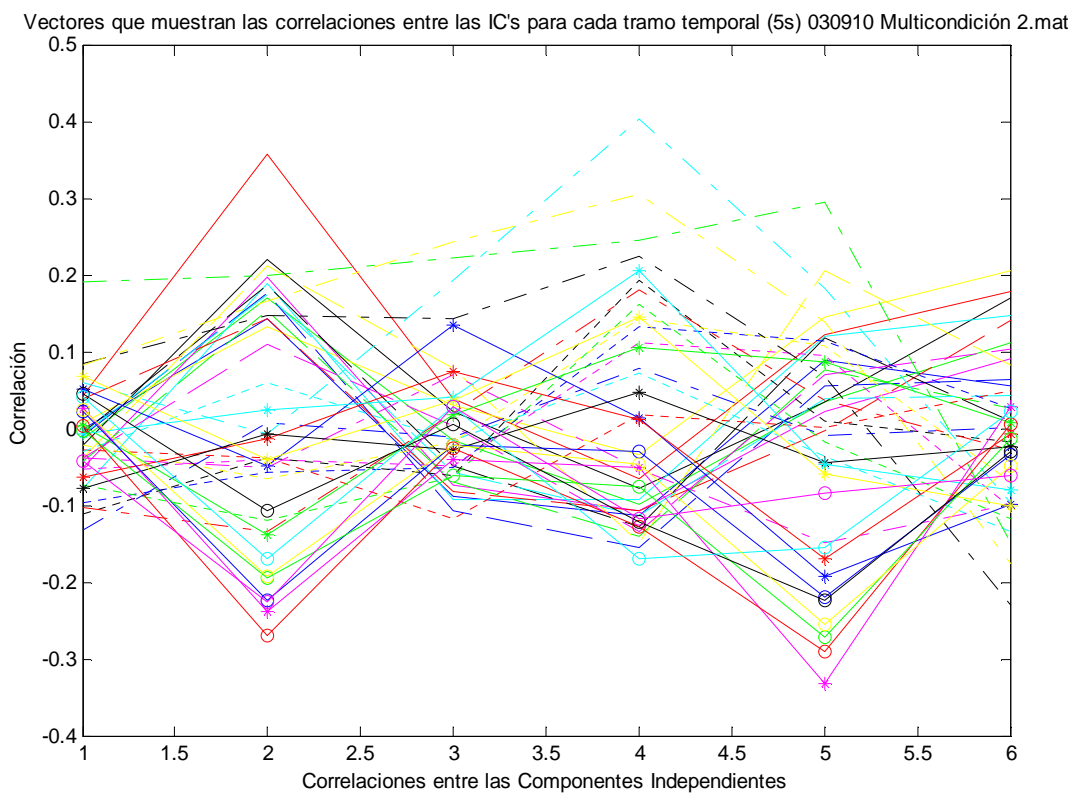


Figura 3.26. Vectores que muestran las correlaciones entre las Componentes Independientes para cada tramo temporal de 5s

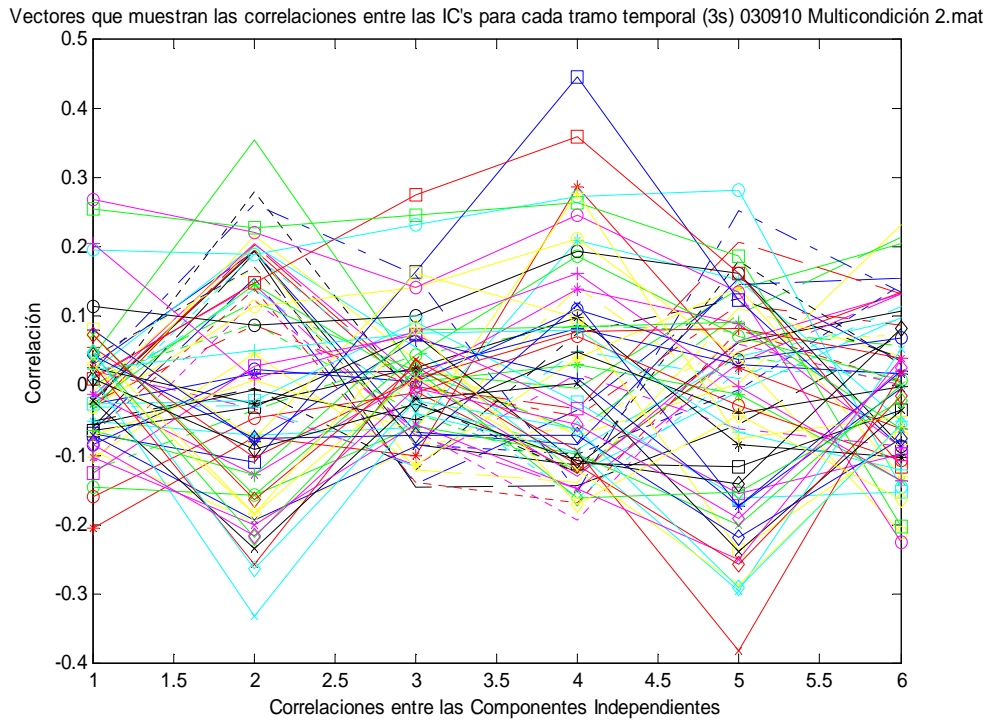


Figura 3.27. Vectores que muestran las correlaciones entre las Componentes Independientes para cada tramo temporal de 3s

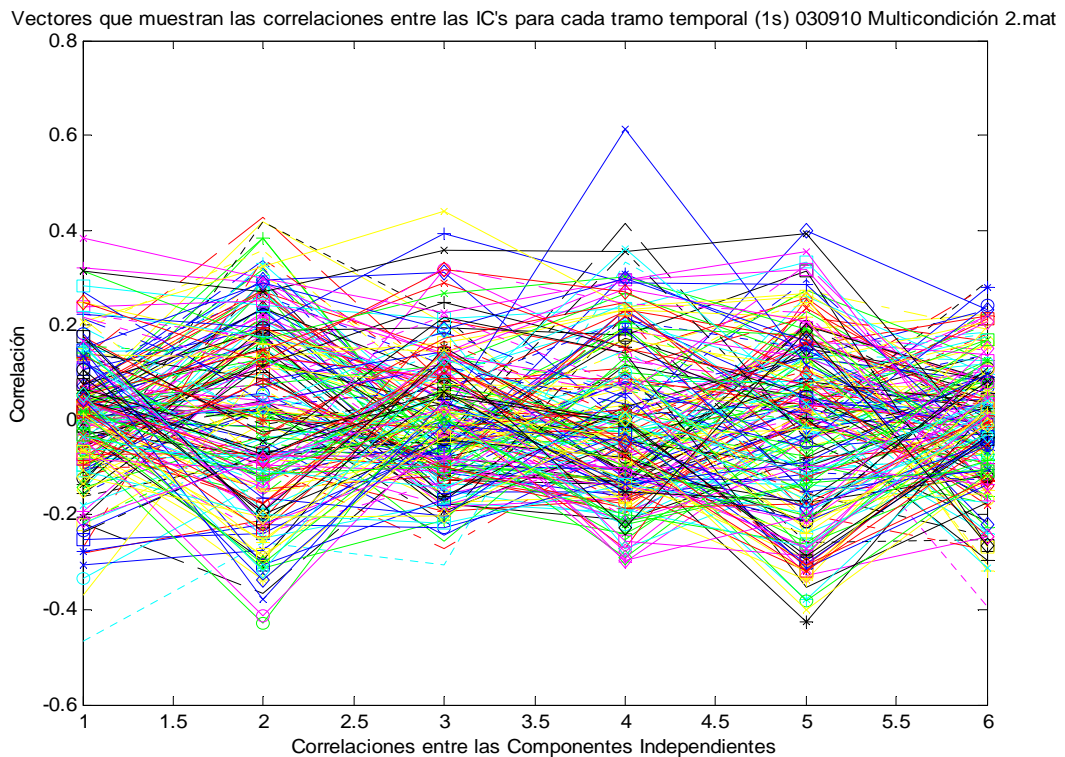


Figura 3.28. Vectores que muestran las correlaciones entre las Componentes Independientes para cada tramo temporal de 1s

Conforme disminuye el tamaño de los tramos temporales, aumenta el número de curvas de correlación, lo que hace aún más complicado la interpretación de las gráficas. Por ello, calculamos las matrices de correlación correspondientes a las curvas de correlación de las figuras 3.26, 3.27 y 3.28 como se muestra en las figuras 3.29, 3.30 y 3.31.

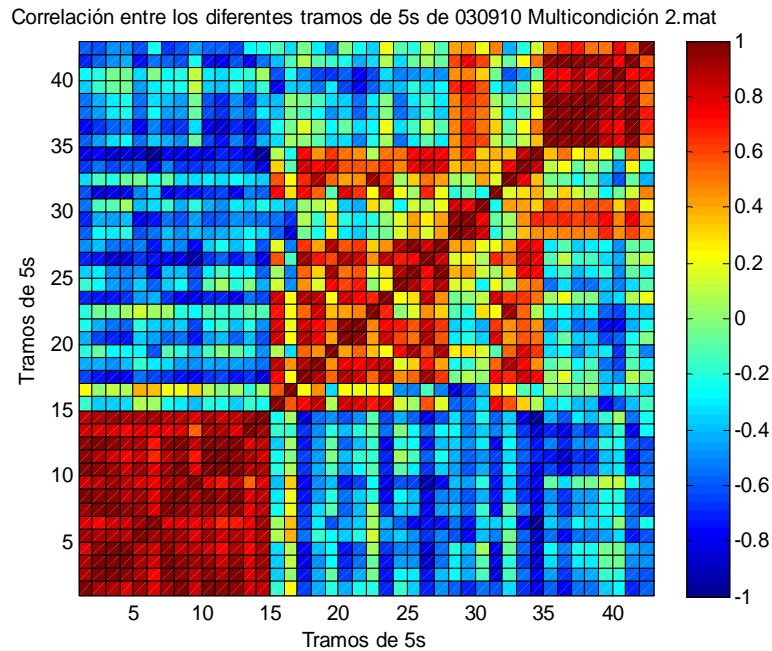


Figura 3.29. Matrices de correlación entre las curvas de correlación de los tramos de 5s de "030910 Multicondición 2.mat"

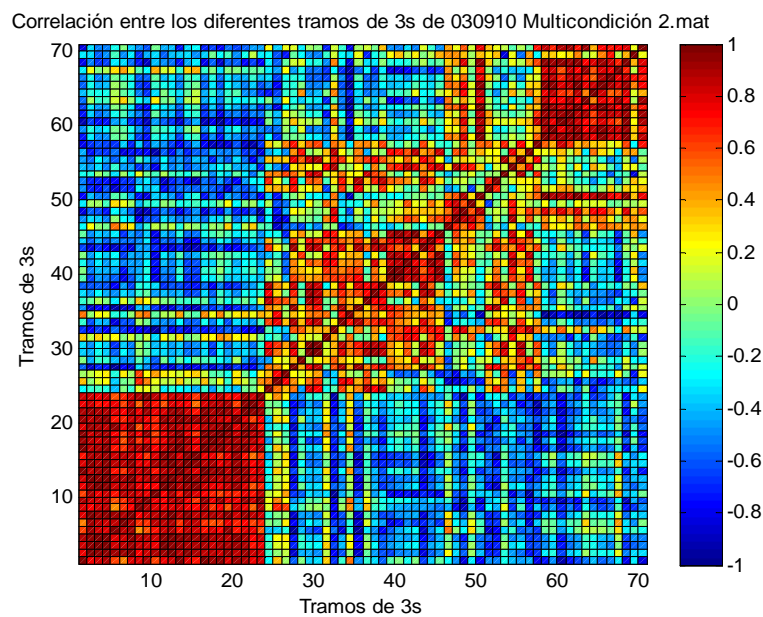


Figura 3.30. Matrices de correlación entre las curvas de correlación de los tramos de 3s de "030910 Multicondición 2.mat"

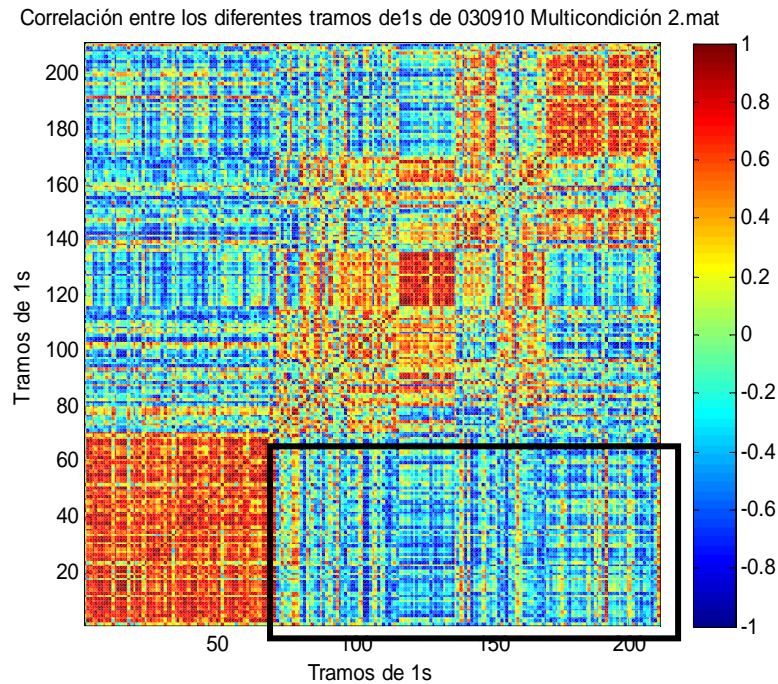


Figura 3.31. Matrices de correlación entre las curvas de correlación de los tramos de 1s de "030910 Multicondición 2.mat". En el recuadro se indica la franja que compara curvas de correlación de control con LTP y LTP+3h en la que observamos valores altos de correlación entre las diferentes etapas que se van repitiendo

A partir de la distribución de las etapas de control, LTP y LTP+3h y observando las figuras 3.29-3.31 observamos que los valores más altos de correlación se dan entre tramos pertenecientes a una misma etapa: control, LTP y LTP+3h. Esto se da con más intensidad en la etapa de control, en la que los valores de la correlación son muy cercanos a 1. Sucede lo mismo en la parte final de la etapa de LTP+3h [170-210s]. También observamos altos valores de correlación entre tramos pertenecientes a LTP y tramos pertenecientes a LTP+3. Lo más destacado es la presencia de valores altos de correlación que se repiten con cierta periodicidad entre los tramos pertenecientes a una etapa y algunos tramos pertenecientes a todo el tiempo de registro [véase el rectángulo destacado en la Figura 3.31]. Cabe recordar que los altos valores de correlación en estas matrices señalan el alto parecido entre las curvas de correlación obtenidas a partir de las componentes independientes. Por ello, el gran parecido entre curvas pertenecientes a diferentes etapas nos invita a pensar que las componentes independientes van cambiando;

pasando por estados muy breves (en la figura 3.31 son de 1s) que se van repitiendo a lo largo del tiempo. Estos patrones de correlación interregional que aparecen de forma repetida en los registros, se asocian con eventos electrofisiológicos identificables en la señal y son modulados por procesos de plasticidad sináptica. A estos estados, dada su breve duración, los hemos denominado '*ministates*'.

4. Conclusiones

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral era aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de transferencia de información entre las distintas regiones del hipocampo y de éstas con la corteza cerebral y por tanto, contribuir a un mejor entendimiento del aprendizaje y la memoria. Para ello se ha procedido al análisis de señales adquiridas mediante registros electrofisiológicos de alta densidad, correspondientes a distintas partes del hipocampo y el córtex parietal asociativo, adquiridas en distintos instantes de tiempo antes y después de la potenciación sináptica del tracto perforante. Para ello, y a lo largo del mismo:

- Se han estudiado las operaciones necesarias para el correcto trabajo con las señales de LFP provenientes de registros electrofisiológicos adquiridos en el hipocampo de ratas y se han programado todas ellas bajo entorno MATLAB, proporcionando una biblioteca de funciones que establece la semilla de una futura herramienta de cuantificación global.
- Se ha desarrollado un protocolo de trabajo para, una vez obtenidos los registros, seguir para cada experimento los mismos pasos hasta obtener los resultados convenientes, estableciendo así un protocolo automático de análisis de este tipo de señales.
- Se ha analizado la correlación y la coherencia entre las señales de potencial de campo tomadas en diferentes partes del hipocampo y la corteza parietal asociativa y el cambio que sufren tras inducir LTP en el giro dentado, todo esto en tres experimentos para dos electrodos situados en distintas partes del cerebro de la rata.

- Como se pretendía, se ha trabajado con las componentes independientes de estos registros electrofisiológicos estudiando su comportamiento a lo largo del tiempo de registro y se ha realizado una comparativa entre los resultados de correlación y coherencia obtenidos con las componentes independientes y los obtenidos con los canales de LFP que mejor representan cada una de estas componentes independientes, evaluando la significación estadística de estos resultados.

- Se ha examinado el efecto de la potenciación sináptica sobre la coherencia entre las componentes independientes, observando los cambios que se producen en el momento de la LTP, pasadas dos horas y pasadas tres horas tras la potenciación, y hemos señalado algunos patrones que se dan entre algunos de los generadores.

- Se han desarrollado funciones para el correcto manejo de las componentes independientes, centradas principalmente en el cálculo de la correlación entre dichas componentes, en la obtención de las denominadas curvas de correlación para los diferentes tramos temporales y en la correlación entre dichas curvas para encontrar similitudes entre ellas a lo largo del tiempo de registro, pasando por las diferentes etapas del aprendizaje y utilizando distintos tamaños temporales.

- Se ha analizado la correlación entre las componentes independientes de las señales de potencial de campo tomadas en diferentes partes del hipocampo y la corteza parietal asociativa y el cambio que sufren tras inducir LTP en el giro dentado, todo esto en cinco experimentos.

Conclusiones biológicas

Tras los análisis realizados, se ha comprobado la dependencia espacial y temporal de la dispersión de los valores en las medidas de correlación y coherencia, se ha analizado la estructura funcional en reposo de los circuitos de la formación hipocampal obteniendo evidencias a favor de la existencia de dos vías de procesamiento paralelo e independiente en el sistema. Hemos mostrado además las ventajas de emplear el análisis de componentes independientes para estudiar la sincronía entre los generadores de LFP en el hipocampo eliminando fuentes de confusión generadas por la propagación extracelular de los campos eléctricos. Empleando esta metodología se ha estudiado la influencia de la plasticidad sináptica sobre la comunicación bilateral del hipocampo en base a los valores globales de correlación y coherencia entre los generadores homotópicos del LFP. Se han encontrado cambios modestos, aunque interesantes, en la coherencia gamma en la vía asociativa que se muestran significativos a 3 horas tras la inducción de LTP y que requerirán más trabajo experimental para elucidar su relevancia.

Se ha profundizado en el análisis de la conectividad funcional en el hipocampo aumentando la resolución espacial de nuestros análisis. A partir de los resultados obtenidos al calcular la correlación entre las componentes independientes en ventanas de tiempo decrecientes, se observa la existencia de estados cerebrales de muy corta duración ($\approx 1s$) que se definen como configuraciones distintivas de conectividad funcional interregional, es decir, modos estereotípicos de transferencia de información entre áreas cerebrales, en este caso, implicadas en el aprendizaje. Pensamos que dichos patrones de comunicación, a los que hemos denominado 'ministates' se suceden en el tiempo en secuencias controladas por procesos de plasticidad sináptica que determinan el peso sináptico (en términos de transferencia de carga) de las conexiones individuales entre los módulos cerebrales. Nuestro estudio demuestra, en buena sintonía con resultados previos [6], que, además, la plasticidad sináptica local (en un módulo) reorganiza la

estructura global de conexiones funcionales en el *network*, modificando la frecuencia de aparición de los distintos 'ministates'.

Por tanto, a partir de la distribución de las correlaciones entre las distintas componentes independientes en un tramo temporal podemos definir el estado en el que se encuentra nuestro registro y muy probablemente, establecer su correlación con las fases del aprendizaje. Estudiando las gráficas obtenidas hemos observado que estos estados ('ministates') se repiten a lo largo de todo el tiempo, apareciendo en las distintas fases estudiadas de nuestro modelo experimental de aprendizaje. Esta observación preliminar sugiere que los procesos de plasticidad sináptica no crearían nuevos modos de funcionamiento de la red, sino que modificarían su distribución de probabilidad.

Aún nos encontramos lejos de poder describir cómo el aprendizaje modifica el 'estado interno' del cerebro. Entre las dificultades encontradas cabe destacar la enorme variabilidad en las señales electrofisiológicas registradas en los distintos estados por los que, de forma espontánea, transcurre la actividad cerebral. De esta forma la huella del aprendizaje o la memoria se encuentra enmascarada por grandes fluctuaciones de actividad. Sin embargo, gracias a las herramientas desarrolladas hasta el momento ya hemos podido aportar datos nuevos sobre cómo tiene lugar la comunicación en la formación hipocampal, constatar que la plasticidad sináptica modula dicha comunicación.

5. Líneas futuras

Tras el desarrollo de esta Tesis Doctoral son varias las preguntas que hemos respondido y aún son más numerosas las preguntas que nos han surgido a partir de los diferentes experimentos. Todas esas preguntas se convierten en las futuras líneas de evolución por las que pretendemos continuar esta investigación:

- La gran variabilidad espontánea de la actividad electrofisiológica durante los experimentos nos obliga a desarrollar métodos de clasificación de los registros electroencefalográficos (EEG).
- Una vez clasificados los registros electroencefalográficos, será de interés comparar fragmentos equiparables de EEG antes y después de LTP e identificar la huella dejada por la potenciación sináptica.
- Estudiaremos con mayor profundidad la regionalización observada en la dispersión de las medidas de correlación y coherencia con el objetivo de obtener información acerca de la estructura funcional del sistema que podría estar tras esta dependencia espacial de la dispersión.
- Los resultados señalan la existencia de 'ministates' en la actividad cerebral que se relacionan con las distintas fases del modelo de aprendizaje y memoria empleado, pero ¿cuántos 'ministates' diferentes podemos identificar y cómo se relacionan con la función cerebral? Un objetivo inmediato será desarrollar un clasificador de curvas que encuentre automáticamente las curvas de correlación más parecidas y que las agrupe en familias, para así poder estudiar en profundidad el comportamiento de estos 'ministates'.

Referencias

- [1] Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 Years of Consolidation - Remembering Müller and Pilzecker. *Learning & memory* 1999; 6:77-87.
- [2] Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science* 1991; 253(5026):1380-1386.
- [3] Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 2004; 27:279-306.
- [4] Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 1973; 232:331-356.
- [5] Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The hippocampus book*. Oxford University Press. 1st ed. 2007.
- [6] Canals S, Beyerlein M, Merkle H, Logothetis N. Functional MRI Evidence for LTP-Induced Neural Network Reorganization. *Current Biology* 2009; 19:398-403.
- [7] Leung LS. Field Potentials in the Central Nervous System. *Neurophysiological Techniques*. *Neuromethods* 1991; 15:277-312.
- [8] Makarov VA, Makarova J, Herreras O. Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *Journal of Computational Neuroscience* 2010; 29:445-457.
- [9] Ramos M, Rovira C, Umfuhrer L, Urbina E. Sistema nervioso autónomo. *Revista de Postgrado de la Cátedra VIa Medicina N° 101*; 2001 Feb. p. 1-7.

[10] Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E. Atlas de anatomía humana: Estudio fotográfico del cuerpo humano. Elsevier 2007.

[11] Atlanta Brain and Spine Care. Disponible en: <http://www.atlantabrainandspine.com/subject.php?pn=brain-anatomy-066>.

Fecha último acceso: 25 de julio de 2012.

[12] The Roots Project – general information, methods and phases. University of Cambridge. Disponible en: <http://www.roots.group.cam.ac.uk/brain.html>

Fecha último acceso: 25 de julio de 2012.

[13] Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The medial temporal lobe. Annual Review of Neuroscience 2004; 27:279-306.

[14] Blog de medicina y farmacología. Disponible en:

<http://medicinafarmacologia.blogspot.com.es/2010/03/cisura-de-silvio.html>

<http://medicinafarmacologia.blogspot.com.es/2010/04/lobulo-temporal.html>

Fecha último acceso: 26 de julio de 2012.

[15] Blog “Aureus: Curiosidades y novedades de la ciencia”- El hipocampo y la neurogénesis: Archivando memoria. Disponible en:

<http://listadeaureus.blogspot.com/2009/11/el-hipocampo-y-la>

[neurogenesis.html](http://listadeaureus.blogspot.com/2009/11/el-hipocampo-y-la-neurogenesis.html) Fecha último acceso: 5 de septiembre de 2011

[16] Hesselink J.R. The temporal lobe & limbic system. NeuroWeb de la Universidad de California, San Diego. Disponible en:

<http://spinwarp.ucsd.edu/NeuroWeb/Text/br-800epi.htm>

Fecha último acceso: 26 de julio de 2012

[17] Micheau A, Hoa D. Atlas de Neuroanatomía. Disponible en:

<http://www.imaios.com/es/e-Anatomy/Cabeza-y-cuello/Cerebro-diagramas>

- [18] Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents - EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews Neuroscience* 2012; 13:407-420.
- [19] David SV, Malaval N, Shamma SA. Decoupling Action Potential Bias from Cortical Local Field Potentials. *Computational Intelligence and Neuroscience* 2010; 2010(7). 12 p.
- [20] Kruse W, Eckhorn R. Inhibition of sustained gamma oscillations (35-80 Hz) by fast transient responses in cat visual cortex. *PNAS* 1996; 93(12):6112-6117.
- [21] Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. Modulation of Oscillatory Neuronal Synchronization by Selective Visual Attention. *Science* 2001; 291(5508):1560-1563.
- [22] Siegel M, König P. A Functional Gamma-Band Defined by Stimulus-Dependent Synchronization in Area 18 of Awake Behaving Cats. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(10):4251-4260.
- [23] Scherberger H, Jarvis MR, Andersen RA. Cortical Local Field Potential Encodes Movement Intentions in the Posterior Parietal Cortex. *Neuron* 2005; 46(2):347-354.
- [24] Rickert J, Cardoso de Oliveira S, Vaadia E, Aertsen A, Rotter S, Mehring C. Encoding of Movement Direction in Different Frequency Ranges of Motor Cortical Local Field Potentials. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25(39):8815- 8824.
- [25] Liu J, Newsome WT. Local Field Potential in Cortical Area MT: Stimulus Tuning and Behavioral Correlations. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(30):7779 -7790.

- [26] Csicsvari J, Henze DA, Jamieson B, Harris KD, Sirota A, Barthó P, Wise KD, Buzsáki G. Massively Parallel Recording of Unit and Local Field Potentials With Silicon-Based Electrodes. *Journal of Neurophysiology* 2003; 90(2):1314-1323.
- [27] Stein T, Moritz C, Quigley M, Cordes D, Haughton V, Meyerand. Functional Connectivity in the Thalamus and Hippocampus Studied with Functional MR Imaging. *American Journal of Neuroradiology* 2000; 21(8):1397-1401.
- [28] Grady CL, McIntosh AR, Craik FIM. Age-Related Differences in the Functional Connectivity of the Hippocampus During Memory Encoding. *Hippocampus* 2003; 13:572-586.
- [29] Shibasaki H. Human brain mapping: Hemodynamic response and electrophysiology. Invited review *Clinical Neurophysiology* 2008; 119:731-743
- [30] Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med*. 1995; 34(4):537-541.
- [31] Allen G, Barnard H, McColl R, Hester AL, Fields JA, Weiner MF, Ringe WK, Lipton AM, Brooker M, McDonald E, Rubin CD, Cullum CM. Reduced Hippocampal Functional Connectivity in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* 2007; 64(10):1482-1487.
- [32] Bettus G, Wendling F, Guye M, Valton L, Régis J, Chauvel P, Bartolomei F. Enhanced EEG functional connectivity in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 2008; 81:58-68.

- [33] Cordes D, Haughton VM, Arfanakis K, Carew JD, Turski PA, Moritz CH, Quigley MA, Meyerand ME. Frequencies contributing to functional connectivity in the cerebral cortex in “resting-state” data. *American Journal of Neuroradiology* 2001; 22:1326-1333.
- [34] Greicius MD, Supekar K, Menon V, Dougherty RF. Resting-State Functional Connectivity Reflects Structural Connectivity in the Default Mode Network. *Cerebral Cortex* 2009; 19:72-78.
- [35] Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *PNAS* 2003; 100(4):2065-2069.
- [36] Ranganath C, Heller A, Cohen MX, Brozinsky CJ, Rissman J. *Hippocampus* 2005; 15:997-1005.
- [37] Nerad L, Bilkey DK Ten- to 12-Hz EEG Oscillation in the Rat Hippocampus and Rhinal Cortex That is Modulated by Environmental Familiarity. *Journal of Neurophysiology* 2005; 98(3):1246-1254.
- [38] Kirov R, Weiss C, Siebner HR, Born J, Marshall L. Slow oscillation electrical brain stimulation during waking promotes EEG theta activity and memory encoding. *PNAS* 2009; 106(36):15460-15465.
- [39] Klimesch W, Doppelmayr M, Yonelinas A, Kroll NEA., Lazzara M, Röhlm D, Gruber W. Theta synchronization during episodic retrieval: neural correlates of conscious awareness. *Cognitive Brain Research* 2001; 12(1):33-38.
- [40] Fuentemilla L, Penny WD, Cashdollar N, Bunzeck N, Düzel E. Theta-Coupled Periodic Replay in Working Memory. *Current Biology* 2010; 20(7), 606-612.

- [41] Belluscio MA, Mizudeki K, Schmidt R, Kempter R, Buzsáki G. Cross-frequency phase-phase coupling between theta and gamma oscillations in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 2012; 32(2):423-435.
- [42] Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33(3):325-340.
- [43] Tesche CD, Karhu J. Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. *PNAS* 2000; 97(2):919-924.
- [44] Buzsáki G, Wang XJ. Mechanisms of gamma oscillations. *Annual Review of Neuroscience* 2012; 35:203-225.
- [45] Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. Gamma (40-100 Hz) Oscillation in the Hippocampus of the Behaving Rat. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15(1): 47-60.
- [46] Montgomery SM, Sirota A, Buzsáki G. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(26):6731-6741.
- [47] Oja E. Finding Hidden Factors Using Independent Component Analysis. *Proceedings of the 6th European Conference on Principles of Data Mining and Knowledge Discovery* 2002; Page 488.
- [48] Stone JV. Independent component analysis: an introduction. *TRENDS in Cognitive Sciences* 2002; 6(2):59-64.
- [49] Bell AJ, Sejnowski TJ. An information-maximisation approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Computation* 1995; 7(6):1129-1159.

[50] Makeig S, Bell AJ, Jung T, Sejnowski TJ. Independent Component Analysis of Electroencephalographic Data. 1st ed. D. Touretzky, M. Mozer and M. Hasselmo, editors. Advances in Neural Information Processing Systems 8. MIT Press, Cambridge MA 1996. p. 145-151.

[51] Yun K, Lebedev M, Nicolelis MAL. Prediction of motor timing using nonlinear analysis of local field potentials. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006. IFMBE Proceedings. Springer Berlin Heidelberg 2007; 14:1005-1008.

[52] Reber PJ, Squire LR. Parallel brain systems for learning with and without awareness. Learning & memory 1994; 1:217-229.

[53] White NM, McDonald RJ. Theoretical Review: Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiology of Learning and Memory 2002; 77:125-184.

[54] Łęski S, Kublik E, Świejkowski DA, Wróbel A, Wójcik DK. Extraction of functional components from multichannel LFP data. Front. Neur. Conference: Neuroinformatics 2009, Pilsen, Czech Republic, 6 Sep - 8 Sep, 2009.

[55] Del Canto Serrano I. Directores: David Moratal Pérez, Raúl López Grueso. Proyecto Fin de Carrera "PETra: Herramienta de análisis semiautomático de imágenes moleculares de cerebro de rata adquiridas mediante Tomografía por Emisión de Positrones". Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación, Universitat Politècnica de València, 2010.

[56] Barnett SA. The story of rats: their impact on us and our impact on them. Griffin Press; 2001.

[57] Harlan Laboratories - Sprague Dawley Rat. Disponible en: <http://www.harlan.com/> Fecha último acceso: 1 de septiembre de 2010.

[58] Koblin D. Urethane: Help or Hindrance? *Anesthesia & Analgesia* 2002; 94(2):241-242.

[59] Gabaldón López MV. Directores: David Moratal Pérez, Santiago Canals Gamoneda. Trabajo de Investigación "Estructura dinámica de las interacciones funcionales en el hipocampo: en busca de la huella neurofisiológica de la memoria". Programa de Doctorado en Tecnologías para la Salud y el Bienestar, Universitat Politècnica de València, 2011.

[60] Manual y catálogo de productos para investigación - Microelectrodos de Silicona 2006 - 2008 NeuroNexus Technologies, Inc. Rev. 2ª, 2008.

[61] Geisinger D. Electrodo implantable en el cerebro en aplicaciones de prótesis neurales. XIV Seminario de Ingeniería biomédica 2005. Disponible en: <http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario2005/monografias2005/Geisinger.pdf>

[62] Sterratt D, Auzinger W, Fabianek C, Holy P, Pawlik S. An Introduction to MATLAB for Neuroscience Research. University of Edinburgh 2006.

[63] Korzeniewska A, Mańczak M, Kamiński M, Blinowska KJ, Kasicki S. Determination of information flow direction among brain structures by a modified directed transfer function (dDTF) method. *Journal of Neuroscience Methods* 2003; 125(1-2):195-207.

[64] Ramón y Cajal S. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Imprenta y Librería de Nicolás Moya 1899.

- [65] Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 2008; 321(5885):53-57.
- [66] Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31:571-591.
- [67] Kim Y, Spruston N. Target-specific output patterns are predicted by the distribution of regular-spiking and bursting pyramidal neurons in the subiculum. *Hippocampus* 2012; 22:693-706.
- [68] Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *Journal of Neuroscience* 1989; 9:216-228.
- [69] Sabolek HR, Penley SC, Hinman JR, Bunce JG, Markus EJ, Escabi M, Chrobak JJ. Theta and gamma coherence along the septotemporal axis of the hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 2009; 101(3):1192-1200.
- [70] Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 2004; 304(5679).
- [71] Labarga, A. Análisis de componentes independientes en el estudio de potenciales auditivos P300. *Bioingeniería y Física Médica Cubana* 2002; 3(1): 34-37.
- [72] Gleich D. Principal Component Analysis and Independent Component Analysis with Neuronal Networks. Final Project. Department of Computer Science. Purdue University 2003.
- [73] Leung LW. Model of gradual phase shift of theta rhythm in the rat. *Journal of Neurophysiology* 1984; 52(6):1051-1065.

[74] Brankack J, Stewart M, Fox SE. Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Research* 1993; 615(2):310-327.

[75] Buzsáki G, Czopf J, Kondákor I, Kellényi L. Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Research* 1986; 365(1):125-137.

[76] Bédard C, Kröger H, Destexhe A. Modeling Extracellular Field Potentials and the Frequency-Filtering Properties of Extracellular Space. *Biophysical Journal* 2004; 86:1829-1842.

[77] Greicius MD, Flores BH, Menon V, Glover GH, Solvason HB, Kenna H, Reiss AL, Schatzberg AF. Resting-State Functional Connectivity in Major Depression: Abnormally Increased Contributions from Subgenual Cingulate Cortex and Thalamus. *Biological Psychiatry* 2007; 62:429-437.

Publicaciones

Moreno A, **Gabaldón MV**, De la Cruz F, Álvarez E, Moratal D, Makarov V, Canals S
Interhemispheric functional connectivity of the hippocampal formation: electrophysiology
and fMRI. 8th FENS Forum of Neuroscience. July 14-18, 2012. Barcelona, Spain.