

**Actividad sincrónica cortical:
características; propagación intra e
interhemisférica y su modulación por
serotonina.**

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Víctor Rovira Zambrana

2014

AGRADECIMIENTOS:

A mi Director de tesis, el Dr. Emilio Geijo Barrientos, por iniciarme en el mundo de la ciencia con paciencia y rigor. Gracias por hacer de guía hacia mis sueños durante estos años.

Por supuesto, a mi familia. A mis padres por animarme y apoyarme, no solo ahora, si no siempre. Os debo no solo esta tesis, sino todo lo que soy. Gracias. A mis hermanos, que han estado siempre a mi lado en lo bueno y en lo malo, y han sido amigos además de familia.

A mis amigos. Disculpad la desaparición y gracias por ser tan pacientes y comprensivos.

A la Dra. Laura Almaraz, por estar siempre cerca con un consejo adecuado o una palabra de ánimo.

A los compañeros que ya se fueron. José y Lourdes, porque mis primeros pasos en esta aventura los di en gran parte gracias a vosotros.

A los compañeros que se quedan. Eduardo y Alejandro, ha sido un placer poder enseñaros lo poco que se, y poder haber aprendido algo de todo lo que habéis intentado enseñarme. Y sobre todo gracias por hacer los largos días de trabajo tan agradables de pasar en el laboratorio.

A los compañeros de otros laboratorios. A toda esa gente, investigadores y doctorandos, que me ha prestado ayuda desinteresadamente, o ha hecho de mi estancia en el INA una experiencia enriquecedora no solo en lo profesional, sino también en lo personal. Gracias por ser amables, críticos, por tener una broma preparada por las mañanas o por compartir unos minutos de conversación de vez en cuando.

A los encargados de los animalarios. Aunque algunos me habéis tenido que aguantar más que otros creo que en algún momento todos habéis tenido que sufrirme. Gracias por la gran ayuda que habéis sido estos años, y disculpad la infinidad de molestias que seguro que os he causado y nunca me habéis recriminado.

A todos los que se me olvidan, disculpad, y gracias a vosotros también.

ÍNDICE DE CONTENIDO

OBJETIVOS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1.- LA CORTEZA CEREBRAL.....	4
1.1.- Estructura de la corteza cerebral.....	5
1.2.- Tipos celulares en la corteza cerebral.....	8
1.3.- Desarrollo de la corteza cerebral.....	12
1.4.- La corteza cerebral del ratón.....	13
2.- CONECTIVIDAD DE LA CORTEZA CEREBRAL.....	14
2.1.- Microcircuitos corticales locales.....	14
2.2.- Conexiones intracorticales.....	16
2.3.- Conexiones intercorticales: El cuerpo calloso.....	17
3.- ACTIVIDAD ELÉCTRICA CORTICAL SINCRONIZADA.....	21
3.1.- Actividad oscilatoria.....	22
3.2.- Actividad cortical de ondas lentas.....	27
3.3.- Actividad oscilatoria de 7-14 Hz asociada a las oscilaciones lentas.....	28
3.4.- Propagación intrahemisférica de la actividad oscilatoria cortical de ondas lentas.....	29
3.4.- Propagación interhemisférica de la actividad oscilatoria cortical de ondas lentas.....	30
4.- MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CORTICAL POR SEROTONINA.....	31
MÉTODOS.....	35
1.- MODELO ANIMAL.....	35
2.- EXTRACCIÓN DEL CEREBRO Y PREPARACIÓN DE RODAJAS PARA REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS “IN VITRO”.....	36
2.1.- Cámara de registro y sistema de perfusión.....	39
2.2.- Soluciones extracelulares.....	41
2.3.- Registros extracelulares simultáneos.....	42
2.4. Registro intracelular y extracelular simultáneo.....	47
3.-OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	50
4.-AGENTES FARMACOLÓGICOS.....	52
5.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA CONECTIVIDAD INTERHEMISFÉRICA.....	53

RESULTADOS.....	55
1.- RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS REGISTRADAS EN LA REGIÓN SUPERFICIAL DE LAS CAPA II/III DE LA CORTEZA CINGULAR.....	55
1.1.- Descargas sincrónicas de aparición espontáneas.....	59
1.2.- Postdescargas oscilatorias.....	63
1.3.- Efecto del bloqueo de los receptores de GABA _B	65
1.4.- Respuestas electrofisiológicas intracelulares en la región superficial de la capa II/III de la corteza.....	68
2.- PROPAGACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS.....	71
3.- SINCRONIZACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS POSTDESCARGAS OSCILATORIAS.....	79
4.- MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS.....	84
4.1.- Receptores serotoninérgicos implicados en la modulación de las descargas sincrónicas evocadas.....	90
4.2.- Ratones SERT knockout.....	96
DISCUSIÓN.....	101
1.- CARACTERÍSTICAS DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS.....	103
2.- PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS.....	106
3.- SINCRONIZACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS POSTDESCARGAS OSCILATORIAS.....	109
4.- MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS.....	111
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	117

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es el estudio de la propagación de la actividad eléctrica por la capa II/III de la corteza cingular del ratón tras el bloqueo de los receptores inhibidores GABA_A, y el papel del cuerpo calloso en la propagación entre hemisferios de esta actividad.

El propósito general del trabajo se puede dividir en los siguientes **objetivos específicos**:

1.- Estudio y caracterización de la actividad eléctrica sincrónica generada en la corteza cingular del ratón, tanto evocada por estimulación eléctrica como de aparición espontánea, tras la desinhibición de rodajas coronales con bicuculina.

2.- Estudio de la propagación de la actividad eléctrica sincrónica evocada, tanto intrahemisférica como interhemisférica, en nuestro modelo de rodajas coronales de ratón desinhibidas con bicuculina.

3.- Estudio de las postdescargas oscilatorias asociadas a la actividad eléctrica sincrónica.

4.- Estudio de la modulación por serotonina de la propagación, tanto intrahemisférica como interhemisférica, de la actividad eléctrica evocada por la estimulación eléctrica. Estudio de la implicación en esta modulación de varios receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}).



INTRODUCCIÓN

El cerebro humano es una compleja red de millones de neuronas individuales interconectadas en sistemas que elaboran nuestras percepciones del mundo exterior y controlan nuestras acciones. Diferentes regiones del cerebro están especializadas en diferentes funciones, que realizan gracias a las neuronas y a las conexiones que estas forman entre ellas. Estas áreas diferenciadas funcionalmente trabajan en paralelo para formar una imagen continua y coherente del mundo exterior. Así por ejemplo existen regiones especializadas en la comprensión y la producción del lenguaje (áreas de Wernicke y Broca, respectivamente), cuyas lesiones producen efectos muy específicos y determinados dependiendo del área lesionada, como la imposibilidad de articular correctamente el habla mientras se mantiene una capacidad normal para comprenderla (afasia de Broca).

Las operaciones responsables de las capacidades cognitivas del ser humano ocurren fundamentalmente en la corteza cerebral, que cubre cada uno de los hemisferios cerebrales. Cada hemisferio se encarga principalmente de los procesos sensoriales y motores del lado contralateral (opuesto) del cuerpo. Además los hemisferios no son funcional ni estructuralmente simétricos ya que algunas regiones especializadas se encuentran tan solo en uno de los hemisferios, como es el caso de las áreas de Broca y Wernicke comentadas anteriormente.

1.- LA CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral es una estructura especialmente desarrollada en mamíferos, sobre todo en primates, y que alcanza el máximo nivel de desarrollo filogenético en el ser humano. Es una de las estructuras funcionalmente más complejas del sistema nervioso central (SNC) y cubre la superficie de los hemisferios del cerebro. La corteza cerebral en los primates tiene una forma muy plegada, formando una serie de surcos y circunvoluciones que la dividen en diferentes lóbulos. Estos lóbulos cerebrales se denominan en base a los huesos craneales que los cubren, lóbulo frontal, lóbulos temporales, lóbulos parietales y el lóbulo occipital.

La corteza cerebral, al igual que el resto del sistema nervioso, está formada principalmente por neuronas, unas células especializadas en la recepción y transmisión de señales capaces de transportar información. Existen otros tipos de células en el cerebro, llamadas células gliales o glía, pero las neuronas son las encargadas de formar los circuitos a través de los cuales se transmiten las señales y se procesa la información.



Figura 1.1. La corteza cerebral.

Dibujo de la corteza cerebral con los lóbulos cerebrales clasificados en base a los huesos craneales que las cubren. Lóbulo frontal (Naranja), parietal (azul), occipital (verde) y temporal (rosa). Se muestra también el cerebelo (rojo).

1.1.- Estructura de la corteza cerebral.

Evolutiva, estructural y funcionalmente, se han distinguido clásicamente en la corteza cerebral varias regiones. Así, se habla de regiones corticales filogenéticamente antiguas clasificadas como paleocórtex, regiones intermedias o arquicórtex, y regiones más modernas o neocortex. El isocórtex o neocórtex corresponde a aquella parte de la corteza en la que puede reconocerse estratificación de las neuronas que la forman en seis capas, mientras que las otras regiones corticales como el archicórtex (hipocampo y fascia dentata) y el paleocórtex (corteza olfativa) exhiben una estructura laminar más simple compuesta por tres capas. Actualmente, datos más modernos, apuntan a la presencia de todas las regiones corticales a lo largo de la filogenia de vertebrados (Rakic y Zacevic, 2003; Puelles y Rubenstein, 2003). En la región neocortical, la corteza madura está organizada radialmente en seis capas distintas en cuanto a la morfología, densidad y propiedades fisiológicas de las neuronas que forman cada una de ellas. Las células de cada capa proyectan y reciben impulsos desde diferentes lugares y están interconectadas funcionalmente por una compleja red de fibras especializadas en la transmisión y recepción de información.

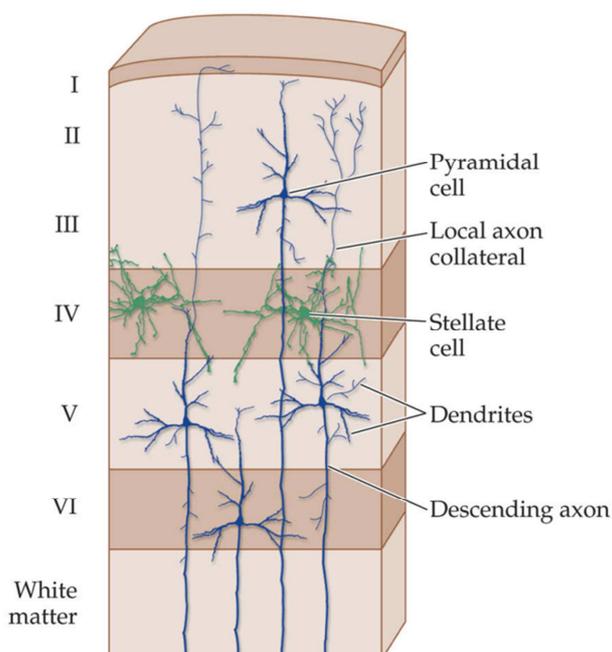


Figura I.2. Estructura cortical en capas.

Estructura en seis capas diferenciadas de la corteza cerebral. Se pueden ver ejemplos de neuronas piramidales (en azul) e interneuronas (en verde).

Tomado de NEUROSCIENCE: Third edition, Purves (2004).

Cada capa de la neocorteza tiene su propia estructura, dada por variedades celulares específicas y por sus conexiones, pero ha de señalarse que estas capas no operan de forma aislada: los elementos que las caracterizan están íntimamente relacionados con los componentes de las otras capas corticales. Ésta es la filosofía sobre la que se han desarrollado modernos conceptos de operación modular de la corteza, la cual es contemplada como una organización de grupos celulares verticalmente ensamblados entorno a un eje central representado por fibras aferentes corticales. Esta organización vertical de las neuronas recibe el nombre de columna cortical, y se considera el circuito básico a partir del cual se organiza el resto de redes corticales. Estas columnas suelen recibir el mismo tipo de información, y proporcionan una estructura anatómica que conserva las propiedades de localización y modalidad de información (Mountcastle, 1997).

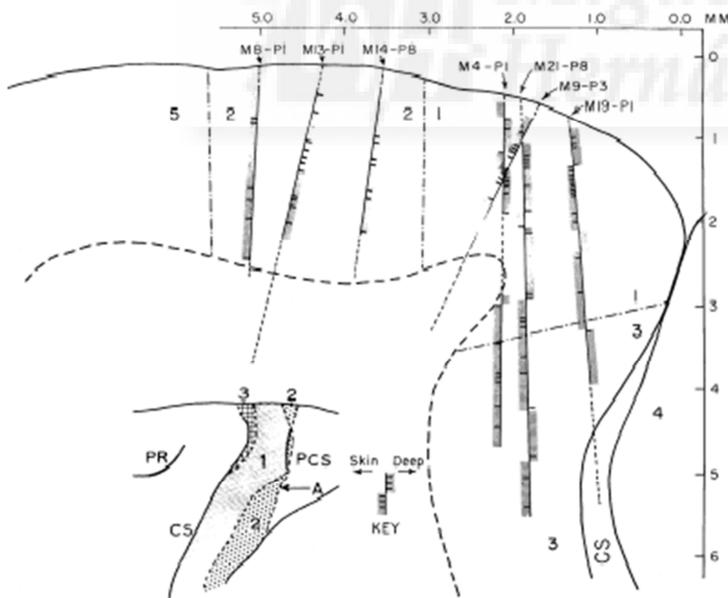
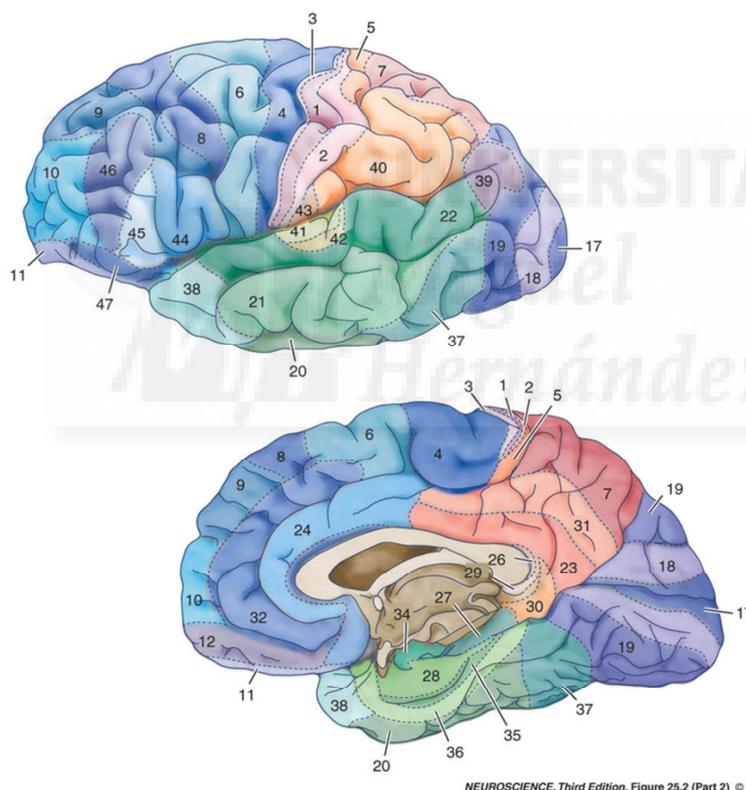


Figura 1.3. Columnas corticales.

Dibujo del experimento de Powel y Mountcastle (1959) donde se muestra la dirección entrada en la corteza visual del gato de varios electrodos de registro electrofisiológico. Los electrodos introducidos perpendicularmente en la corteza registraron respuestas en la misma modalidad a lo largo de toda la columna registrada. Modificado de Mountcastle (1997).

Estas diferencias en cuanto a tipos celulares y a su distribución a lo largo del área cortical, generó en el hombre un mapa de subregiones refinadas con características estructurales diferentes que se conocen como áreas de Brodmann. La corteza está también dividida en distintas áreas con especialización funcional como el procesamiento sensorial, el control motor y las asociaciones entre estos procesos (Johnson-Frey, 2003; Satow y cols, 2003) que presentan características histológicas y moleculares distintivas (Caviness 1975; Valverde 2002). En líneas generales, las áreas funcionales corticales concuerdan con los dominios estructurales diferenciados en las áreas de Brodmann.



NEUROSCIENCE, Third Edition, Figure 25.2 (Part 2) © 2004 Sinauer Associates, Inc.

Figura I.4. Áreas de Brodmann en el cerebro humano.

Se muestra un dibujo de las áreas superficiales (panel superior) y un corte sagital del cerebro con las áreas de mediales (panel inferior). Se muestran resaltadas y con la numeración correspondiente las áreas cerebrales según la clasificación de Brodmann.

Tomado de *NEUROSCIENCE: Third edition, Purves (2004)*.

1.2.- Tipos celulares en la corteza cerebral.

La corteza cerebral de los mamíferos tiene una gran cantidad de tipos celulares, que se pueden dividir en dos categorías principales. En primer lugar debemos diferenciar entre las células gliales, que parecen tener una función de soporte y mantenimiento similar a la del tejido conjuntivo en otros órganos, y las neuronas, células especializadas en la recepción, procesamiento y transmisión de la actividad nerviosa. A pesar de la importancia de las células gliales para el mantenimiento y buen funcionamiento del cerebro en general, y de la corteza cerebral en particular, las principales células del sistema nervioso son las neuronas. Las neuronas son células especializadas en el procesamiento y la transmisión de información. Las neuronas típicas tienen un cuerpo celular (soma), dendritas, un axón y terminaciones sinápticas. En el soma se encuentra el núcleo de la neurona y el retículo endoplasmático. Desde el soma se originan prolongaciones de la membrana celular que forman las dendritas y el axón. Las dendritas son prolongaciones especializadas de la membrana celular con extensas ramificaciones que se encargan de la recepción de las señales procedentes de otras neuronas. El axón, el otro tipo de prolongación de la membrana celular de la neurona, es la principal unidad de conducción de señales a otras neuronas, normalmente haciendo contactos con las dendritas de las neuronas objetivo, aunque algunas neuronas pueden realizar sus contactos con otros lugares de las neuronas objetivo, como el soma o el propio axón. Las sinapsis son el lugar donde se produce la transmisión de la información desde las terminaciones sinápticas del axón de una neurona hasta las dendritas u otros lugares de contacto de la neurona objetivo. Algunas de estas sinapsis conllevan una unión directa entre los citoplasmas de las neuronas en contacto, conduciendo directamente los cambios eléctricos desde una neurona hasta la siguiente (sinapsis eléctricas), aunque la mayoría de las sinapsis se realizan en el espacio

extrasináptico por medios químicos (sinapsis químicas). En estas sinapsis químicas no existe ninguna continuidad estructural entre las neuronas pre y postsinápticas (la neurona que envía y la que recibe la señal, respectivamente), y la transmisión de la información se realiza en el espacio que separa a la neurona presináptica de la postsináptica, la hendidura sináptica. En este espacio, de entre 20 y 40 nm, la neurona presináptica vierte unas sustancias químicas que se unen a receptores específicos de la membrana de la neurona postsináptica. Estas sustancias químicas, llamadas neurotransmisores, al unirse a los receptores de la neurona postsináptica modifican el estado de sus canales de membrana para modular o transmitir las señales eléctricas.

Las últimas estimaciones de densidad neuronal dan una población neuronal aproximada de 86 mil millones de neuronas en el cerebro del ser humano, de las que aproximadamente el 19% están localizadas en la corteza, y un número similar de células gliales (Azevedo, 2009). Las neuronas corticales pueden dividirse a su vez en neuronas piramidales y no piramidales. Existen diferencias morfológicas, químicas y funcionales importantes entre estos dos tipos neuronales. A continuación enumeramos las principales características de cada tipo neuronal:

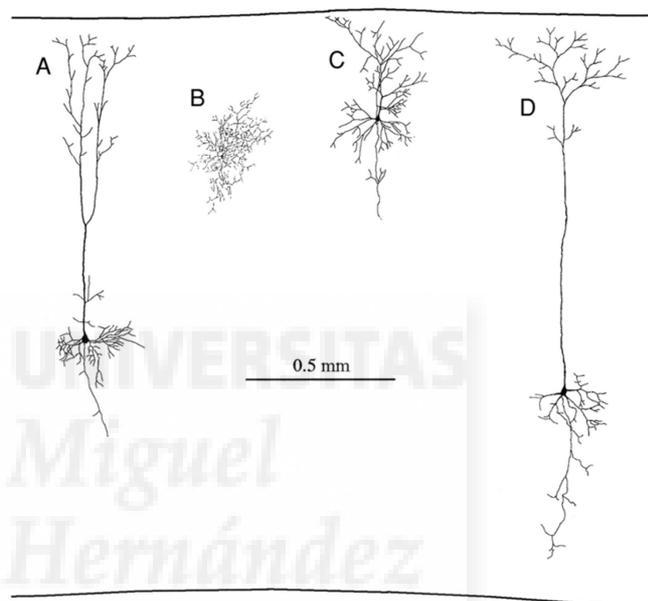
Neuronas piramidales: Las células piramidales son el tipo fundamental de célula cortical, representando aproximadamente el 80% de las neuronas de la corteza cerebral (Meyer y cols, 2011; Braak y Braak, 1986). Son las únicas neuronas cuyos axones proyectan fuera de la corteza cerebral. Presentan una dendrita apical característica que en la mayoría de los casos proyecta hasta la capa I y un abanico de dendritas basales que alcanzan distancias variables. Otra característica particular de las neuronas piramidales es la presencia de “espinas” dendríticas, pequeñas protuberancias en las dendritas donde se producen las sinapsis con los axones de otras neuronas (Valverde, 2002). Las

neuronas piramidales son la principal fuente de transmisión excitadora en el cerebro, mediada por el aminoácido neurotransmisor glutamato, además de ser las únicas neuronas capaces de proyectar sus axones de manera no local fuera de la corteza además de a neuronas cercanas. Es por esto que se las considera las principales constituyentes de los circuitos cerebrales y corticales (De Felipe y Fariñas, 1992).

Figura I.5. Neuronas glutamatérgicas.

Se pueden observar tres ejemplos de neuronas piramidales en diferentes capas de corteza (A, C y D) y una neurona estrellada con espinas (B).

Tomado de Zhu & Connors (1999).



Neuronas no piramidales: Las neuronas no piramidales, o interneuronas, presentan una variedad morfológica, bioquímica y funcional mucho más amplia que las neuronas piramidales. Hay varias características que las diferencian de las neuronas piramidales. En primer lugar la mayoría de las interneuronas presentan dendritas sin espinas y además pueden tener sinapsis tanto excitadoras como inhibitoras en su soma. Su conectividad también es diferente, ya que sus axones y ramificaciones axonales se extienden por la columna cortical de la que forma parte y hacia columnas adyacentes, pero no suele proyectar hacia la sustancia blanca y a otras regiones del córtex. Además

diferentes tipos de interneuronas parecen hacer contactos sinápticos de manera preferente con regiones específicas de las neuronas post-sinápticas, como las dendritas, el soma o incluso el axón de otras neuronas (Kawaguchi y Kubota, 1997; 1998). La acción principal de la mayoría de las interneuronas es la inhibición de la actividad eléctrica. Esta acción inhibitoria está mediada principalmente por el neurotransmisor GABA (ácido gamma-amino butírico). Estas neuronas permiten un control preciso de la actividad cortical que las neuronas excitadoras por si solas no podrían lograr (Valverde, 2002). A pesar de que la mayoría de las interneuronas utilizan el GABA como neurotransmisor existen excepciones notables, como las células estrelladas con espinas que utilizan el glutamato, y algunas interneuronas capaces de utilizar péptidos excitadores como neurotransmisores (Markram y cols, 2004).

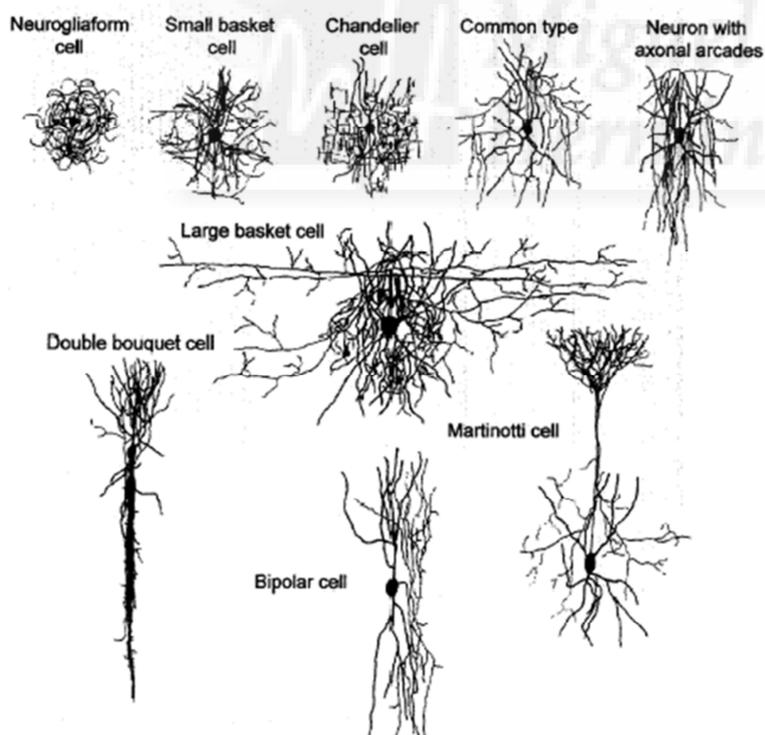


Figura I.6.
Neuronas gabaérgicas.

Reconstrucciones de los principales tipos de neuronas gabaérgicas (interneuronas) de las capas II-VI de la corteza.

Tomado de DeFelipe (2003).

1.3.- Desarrollo de la corteza cerebral.

Las neuronas de la corteza cerebral de los mamíferos se generan durante el desarrollo en el exterior de la misma, y migran posteriormente hacia sus posiciones finales en la corteza cerebral. Las neuronas piramidales se generan en la región germinal en la superficie ventricular del telencéfalo (Parnavelas, 2002) y deben migrar largas distancias hasta alcanzar la superficie pial de la corteza cerebral, formando la precapa cortical (Nadarajah y cols, 2003). Para alcanzar su posición final en la corteza desde la precapa cortical las neuronas piramidales atraviesan la corteza de manera radial, utilizando para ello diversos mecanismos como la translocación de su núcleo o la locomoción usando las proyecciones de células gliales ya situadas en el córtex como soporte (Rakic, 2003; Kriegstein y Noctor, 2004). Las interneuronas gabaérgicas en cambio se generan principalmente en la eminencia ganglionar (Parnavelas, 2002) y siguen rutas de migración tangenciales para entrar en la corteza cerebral en desarrollo (Nadarajah y cols, 2003).

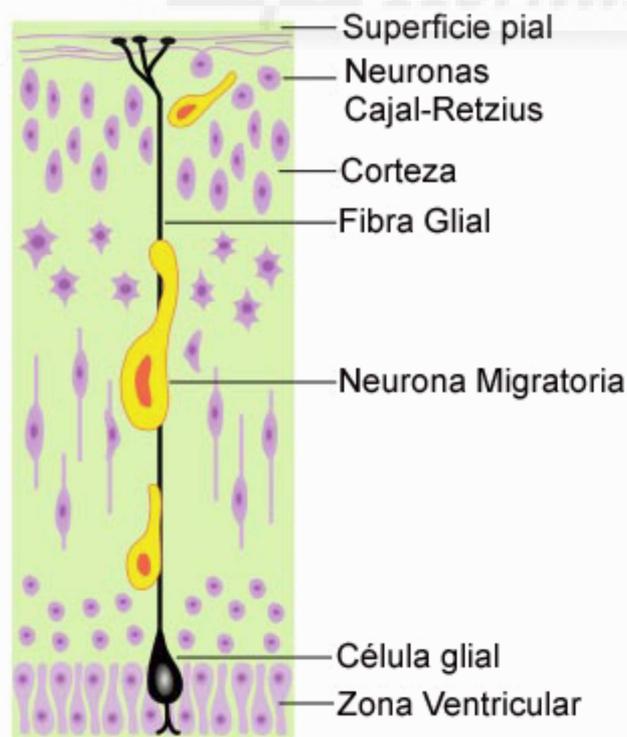


Figura I.7.
Migración radial.
Esquema de la ruta de migración radial hacia la capa cortical objetivo de las neuronas piramidales durante el desarrollo de la corteza cerebral.

1.4.- La corteza cerebral del ratón.

Las pautas de desarrollo, migración y localización neuronal en la corteza de todos los mamíferos tienen algunos puntos en común. El neocórtex de los mamíferos se estructura en seis capas, las neuronas se generan fuera del córtex y deben migrar hacia este a lo largo del desarrollo. A pesar de estas similitudes el desarrollo y estructura precisa de la corteza cerebral de las diferentes especies de mamíferos difiere considerablemente. La corteza cerebral del ratón representa un porcentaje menor del cerebro que la de los primates y el porcentaje de neuronas del córtex con respecto al resto del cerebro también es menor en roedores (Herculano-Houzel, 2009). Además la corteza cerebral de los ratones tiene una arquitectura cortical menos elaborada debido a que su precapa cortical es menor, está menos compartimentalizada que la de los primates y además emplea diferentes estrategias de producción de los progenitores celulares situados en la precapa cortical que conformarán las neuronas adultas del córtex cerebral (Molnár y Clowry, 2012).

2.- CONECTIVIDAD DE LA CORTEZA CEREBRAL

Las neuronas de la corteza cerebral son capaces de realizar las funciones de recepción, procesamiento y transmisión de las señales gracias a las conexiones que forman entre ellas. Cada tipo de neurona tiene un patrón de desarrollo, estructura y características químicas y morfológicas que determinan con que neuronas realizará contactos sinápticos (Stepanyats y cols, 2004). Estos contactos pueden realizarse a diferentes distancias del cuerpo celular de la neurona, desde contactos con las neuronas adyacentes hasta proyecciones hacia la corteza del otro hemisferio cerebral (Valverde, 2002). Al igual que en el caso del desarrollo cortical, todos los mamíferos comparten ciertas características comunes en cuanto a la conectividad cortical, pero también existen algunas diferencias importantes entre los dos modelos más utilizados para su estudio, los primates y los roedores (DeFelipe y cols, 2003).

2.1.- Microcircuitos corticales locales.

La corteza cerebral recibe una importante entrada de información desde las fibras que proyectan desde el tálamo hasta las neuronas de la capa IV de la corteza (Castro-Alamancos y Connors, 1997). Desde aquí se forma en el eje vertical de la corteza, en la denominada columna cortical (Mountcastle, 1997), un circuito recurrente en la capa IV que también proyecta hacia las neuronas de la capa III (Petersen, 2002). De nuevo en la capa III se forma un circuito recurrente que a su vez proyecta hacia la capa II de corteza. Desde las neuronas piramidales de las capas II y III de corteza se forman contactos de medio y largo alcance hacia las capas II y III de otras regiones corticales y además proyectan hacia las neuronas de la capa V de su columna cortical. En la capa V las neuronas piramidales reciben información tanto de las capa II y III de su propia columna cortical como de las demás regiones que se interconectan entre

estas capas. Las neuronas piramidales de la capa V son las únicas neuronas corticales que proyectan sus axones fuera de la corteza hacia regiones subcorticales (Thomson y Bannister, 2003).

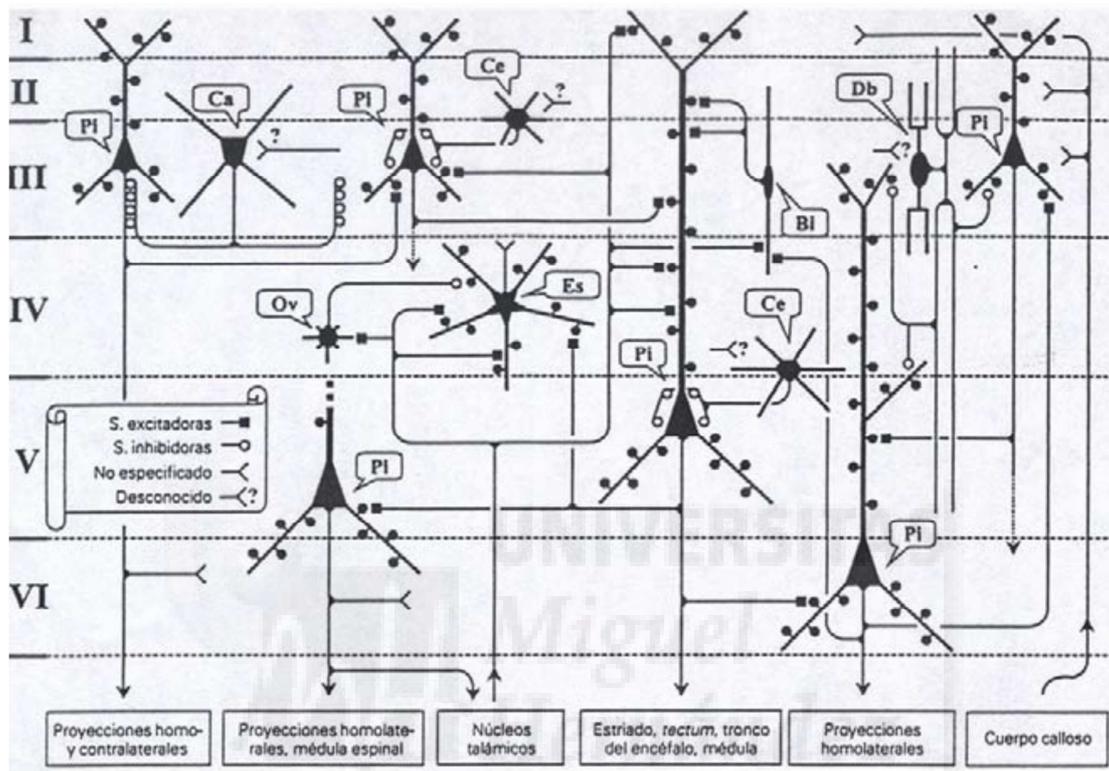


Figura I.8. Conexiones intracorticales locales.

Esquema que representa las conexiones sinápticas entre varios tipos celulares distintos. Las sinapsis excitadoras aparecen señaladas con un cuadrado negro; las inhibitorias, como un círculo vacío. Para completar el esquema se señalan, de forma general, las proyecciones subcorticales y los sistemas aferentes de diverso origen. **Bi:** células bipolares; **Ca:** células en candelabro; **Ce:** células en cesto; **Db:** células bipenachadas; **Es:** células estrelladas con espinas; **Ov:** células en ovillo; **Pi:** células piramidales. Tomado de Valverde (2002).

2.2.- Conexiones intracorticales.

Una gran parte de las aferencias excitadoras que llegan a una columna cortical provienen de fuera de la misma. Por ejemplo, en el caso de la corteza visual del gato la gran mayoría de las aferencias excitadoras que llegan a una columna cortical provienen de neuronas situadas a distancias superiores a los 800 μm (Stepanyats y cols, 2009). Estas conexiones pueden realizarse con neuronas con las que comparten características funcionales, como los campos receptivos de la corteza visual de los simios en los que las ramificaciones axonales de algunas neuronas se extienden hasta distancias de 400 μm de su soma, conectando columnas corticales que responden a las mismas modalidades receptoras de los estímulos visuales como por ejemplo la orientación o la dirección del movimiento (Sincich y Blasdel, 2001). Este tipo de estructuración en grupos neuronales se ha detectado en diferentes regiones de la corteza de algunos mamíferos como simios o gatos (Mountcastle, 1997; Issa, 2000). Estos mapas que unen columnas corticales distantes en base a las características del estímulo no se han encontrado en roedores, a pesar de que si se detectan neuronas capaces de responder de manera precisa a ciertas características de los estímulos visuales (Van Hooser y cols, 2005).

Las neuronas piramidales también proyectan sus axones formando conexiones de larga distancia con otras regiones funcionales del córtex. La información sensorial alcanza las regiones sensoriales de la corteza desde las proyecciones talámicas. Desde las regiones sensoriales la información es procesada y transmitida a regiones corticales de asociación, donde se combinan las percepciones sensoriales para formar una representación del entorno. Desde estas regiones de asociación la información es transmitida, de nuevo por los axones de las neuronas piramidales de proyección, hacia las áreas corticales motoras y premotoras. En estas áreas corticales se planifican los movimientos en

base a la información recibida desde las áreas sensoriales y se transmite esta información, de nuevo desde las neuronas piramidales de proyección, hasta las áreas corticales motoras encargadas de producir las respuestas motoras específicas adecuadas para la conducta planificada. Estas respuestas motoras son transmitidas posteriormente a las motoneuronas de la médula espinal. Algunas áreas corticales reciben proyecciones simultáneas de varias regiones, no solo de la inmediatamente anterior en el procesamiento de la información. Por ejemplo la corteza premotora, encargada de planificar los movimientos, recibe aferencias del tálamo, de la corteza somatosensorial primaria, la corteza parietal de asociación y la corteza asociativa prefrontal. Así algunas regiones corticales reciben información de diversas fuentes en paralelo, permitiendo la planificación y la supervisión de las respuestas conductuales de manera más precisa y continua.

Todas las conexiones corticales comentadas hasta ahora conectan diferentes grupos de neuronas o regiones corticales situados en el mismo hemisferio cerebral. Otro tipo de conectividad cortical es el que encontramos con las conexiones intercorticales, es decir, aquellos axones de neuronas piramidales de proyección que conectan regiones corticales situadas en el otro hemisferio.

2.3.- Conexiones intercorticales: El cuerpo calloso.

Los hemisferios corticales están separados por la fisura interhemisférica y dependen de conexiones a larga distancia para la comunicación directa entre ellos. Mientras que en otras especies animales los axones encargados de la comunicación intercortical cruzan principalmente a través de la comisura anterior o la hipocampal, en el caso de los mamíferos placentarios la principal vía de comunicación intercortical es el cuerpo calloso. Esta estructura es un rasgo único de los

mamíferos placentarios, y no se encuentra en ningún otro grupo animal. En el caso de los marsupiales la estrategia evolutiva para mejorar la conexión entre hemisferios corticales cada vez mayores ha sido el aumento de tamaño de la comisura hipocampal y la comisura anterior. En cambio los mamíferos placentarios parecen haber seguido otra ruta evolutiva más eficaz, originando un nuevo tracto de fibras nerviosas, el cuerpo calloso, a partir de la comisura hipocampal y desplazando este nuevo tracto a una posición más dorsal al hipocampo (Owen, 1837). Esto permite una comunicación rápida y directa entre regiones corticales de ambos hemisferios. Así el cuerpo calloso parece haber aparecido facilitado por la necesidad de integrar la información de las representaciones corticales de la superficie sensorial de ambos hemisferios, permitiendo una mejor integración de la información entre regiones sensoriales contralaterales (Aboitiz y Montiel, 2003).

A lo largo del desarrollo postnatal la mayoría de los axones que han proyectado al hemisferio contralateral usando el cuerpo calloso desaparecen. Aunque muchos axones de proyección tienen la posibilidad de cruzar al lado contralateral a través del cuerpo calloso solo aquellos capaces de crear conexiones funcionales sobreviven al desarrollo perinatal y postnatal del cerebro. Esta reducción en la cantidad de fibras de proyección puede ser de hasta el 75% de las fibras callosas durante el periodo de desarrollo perinatal en el caso de los primates (LaMantia y Rakic, 1990). En el caso de los roedores también parece existir esta sobreproducción inicial de proyecciones callosas, seguida de una reducción de las mismas durante el desarrollo postnatal, aunque de mucha menor magnitud que en el caso de los primates (Mitchell y Macklis, 2005).

El cuerpo calloso de un adulto humano está formado por cerca de 200 millones de fibras que lo cruzan conectando diferentes regiones corticales. Existe cierta organización en la manera en la que las fibras

cruzan el cuerpo caloso, pasando las fibras que conectan cada región cortical por zonas delimitadas del cuerpo caloso. Así las fibras que conectan regiones más frontales de la corteza cruzan el cuerpo caloso por su parte más anterior (genu), de la misma manera que las fibras conectando regiones más posteriores cruzan por la zona más posterior del cuerpo caloso (splenium). Esta organización topográfica es más clara en los humanos (Aboitiz y Montiel, 2003; Wahl y cols, 2007) y en especies como el macaco (LaMantia y Rakic, 1990; Rockland y Pandya, 1986) y algo más difusa en roedores (Nishikimi y cols, 2011; Aboitiz y Montiel, 2003; Barazany y cols, 2009; Kim y cols, 1996). A estas diferencias topográficas en la conformación del cuerpo caloso se añade la diferencia en la morfología de las fibras que cruzan por cada región del mismo. Las fibras que unen regiones frontales se caracterizan por ser de pequeño diámetro y estar pobremente mielinizadas. En cambio las fibras que conectan regiones posteriores del córtex, encargadas del control motor y la recepción sensorial están mielinizadas y son más gruesas, de hasta 3 μm de diámetro, y son capaces de altas velocidades de conducción (Aboitiz y Montiel, 2003).

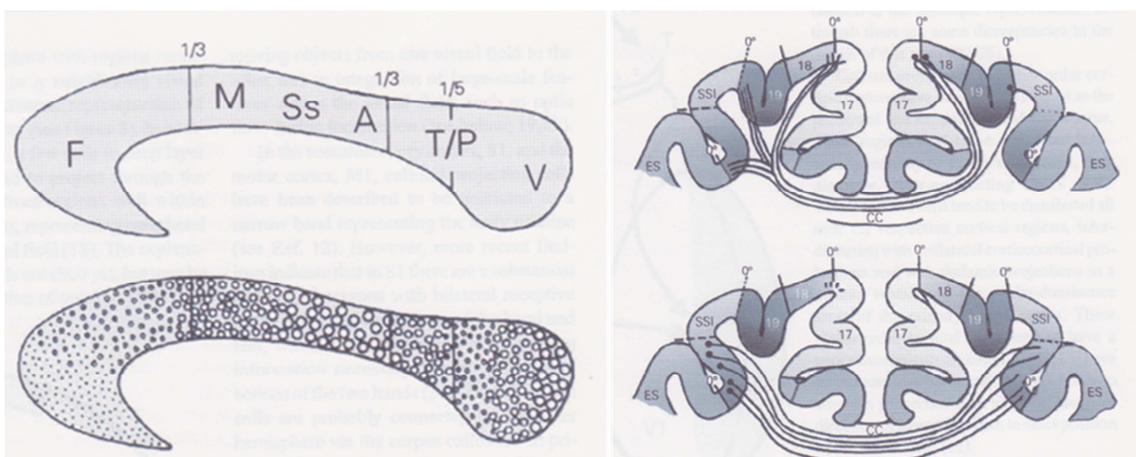


Figura 1.9. Cuerpo caloso.

Se muestra en el panel izquierdo un dibujo de un corte lateral del cuerpo caloso humano, mostrando los diferentes grosores de las fibras que lo cruzan. El panel derecho muestra algunas de las conexiones callosas anatómica y/o funcionalmente homotópicas en el cerebro de gato. *Modificado de Aboitiz y Montiel (2003).*

En el caso de los ratones las fibras que forman el cuerpo calloso provienen en su mayoría de los axones de proyección intercortical de neuronas de proyección localizadas principalmente en las capas II/III y V del neocortex (Mitchell y Macklis, 2005). Inicialmente las neuronas de proyección cortical suelen tener proyecciones simultáneas a regiones frontales en la corteza ipsilateral y proyecciones a regiones contralaterales del córtex a través del cuerpo calloso. Durante el desarrollo postnatal muchas de estas neuronas con proyecciones simultáneas a la corteza de ambos hemisferios suelen perder la conexión callosa en favor de la conexión cortical ipsilateral, quedando tan solo una parte de las conexiones callosas iniciales, y disgregándose la población de neuronas con proyecciones a ambos hemisferios en dos poblaciones con proyecciones principalmente solo ipsilaterales o solo callosas. En el caso de los ratones algunas de las neuronas son capaces de conservar ambas proyecciones corticales. Estas neuronas con proyecciones ipsilaterales y contralaterales se localiza en la capa II/III y, sobre todo, en la capa V del córtex somatosensorial, y conectan con regiones frontales de la corteza motora ipsilateral y regiones generalmente homotópicas del córtex contralateral (Mitchell y Macklis, 2005). En resumen, el cuerpo calloso permite la integración de información motora, sensorial y cognitiva de ambos hemisferios de una manera rápida y eficaz. A pesar de esto la ausencia del cuerpo calloso no tiene efectos muy graves en la función normal de los sujetos que la sufren. Esta ausencia del cuerpo calloso puede deberse a mutaciones en las que el cuerpo calloso no se forma o lo hace de manera anormal durante el desarrollo (agenesia del cuerpo calloso), o a la pérdida de parte o todo el cuerpo calloso por enfermedad o tratamiento quirúrgico (callosotomía total o parcial). En el caso de sujetos con pérdida parcial o total del cuerpo calloso existe evidencia clínica de diversos déficits cognitivos y motores aunque algunos pacientes aprenden habilidades que les permiten evitar gran parte de la sintomatología (Chiappedi y Bejor, 2010).

3.- ACTIVIDAD ELÉCTRICA CORTICAL SINCRONIZADA

Como hemos visto, en la corteza cerebral hay multitud de conexiones sinápticas y de fibras proyectando estas conexiones a diferentes regiones. Estas conexiones pueden ser de corto alcance, como en el caso de las conexiones en las columnas corticales, que suelen producirse mayoritariamente entre axones y dendritas de neuronas próximas espacialmente. Estas conexiones también se realizan entre regiones situadas a grandes distancias en la corteza, normalmente mediadas por fibras de proyección capaces de recorrer estas grandes distancias y encontrar su objetivo gracias a diferentes marcadores químicos y a su propia programación genética, como en el caso de las conexiones comisurales. Pero en otras ocasiones no existen estas conexiones directas entre diferentes zonas, o se activan varias zonas en diferentes lugares y es necesario integrar la información de estas zonas activadas para el funcionamiento normal del organismo. La corteza cerebral es capaz de generar patrones de actividad organizados a diferentes frecuencias oscilatorias, gracias al disparo coordinado de potenciales de acción por diferentes neuronas, que parecen encargarse precisamente de este funcionamiento coordinado de diversos procesos mentales en diferentes regiones de la corteza (Buzsáki y Draguhn, 2004).

Una gran parte de los estudios sobre la actividad cortical sincronizada en las últimas décadas se han realizado sobre modelos animales con registros intra o extracelulares "*in vitro*" o "*in vivo*". Gracias a estas técnicas se puede medir la actividad eléctrica en pequeños grupos de neuronas, incluso en neuronas individuales desde dentro del mismo cerebro (registro extracelular e intracelular respectivamente). Además estos registros se pueden realizar en animales vivos anestesiados (*in vivo*) o en secciones de cerebro preparadas y mantenidas en condiciones especiales para preservar la conectividad dentro de las secciones (*in vitro*). Los registros *in vivo* tienen la ventaja

de trabajar con un animal vivo y un cerebro intacto, con todas las conexiones y redes neuronales conservadas. Existe el problema de la anestesia, que reduce las posibilidades de experimentar con diferentes tareas cognitivas, y que tampoco reproduce de manera totalmente fidedigna el patrón de sueño natural (dominado también por ciertos ritmos de actividad sincronizada). Los registros en secciones de cerebro (rodajas), o experimentos *in vitro*, permiten una aproximación más directa a la actividad neuronal específica que genera la actividad eléctrica sincronizada. Aunque en estas secciones de cerebro se han perdido gran parte de las conexiones cerebrales entre núcleos alejados o en diferentes planos al utilizado al realizar las secciones del cerebro, se mantienen las conexiones locales y, dependiendo del plano de corte del cerebro, algunas conexiones de media o larga distancia. Es por esto que se pierde gran parte de la actividad global que se mantiene en los animales vivos, pero también facilita la identificación de redes locales capaces de generar de manera autónoma ciertos ritmos corticales sin la interferencia o ruido provocados por el resto del cerebro.

3.1.- Actividad oscilatoria.

Se han identificado diversos de estos patrones coordinados de disparo y, al menos en algunos casos, se han obtenido resultados que permiten sugerir la función de estos patrones de actividad. La primera referencia a estos ritmos cerebrales se debe a Hans Berger, médico y pionero en el registro de la actividad eléctrica en el cerebro. Hans Berger crea y utiliza por primera vez un aparato de medida de actividad eléctrica cerebral con electrodos, un electroencefalógrafo, capaz de generar un registro de las medidas recogidas en medio externo, es decir, un electroencefalograma. Esta depuración en la técnica le permite estudiar de manera habitual a sujetos humanos, tanto sanos como con trastornos

mentales o traumas del cráneo. Gracias a estos registros de la actividad eléctrica cerebral Hans Berger fue capaz de detectar dos ritmos distintivos en los patrones de actividad cerebral. El primero con una duración de la oscilación aproximada de 90 milisegundos y el segundo con una duración aproximadamente 35 milisegundos. A estas oscilaciones las llamó ondas *alpha* y *beta* respectivamente en un trabajo publicado en 1929, y esta denominación se ha mantenido hasta ahora. Desde entonces se han detectado y estudiado diferentes frecuencias oscilatorias de la actividad eléctrica cerebral además de estas dos, y se han definido en base a las frecuencias habituales de oscilación de cada una en hertzios (ciclos por segundo), manteniendo la terminología de letras griegas iniciada por Hans Berger. Así tenemos las ondas Alpha y Beta descubiertas en primer lugar por Berger, con oscilaciones de entre 8 y 13 Hz y entre 13 y 30 Hz respectivamente. Además tenemos las ondas de frecuencia Delta, de entre 0 y 4 Hz, las Theta, con oscilaciones entre 4 y 8 Hz y las ondas Gamma, con frecuencias de oscilación superiores a los 30 Hz (Sauseng y Klimesch, 2008; Steriade, 1999). Estas oscilaciones tienen que entenderse como patrones de actividad que se superponen y combinan en diferentes momentos dependiendo de las condiciones y las necesidades del cerebro. Permiten que diferentes núcleos o regiones funcionales del cerebro se coordinen en una gran red neural y trabajen de manera coordinada. Ciertas actividades o estados mentales pueden ocasionar un aumento o disminución de la actividad cerebral en frecuencias específicas, hecho que se ha aprovechado para estudiar la función de cada ritmo en el funcionamiento del cerebro, pero diferentes regiones corticales pueden estar funcionando a diferentes frecuencias en un momento dado, reflejando diferentes estados de activación cerebral o diferentes necesidades de sincronía neuronal (Steriade, 1999).

Es difícil integrar toda la información relativa a las oscilaciones cerebrales ya que ha existido siempre un gran interés en su estudio como medio para entender el funcionamiento del cerebro y en su posible aplicación al diagnóstico de enfermedades o desordenes psicológicos y psiquiátricos, y por lo tanto existe gran cantidad de datos y teorías sobre los mismos. Aunque se sabe bastante sobre los tipos celulares y las redes o regiones donde se generan estas oscilaciones aún falta mucho trabajo para comprender completamente la función y las reglas que dominan la integración global de la actividad oscilatoria. A continuación presentamos un pequeño resumen de las hipótesis de trabajo más destacadas o apoyadas actualmente sobre la función normal, la localización de las redes neuronales generadoras de las oscilaciones y de las posibles patologías asociadas a cada uno de los ritmos cerebrales (Steriade, 1999; Uhlhaas y cols, 2008):

Ritmo alpha: Oscilaciones entre 8 y 13 Hz. Se generan en múltiples regiones, como en el hipocampo, el tálamo, la formación reticular y en regiones motoras y sensoriales de la corteza. Dada la amplia variedad de regiones corticales donde se genera se han propuesto muchas funciones para el ritmo alpha, como la atención, consciencia, control “top-down” del flujo de información y la sincronización de la actividad a largas distancias.

Ritmo beta: Oscilaciones entre 13 y 30 Hz. Se generan por toda la corteza cerebral, en el hipocampo, los ganglios basales, la corteza olfatoria y los núcleos subtalámicos. Se ha asociado la oscilación en ritmos beta a funciones de atención sensorial, percepción de estímulos, control motor y sincronización a largas distancias. Más específicamente se ha estudiado la oscilación beta en el mantenimiento de patrones motores, y su desaparición al cambiar de patrón motor. Así parece que las frecuencias en la banda beta facilitan el mantenimiento del “status quo” motor y sensorial. El incremento patológico de las oscilaciones beta parece ser el responsable del estado akinético de los pacientes de

Parkinson, estado que desaparece al ser sustituidas las oscilaciones beta por oscilaciones de mayor frecuencia debido a la medicación con levodopa, precursor de la dopamina y tratamiento habitual para el Parkinson (Engel y Fries, 2010).

Ritmo gamma: Oscilaciones entre 30 y 200 Hz. Se generan en todas las estructuras cerebrales, en la retina y el bulbo olfatorio. Se considera que las oscilaciones gamma representan estados de alto nivel atencional, de alta plasticidad neuronal, retención en memoria (memoria a corto plazo) y control motor. Déficits en la generación o en la sincronía del ritmo gamma se han relacionado con los síntomas negativos de la esquizofrenia como déficits de atención, apatía, o anhedonia, y un exceso de actividad con el autismo y los síntomas positivos de la esquizofrenia, como las alucinaciones (Orekhova y cols, 2007).

Ritmo delta: Oscilaciones entre 0 y 4 Hz. Se generan en circuitos corticales y talámicos. El ritmo delta parece importante para la sincronización a gran escala de la corteza (Stefanics y cols, 2010; Bruns y Eckhorn, 2004) y para los procesos atencionales y de producción del lenguaje (Basar y cols, 2001).

Ritmo theta: Oscilaciones entre 4 y 8 Hz. Se generan en el hipocampo, la corteza prefrontal y la corteza sensorial. Se relaciona con diversos procesos de memoria, como la retención de información, el procesamiento de memoria declarativa y episódica y la navegación espacial (Fell y cols., 2003; Klismech y cols, 2001; Kahana, 2006), además del control “top-down” del procesamiento de la información y la sincronización de la actividad a largas distancias (Uhlhaas y cols, 2008).

Es importante hacer notar que la división en frecuencias es un artificio necesario para su definición y estudio, pero no debe ser tomado como un encasillamiento absoluto. Dentro de cada rango de frecuencias de oscilación existe cierta variedad en las frecuencias y sus funcionalidades. Algunos autores dividen ciertos ritmos en oscilaciones lentas y rápidas dentro de su propia frecuencia. Por ejemplo el ritmo gamma se puede dividir en actividad gamma lenta para frecuencias entre 30 y 80 Hz y actividad gamma rápida para frecuencias por encima de los 80 Hz (Jia y Kohn, 2011). Dado que diversos ritmos aparecen de manera simultánea y que la transición entre las diferentes frecuencias de oscilación predominante de la actividad cerebral es un fenómeno rápido pero gradual lo más acertado sería entender los diferentes ritmos oscilatorios como una representación conceptual manejable de un cerebro que trabaja con multitud de patrones de actividad diferente en una línea temporal continua (Singer, 2009). Como hemos visto anteriormente los ritmos oscilatorios más lentos (delta y theta) parecen encargarse de la coordinación de la actividad a largas distancias, mientras ritmos más rápidos (ritmos beta y gamma) parecen coordinar la actividad de centros específicos y grupos de neuronas locales (Steriade, 1999).

3.2.- Actividad cortical de ondas lentas.

Los ritmos de actividad de baja frecuencia que ocurren en el cerebro ayudan a coordinar ritmos de mayor frecuencia en regiones delimitadas en redes mayores de procesamiento de información. Algunas de estas actividades oscilatorias de la corteza cerebral son muy similares a las descargas producidas por diversos tipos de epilepsia, por lo que en ocasiones recibe el nombre de actividad epileptiforme, aunque también aparece actividad muy similar en registros durante el sueño normal en personas sanas. Dada la similitud entre ambos tipos de actividad lo más probable es que se trate de un mismo mecanismo funcionando de manera anormal o normal dependiendo del caso (Timofeev y Steriade, 2004). La desinhibición de la corteza cerebral de roedores anestesiados (antagonizando los receptores GABA_A) también hace aparecer actividad oscilatoria recurrente a frecuencias bajas de disparo, no mayores de 1 Hz, generada en el córtex cerebral, y no en el tálamo (Castro-Alamancos, 2000). Este tipo de actividad de baja frecuencia se puede generar con otros modelos experimentales, por ejemplo un modelo de experimentación "in vitro" es capaz de simular de manera fidedigna el funcionamiento del córtex de un modelo "in vivo" si se modifica ligeramente la solución donde se mantienen las rodajas para su estudio (Sánchez-Vives y McCormick, 2000), con la reducción de la concentración de Magnesio de la solución extracelular en la que se mantienen las rodajas (Trevelyan y cols, 2006; Castro-Alamancos y cols, 2007) o con la adición de antagonistas de los receptores gabaérgicos encargados de la inhibición como la picrotoxina o la bicuculina (Pinto y cols, 2005; Alefeld y cols, 1998). Gracias a estas técnicas se ha demostrado que la generación de este tipo de actividad oscilatoria lenta es dependiente de la activación de receptores de glutamato AMPA, ya que la inactivación de los mismos con el antagonista específico NBQX elimina tanto la propagación a través del córtex como la ocurrencia local

de la actividad (Alefeld y cols, 1998). En cambio la inactivación de los receptores de glutamato NMDA no parece tener consecuencias en la generación de la actividad ni en la propagación de la misma (Castro-Alamancos y Rigas, 2002). Ya hemos comentado con anterioridad que este tipo de actividad, a pesar de formar parte de un circuito talámico-cortical, es de origen cortical. Más específicamente parece generarse en las capa V y, en menor medida, en las capas II/III del neocortex del ratón (Castro-Alamancos, 2000).

3.3.- Actividad oscilatoria de 7-14 Hz asociada a las oscilaciones lentas.

Si se realiza una desinhibición más completa en los modelos de generación de actividad oscilatoria de baja frecuencia (antagonizando los receptores GABA_B además de los GABA_A o reduciendo la concentración de magnesio extracelular liberando así los receptores NMDA y facilitando su activación) se genera un segundo patón de actividad oscilatoria de entre 7 y 14 Hz asociado a las descargas que generan el ritmo lento (Castro-Alamancos, 2000). A diferencia de las oscilaciones lentas esta actividad de 7-14 Hz parece modulada por los receptores NMDA ya que cuando se aplica APV (antagonista de los receptores NMDA) en estas condiciones las oscilaciones aumentan su frecuencia hasta valores entre 15 y 25 Hz. Usando diferentes dosis de CNQX, otro bloqueante de receptores de glutamato que antagoniza de manera dosis-dependiente receptores AMPA a bajas dosis y receptores AMPA, NMDA y de kainato a dosis mayores, es posible bloquear de manera selectiva tanto la actividad recurrente de 7 a 14 Hz a bajas dosis como la actividad de menos de 1 Hz a dosis mayores (Castro-Alamancos y Rigas, 2002). Además la actividad oscilatoria de entre 7 y 14 Hz se genera en la zona agranular del neocortex (corteza motora) con la

aplicación de bloqueantes de la inhibición GABA_A y GABA_B, pero en cambio no aparece en las mismas condiciones experimentales en el córtex granular (corteza sensorial, corteza en barriles). Esto parece ser debido a las diferentes configuraciones de receptores y corrientes activas en las neuronas de estas zonas, y es posible bloquear la actividad oscilatoria de entre 7 y 14 Hz en el córtex agranular y generar la misma actividad oscilatoria en el córtex granular con las modificaciones farmacológicas adecuadas (Castro-Alamancos y Tawara-Hirata, 2007).

3.4.- Propagación intrahemisférica de la actividad oscilatoria cortical de ondas lentas.

La actividad oscilatoria cortical de baja frecuencia se genera por la activación de un grupo de neuronas de manera sincronizada (Timofeev y Steriade, 2004). Dependiendo del modelo utilizado para su estudio, la actividad sincronizada puede aparecer de manera espontánea (Castro-Alamancos, 2000; Castro-Alamancos y Tawara-Hirata 2007) y/o ser generada gracias a la aplicación de un estímulo eléctrico en regiones cercanas de la corteza (Alefeld y cols, 1998; Pinto y cols, 2005). Esta actividad sincronizada es capaz de propagarse a través de la capa I de la corteza cerebral, tanto en el eje rostro-caudal como en el medio-lateral de la corteza (Alefeld y cols, 1998). La velocidad a la que se propaga esta actividad sincronizada cortical es dependiente del modelo experimental utilizado para generarla, siendo mayor en modelos de bloqueo de la inhibición con picrotoxina o bicuculina donde se propaga a velocidades de decenas de milímetros por segundo (Alefeld y cols, 1998; Pinto y cols, 2005) que en los modelos de bajo Magnesio donde la propagación es del orden de centenas de micras por segundo (Trevelyan y cols, 2007). Esta diferencia en las velocidades de propagación cortical de la actividad oscilatoria de baja frecuencia, o actividad epileptiforme, se

debe a que el principal limitador de la propagación de este tipo de actividad es la activación anterógrada del sistema inhibitorio, que restringe la activación de nuevos grupos de neuronas (Trevelyan y cols, 2006). Dado que el modelo de generación de actividad epileptiforme con bicuculina o picrotoxina elimina parte de la capacidad de inhibición de la corteza cerebral es más fácil que se recluten nuevos grupos de neuronas (Trevelyan y cols, 2007). Este tipo de actividad oscilatoria puede llegar a comportar patologías severas, principalmente epilepsias, si se propaga sin control (McNamara, 1994; Englot y Blumenfeld, 2009).

3.4.- Propagación interhemisférica de la actividad oscilatoria cortical de ondas lentas.

Este tipo de actividad cortical sincronizada también puede propagarse desde el hemisferio donde se genera inicialmente hasta el otro hemisferio cerebral cuando el cuerpo calloso está conservado en el modelo experimental (Alefeld y cols, 1998). Este tipo de propagación ha sido poco estudiada y existen pocos datos sobre sus características. Un reciente estudio parece demostrar cierta variación en la velocidad de propagación interhemisférica de la actividad sincronizada dependiendo de la localización en el eje rostro-caudal de la región cortical utilizada, apareciendo diferencias al realizar registros en posiciones simétricas de ambos hemisferios en rodajas de diferentes niveles rostro-caudales de la corteza cingular del ratón (Walker y cols, 2012).

4.- MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CORTICAL POR SEROTONINA

La corteza cerebral recibe una importante proyección axonal desde los núcleos del rafe, en los que se agrupan las neuronas serotoninérgicas del cerebro (Jacobs y Azmitia, 1992). Estas proyecciones serotoninérgicas a la corteza prefrontal tienen un papel muy importante en el control de las funciones de la corteza, ya que la serotonina (5-HT) es uno de los principales moduladores de la actividad cerebral. El sistema serotoninérgico es muy complejo, pues se han identificado al menos 7 tipos de receptores de 5-HT (Pauwels PJ, 2003). Los receptores serotoninérgicos son de tipo metabotrópico y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, con la excepción del tipo 5-HT₃ que es un receptor de tipo ionotrópico (Jacobs y Azmitia, 1992; Pauwels PJ, 2003). Las neuronas de la corteza frontal, tanto neuronas piramidales como interneuronas gabaérgicas, expresan diversos tipos de receptores de serotonina, siendo los tipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} los más abundantes (Pazos y Palacios, 1985; Pazos y cols. 1985; Pompeiano y cols. 1992; Willins y cols, 1997; Jakab y Goldman-Rakic, 2000; Santana y cols. 2004). El receptor 5-HT_{1B} se expresa principalmente en las terminales presinápticas y los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} se expresan en las neuronas piramidales y no piramidales con un alto nivel de co-expresión en las neuronas piramidales (Amargós-Bosch y cols. 2004).

Dada la gran diversidad de receptores serotoninérgicos los efectos de la serotonina en la actividad eléctrica cortical son bastante heterogéneos. Por ejemplo, en experimentos “*in vivo*” la estimulación de los núcleos del rafe produce una inhibición de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, inhibición que se bloquea parcialmente con antagonistas de receptores tipo 5-HT_{1A} (Puig y cols. 2005; Amargós-

Bosch y cols. 2004); por otra parte, la activación de los receptores tipo 5-HT_{2A} mediante la aplicación de agonistas produce excitación de las neuronas piramidales (Puig y cols. 2003). En preparaciones “in vitro” se han estudiado los efectos de la aplicación de serotonina y agonistas serotoninérgicos, principalmente sobre el potencial de membrana, y se ha descrito tanto excitación como inhibición de la actividad eléctrica de neuronas piramidales (Araneda y Andrade, 1991; Tanaka y North, 1993; Aghajanian y Marek, 1999; Arvanov y cols. 1999; Zhou y Hablitz 1999; Puig y cols, 2004). En las terminales presinápticas la serotonina principalmente inhibe la liberación de neurotransmisores (Laurent y cols, 2002; Tanaka y North, 1993) modulando la eficiencia de la transmisión sináptica. En el caso de la transmisión callosa también se han descrito efectos moduladores de la serotonina, principalmente una inhibición de la amplitud de las respuestas sinápticas de las neuronas piramidales corticales evocadas por la estimulación de las fibras callosas (Troca y Geijo, 2010).

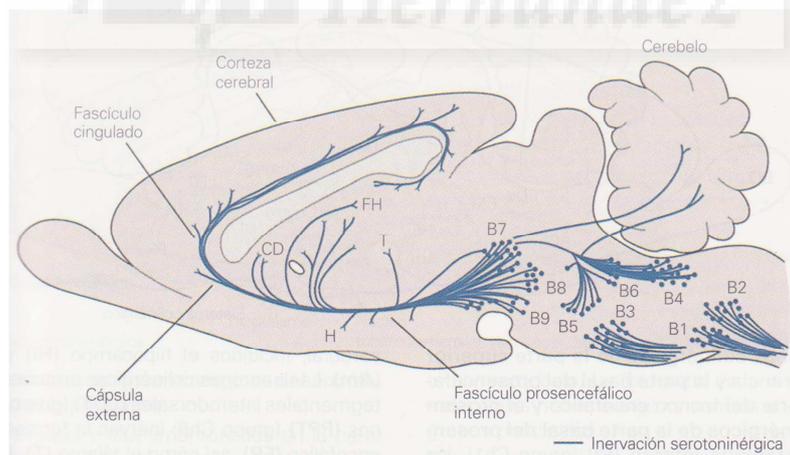


Figura I.10. Sistema serotoninérgico.

Dibujo de un cerebro de ratón donde se muestran las proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del Raphe. Tomado de *Principios de Neurociencia: cuarta edición, Kandel (2000)*.

Recientemente se ha relacionado al receptor 5-HT_{2A} localizado en la corteza prefrontal con la memoria operativa (Williams y cols., 2002) y se han asociado distintos alelos del gen del receptor 5-HT_{2A} con la memoria en el hombre (de Quervain y cols., 2003). A su vez, los receptores 5-HT_{1A} se implican en ansiedad (Parks y cols., 1998) y aprendizaje, y se ha descrito que antagonistas de receptores 5-HT_{1A} revierten déficits cognitivos inducidos por diversos fármacos (Harder y Ridley, 2000). Además de estas observaciones, se han descrito alteraciones en receptores serotoninérgicos en el lóbulo frontal de pacientes psiquiátricos (Gurevich y cols., 2002), lo que muestra la implicación de la 5-HT en algunas enfermedades cerebrales y ha llevado a estudiar el papel de la 5-HT en el control de la actividad de las neuronas de la corteza como primer paso para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la modulación de receptores serotoninérgicos. De particular importancia es el efecto antiepiléptico de la serotonina (Salgado y Alkadhi, 1995) y el hecho de que los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} son los objetivos terapéuticos de diversos fármacos antipsicóticos (Meltzer y Massey, 2011) que en los últimos años están sustituyendo a los antipsicóticos clásicos. Estos antipsicóticos atípicos actúan bloqueando los receptores 5-HT_{2A} y activando los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} sin afectar a los receptores dopaminérgicos, evitando así los efectos secundarios extrapiramidales habituales con los antipsicóticos clásicos.



MÉTODOS

1.- MODELO ANIMAL

Para la realización de este trabajo de investigación se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6, de edades comprendidas entre los 14 y los 20 días postnatales. Solo se utilizaron ratones machos para evitar la posible variabilidad debida al sexo del animal.

Los animales experimentales han sido sacrificados mediante dislocación cervical. Este método permite que los ratones sean sacrificados de una manera rápida y con el mínimo sufrimiento y ansiedad posible para los animales de experimentación. Todos los animales estaban sanos y no fueron manipulados farmacológicamente antes de los experimentos.

Los ratones fueron criados y suministrados por el servicio de animalario del Instituto de Neurociencias de Alicante. Todos los protocolos utilizados en este trabajo han sido aprobados por la Comisión de Ética en la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández.



Figura M.1. Modelo animal. Ratón C-57BL/6 de 20 días de edad.

2.- EXTRACCIÓN DEL CEREBRO Y PREPARACIÓN DE RODAJAS PARA REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS “IN VITRO”

Todos los experimentos se han realizado en preparaciones de rodajas de cerebro “in vitro”. La metodología de preparación de rodajas es la de uso habitual en el laboratorio (de la Peña y Geijo Barrientos, 1996; Valdés y col, 2007) incluyendo la preparación de rodajas coronales en las que se conservó el cuerpo caloso (Troca y Geijo Barrientos, 2010). El procedimiento utilizado se detalla a continuación:

Tras realizar la dislocación cervical del ratón se procede a la decapitación del mismo con unas tijeras y a la retirada de la piel que recubre el cráneo. A partir de este momento y en cada paso de la cirugía (cada 10 o 15 segundos) el cráneo y/o el cerebro se bañan con solución de corte fría. Esta solución, cuya composición se detalla en la tabla M.1 se enfría previamente a la cirugía hasta una temperatura cercana a la congelación (2-4⁰C) y se mantiene saturada con carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂) para mantener el pH (pH=7.4) de la solución. Esta solución extracelular de corte tiene una concentración de calcio más baja y una de magnesio más alta que las soluciones extracelulares habituales para reducir la excitabilidad neuronal. Esto aumenta la supervivencia del tejido al reducir la liberación de glutamato, que puede resultar tóxico para las neuronas. Inmediatamente después de descubrir el cráneo se utilizan unas tijeras finas para realizar un corte longitudinal siguiendo la línea media del cráneo, desde la parte posterior del mismo y evitando dañar el tejido al realizar el corte. A continuación se procede a retirar los huesos frontal y parietal del cráneo con una gubia aprovechando el corte realizado anteriormente y con el máximo cuidado para no presionar el cerebro. Una vez descubierto el cerebro se puede proceder a su extracción con una espátula de laboratorio del tamaño adecuado. Normalmente es necesario cortar los nervios ópticos antes de proceder a retirar el cerebro para evitar tirones y que este se dañe o caiga. Esto se

puede realizar con la misma espátula con la que retiramos el cerebro o ayudándonos con un bisturí o una lanceta.

El cerebro ya extraído se coloca en una superficie dura y plana de metacrilato cubierta con papel de filtro humedecido con la misma solución de corte fría con la que bañamos el cerebro durante la extracción. Sobre esta base el cerebro se talla con una cuchilla limpia y desengrasada en acetona, etanol y agua destilada, en este orden. El tallado debe realizarse respetando las zonas de interés para el registro electrofisiológico. En nuestro caso se realizaba un corte coronal para retirar la corteza olfatoria respetando la corteza cingular anterior. Además se realizaba otro corte coronal en la parte posterior del cerebro eliminando el cerebelo y dejando una superficie lisa y homogénea de tejido lo más paralela posible al ángulo de corte deseado para las rodajas. El bloque de cerebro resultante se coloca en un recipiente con solución de corte fría y burbujeada con carbógeno mientras se procede a preparar el soporte del vibratomo. Todo este proceso de extracción y tallado del cerebro debe realizarse lo más rápido posible (preferentemente no más de dos minutos) pero prestando mucho cuidado en no dañar ni presionar el cerebro durante el mismo.

Una vez ya tenemos el bloque de cerebro preparado lo pegamos con cianoacrilato en el soporte del vibratomo (Leica VT1000S) por la parte posterior del cerebro y procurando que la cara dorsal del cerebro quede orientada hacia la cuchilla del vibratomo. La cuchilla del vibratomo está inclinada 15° por debajo del plano horizontal y se hace avanzar a una velocidad constante baja (0.125mm/s) y a una alta frecuencia de vibración (80Hz). Las rodajas se cortan de manera automática, una vez marcada la ventana de corte manualmente, con un grosor de $350\mu\text{m}$. Durante todo este proceso el soporte con el bloque de cerebro pegado se mantiene sumergido en solución de corte fría en la cubeta del vibratomo, que a su vez se encuentra rodeada de hielo y burbujeada con carbógeno.

El proceso de preparado del cerebro y corte de rodajas (entre 3 y 6 rodajas por ratón) suele durar entre 10 y 15 minutos. Cada una de las rodajas obtenidas se transporta cuidadosamente con una pipeta Pasteur preparada al efecto hasta un vaso de precipitado con solución extracelular modificada, situado en un calentador y cuya composición se detalla en la tabla M.1. Esta solución se mantiene gaseada con carbógeno y a una temperatura de 37°C en un baño termostatzado.

En este vaso de precipitado se encuentra sumergida una pieza cilíndrica de plástico con una malla de teflón cuadrículada de 1mm x 1mm de tamaño de cuadrícula insertada en su zona central. Es en esta malla donde se colocan las rodajas, donde pueden reposar sumergidas en la solución, bañadas y bien oxigenadas por ambos lados. Las rodajas se mantenían a 37°C durante al menos 30 minutos para favorecer la acción enzimática, que ayuda a eliminar restos de tejidos ocasionados durante la cirugía, para que la superficie de la rodaja quede más limpia. Pasados estos 30 minutos el vaso de precipitado se retiraba del baño termostatzado y se dejaban reposar las rodajas 1 hora a temperatura ambiente hasta su utilización para permitir la estabilización del tejido. Esta preparación permite la supervivencia de las rodajas durante varias horas, normalmente entre 7 y 9 horas hasta que comienzan a estropearse.

Las rodajas se realizaban intentando conservar el cuerpo caloso. Para que esto fuera posible se comenzaban a cortar las rodajas después de retirar parte de la corteza frontal, y se realizaban rodajas consecutivas de un grosor de 350µm a lo largo de la longitud del cuerpo caloso. Cortando las rodajas de este grosor aumentaban las posibilidades de conservar fibras callosas que cruzaran de un hemisferio a otro, permitiéndonos así estudiar la propagación de la actividad entre ambos hemisferios.

2.1.- Cámara de registro y sistema de perfusión.

Después de una hora a temperatura ambiente las rodajas ya pueden utilizarse para registros electrofisiológicos. En el Setup hay una cámara de registro donde se coloca la rodaja, situada en una pletina de microscopio fija, que a su vez está fijada a una mesa antivibración. Esta cámara de registro (Warner Instruments, Model RC-27; figura M.2) está fabricada en metacrilato. Su base es rectangular y tiene un pequeño compartimento para colocar las rodajas de 5cm x 2cm. Esta cámara tiene en su parte posterior un orificio para conectar el tubo de entrada de solución. En la parte anterior tiene otro tubo conectado a una bomba de vacío para succionar la solución. Esto mantiene la solución fluyendo continuamente por la cámara de registro. La cámara de registro tiene una capacidad de aproximadamente 3ml. El flujo de solución en la cámara es de 4 ml/min aproximadamente, con lo que la solución se recambia en poco menos de un minuto. El volumen de solución en la cámara se puede controlar modificando la inclinación, y por lo tanto la altura sobre la cámara, del tubo de succión. La velocidad del flujo de solución también se puede modificar cambiando diversos parámetros del sistema de botellas y válvulas con el que se suministra la solución a la cámara de registro. Este sistema se compone en primer lugar de un soporte donde se colocan los recipientes con las distintas soluciones experimentales. Este soporte se encuentra a mayor altura que la cámara de registro para que la solución pueda fluir de manera natural. Se puede variar la altura de estos recipientes, así como su forma y tamaño, para cambiar la velocidad a la que la solución fluirá hacia la cámara de registro. Para conectar los recipientes con soluciones experimentales con la cámara de registro se utilizan varios tubos de polietileno que permiten que las soluciones experimentales fluyan hasta un sistema eléctrico de válvulas con el que se puede abrir y cerrar el paso de los diferentes tubos por separado, permitiendo cambiar de solución de manera rápida y fiable durante la realización de los experimentos.

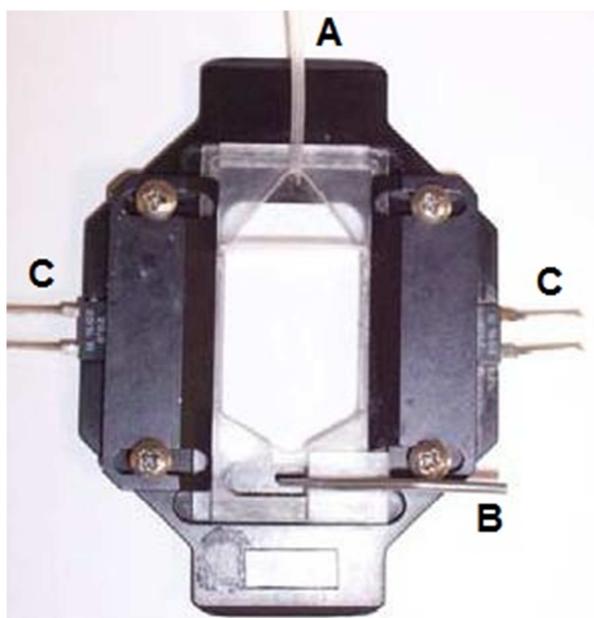


Figura M.2. Cámara de registro.

En la imagen podemos ver la cámara de registro. Se puede observar en la parte superior el tubo de acceso de flujo de solución (A), y en la inferior el tubo de succión (B). Se puede observar además las conexiones de las resistencias del calentador (C).

Para controlar la temperatura de la solución en la cámara de registro esta cuenta con un sensor térmico y dos termorreguladores incorporados. La temperatura para los experimentos se mantuvo en $33\pm 1^{\circ}\text{C}$. Esto se conseguía gracias a un precalentador (Warner Instruments) situado entre las válvulas de control de flujo y la entrada de la cámara de registro. Además los termoreguladores mantienen la solución en la cámara a la temperatura deseada, y esta se controla gracias a un sensor térmico en contacto con la solución.

2.2.- Soluciones extracelulares.

Hemos utilizado dos soluciones extracelulares diferentes durante la realización de los experimentos (tabla M.1). La solución extracelular de corte, utilizada durante la preparación de las rodajas, tiene una baja concentración de calcio y alta de magnesio para reducir la liberación de glutamato durante la fase de preparación de las rodajas. La solución extracelular modificada que será utilizada para la perfusión de la rodaja durante la realización de los experimentos contiene concentraciones similares a las existentes en el fluido intersticial del cerebro (Sánchez-Vives y McCormick, 2000; Zhang y cols, 1990;).

	Solución extracelular modificada (mM)	Solución extracelular de corte (mM)
NaCl	124	124
KCl	5	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25	1.25
MgCl ₂	1	2.5
CaCl ₂	1.2	0.5
NaHCO ₃	26	26
Glucosa	10	10

Tabla M.1. Soluciones extracelulares.

Las soluciones se burbujan continuamente con carbógeno durante su uso (95% O₂ + 5%CO₂; Osmolalidad ≤ 300 mOsm, pH = 7.4).

2.3.- Registros extracelulares simultáneos.

Los registros se realizaron en la zona superficial de la capa II/III de la corteza cingular anterior. La visualización de las rodajas se realizaba con un microscopio (Leica DMLFSA) equipado con óptica Nomarski (contraste de interferencia diferencial –DIC-), iluminación por infrarrojos y dos objetivos intercambiables, uno de ampliación 4x y otro de inmersión en agua con ampliación de 40x. La identificación de la situación de la rodaja en el eje antero-posterior del cerebro se realizaba basándose en comparaciones visuales con los cortes esquemáticos del atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (The mouse brain in stereotaxic coordinates, Paxinos & Franklin, 2001) a una ampliación de 4x. Se intentaba utilizar de manera prioritaria aquellas rodajas con el cuerpo calloso conservado, como en el ejemplo mostrado en la figura M.3.

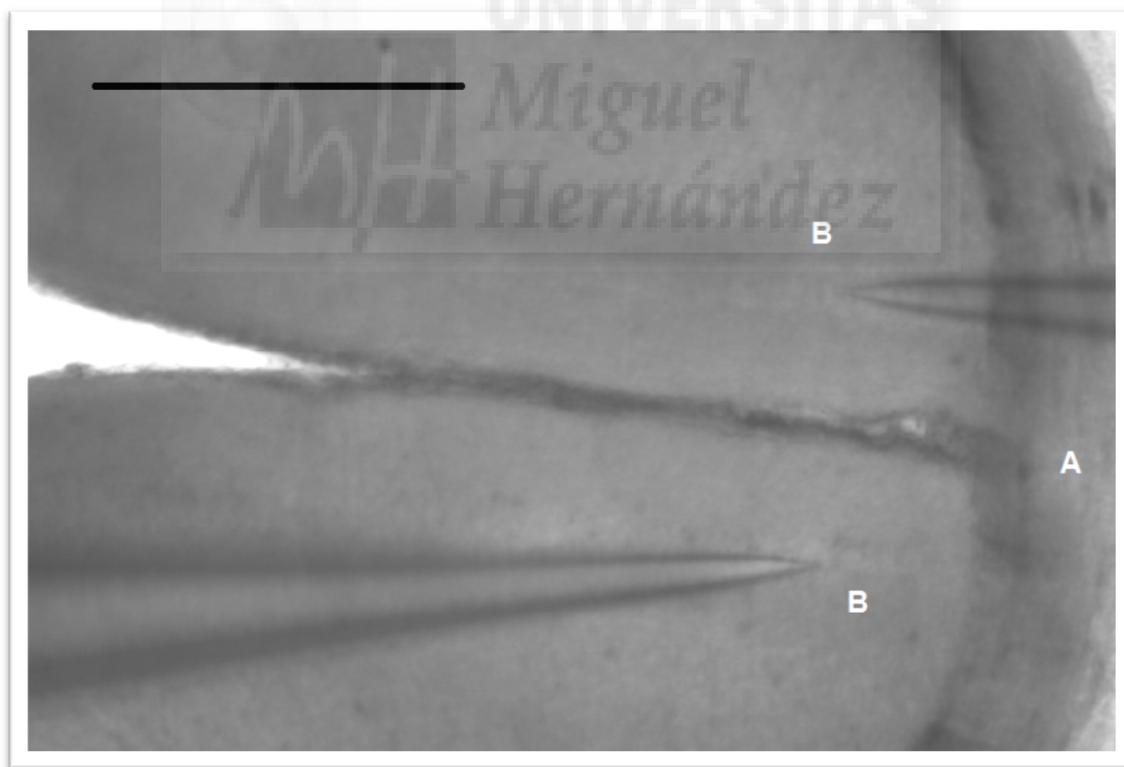


Figura M.3. Registro doble extracelular.

En esta foto se pudo observar una preparación de rodaja "in vitro" en la que se conserva el cuerpo calloso (A). También se pueden observar los electrodos de registro extracelular situados sobre ambos hemisferios cerebrales (B). Barra de escala de 0.5 milímetros.

Para realizar los registros se estimulaba en la zona dorsal de la capa I de uno de los hemisferios cerebrales para luego registrar en diferentes posiciones de la capa II/III (figura M.4). La estimulación se realizaba con un electrodo metálico concéntrico (Frederick Haer and Co, catalog CBBRC75) con un polo exterior de 200 μ m de diámetro, punta redonda y cuyos polos internos están formados por hilos de Platino e Iridio de 25 μ m de diámetro.

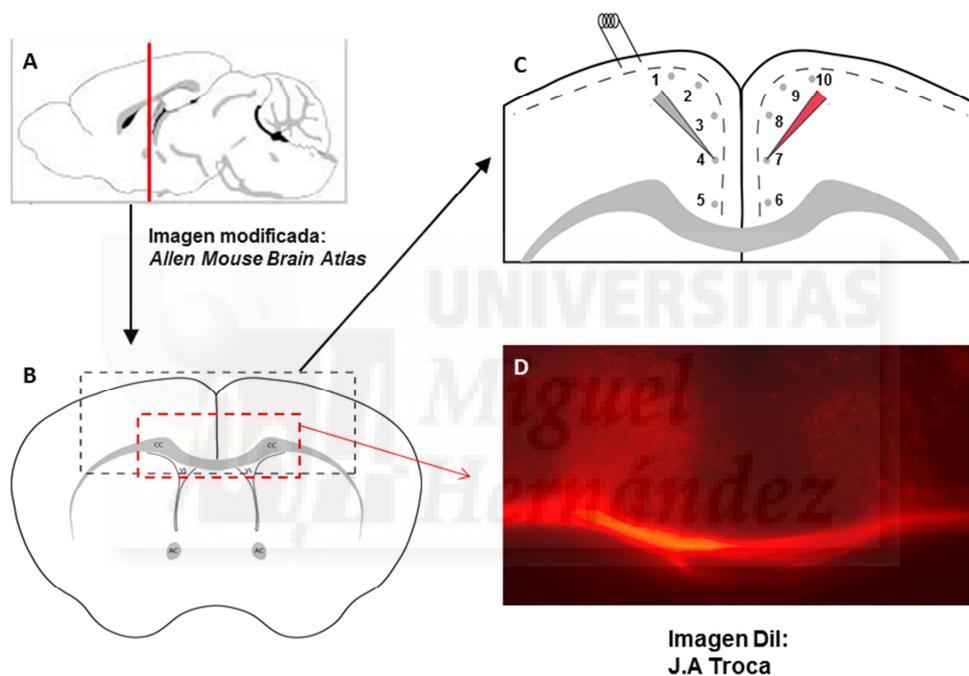


Figura M.4. Zona de registro electrofisiológico.

A. diagrama sagital del cerebro de ratón. Se muestra con una línea roja la posición de corte aproximada de la rodaja. **B.** Esquema coronal de la rodaja. **C.** Ampliación de la zona de registro de nuestros experimentos. Se muestran la posición aproximada donde se estimula la rodaja (capa I), las posiciones de registro electrofisiológico (numeradas) y dos ejemplos de electrodos posicionados para registro simultáneo (capa II/III). **D.** Imagen de una rodaja con marcaje con Dil en el cuerpo calloso, donde se aprecia la entrada de axones en ambos hemisferios cerebrales desde el cuerpo calloso.

La distancia entre las posiciones donde se realizaron los registros, que se mantenían equidistantes entre ellas en cada rodaja, no era la misma dependiendo de la posición rostro-caudal de las rodajas utilizadas. Entre las rodajas más frontales y las más caudales existe una diferencia en el grosor de la zona ventral del córtex cingular, estrechándose esta región en las rodajas más caudales. Se utilizó una regla escalada a la ampliación del microscopio para determinar las distancias entre electrodos de registro y para cuantificar la reducción de la longitud de la capa de corteza cingular ventral en las rodajas más caudales. Esto nos permite establecer comparaciones entre las diferentes rodajas, ya sean caudales o rostrales, en posiciones equivalentes aunque no siempre equidistantes entre rodajas. En la siguiente tabla se muestran las equivalencias entre los esquemas coronales del atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) usados como referencia anatómica y su situación con respecto al bregma craneal:

<i>Rodaja coronal del atlas de cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001)</i>	<i>Posición equivalente en milímetros respecto al bregma craneal</i>
20	1.34
22	1.1
24	0.86
26	0.62
28	0.38
30	0.14
32	-0.1
34	-0.34
36	-0.58
38	-0.82
40	-1.06
42	-1.34
44	-1.58
46	-1.82

Tabla M.2. Posición Rostro-Caudal de las rodajas.

Equivalencia entre el esquema coronal numerado del atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) y su posición con respecto al bregma craneal según el propio atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001).

Para determinar la intensidad el estímulo se buscaba la intensidad mínima que producía la respuesta deseada. En nuestros experimentos utilizamos un pulso de corriente de 0.1ms de duración y con una intensidad de estímulo al menos igual al doble del umbral de respuesta de la rodaja para evitar la variabilidad en la latencia inicial de la actividad (Pinto y cols, 2005). El umbral de respuesta en la mayoría de las ocasiones se calculó en aproximadamente entre 0.05 y 0.15 mA, con lo que la intensidad de estímulo habitual fue de entre 0.1 y 0.3 mA.

Para obtener el registro electrofisiológico se utilizaban electrodos preparados a partir de capilares de vidrio de borosilicato de 1.5mm de diámetro externo y 0.86mm de diámetro interno, con filamento interno (Harvard apparatus LTD, model GC150F-10). Los capilares se estiraban con un estirador horizontal electrónico (Sutter instruments, model P-87, USA), obteniéndose dos capilares idénticos con una resistencia en la punta de 1.5 a 2.5 M Ω cuando se rellenaban con la solución extracelular modificada. El rellenado de los capilares se realizaba con una aguja de fibra de vidrio de unos 5cm de longitud. La solución se inyectaba pasándola previamente por un filtro de 0.22 μ m ajustado entre la jeringa y la aguja de fibra de vidrio. Esta operación era facilitada por el filamento interno del capilar, que reduce la aparición de burbujas y facilita su eliminación en caso de que aparezcan. Una vez preparados los capilares se colocaban en dos preamplificadores (Axon instruments CV-7B) introduciendo el filamento de los mismos en el interior de los capilares y fijándolos mediante un sujetaelectrodos incorporado al propio preamplificador. Estos preamplificadores están a su vez conectados y controlados por dos manipuladores. Uno de ellos está fijado a un micromanipulador mecánico (MX100R) y el otro a un micromanipulador motorizado (Sutter instruments MP-225). Estos micromanipuladores permiten el manejo de los electrodos fijados a los preamplificadores de una manera segura y precisa. Para la obtención de los registros los electrodos se conectan, a través de los preamplificadores, a un

amplificador (Axon instruments, Multiclamp 700B) que permite medir y controlar el paso de corriente por los electrodos. En todo momento se mantuvo un electrodo adicional de referencia formado por un “pellet” de Ag-AgCl, conectado a la toma de tierra y sumergido en la cámara de registro.

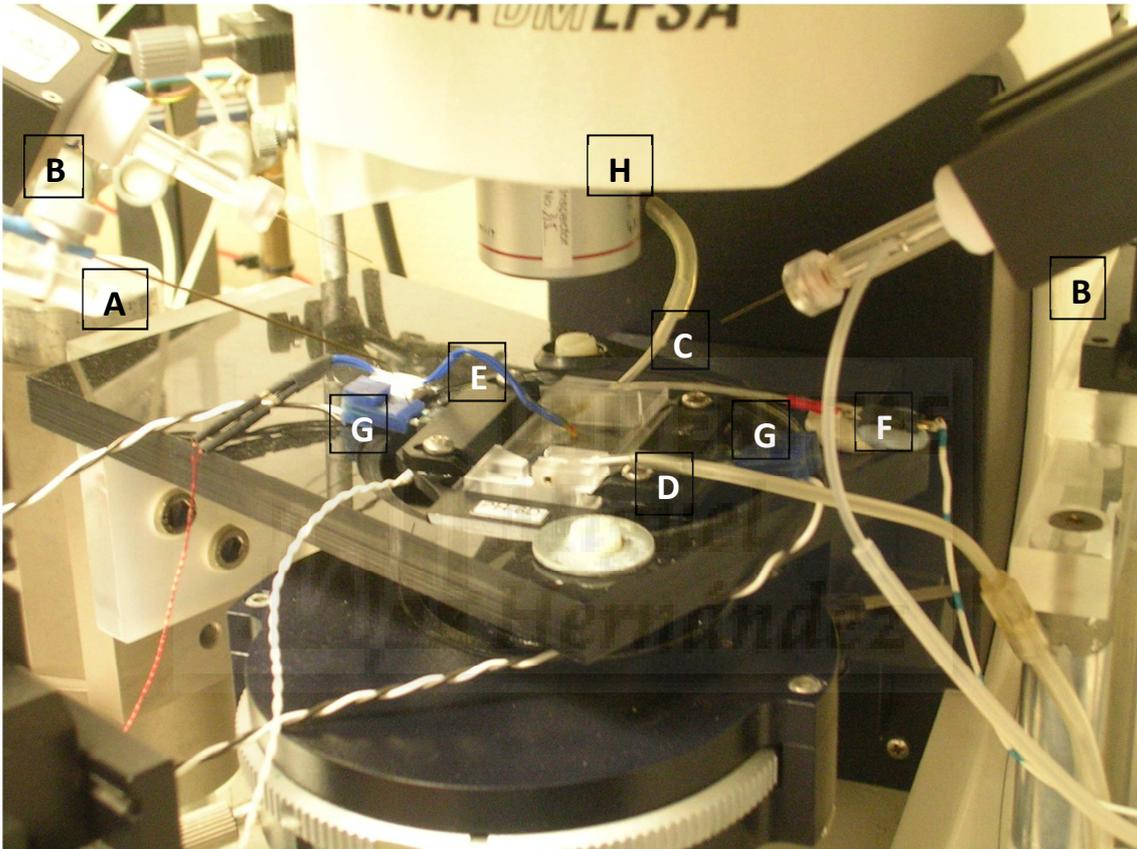


Figura M.5. Setup experimental.

En la foto superior podemos observar el setup experimental, con el electrodo de estímulo (A) y los headstages con los electrodos de registro (B) situados encima de la cámara de registro. También se pueden observar los tubos de entrada (C) y succión de flujo (D) de la solución extracelular, el sensor de temperatura (E), la toma de tierra (F) y los cables de los calentadores (G). Justo encima de la cámara de registro podemos observar el microscopio con el objetivo de 4 aumentos (H).

2.4. Registro intracelular y extracelular simultáneo.

Se realizó un grupo de experimentos usando uno de los electrodos de registro para registro extracelular y el otro para registro intracelular. Esto nos permitió ver la correspondencia intracelular de la actividad extracelular registrada en el resto de los experimentos.

Para la realización de estos registros se preparaba el experimento de una manera similar a cuando se realizaban los registros extracelulares dobles. Para el registro intracelular era necesario utilizar el objetivo de 40x con la óptica Nomarski. La visualización se realizaba gracias a una cámara de video sensible a infrarrojos (SONY CCD-IRIS, SSC-M370CE) que permitía ver en el monitor de un ordenador las neuronas e identificarlas visualmente para su registro. La preparación del electrodo para registro intracelular difiere de la de los electrodos para registro extracelular. En primer lugar la resistencia del electrodo debe ser mayor, de entre 2 a 3 M Ω en nuestros experimentos. Además la solución utilizada para rellenar el capilar es una solución que simula el medio intracelular de las neuronas. La composición de la solución intracelular se detalla en la tabla siguiente.

	Solución intracelular (mM)
Gluconato de Potasio	125
KCl	20
Hepes	10
EGTA	0.5
Mg-ATP	2
Na-GTP	0.2

Tabla M.3. Solución Intracelular.

Composición de la solución intracelular utilizada durante el proceso experimental. Osmolalidad \leq 300 mOsm. pH = [7.2 – 7.3] ajustado con KOH (1M).

Existen diversos métodos de registro intracelular. En nuestro caso se realizaron registros de *Patch Clamp*, en la configuración de *Whole Cell*. Esta configuración permite que el electrodo de registro forme un continuo con la membrana de la célula a registrar, permitiendo detectar y controlar con el electrodo de registro los flujos de corriente en la neurona. Para poder llegar a esta configuración de registro intracelular en primer lugar se introduce el electrodo en la cámara de registro mientras se aplica una pequeña presión positiva en el electrodo. Esta presión positiva evita la obstrucción de la punta del capilar. Una vez introducido el electrodo en la cámara de registro se prepara el microscopio con el objetivo de 40x para poder visualizar el proceso gracias a la cámara de video sensible a infrarrojos y a la óptica de Nomarski. Una vez el electrodo está en la cámara de registro se aproxima este al tejido lentamente, directamente encima de una neurona adecuada identificada durante el proceso de aproximación. El electrodo se pone entonces ligeramente en contacto con la superficie de la membrana de la neurona. El contacto con la misma se confirma tanto visualmente como monitorizando la resistencia de entrada del electrodo, que cambia al entrar en contacto con la membrana celular. Una vez en contacto con la célula se aplica presión negativa al electrodo para succionar ligeramente la membrana celular, formando la configuración de “gigasello”, en la que toda la punta del electrodo queda taponada por la membrana celular. Una vez conseguida esta configuración se continúa aplicando presión negativa hasta conseguir romper la membrana celular en la punta del electrodo. En caso de haberse realizado correctamente toda la operación tendremos una situación en la que el interior del capilar quedaría en contacto directo con el citoplasma, formando un continuo entre el electrodo y la neurona, quedando en configuración de *whole-cell*.

Una vez estamos en configuración de *whole-cell* se puede mantener el registro en modo de *voltage-clamp* (fijación experimental del voltaje de membrana y medición de las corrientes de membrana) o de

current-clamp (medición de los cambios de voltaje de membrana). Para realizar registros de fijación de voltaje es necesario el uso de dos electrodos, uno para inyectar corriente para mantener el potencial de membrana y otro para registrar el voltaje, de modo que la corriente inyectada es igual a la corriente total que en ese momento pasa a través de la membrana de la célula, pero de signo contrario.

No se corrigió el potencial de unión del electrodo de registro intracelular. Este potencial de unión fue de aproximadamente +20 mV.

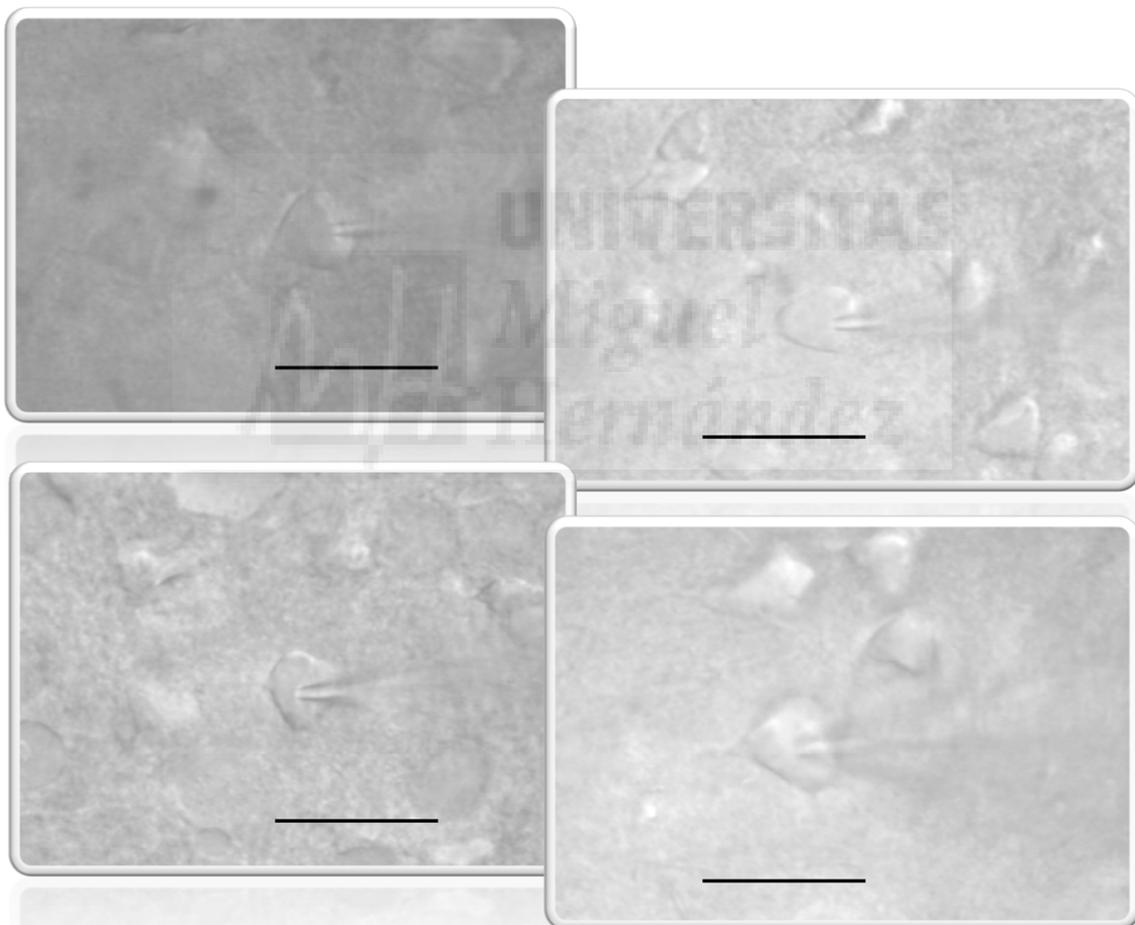


Figura M.6. Ejemplos de registro Intracelular.

En la imagen superior podemos observar varias fotos de células con el electrodo de registro superpuesto a las mismas y preparado para entrar en configuración de whole-cell. Barras de escala de 50 μm .

3.-OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron registros tanto extracelulares, como intracelulares en *voltage-clamp* y *current-clamp*, obtenidos todos con un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments, USA). Los registros se obtuvieron con una digitalización de 20KHz con un convertidor analógico-digital de 16 bits de resolución (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA). La generación de pulsos y la adquisición de datos se controlaron con el software pClamp 9.2 (Axon Instruments, USA). Para el cálculo de las latencias de la actividad se utilizó el programa WinWCP (Windows Whole Cell Program, Strathclyde University, Glasgow). Con este programa es posible detectar de manera automatizada las ocurrencias de actividad electrofisiológica y determinar diversas características de la misma. Para estos análisis se automatizó la detección para identificar como actividad electrofisiológica cualquier cambio del potencial de campo que implicara al menos un 10 por ciento del cambio máximo del potencial de campo en cada barrido de 30 segundos (ver figura M.7). En ocasiones, debido al ruido ocasionado por la actividad neuronal de fondo, era necesario aumentar este rango de detección hasta el 20 o 30 por ciento del cambio máximo de potencial extracelular negativo detectado, aunque esto apenas influye en las medidas de latencia ya que la caída de potencial extracelular suele ser muy rápida en las descargas sincrónicas utilizadas para los análisis.

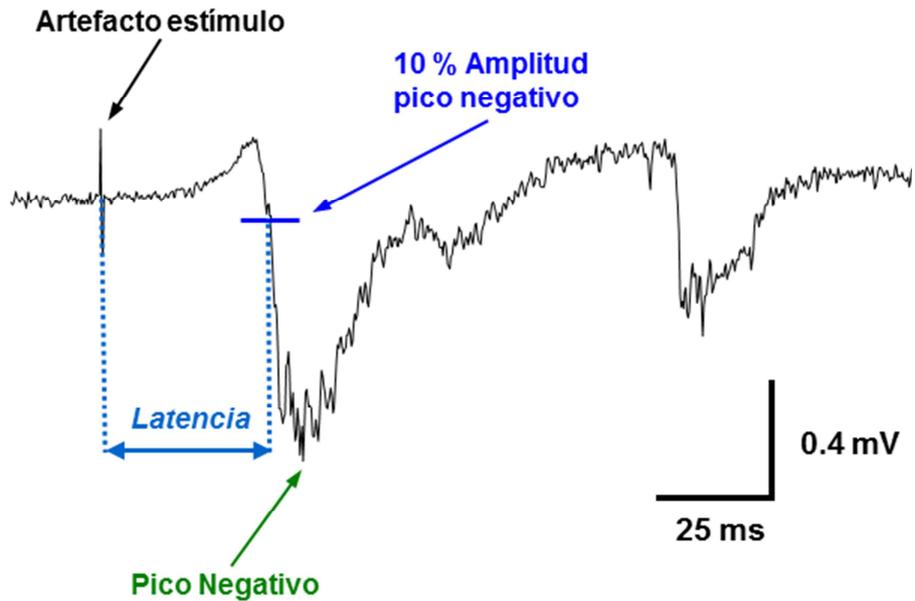


Figura M.7. Análisis de latencias.

Se muestran los parámetros utilizados para la medida y análisis de las latencias de la actividad sincrónica evocada.

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando la *t* de Student, para muestras pareadas o no pareadas según el caso, aplicando previamente una prueba de normalidad y similitud de varianzas para determinar la adecuación de la prueba a los datos. En caso de que los grupos de datos no pasaran el test de normalidad o el de similitud de varianzas se utilizaron los test no paramétricos de Mann-Whitney para muestras no pareadas o el test de Wilcoxon para las muestras pareadas. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SigmaStat 3.11 (Systat Software Inc.). Excepto donde se indique lo contrario los datos se presentan como media \pm error estándar. Se realizaron espectros de frecuencias y correlaciones cruzadas con el programa Clampfit 9.2 (Axon Instruments Inc) para estudiar la frecuencia de disparo de la actividad oscilatoria y la sincronización de la actividad entre registros simultáneos en diferentes regiones corticales.

Para las representaciones gráficas de los datos y las figuras con registros de ejemplo se utilizó el programa Origin 6.0 (Microcal, USA).

4.-AGENTES FARMACOLÓGICOS

Se detallan a continuación los diversos agentes farmacológicos utilizados en los experimentos. La bicuculina, a una concentración de 10 μ M, se aplica en todos los experimentos. Dado que la bicuculina se aplica en todas las rodajas y es necesaria para la generación de la actividad objeto de estudio consideraremos a partir de este momento que la aplicación de la misma al flujo de solución con el que se perfunde la rodaja es nuestra situación control.

		<i>Distribuidor</i>
Bicuculina	Antagonista selectivo de receptores GABA _A	Sigma-Aldrich
CGP55485	Antagonista Selectivo de receptores GABA _B	Tocris
Serotonina	Neuromodulador	Sigma-Aldrich
DOI	Agonista selectivo de receptores 5-HT _{2A}	Sigma-Aldrich
CP93129	Agonista selectivo de receptores 5-HT _{1B}	Tocris
8-OH-DPAT	Agonista selectivo de receptores 5-HT _{1A}	Sigma-Aldrich
WAY 100135	Antagonista selectivo de receptores 5-HT _{1A}	Sigma-Aldrich

Tabla M.4. Agentes farmacológicos.

Todos los agentes farmacológicos se preparan previamente a su utilización diluyéndose en agua ultradestilada a 1000 veces la concentración final de uso, excepto el CGP35348 que se diluye en DMSO. Una vez preparados se alicuotan y se congelan hasta el momento de usarlos. Ninguna de las alicuotas se vuelve a congelar una vez descongelada, desechándose el sobrante.

5.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA CONECTIVIDAD INTERHEMISFÉRICA

Para confirmar la supervivencia de fibras callosas que conectaran ambos hemisferios cerebrales en nuestra preparación realizamos diversos marcajes con Dil en algunas de las rodajas utilizadas en los experimentos.

El Dil (Sigma-Aldrich) es un trazador retrógrado lipofílico que se incorpora a las membranas celulares del tejido en incubación, confiriéndole fluorescencia roja. Para su utilización en primer lugar se fijaron las rodajas a marcar con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (Phosphate Buffered Saline). Después de dos días a 4°C para que el tejido se fijase bien se procedió a la colocación del Dil con una aguja de Tungsteno. El Dil se colocó en la corteza cingular medial de uno de los hemisferios, para asegurarnos que las fibras marcadas eran fibras de proyección de un hemisferio al hemisferio contralateral. Después de colocar el Dil se dejaron las rodajas en la incubadora a 37°C durante 3 semanas para favorecer el marcaje. Posteriormente se lavaron las rodajas con PBS y se procedió a la visualización del marcaje con una lupa Leica MZ16FA con iluminación y filtros de fluorescencia, como se puede ver en los ejemplos de la figura M.8.

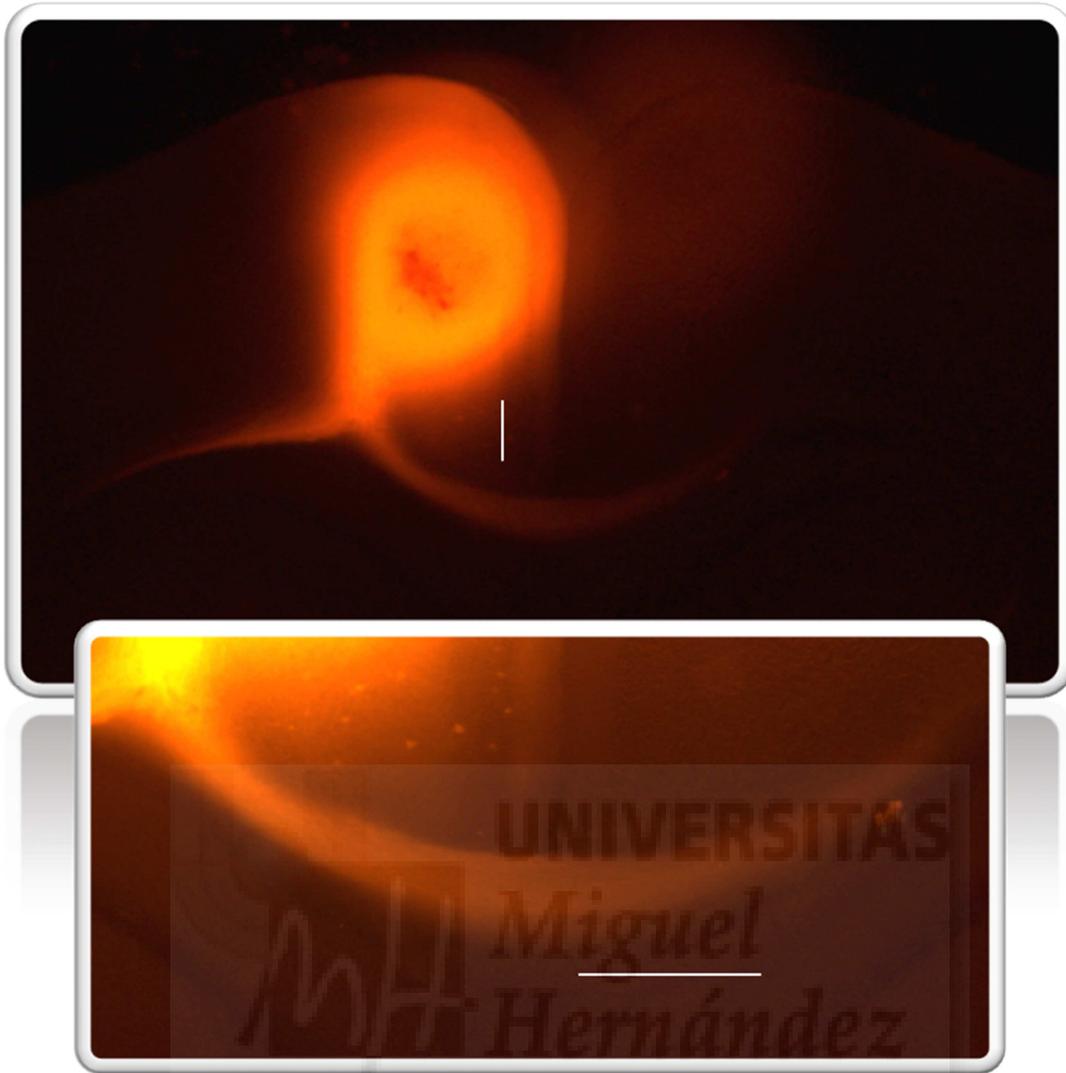


Figura M.8.- Proyecciones callosas desde la corteza cingular.

En la figura podemos observar dos fotografías de una rodaja marcada con Dil. En la foto superior podemos observar en el hemisferio donde se colocó el Dil un fuerte marcaje que se propaga por el cuerpo calloso y proyecta hacia el hemisferio contralateral (rodaja equivalente al esquema coronal 22 del atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001), ratón postnatal de 14 días, 12 aumentos). En la foto inferior podemos observar otra fotografía de la misma rodaja en la que podemos apreciar la proyección en el cuerpo calloso a mayor ampliación (misma rodaja, 47 aumentos). Barras de escala de 300 μ m.

RESULTADOS

El propósito de este trabajo es el estudio de la propagación de la actividad eléctrica por la capa II/III de la corteza cingular del ratón tras el bloqueo de los receptores inhibidores GABA_A, y el papel del cuerpo calloso en la propagación entre hemisferios de esta actividad.

1.- RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS REGISTRADAS EN LA REGIÓN SUPERFICIAL DE LAS CAPA II/III DE LA CORTEZA CINGULAR

En nuestro modelo de rodajas coronales de corteza cingular con el cuerpo calloso conservado y perfundidas con solución extracelular modificada (5mM K⁺ y 1.2 mM Ca⁺⁺, ver métodos) y bloqueantes de receptores GABA_A (bicuculina 10μM) y, ocasionalmente, de GABA_B (CGP55845 1μM) hemos registrado, mediante electrodos de registro extra e intracelular, varios tipos de actividad electrofisiológica (figura R.1). Esta actividad electrofisiológica, que puede tanto ser evocada por la estimulación eléctrica de la capa I de la corteza cingular o del cuerpo calloso como ser generada de manera espontánea por la rodaja, refleja el disparo sincrónico de potenciales de acción en neuronas corticales en las condiciones descritas anteriormente (figura R.11). Todos los experimentos se han realizado situando dos electrodos de registro simultáneamente en diferentes posiciones de la zona superficial de la capa II/II de la corteza cingular de rodajas de ratón de entre 14 y 20 días de edad (ver métodos, figura M.4). Excepto donde se especifiquen otras condiciones experimentales todos los experimentos se han realizado en las condiciones de desinhibición parcial de la rodaja (5mM K⁺, bicuculina 10μM) y está se considerará nuestra condición de registro control.

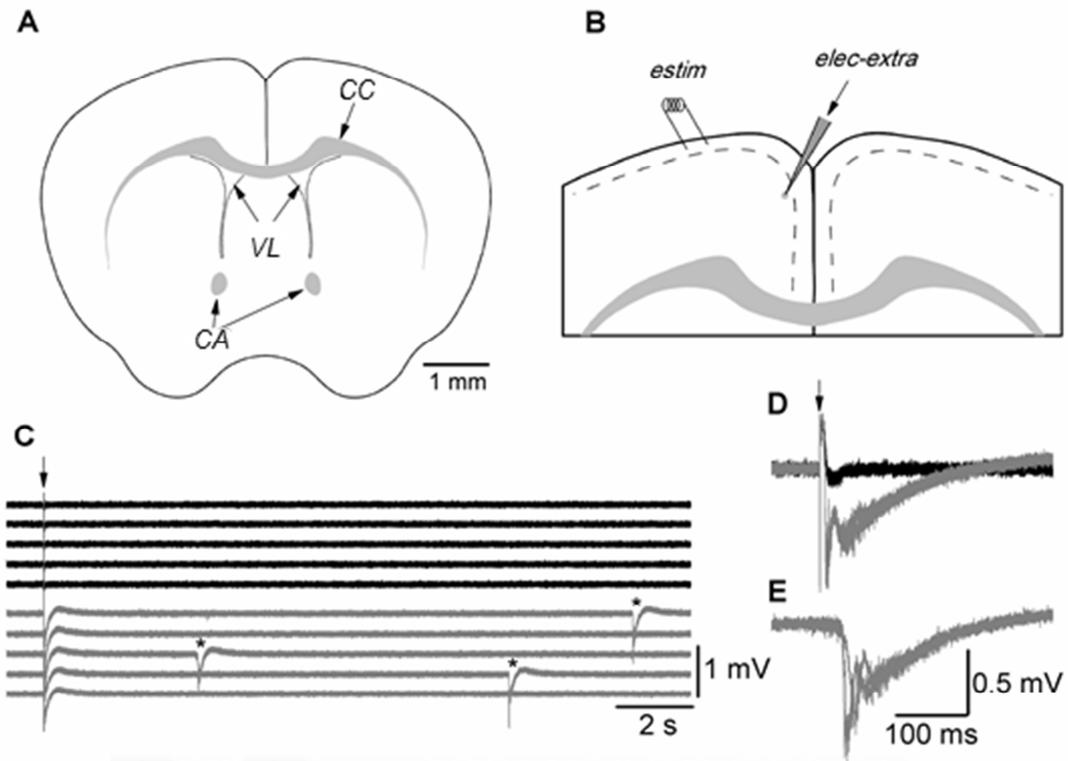


Figura R.1. Descargas sincrónicas registradas en presencia de bicuculina 10 μ M.

A. Esquema coronal de una rodaja de cerebro de ratón correspondiente al nivel rostro-caudal 24 (0.86 mm del bregma) del atlas de cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001). CC: Cuerpo calloso, VL: Ventrículo lateral, CA: Comisura anterior. **B.** Ampliación de la región medial y dorsal del córtex, incluyendo el cuerpo calloso, donde se muestra la posición del electrodo de estímulo (*estim*) y un electrodo de registro extracelular (*elec-extra*). Las líneas punteadas muestran el límite de la capa I. **C.** Ejemplos de registros obtenidos en esta preparación con un electrodo extracelular situado en la posición indicada en *B* (*elec-extra*); el artefacto de estímulo se muestra con una flecha. Los cinco trazados superiores (en negro) muestran registros obtenidos en solución extracelular modificada. Los cinco trazados inferiores (en gris) muestran registros obtenidos después de 10 minutos de perfusión con bicuculina 10 μ M; se aprecia la presencia de descargas sincrónicas evocadas y espontáneas (asteriscos). **D.** Descargas sincrónicas evocadas mostradas en *C*, ampliadas en las escalas de voltaje y temporal. **E.** Descargas sincrónicas espontáneas mostradas en *C* y marcadas con asteriscos, sobreimpuestas y ampliadas en las escalas de voltaje y temporal. Registros obtenidos de rodajas de un ratón P16.

En todas las rodajas estudiadas, en presencia de bicuculina $10\mu\text{M}$, la aplicación de un estímulo eléctrico de entre 100 a $300\ \mu\text{A}$ de 0.1 ms de duración en la capa I de la zona dorso-medial de la corteza evocó una clara respuesta sincrónica de las neuronas cercanas al electrodo de registro. Esta concentración de bicuculina produce un bloqueo parcial de los receptores de GABA_A (Connors y cols, 1988) con lo que se elimina parte del sistema inhibitor cortical (Trevelyan y cols, 2006). En la figura R.2 podemos observar ejemplos de la actividad extracelular evocada en estas condiciones experimentales de desinhibición parcial. Todas las respuestas consistieron en una onda negativa inicial de entre 50 y 150 milisegundos de duración y de entre 0.5 a 1 mV de amplitud, con una caída rápida del potencial y una latencia de aparición dependiente de la distancia del electrodo de registro con respecto al electrodo de estímulo (figura R.2, F). Esta descarga sincrónica inicial era seguida en algunos registros por un segundo componente negativo de mayor duración y morfología variable (figura R.2, B, C). Este componente secundario incluía en ocasiones un periodo prolongado de postdescargas oscilatorias (0.89 ± 0.02 segundos, $n=263$ postdescargas oscilatorias, Figura R.2, D). La frecuencia promedio de estas postdescargas oscilatorias fue de 13.3 ± 0.3 Hz, y aparece en el 34% de las rodajas estudiadas (figura R.2, panel E; $n=99$ rodajas).

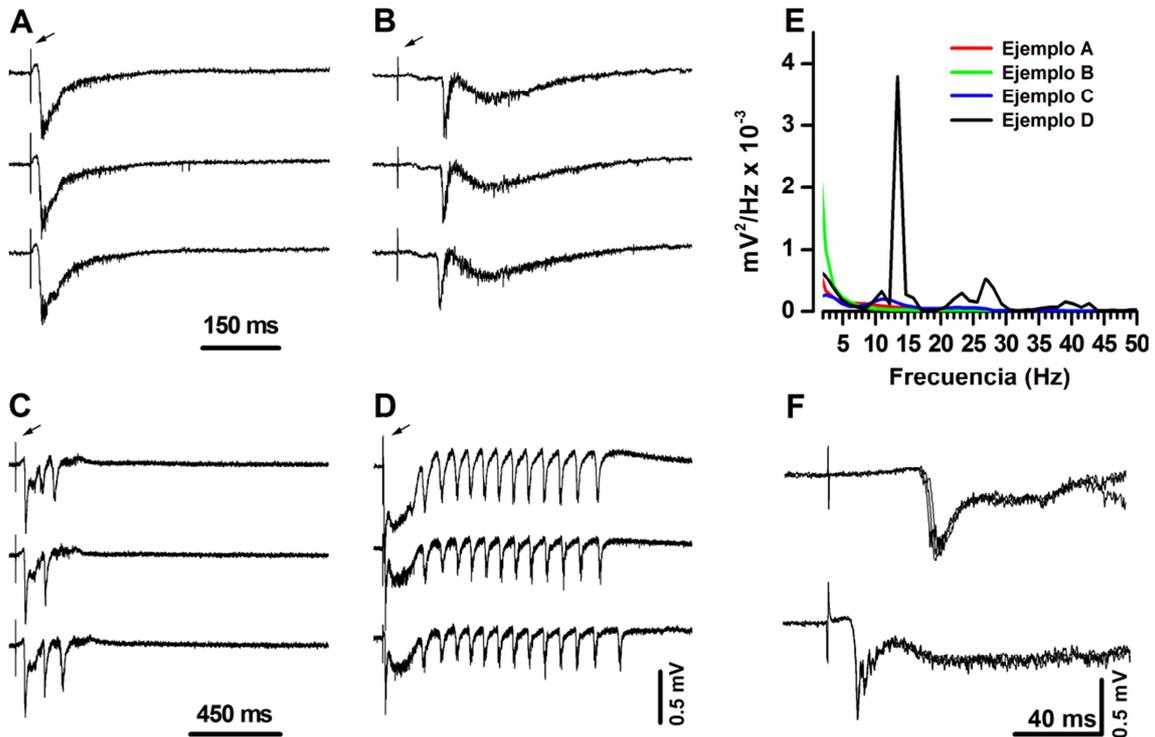


Figura R.2. Respuestas extracelulares registradas en la capa II/III de la corteza cingular evocadas por la estimulación eléctrica de la capa I.

A-D. Ejemplos de descargas sincrónicas en la capa II/III de rodajas coronales de la corteza cingular evocadas por la estimulación eléctrica de la capa I (flechas señalando el artefacto de estímulo, un estímulo cada 30 segundos, 0.033Hz) en presencia de bicuculina 10 μ M. **D.** Ejemplo de descarga sincrónica evocada con postdescargas oscilatorias, realizadas en las mismas condiciones que los registros de los paneles anteriores. En cada panel se muestran tres respuestas consecutivas. **E.** Espectro de frecuencias de los ejemplos de actividad; El análisis se ha realizado en un segmento de 1.2 segundos después de la descarga sincrónica evocada. **F.** Descarga inicial de los ejemplos en C (parte superior del panel) y D (parte inferior del panel) con la escala temporal ampliada y superpuestas.

1.1.- Descargas sincrónicas de aparición espontáneas.

Además de las descargas sincrónicas evocadas por la estimulación de la capa I descritas anteriormente, se observó la presencia de descargas sincrónicas de aparición espontánea en un alto porcentaje de las rodajas. En 84 de las 99 rodajas estudiadas en estas condiciones observamos la presencia de al menos una descarga sincrónica de aparición espontánea en los primeros cinco minutos de registro. Éstas suelen tener la misma morfología y duración que las descargas sincrónicas evocadas en el mismo registro, como podemos observar en la figura R.3.

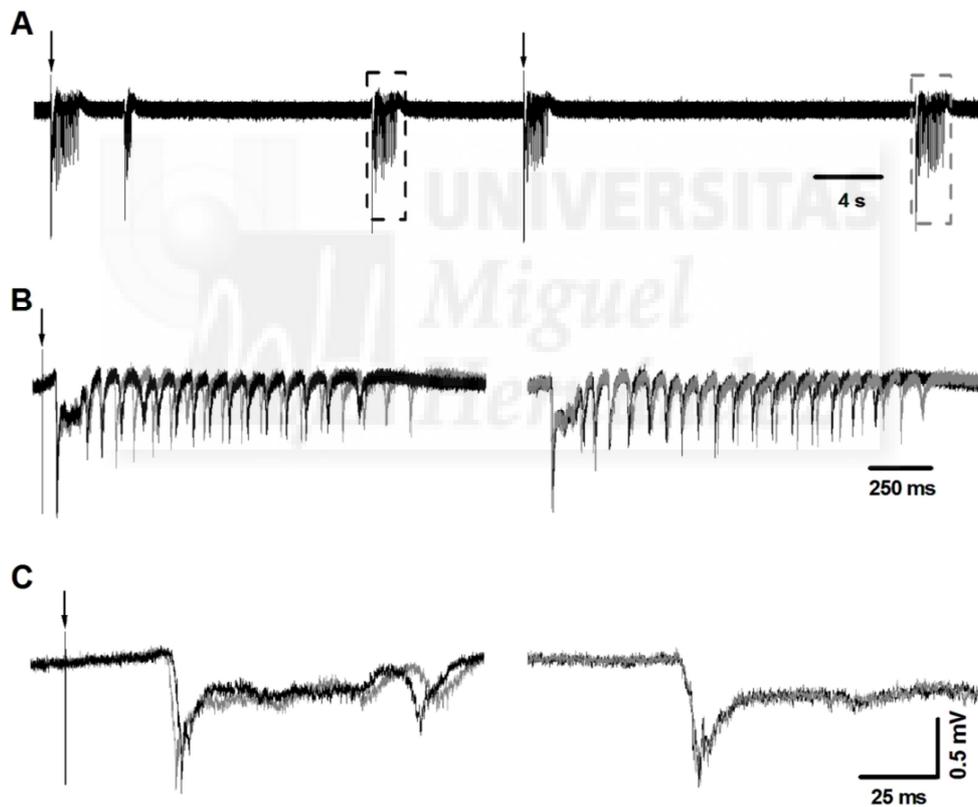


Figura R.3. Ejemplos de actividad evocada por estimulación eléctrica y actividad espontánea en la rodaja.

A. Ejemplo de 60 segundos de registro con descargas sincrónicas evocadas (artefacto de estímulo marcado con una flecha) y descargas sincrónicas espontáneas (encuadres). **B.** Se muestran superpuestas y ampliadas las descargas evocadas, a la izquierda, y las dos descargas espontáneas resaltadas en A, a la derecha. Las descargas han sido alineadas con respecto al estímulo y al inicio de la descarga sincrónica inicial, respectivamente. **C.** Ampliación de la escala temporal de las descargas sincrónicas mostradas en B. Se muestran en gris las ampliaciones de las descargas sincrónicas ocurridas tras el segundo estímulo.

En nuestros experimentos en condiciones control el porcentaje de rodajas con descargas sincrónicas espontáneas es alto independientemente de la edad de los ratones (figura R.4, panel A) y de la situación rostro-caudal de las rodajas utilizadas como muestra experimental (figura R.4, panel B).

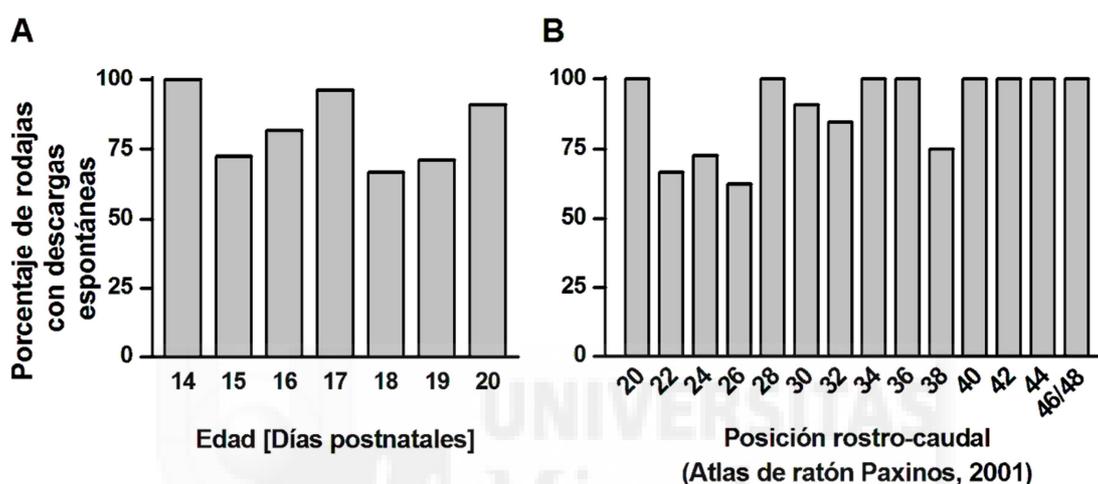


Figura R.4. Rodajas con descargas sincrónicas espontáneas.

A. Porcentaje de rodajas con descargas sincrónicas espontáneas según la edad del ratón ($n=6-26$, 99 rodajas en total). **B.** Porcentaje de rodajas con descargas sincrónicas espontáneas según la posición antero-posterior de la rodaja respecto al bregma ($n=1-16$, 99 rodajas en total).

Para analizar la frecuencia de aparición de estas descargas espontáneas eliminamos 5 segundos de cada registro comenzando en el artefacto de estímulo (figura R.5, panel A). Esto eliminaba tanto la descarga evocada por la estimulación eléctrica como las posibles descargas espontáneas inmediatamente posteriores a la evocada que podrían estar directamente producidas por la activación cortical ocasionada por la estimulación eléctrica experimental (Trevelyan y cols, 2006). La frecuencia promedio de aparición de actividad espontánea en las rodajas es de 0.019 ± 0.002 Hz ($n=79$). Como podemos observar en

el histograma de frecuencias de la figura R.5, panel B, en la mayoría de las rodajas la frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas es inferior a 0.03 Hz (82.3%, n=79 rodajas), menor que la frecuencia de estimulación experimental (0.033 Hz). Al analizar estas frecuencias de aparición de las descargas sincrónicas espontáneas no encontramos diferencias significativas al agrupar los datos según la edad del ratón o la posición rostro-caudal de la rodaja utilizada (test de normalidad de los datos no superado, ANOVA por rangos, n= 2-5 ratones, 28 total, n= 2-9 rodajas, 79 en total).

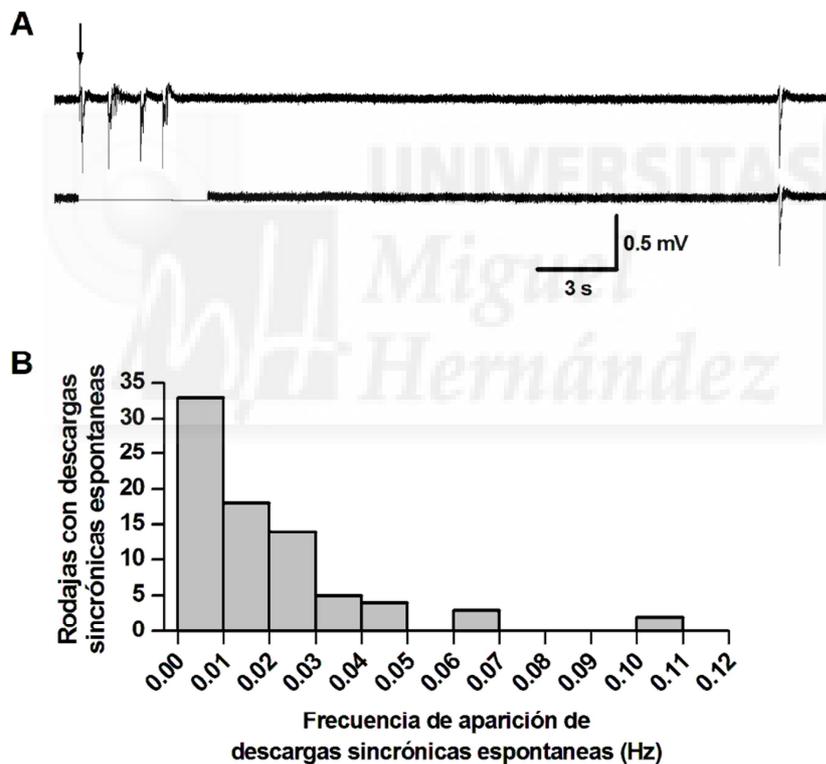


Figura R.5. Frecuencia de aparición de las descargas sincrónicas espontáneas.

A. Se muestran 30 segundos de barrido continuo donde se puede observar la descarga evocada por el estímulo (flecha negra) y varias descargas espontáneas. Debajo se puede observar el mismo registro con 5 segundos eliminados, comenzando en el estímulo e incluyendo a este (ver texto). **B.** Histograma de la frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas en las rodajas (n=79 rodajas).

Dado que la mayoría de nuestros registros duran menos de 60 minutos realizamos registros de larga duración para comprobar cualquier posible efecto en la frecuencia de aparición de las descargas sincrónicas espontáneas de la aplicación continuada de la bicuculina y de la estimulación eléctrica de la rodaja. Como podemos observar en la figura R.6 se aprecia un importante aumento de la frecuencia de aparición de las descargas sincrónicas espontáneas durante estos registros, desde valores cercanos a 0.03 Hz hasta aproximadamente 0.15 Hz tras 120 minutos de aplicación continua de bicuculina y estimulación eléctrica a 0.033 Hz.

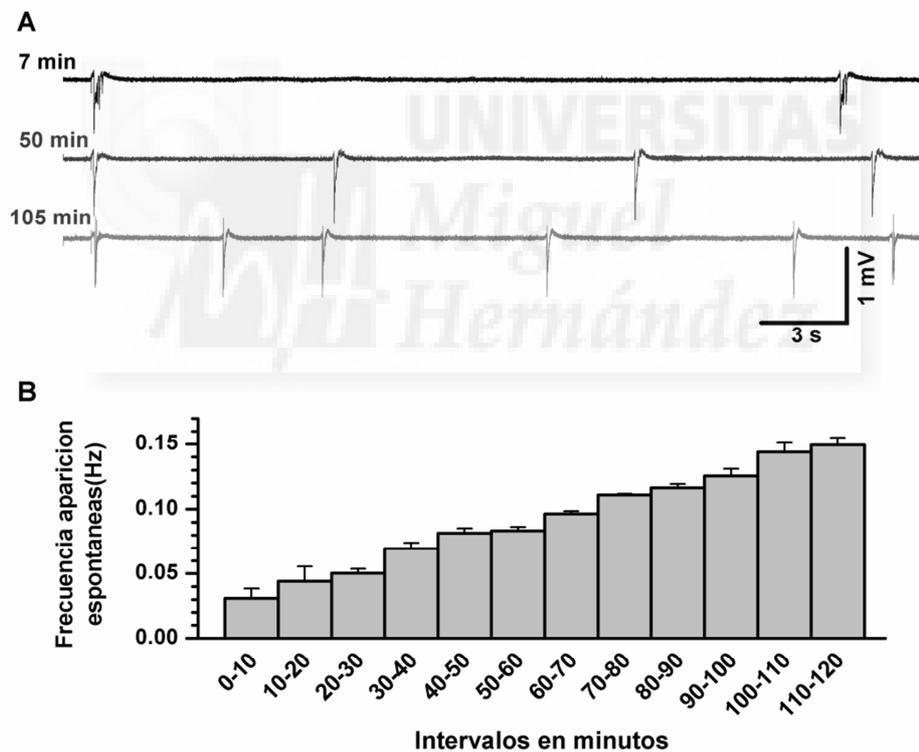


Figura R.6. Aumento de la frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas.

A. Se muestran tres barridos en diferentes momentos de un registro de 120 minutos continuo en las condiciones control. **B.** Promedio de la frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas durante 120 minutos de registro en las condiciones control (n= 4 registros, 2 rodajas, 2 ratones de 14 y 16 días de edad).

1.2.- Postdescargas oscilatorias.

En algunas de las rodajas las descargas sincrónicas se componían tanto de la onda negativa inicial como de una fase de actividad oscilatoria posterior, como se puede apreciar en el panel D de la Figura R.2. Esta actividad oscilatoria, o postdescargas oscilatorias, tiene una duración variable y se compone de varias ondas negativas rápidas, desde cuatro a más de veinte ondas similares a la onda negativa inicial, aunque de menor amplitud y duración, en un periodo de tiempo promedio de 0.89 ± 0.02 segundos ($n=263$ descargas evocadas con postdescargas oscilatorias). Encontramos estas postdescargas oscilatorias en 34% de las rodajas ($n=99$). Al considerar los ratones como muestra la probabilidad de aparición de estas postdescargas oscilatorias es del 58.8% ($n=34$). Como podemos observar en la figura R.7 la probabilidad de obtener registros con postdescargas oscilatorias en las descargas sincrónicas evocadas depende claramente de la edad del ratón. En el intervalo de edades usado en nuestros experimentos la aparición de postdescargas oscilatorias es mayor cuanto más joven es el ratón del que obtienen las rodajas. La probabilidad de aparición de postdescargas oscilatorias se reduce drásticamente en los ratones de mayor edad.

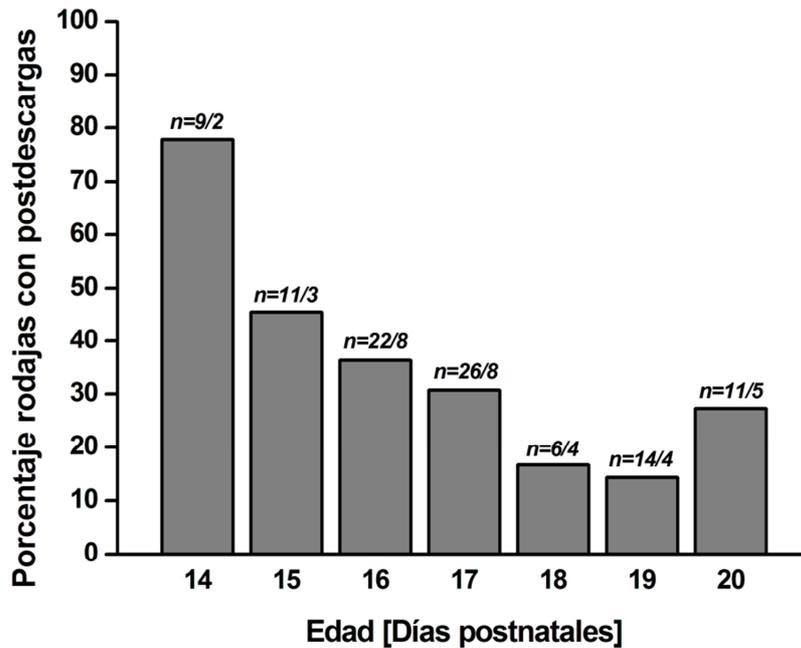


Figura R.7. Porcentaje de rodajas con actividad oscilatoria en las descargas sincrónicas evocadas.

Se muestra el porcentaje de rodajas, divididas por edad, en los que al menos hubo un caso de actividad evocada con postdescargas (n=rodajas/ratones).

Como hemos visto en la figura R.3 las postdescargas que aparecen en la actividad espontánea son, en muchos casos, similares en forma y duración a las postdescargas de la actividad evocada del mismo registro. Además en la gran mayoría de los registros en los que aparecían postdescargas en la actividad evocada también aparecían postdescargas en la actividad espontánea (91.2% de las rodajas con postdescargas evocadas y actividad espontánea, n=34). Como cabría esperar viendo estas similitudes entre las postdescargas de la actividad evocada y la espontánea el porcentaje de rodajas con postdescargas en la actividad espontánea también parece dependiente de la edad del ratón utilizado para la realización de los experimentos, como se puede ver en la figura R.8. Esta relación es prácticamente la misma que la observada en las postdescargas en la actividad evocada.

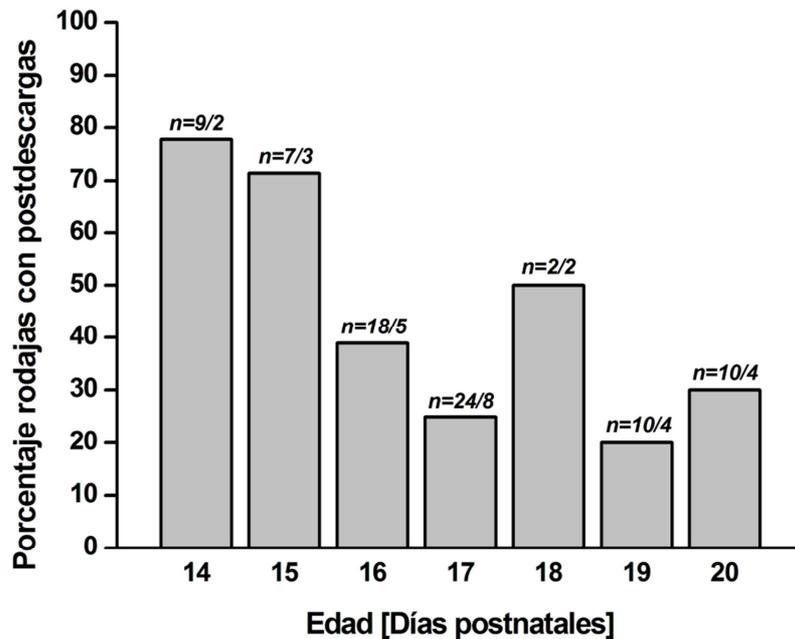


Figura R.8. Porcentaje de rodajas con actividad oscilatoria en las descargas sincrónicas espontáneas.

Se muestra el porcentaje de rodajas, divididos por edad, en los que hubo al menos un caso de actividad espontánea con postdescargas (n =rodajas/ratones).

1.3.- Efecto del bloqueo de los receptores de GABA_B.

La aplicación de un antagonista selectivo de los receptores GABA_B (CGP 55845 1 μ M) en rodajas sin postdescargas oscilatorias en la situación control generó, en todos los casos ($n=5$, ver figura R.9), la aparición de las mismas. Los receptores GABA_B son receptores metabotrópicos transmembrana que controlan la apertura de canales de potasio a través de la activación de proteínas G, además de poder reducir la conductancia al calcio y la activación de las adenilciclasas que funcionan como segundos mensajeros celulares. La aplicación del CGP 55485 1 μ M genera postdescargas que se reflejan como un pico en la banda de 19 Hz al calcular el espectro de frecuencias (fig. R.9, panel D).

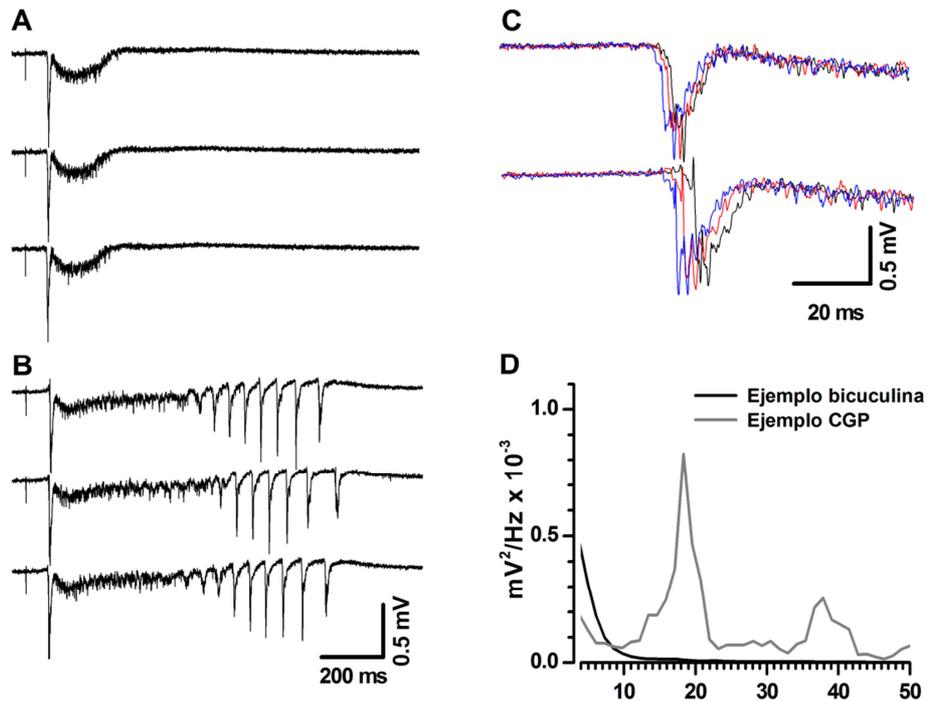


Figura R.9. Efectos del bloqueo completo de la inhibición GABAérgica en las rodajas.

A. Ejemplo de tres barridos consecutivos con descargas sincrónicas evocadas sin postdescargas en condiciones control de un ratón P20. **B.** Ejemplo de tres registros consecutivos en la misma rodaja y posición que en (A), después de 5 minutos en solución control + CGP 55485 $1\mu\text{M}$. Se puede observar la aparición de postdescargas. **C.** Ampliación de la descarga sincrónica inicial y superposición de los tres barridos en cada condición experimental. Los tres barridos superiores corresponden a los barridos en (A) y los tres inferiores a (B). **D.** Espectro de frecuencias del registro de ejemplo, en las condiciones control y aplicación de CGP.

Como hemos comentado previamente la frecuencia de las postdescargas oscilatorias en los registros en las condiciones control es de 13.3 ± 0.3 Hz. Como podemos observar en la figura R.10 las frecuencias de las postdescargas de la actividad evocada es igual a la de las postdescargas de la actividad espontánea. En cambio en los registros en los que se generan las postdescargas oscilatorias aumentando la desinhibición de la rodaja con CGP 55845 $1\mu\text{M}$ la frecuencia es de 19.7 ± 1 Hz, mayor que en las postdescargas con desinhibición parcial. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.001$, t de Student).

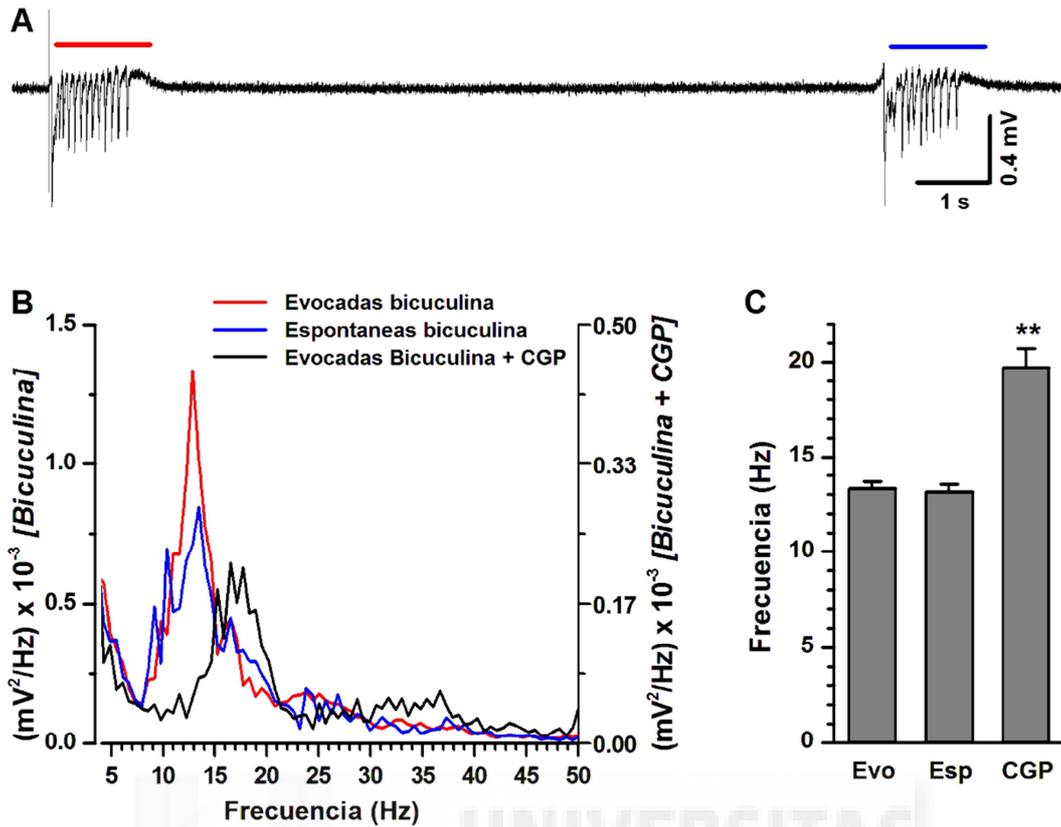


Figura R.10. Frecuencia de disparo de la fase oscilatoria de las descargas sincrónicas.

A. Ejemplo de registro en las condiciones de desinhibición parcial (bicuculina $10\mu\text{M}$) con postdescargas en la descarga evocada (barra roja) y en la descarga espontánea (barra azul). **B.** Se muestra el promedio del espectro de frecuencias de las postdescargas de la actividad evocada y espontánea en las condiciones de desinhibición parcial con bicuculina $10\mu\text{M}$ y de las postdescargas de la actividad evocada en presencia de bicuculina $10\mu\text{M}$ y CGP $55845\ 1\mu\text{M}$. Se ha multiplicado por tres la escala [bicuculina + CGP]. **C.** Promedios de la frecuencia de disparo de las postdescargas. Se muestran los datos de las rodajas con registros en el hemisferio estimulado (** $p < 0.001$, $\alpha = 0.05$, t de Student, diferencias entre las postdescargas oscilatorias evocadas con bicuculina $10\ \mu\text{M}$ y las postdescargas oscilatorias evocadas con bicuculina $10\mu\text{M}$ y CGP $55845\ 1\mu\text{M}$, $n = 13$ y 3 rodajas respectivamente).

1.4- Respuestas electrofisiológicas intracelulares en la región superficial de la capa II/III de la corteza.

Realizamos varios registros intracelulares y extracelulares simultáneos para estudiar la correspondencia entre el cambio del potencial de campo registrado extracelularmente y la actividad intracelular de las neuronas individuales. Todos los registros intracelulares se han realizado en las condiciones control y, ocasionalmente, CGP 55845 $1\mu\text{M}$, estimulando en el cuerpo calloso y registrando en la capa II/III de un hemisferio mientras se registraba la actividad extracelular en el otro hemisferio. Como podemos ver en la figura R.11 la actividad registrada extracelularmente se corresponde al disparo de potenciales de acción de forma sincrónica por neuronas corticales en la zona registrada.

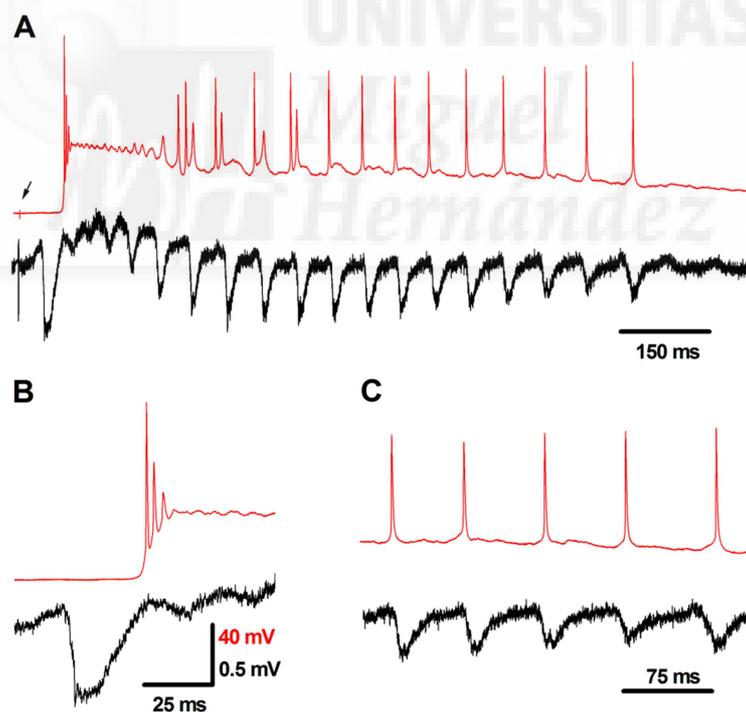


Figura R.11. Registro intracelular y extracelular simultáneo.

A. Ejemplo de un registro simultáneo Intracelular en current clamp (trazado rojo, hemisferio contralateral al estímulo) y extracelular (trazado negro, hemisferio ipsilateral al estímulo) de actividad evocada por la estimulación del cuerpo calloso a la altura del giro cingulado (ver métodos). **B.** Ampliación en la escala temporal de la descarga inicial. **C.** Ampliación en la escala temporal de la actividad oscilatoria asociada a la descarga inicial.

Este método de registro nos permitió comprobar los efectos en la conductancia de membrana de las células registradas al evocar la actividad sincrónica. Para esto aplicamos CGP 55845 $1\mu\text{M}$ a varias rodajas y registramos, aplicando pulsos de corriente hiperpolarizante de 50pA de intensidad y 0.1 ms de duración cada diez segundos aproximadamente, los cambios en la conductancia de membrana de la neurona registrada. La figura R.12 muestra dos ejemplos de registros con descargas sincrónicas evocadas con postdescargas oscilatorias de diferentes duraciones. En el caso de las descargas sincrónicas evocadas con postdescargas oscilatorias cortas, de menos de 2 segundos de duración, la conductancia de membrana de las neuronas implicadas, medida menos de diez segundos después del inicio de la descarga evocada, no se ve modificada significativamente. En cambio en el caso de las descargas sincrónicas evocadas con postdescargas oscilatorias largas, de entre 3 y 5 segundos de duración, reduce la conductancia de membrana de la neurona durante al menos los siguientes 10 segundos ($p=0.014$, t de Student para muestras pareadas, $n=3$, ver figura R.12), aunque la membrana recupera valores de conductancia similares a los valores de reposo en aproximadamente 20 segundos. Nuestra frecuencia de estimulación, 1 estímulo cada 30 segundos, permite la recuperación de la conductancia de membrana hasta un estado de reposo entre las descargas sincrónicas evocadas.

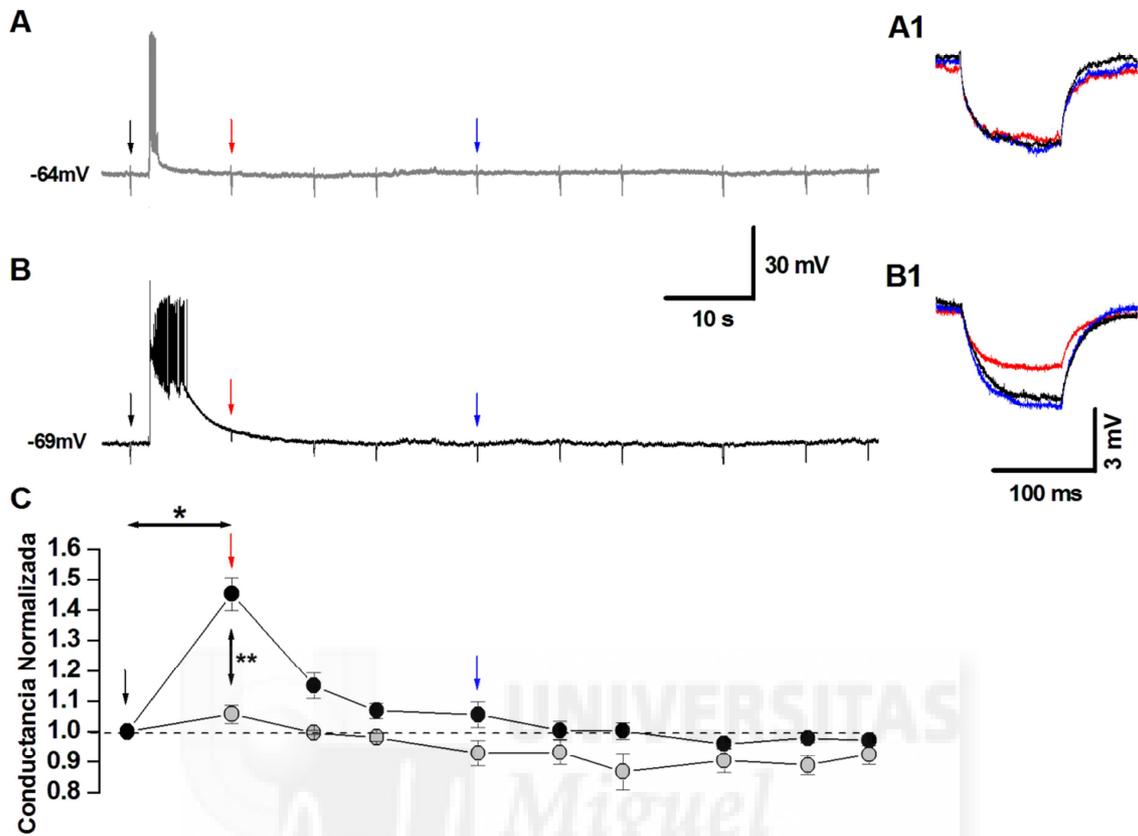


Figura R.12. Cambios en la conductancia de membrana causados por las descargas sincrónicas evocadas.

A. Ejemplo de 90 segundos de registro intracelular en current clamp con una descarga sincrónica evocada con postdescargas de corta duración. Rodaja coronal 24 (bregma 0.86 mm), ratón de 19 días de edad. **B.** Ejemplo de 90 segundos de registro intracelular en current clamp con una descarga sincrónica evocada con postdescargas de larga duración. Rodaja coronal 30 (bregma 0.14 mm), ratón de 19 días de edad (mismo ratón que en **A**). Se muestran en **A1 y B1** una ampliación del cambio en el voltaje de membrana debido a los pulsos de corriente de 50 pA aplicados cada 10 segundos aproximadamente en los registros mostrados en **A y B**, respectivamente. Los colores corresponden a los pulsos resaltados con flechas. **C.** Conductancia normalizada medida a partir del cambio de voltaje de membrana causado por los pulsos de corriente. (* $p=0.014$, ** $p<0.001$, t de student para muestras pareadas y t de student respectivamente, $n = 7$ para postdescargas cortas, $n=3$ para postdescargas largas).

2.- PROPAGACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS

En el apartado anterior hemos descrito diversas características de las descargas sincrónicas generadas en nuestro modelo experimental de rodajas perfundidas con una solución extracelular modificada (5mM K^+ y 1.2mM Ca^{++} , ver métodos) y la adición de bloqueantes de los receptores GABA. Los resultados que vamos a presentar a partir de este momento se han realizado en su totalidad en el modelo de desinhibición parcial y estimulación en la capa I de la zona dorsal de la corteza cingular (ver métodos). En este modelo experimental las descargas sincrónicas evocadas por la estimulación eléctrica se originan en regiones próximas al electrodo de estimulación y se propagan a lo largo de la capa II/III de la corteza paralelamente a la superficie pial. En las rodajas en las que se ha conseguido una buena conservación de las fibras del cuerpo calloso se puede observar también la propagación de estas descargas sincrónicas hacia el hemisferio contralateral al estímulo. Para el estudio de este fenómeno realizamos registros extracelulares simultáneos con dos electrodos situados en distintas posiciones de la capa II/III de la corteza cingular de ambos hemisferios, como en el ejemplo mostrado en el panel A de la figura R.13. Las descargas sincrónicas evocadas siempre aparecían en primer lugar en posiciones cercanas al estímulo propagándose por el resto de la corteza ipsilateral y posteriormente, con latencias mayores, al hemisferio contralateral al estímulo. Las descargas sincrónicas espontáneas, en cambio, pueden aparecer inicialmente en cualquier hemisferio, apareciendo primero en el hemisferio contralateral al estímulo en un 55% de las ocasiones y propagándose desde este al hemisferio ipsilateral al estímulo, como se ve en la figura R.13, panel F (porcentaje calculado con las rodajas con más de 10 ocurrencias de descargas sincrónicas espontáneas, $n=1229$ descargas sincrónicas espontáneas, 12 rodajas de 9 ratones diferentes).

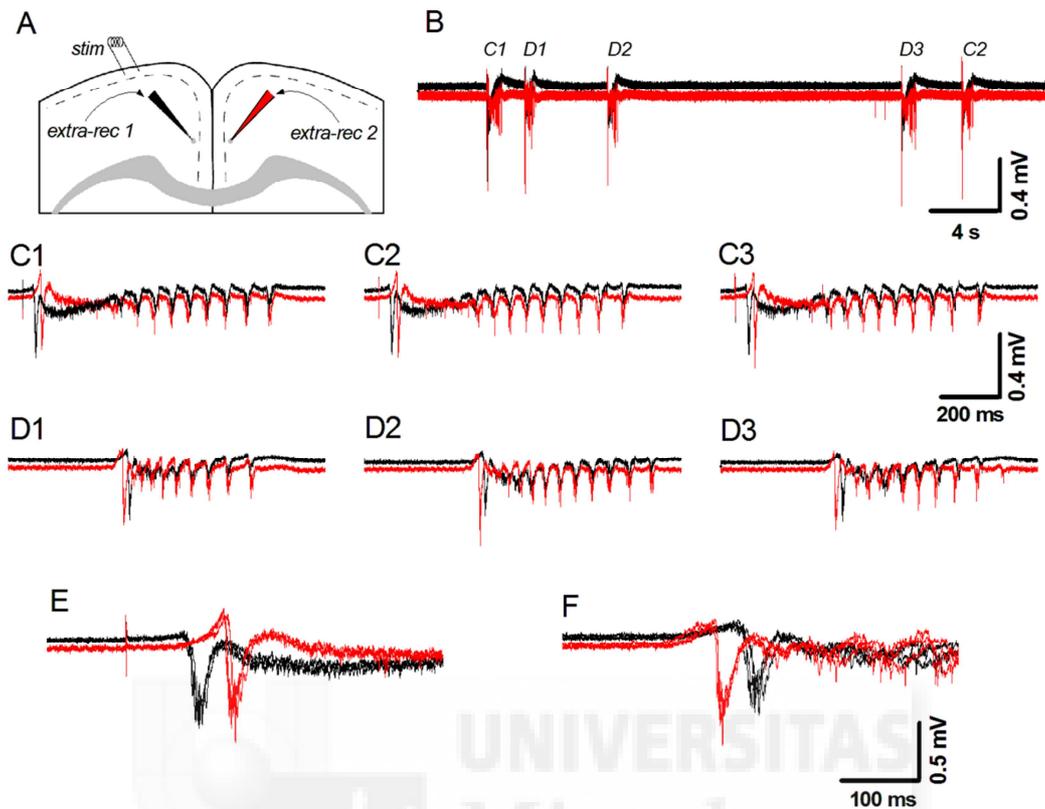
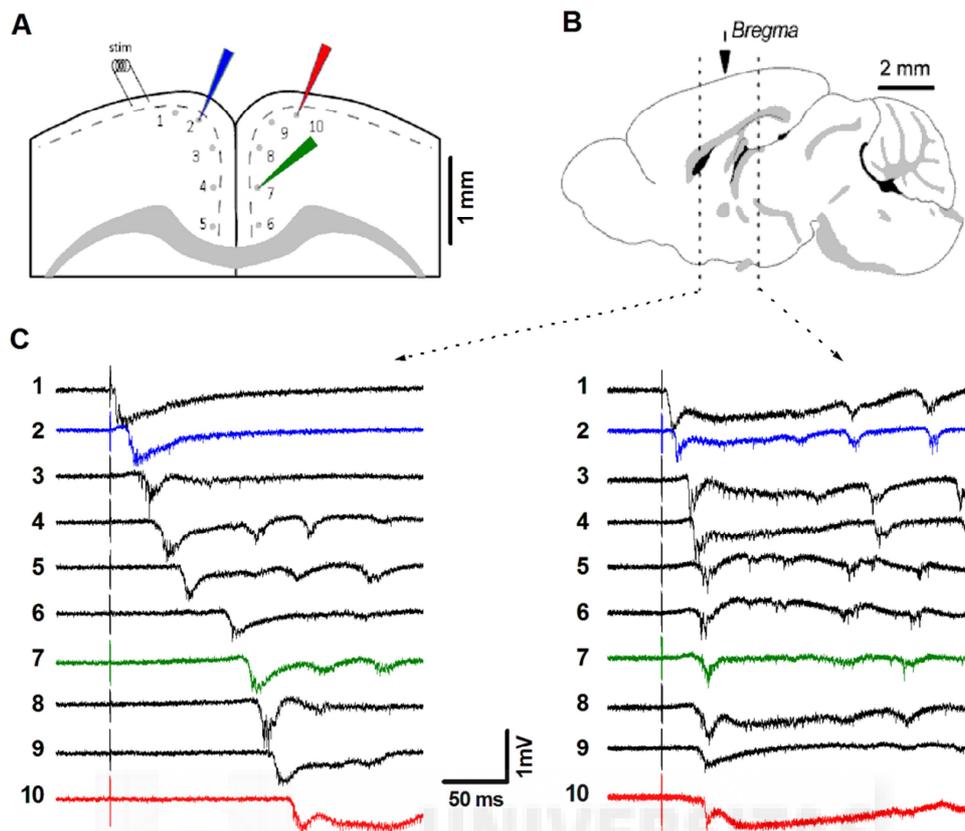


Figura R.13. Propagación interhemisférica de las descargas sincrónicas.

A. Esquema coronal de una rodaja con la posición del electrodo de estímulo y de los electrodos de registro. **B.** Ejemplo de registros simultáneos realizados con un electrodo en el hemisferio ipsilateral al estímulo (trazados en negro) y con un electrodo en el hemisferio contralateral al estímulo (trazados en rojo). En ambos registros se observan las descargas sincrónicas evocadas por la aplicación del estímulo eléctrico en la capa I (*C1* y *C2*) y varias descargas sincrónicas espontáneas (*D1-D3*). Las descargas sincrónicas evocadas y espontáneas se muestran a mayor escala temporal en los paneles **C1 – C3** y **D1 – D3**, respectivamente. La actividad evocada mostrada en *C3* se corresponde a la descarga sincrónica evocada inmediatamente posterior a *C2*, y no se muestra en el panel **A**. La fase inicial de las descargas evocadas y espontáneas se muestra, superpuesta, en los paneles **E** y **F** respectivamente. Registros realizados en un ratón P17 en presencia de bicuculina 10 μ M.

Para estudiar con detalle la propagación intracortical y entre hemisferios obtuvimos registros en varias posiciones preestablecidas de la región superficial de la capa II/III de la corteza cingular de ambos hemisferios en las rodajas coronales de ratón. Estas diez posiciones preestablecidas, cinco en el hemisferio estimulado y cinco en posiciones simétricas en el lado contralateral al estímulo, son equidistantes entre ellas y abarcan la región de corteza entre el electrodo de estímulo y la región ventral de la corteza más próxima al cuerpo calloso (figura R.14). En el ratón el tamaño de las capas corticales es diferente según la posición rostro-caudal de la rodaja utilizada con un estrechamiento de la zona ventral del córtex cingular según nos desplazamos a regiones más caudales. Debido a esto las distancias entre las posiciones de registro en cada nivel rostro-caudal no son exactamente las mismas. Se han tomado medidas de estas distancias y se utilizan los valores medios para el cálculo y la representación de cada grupo de registros. En el caso de las rodajas rostrales la distancia entre posiciones de registro se mantuvo en aproximadamente 440 μm , mientras en las rodajas más caudales la distancia entre las posiciones de registro es de aproximadamente 370 μm . Los registros obtenidos situando los dos electrodos de registro en varias de estas posiciones preestablecidas y realizando mediciones de las descargas sincrónicas generadas por la estimulación eléctrica de la capa I de la rodaja nos dan una estimación de la latencia de aparición de la actividad evocada con respecto a la aplicación del estímulo eléctrico experimental.



R.14. Propagación intra e interhemisférica de las descargas sincrónicas.

A. Esquema de una rodaja coronal de ratón (nivel 49 Allen Brain Atlas, 0.545 mm del bregma) incluyendo la corteza cingular de ambos hemisferios y el cuerpo caloso. Se muestran las diez posiciones donde se han realizado registros y la situación del electrodo de estímulo en la capa I de corteza. **B.** Esquema de un corte sagital al nivel de la línea media del cerebro de ratón. Las líneas punteadas verticales muestran el nivel rostro-caudal de donde se han obtenido los registros presentados en C. Rodajas correspondientes a los niveles 26 (bregma 0.62 mm), rostral, y 40 (bregma -1.06 mm), caudal, del atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin, 2001. **C.** Ejemplos de registros obtenidos en las diez posiciones predeterminadas en rodajas situadas en las posiciones rostro-caudales de corte mostradas en el panel B. Los registros en color en ambas series corresponden a las posiciones de los electrodos de registro de ejemplo del panel A. Registros obtenidos en rodajas coronales del mismo ratón de 19 días de edad. Los dibujos de A y B están tomados del atlas del cerebro de ratón del Instituto Allen (www.brain-map.org).

En la figura R.14 podemos ver dos ejemplos de registros en las diez posiciones preestablecidas obtenidos en rodajas de diferentes niveles rostro-caudales del cerebro del mismo ratón. Se aprecia la propagación a lo largo de la corteza cingular, reflejada por el aumento de las latencias de aparición en posiciones sucesivas. También se aprecia la

existencia de importantes diferencias en la latencia de estas descargas sincrónicas evocadas dependiendo de la posición rostro-caudal de la rodaja utilizada para la obtención de los registros.

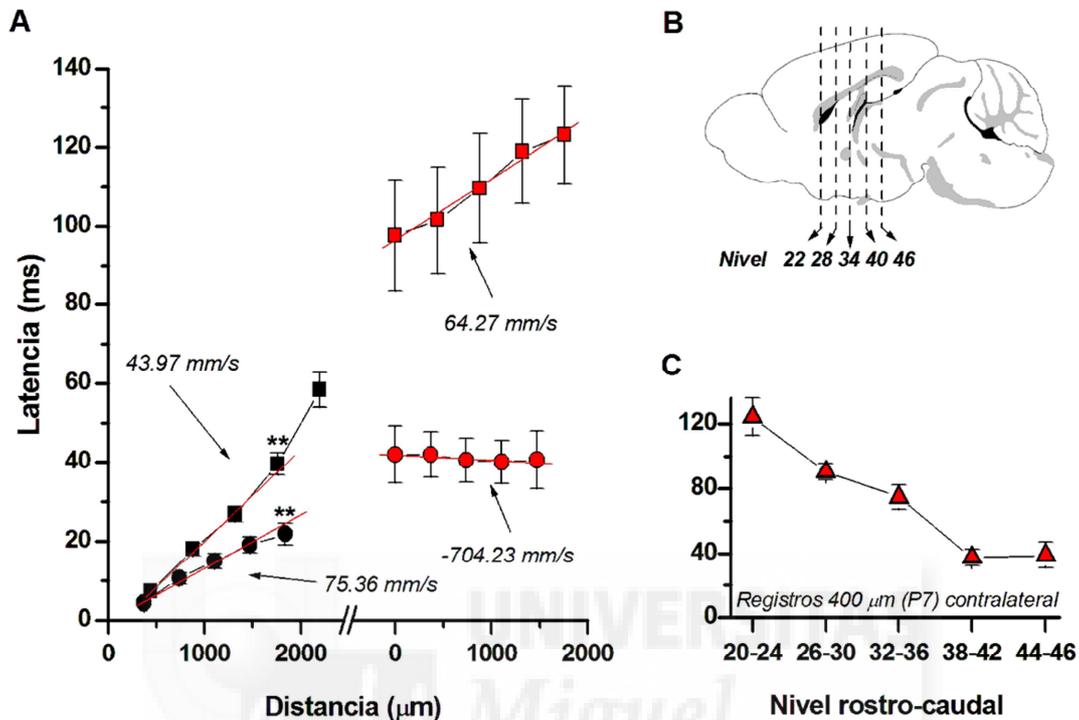


Figura R.15. Diferencias rostro-caudales en la propagación intra e interhemisférica de las descargas sincrónicas evocadas.

A. Promedios de las latencias de las descargas sincrónicas evocadas por estímulo en la capa I y registradas en las diez posiciones de registro preestablecidas. Los símbolos negros corresponden a posiciones en el hemisferio ipsilateral al estímulo y las distancias están medidas respecto al electrodo de estímulo; los símbolos rojos corresponden a posiciones en el hemisferio contralateral y las distancias están medidas desde el electrodo más ventral y cercano al cuerpo calloso. Se muestran los valores promediados ($n = 6-12$) obtenidos en rodajas rostrales (cuadrados; niveles 20-28, desde 1.34 a 0.38 mm del bregma) y caudales (círculos; niveles 36-46, desde -0.58 a -1.82 mm del bregma). Las velocidades de propagación se han calculado a partir de la pendiente del ajuste lineal de los valores de latencia (líneas rojas, calculadas en base a las cinco posiciones de registro de cada grupo de registros, excepto en el caso de los registros ipsilaterales al estímulo de las rodajas rostrales que se han calculado en base a las tres primeras posiciones, ver texto). Las diferencias en la latencia de las descargas sincrónicas evocadas a aproximadamente 1800 μm del electrodo de estímulo son estadísticamente significativas (** $p < 0.001$, $n = 12-6$, t de student). **B.** Esquema sagital de los niveles rostro – caudales estudiados; la numeración corresponde al atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001). **C.** Promedio de la latencia de aparición de las descargas sincrónicas evocadas en la posición 7, contralateral al estímulo, con respecto a la situación rostro-caudal de las rodajas utilizadas para realizar los registros ($n = 3-16$).

En las rodajas rostrales (niveles del 20 al 28, desde 1.34 a 0.38 mm del bregma según el atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin, 2001, figura R.15, panel A, cuadrados) las descargas sincrónicas evocadas se generan primero en las regiones más próximas al electrodo de estímulo, propagándose posteriormente por la capa II/III de la corteza en dirección dorso-ventral. Las descargas sincrónicas evocadas se propagan con una velocidad de 43.9 mm/s, medida a partir de la pendiente del ajuste lineal de los valores promedio de latencia de las tres primeras posiciones de registro, dado que la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas evocadas por el hemisferio ipsilateral al estímulo no es uniforme en toda la región estudiada (figura R.15). Entre las dos posiciones de registro más ventrales, a distancias de 1760 μm y 2200 μm del electrodo de estímulo en las rodajas rostrales, la velocidad de propagación es menor. Las diferencias entre las velocidades de propagación de la actividad en las zonas ventral y dorsal del hemisferio estimulado son estadísticamente significativas al comparar las velocidades de propagación (47.9 ± 3.8 mm/s entre las posiciones #1 y #3; 33.1 ± 5.9 mm/s entre las posiciones #4 y #5) de los registros individuales estudiados ($p=0.029$, t de Student para muestras pareadas, $n=12$). En estas rodajas rostrales, tras un intervalo de aproximadamente 40 ms, las descargas sincrónicas evocadas se propagan al hemisferio contralateral al estímulo. La actividad se genera inicialmente en las regiones más ventrales del hemisferio contralateral, apareciendo sucesivamente en posiciones de registro más dorsales, al contrario que en el hemisferio estimulado, a una velocidad uniforme de 64.3 mm/s, calculada a partir del ajuste lineal entre las cinco posiciones de registro contralaterales al estímulo (figura R.15).

En la rodajas caudales (niveles 36-46, desde -0.58 a -1.82 mm del bregma del atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin, 2001, figura R.15, círculos) las descargas sincrónicas evocadas se generan en posiciones cercanas al electrodo de estímulo y, como en el caso de las rodajas rostrales, se propagan por la capa II/III de la corteza en dirección dorso-ventral desde el electrodo de estímulo. En estas rodajas caudales la velocidad de propagación es de 75.4 mm/s calculada en base al ajuste lineal entre las cinco posiciones de registro (figura R2.3). Esta velocidad de propagación es mayor que en las rodajas rostrales, y es uniforme a lo largo de toda la región de corteza estudiada. Para determinar la significación estadística de estas diferencias en la velocidad de propagación comparamos las latencias en posiciones de registro aproximadamente equidistantes al electrodo de estímulo en el hemisferio estimulado de ambos grupos de rodajas, teniendo en cuenta las diferencias comentadas previamente en las longitudes de la corteza entre rodajas rostrales y caudales. Existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar las latencias de las descargas sincrónicas evocadas en la posición situada a aproximadamente 1800 μm del electrodo de estímulo en ambos grupos de rodajas (39.5 ± 2.8 ms posición #4 en las rodajas rostrales, 21.9 ± 2.7 ms posición #5 en las rodajas caudales, $p < 0.001$, t de student, $n = 12$ y 6, respectivamente). En el caso de la propagación al hemisferio contralateral al estímulo en las rodajas caudales la actividad se genera de manera prácticamente simultánea en todas las regiones corticales registradas tras un intervalo de aproximadamente 20 ms. En el caso de existir propagación de la actividad esta sería muy rápida, de más de 700 mm/s, además de que la propagación sería en dirección dorso-ventral, al contrario que en el hemisferio contralateral de las rodajas rostrales.

También resulta evidente una diferencia en el tiempo de propagación de las descargas sincrónicas desde el hemisferio estimulado hasta el hemisferio contralateral. Para analizar este fenómeno hemos comparado las diferencias entre las latencias de la última ocurrencia de actividad evocada en el hemisferio estimulado, correspondiente a la posición de registro #5 y la latencia de aparición de la actividad en la posición simétrica del hemisferio no estimulado, posición de registro #6. En ambos grupos de rodajas, rostrales y caudales, hemos encontrando diferencias estadísticamente significativas (38.7 ± 9.8 ms en las rodajas rostrales, 15.2 ± 1.9 ms en las rodajas caudales, $p=0.038$, $n=6-4$ respectivamente, Mann-Whitney Rank Sum Test). A pesar de que en ocasiones en las rodajas caudales la actividad se generaba primero en regiones más dorsales que la usada para el análisis, las diferencias de latencias son muy pequeñas y hemos preferido mantener la equivalencia anatómica entre las regiones corticales comparadas.

Estas diferencias en las latencias de propagación intra e interhemisférica de las descargas sincrónicas parecen ser progresivas en sentido rostro-caudal, ya que en las rodajas de zonas intermedias entre las más rostrales y las más caudales (niveles 30-34, desde 0.14 a -0.34 mm del bregma, del atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin, 2001) las latencias tuvieron un valor intermedio entre los de las rodajas rostrales y las caudales, aunque más cercanos a los de las rodajas rostrales. La velocidad de propagación de la actividad en estas rodajas intermedias es de 45.1 mm/s en el hemisferio estimulado y de 64 mm/s en el hemisferio contralateral al estímulo, similares a los de las rodajas rostrales en ambos casos. Por claridad no se muestran los datos en la figura R.15. Estas diferencias en las latencias resultan más evidentes al observar como los valores de latencia medidos en una posición determinada disminuyen de forma progresiva desde rodajas rostrales hacia rodajas caudales, como se muestra en la figura R.15, panel C.

3.- SINCRONIZACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS POSTDESCARGAS OSCILATORIAS

Como ya hemos descrito previamente, en aproximadamente un tercio de las rodajas estudiadas (34/99), hemos observado la presencia de postdescargas oscilatorias prolongadas de 12-14 Hz tras las descargas sincrónicas que aparecen en presencia de bicuculina 10 μ M de forma espontánea o evocadas por la estimulación de la capa I (ej. Figura R.2, panel D). En nuestros registros simultáneos con dos electrodos se aprecia en muchas ocasiones sincronización entre estas postdescargas oscilatorias; hemos estudiado esta sincronización entre las postdescargas oscilatorias evocadas por la estimulación de la capa I.

Realizamos registros simultáneos con dos electrodos en posiciones contiguas del mismo hemisferio y encontramos en todos los casos una sincronización muy precisa entre las postdescargas oscilatorias (figura R.16). Como se puede observar en los ejemplos mostrados en la figura R.16, panel B (hemisferio ipsilateral) y panel C (hemisferio contralateral) las postdescargas oscilatorias están sincronizadas desde su inicio a continuación de la descarga sincrónica inicial. Esta sincronización es esperable, dado que los registros están obtenidos en posiciones contiguas y la actividad electrofisiológica, como hemos mostrado previamente, se propaga a través de la corteza de cada hemisferio. Tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral el intervalo de tiempo (desfase) entre los picos de las postdescargas oscilatorias es similar a la diferencia de latencia entre las descargas sincrónicas iniciales correspondientes (figura R.16, panel D).

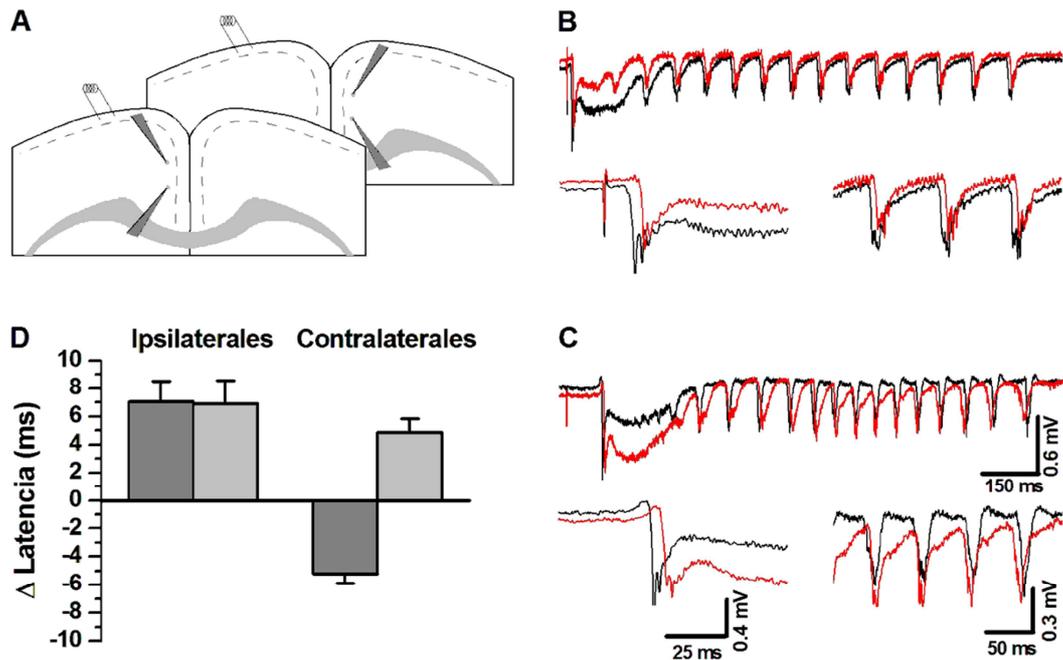


Figura R.16. Sincronización intrahemisférica de las postdescargas oscilatorias.

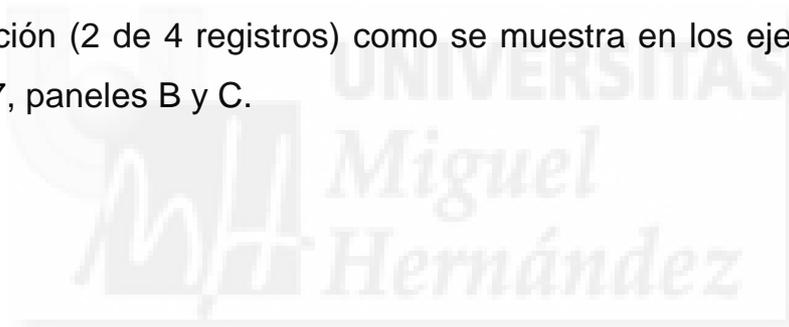
A. Esquemas de rodajas coronales mostrando los electrodos en posiciones de registro contiguas del mismo hemisferio. **B.** Ejemplo de registro simultáneo obtenido en las posiciones 2 y 3 (hemisferio ipsilateral al estímulo); en la parte inferior se muestra la ampliación de la descarga inicial y de un fragmento de la postdescarga oscilatoria. Rodaja coronal 38, -0.82 mm del bregma, atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001), ratón P14. **C.** Ejemplos de registros simultáneos obtenidos en las posiciones 9 y 10 (hemisferio contralateral al estímulo); en la parte inferior se muestra la ampliación de la descarga inicial y de un fragmento de la postdescarga oscilatoria. Rodaja coronal 28, 0.38 mm del bregma, atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001), ratón P19. **D.** Valores promedio de las diferencias en las latencias de las descargas sincrónicas evocadas iniciales (columnas gris oscuro) y valores promedio del desfase entre las postdescargas oscilatorias de los mismos registros (columnas gris claro) en posiciones adyacentes del mismo hemisferio. El desfase entre registros de las postdescargas oscilatorias se midió mediante correlación cruzada (ver figura R.17). Un valor positivo de diferencia de latencia o desfase indica que la actividad en el electrodo dorsal precede a la actividad en el electrodo ventral. Las comparaciones estadísticas se han hecho utilizando el valor absoluto de las diferencias de latencia y de desfase (diferencias no significativas, t de Student para muestras pareadas, $\alpha=0.050$, $n=9-10$).

En la corteza ipsilateral las descargas sincrónicas siempre aparecen en primer lugar en el electrodo más dorsal y cercano al estímulo. El desfase entre las postdescargas oscilatorias tenía el mismo sentido en la mayoría de los registros (7 de 9 registros, 5 rodajas, 3 ratones), es decir, las postdescargas oscilatorias aparecen también primero en las posiciones de registro dorsales en la mayoría de los casos. En los registros simultáneos obtenidos en el hemisferio contralateral las descargas sincrónicas evocadas muestran una propagación ventro-dorsal (valor de diferencia negativa, figura R.16, panel D) en la mayoría de los registros pero el desfase entre las postdescargas oscilatorias muestra que estas aparecen antes en la posición de registro más dorsal (desfase positivo, figura R.16, panel D).

En el caso de los registros simultáneos obtenidos con un electrodo en cada hemisferio (figura R.17) la presencia de sincronización entre las postdescargas oscilatorias de cada hemisferio fue dependiente de las posiciones de registro utilizadas, como se resume en la tabla siguiente:

Posiciones de registro	Rodajas con postdescargas sincronizadas / rodajas estudiadas
5 - 6	3/3
4 - 7	1/4
1 - 6	0/2
4 - 10	0/1

En todos los registros simultáneos obtenidos en las posiciones de registro más ventrales de cada hemisferio (posiciones de registro #5 y #6, figura R.17, panel A), además de en uno de los registros obtenido en posiciones aproximadamente 400 μ m más dorsales que también mostraba sincronización (posiciones de registro #4 y #7), el valor promedio del desfase de las postdescargas oscilatorias fue significativamente menor que la diferencia de latencia de las descargas sincrónicas iniciales (10.2 ± 2.62 ms respecto a 33.9 ± 7.4 ms, $p=0.050$, $n=4$; t de Student para muestras pareadas. Figura R.17, panel E). En todos estos registros las descargas sincrónicas evocadas aparecen primero en el hemisferio estimulado, como es de esperar; sin embargo las postdescargas oscilatorias en el hemisferio no estimulado preceden a las del hemisferio estimulado en la mitad de los registros con sincronización (2 de 4 registros) como se muestra en los ejemplos de la figura R.17, paneles B y C.



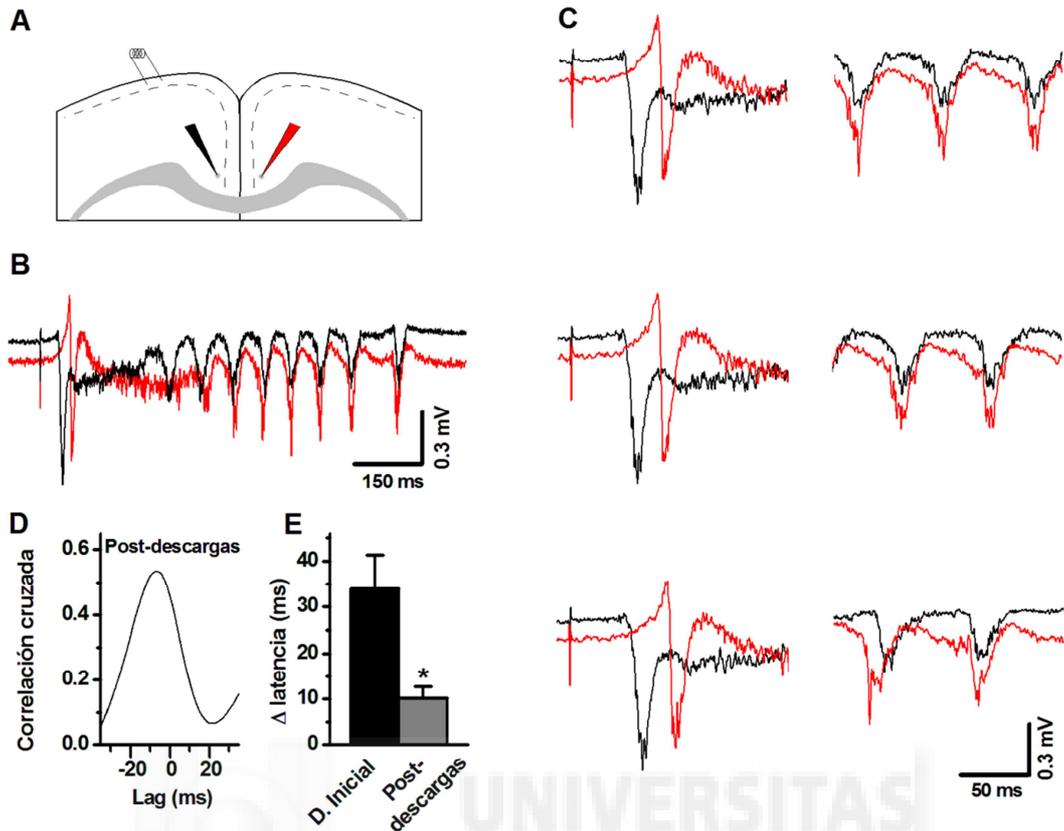


Figura R.17. Sincronización interhemisférica de las postdescargas oscilatorias.

A. Esquema de rodaja con los electrodos en posiciones simétricas en ambos hemisferios. **B.** Ejemplo de registros simultáneos obtenidos en las posiciones 5 (ipsilateral, trazado negro) y 6 (contralateral, trazado rojo), correspondientes a los electrodos del esquema en **A**. Rodaja coronal 26, bregma 0.62 mm, del atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001). Ratón P17. **C.** Ampliación de la descarga inicial y de un fragmento de las postdescargas oscilatorias de tres barridos consecutivos. **D.** Correlación cruzada de la fase de postdescargas oscilatorias del registro mostrado en el panel **B**; se observa una clara sincronía de las postdescargas oscilatorias con un desfase de aproximadamente -7 ms. **E.** Promedio de la diferencia de latencia entre las descargas iniciales (columna negra) y de los valores de desfase de la sincronización de las postdescargas oscilatorias (columna gris). Se han incluido en el promedio los valores de los 3 registros en las posiciones 5 y 6 y un registro en las posiciones 4 y 7 en el que las postdescargas mostraban sincronización. Las comparaciones estadísticas se han hecho utilizando el valor absoluto de las diferencias de latencia y de desfase (* $p=0.050$, t de Student para muestras pareadas, $\alpha=0.050$, $n=4$).

4.- MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS

En el mismo modelo de desinhibición de la rodaja con solución extracelular modificada más la aplicación de bicuculina $10\mu\text{M}$ hemos estudiado la modulación por serotonina de la propagación de las descargas sincrónicas. Para esto aplicamos tanto serotonina a dos concentraciones diferentes como diversos agonistas y antagonistas de receptores específicos de la misma a algunas de las rodajas. Estos experimentos se realizaron registrando con ambos electrodos en las posiciones de registro preestablecidas ya descritas anteriormente y aplicando al flujo de solución extracelular con bicuculina $10\mu\text{M}$ la farmacología experimental durante diez minutos. Se utilizaron preferentemente posiciones simétricas en ambos hemisferios para los registros, o registros con ambos electrodos en el hemisferio estimulado en aquellas rodajas sin propagación de la actividad al hemisferio contralateral.

Durante la aplicación de la serotonina a una concentración de $1\mu\text{M}$ podemos observar un aumento de la latencia de las descargas sincrónicas (figura R.18). Esto ocurre en la casi totalidad de los casos, en concreto en 18 de 19 (94.7%) de los registros realizados aplicando serotonina $1\mu\text{M}$. Este efecto de aumento de la latencia comienza aproximadamente un minuto después de la aplicación de la serotonina y alcanza valores máximos al cabo de 7 u 8 minutos de aplicación continuada de la misma. Las latencias aumentan, en promedio, un 6.7% en el hemisferio estimulado y un 9.1% en el hemisferio contralateral al estímulo (figura R.18, panel D). Este aumento de la latencia de la propagación de las descargas sincrónicas evocadas en presencia de bicuculina $1\mu\text{M}$ es estadísticamente significativo en los registros realizados tanto en el hemisferio ipsilateral (38 ± 3.5 ms control, 40.6 ± 3.7

ms 5-HT; $p \leq 0.05$, $n=12$, t de Student de muestras pareadas) como en el hemisferio contralateral (66.8 ± 17 ms control, 72.9 ± 17.3 ms 5-HT; $p \leq 0.05$, $n=7$, t de Student de muestras pareadas). El efecto de la serotonina suele revertirse con entre 5 y 10 minutos de lavado de la rodaja con solución control.

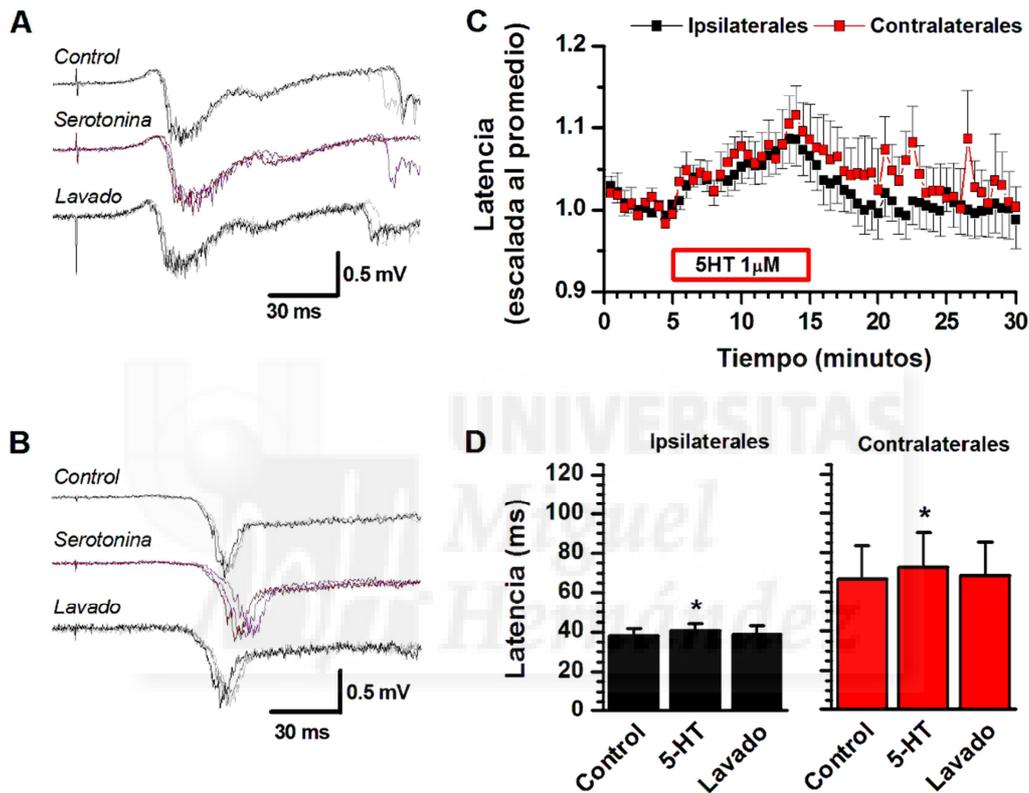


Figura R.18. Efecto de la aplicación de serotonina 1µM en la propagación de las descargas sincrónicas.

A.- Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas ipsilaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de serotonina 1µM y al final del lavado. **B.-** Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas consecutivas contralaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de serotonina 1µM y al final del lavado. **C.-** Curso temporal de las latencias, escaladas al promedio del control de cada registro, durante la aplicación de serotonina 1 µM en ambos hemisferios. **D.-** Promedio de la latencia de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales en los registros ipsilaterales (* $p=0.025$, $n=12$, t de Student de muestras pareadas) y en los registros contralaterales ($p=0.028$, $n=7$, t de Student de muestras pareadas).

En el caso de la aplicación de la serotonina a una concentración de $5\mu\text{M}$ podemos observar también un aumento de las latencias de las descargas sincrónicas evocadas poco después del comienzo de aplicación de la serotonina, aunque el incremento es mayor que el producido por la aplicación de serotonina a concentraciones de $1\mu\text{M}$ (Ver figura R.19). Al igual que en el caso de la aplicación de serotonina a menor concentración visto anteriormente el aumento de latencia se da en la gran mayoría de los registros realizados, en concreto en 53 de 54 registros (98.1%). Este aumento en la latencia con la serotonina $5\mu\text{M}$ alcanza valores máximos en tan solo 3 o 4 minutos de aplicación continuada y se revierte casi por completo tras diez minutos de lavado con solución control. El aumento de latencia es, en promedio, de un 18.9% en el hemisferio estimulado y de un 40.2% en el hemisferio contralateral al estímulo (Ver figura R.19, panel D). Estos aumentos en las latencias son significativos tanto en la propagación de las descargas sincrónicas evocadas por el hemisferio estimulado (28.3 ± 2.5 ms control, 33.6 ± 3 ms 5-HT, $p\leq 0.001$, $n=32$) como en la propagación al hemisferio contralateral al estímulo (73.4 ± 7.2 ms control, 102.9 ± 11.9 ms 5-HT, $p<0.001$, $n=22$).

Al utilizar la concentración de $5\mu\text{M}$ de serotonina en algunos de los registros las descargas sincrónicas evocadas pierden la capacidad de propagarse al hemisferio contralateral. Este efecto es poco habitual (3 de 22 registros) y la rodaja recupera la capacidad de propagar las descargas sincrónicas evocadas hacia el hemisferio contralateral al estímulo poco después de comenzar el lavado de la rodaja con solución control, como se puede observar en el panel B de la figura R.19.

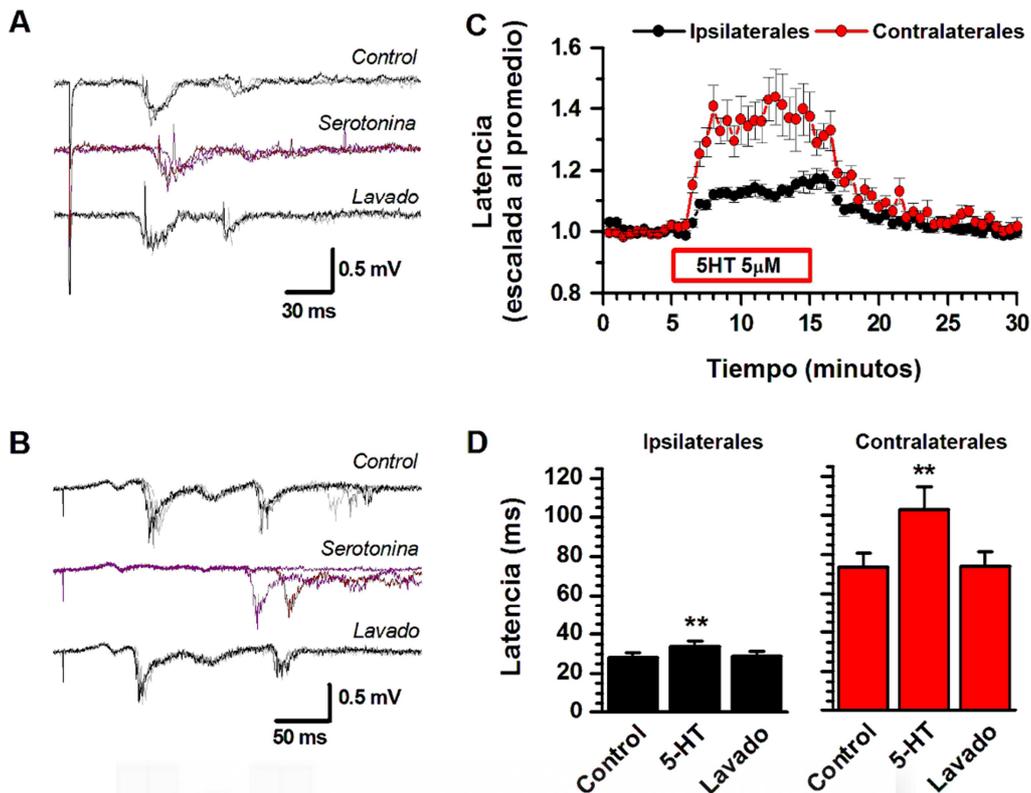


Figura R.19. Efecto de la aplicación de serotonina 5 μ M en la propagación de las descargas sincrónicas.

A.- Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas ipsilaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de serotonina 5 μ M y al final del lavado. **B.-** Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas consecutivas contralaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de serotonina 5 μ M y al final del lavado. Se puede observar el fallo en la propagación de las descargas sincrónicas evocadas en uno de los barridos ejemplo de la aplicación de serotonina 5 μ M. **C.-** Curso temporal de las latencias, escaladas al promedio del control de cada registro, durante la aplicación de serotonina 5 μ M en ambos hemisferios. **D.-** Promedio de la latencia de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales (** $p < 0.001$, $n = 32$ en los registros ipsilaterales al estímulo y $n = 22$ en los registros contralaterales al estímulo, t de Student de muestras pareadas).

En la figura R.20, panel A, podemos observar el caso de los registros realizados en el hemisferio estimulado de las rodajas rostrales, en el que se aprecia la diferencia en la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas evocadas. Este aumento de las latencias ocurre en todo el rango de rodajas estudiadas, como se muestra en el panel C de la figura R.20. Otro de los efectos que observamos en las descargas

sincrónicas evocadas tras la aplicación de la serotonina es un aumento de la variabilidad de las latencias de propagación, especialmente en el hemisferio contralateral, como se muestra en el panel B de la figura R.20 y en los paneles B y C de la figura R.19.

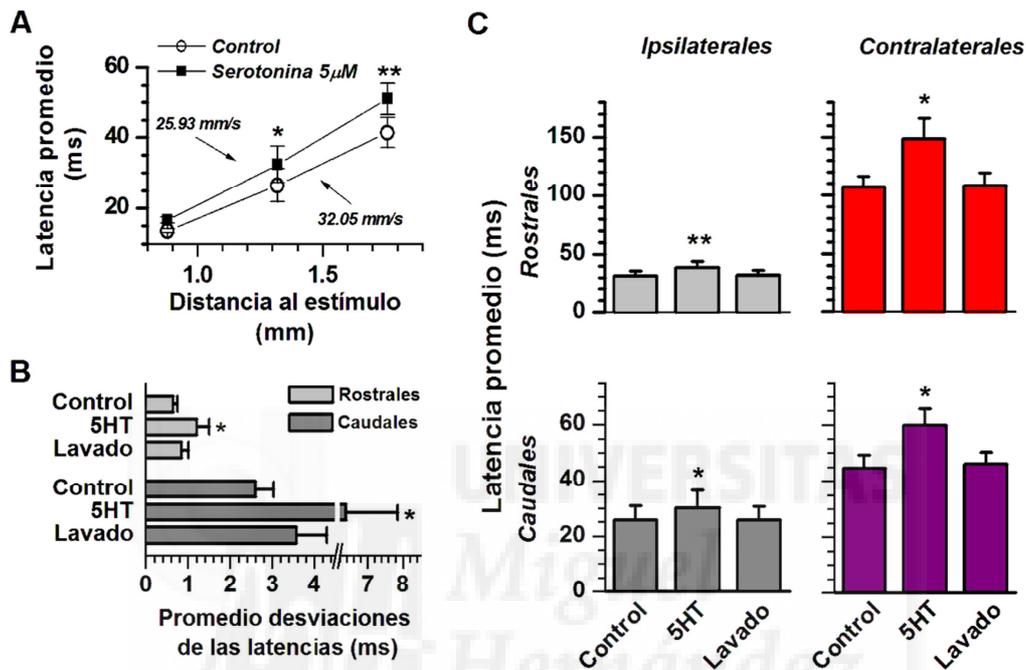


Figura R.20. Velocidad de propagación y diferencias rostro-caudales en la propagación de las descargas sincrónicas tras la aplicación de serotonina 5µM.

A. Cambio de la velocidad de propagación de las descargas evocadas tras la aplicación de serotonina, medidas en el hemisferio ipsilateral al estímulo de las rodajas rostrales (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, $n = 2-8$, t de Student para muestras pareadas). **B.** Aumento de la desviación estándar de los promedios de las latencias utilizados en los análisis con aplicación de serotonina 5µM (* $p < 0.05$, $n = 32$ registros ipsilaterales y $n = 22$ registros contralaterales, t de Student para muestras pareadas). **C.** Promedio de la latencia de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales, mostrando el efecto de la serotonina a una concentración 5µM en las rodajas rostrales y caudales. (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, $n = 6-14$, t de Student para muestras pareadas).

La aplicación de serotonina no solo reduce la velocidad a la que se propaga la actividad por el córtex, sino que además produce un gran aumento del tiempo necesario para la iniciación de la descarga sincrónica en el hemisferio contralateral, medida como el intervalo de tiempo entre las latencias de posiciones de registro simétricas. Como podemos observar en la figura R.21, en registros realizados en las posiciones simétricas #4 y #7 (ipsilateral y contralateral al estímulo respectivamente) podemos observar un gran aumento en la diferencia de latencia entre estas posiciones de registros con la aplicación de serotonina 5 μ M.

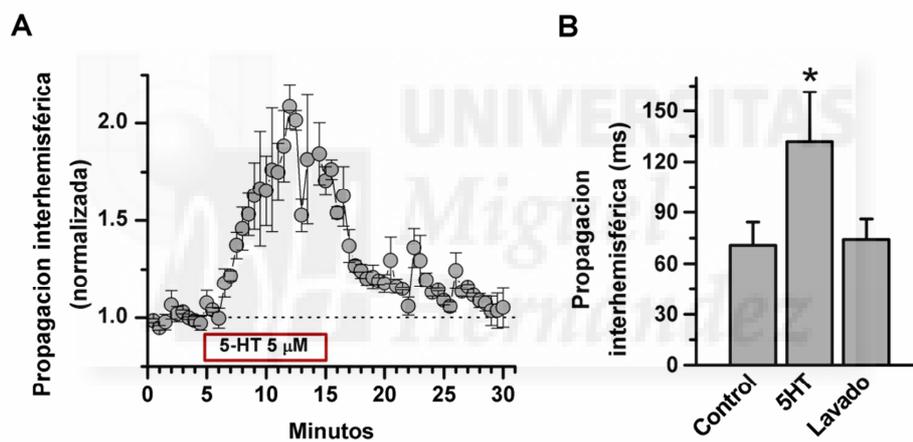


Figura R.21. Efectos de la aplicación de serotonina 5 μ M en la propagación interhemisférica.

A. Curso temporal normalizado de la diferencia de latencias entre posiciones de registro simétricas en ambos hemisferios. **B.** Promedio de las diferencias de latencias (* $p < 0.05$, t de student pareada, $n = 3$).

4.1.- Receptores serotoninérgicos implicados en la modulación de las descargas sincrónicas evocadas.

Una vez determinado el efecto de la aplicación de serotonina sobre las latencias de las descargas sincrónicas evocadas estudiamos el efecto de varios fármacos que actúan sobre receptores específicos de la misma.

4.1.1.- Receptores 5-HT_{1B}.

En primer lugar probamos los efectos del CP 93129 (1 μ M, agonista selectivo de los receptores 5HT_{1B}). El efecto fue de un aumento en la latencia en una gran mayoría de los registros realizados (91.1 %, 16/18 posiciones registradas). El efecto fue estadísticamente significativo y similar al de la aplicación de serotonina 5 μ M, aunque de menor magnitud (ver figura R.22). Este aumento de la latencia de las descargas sincrónicas evocadas tarda entre siete y ocho minutos en alcanzar su efecto máximo. El aumento de latencia es de un 6% en el hemisferio estimulado (36 ± 4.8 ms control, 38.2 ± 5.2 ms CP 93129, $p=0.027$, $n=12$, t de Student de muestras pareadas) y de un 34.3% en el hemisferio contralateral (110.8 ± 10.3 ms control, 148.9 ± 19 ms CP93129, $p=0.011$ y $n=6$, t de Student de muestras pareadas).

El lavado de la rodaja con solución control durante 15 minutos apenas revierte el aumento de las latencias de propagación.

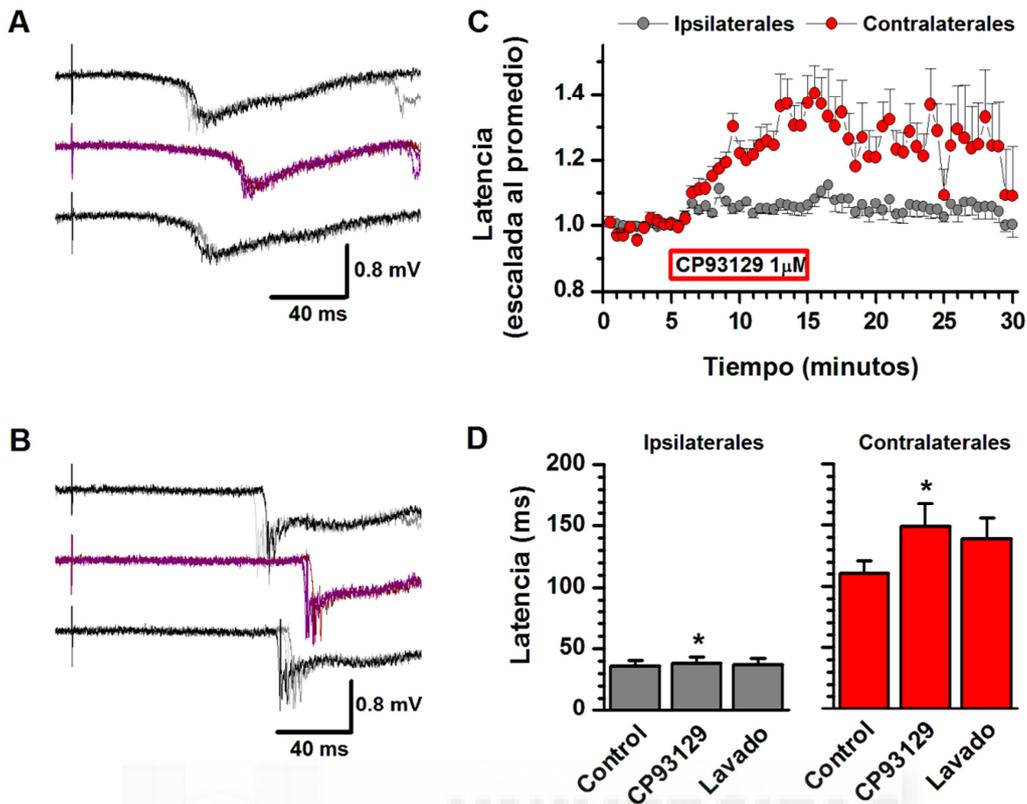


Figura R.22. Efectos de la aplicación de CP 93129 1µM en la propagación de las descargas sincrónicas.

A.- Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas ipsilaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de CP 93129 1µM y al final del lavado. **B.-** Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas consecutivas contralaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de CP 93129 1µM y al final del lavado. **C.-** Curso temporal de las latencias, escaladas al promedio del control de cada registro, durante la aplicación del CP 93129 1µM en ambos hemisferios. **D.-** Promedio normalizado de las latencias de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales en los registros ipsilaterales (* $p=0.027$, $n=12$, t de Student de muestras pareadas) y en los registros contralaterales (* $p=0.011$, $n=6$, t de Student de muestras pareadas).

4.1.2.- Receptores 5-HT_{2A}.

Otro agonista utilizado en nuestros experimentos fue el DOI (10 μ M, agonista selectivo de los receptores 5HT_{2A}). En este caso el efecto fue también de un aumento de la latencia de las descargas sincrónicas evocadas. Se aprecia este aumento de la latencia de las descargas sincrónicas evocadas en la mayoría de los registros (84.4%, 27/32 posiciones registradas), aunque el cambio en la latencia es inferior en magnitud a la apreciada en las rodajas en las que se aplicó la serotonina 5 μ M. Como se puede apreciar en la figura R.23, el aumento de latencia en el hemisferio ipsilateral al estímulo es de un 10.3%, y de un 18.2% en el hemisferio contralateral al mismo. Este aumento es estadísticamente significativo tanto en los registros ipsilaterales (28.5 \pm 2.6 ms control, 31.4 \pm 3.1 ms DOI, p=0.008, n=22, t de Student de muestras pareadas) como en los contralaterales (65.1 \pm 10.6 ms control, 76.9 \pm 12.7 ms DOI, p=0.005, n=10, t de Student de muestras pareadas). De forma similar al CP 93129 1 μ M el efecto del DOI 10 μ M tampoco se revierte por completo tras 15 minutos de lavado con solución control.

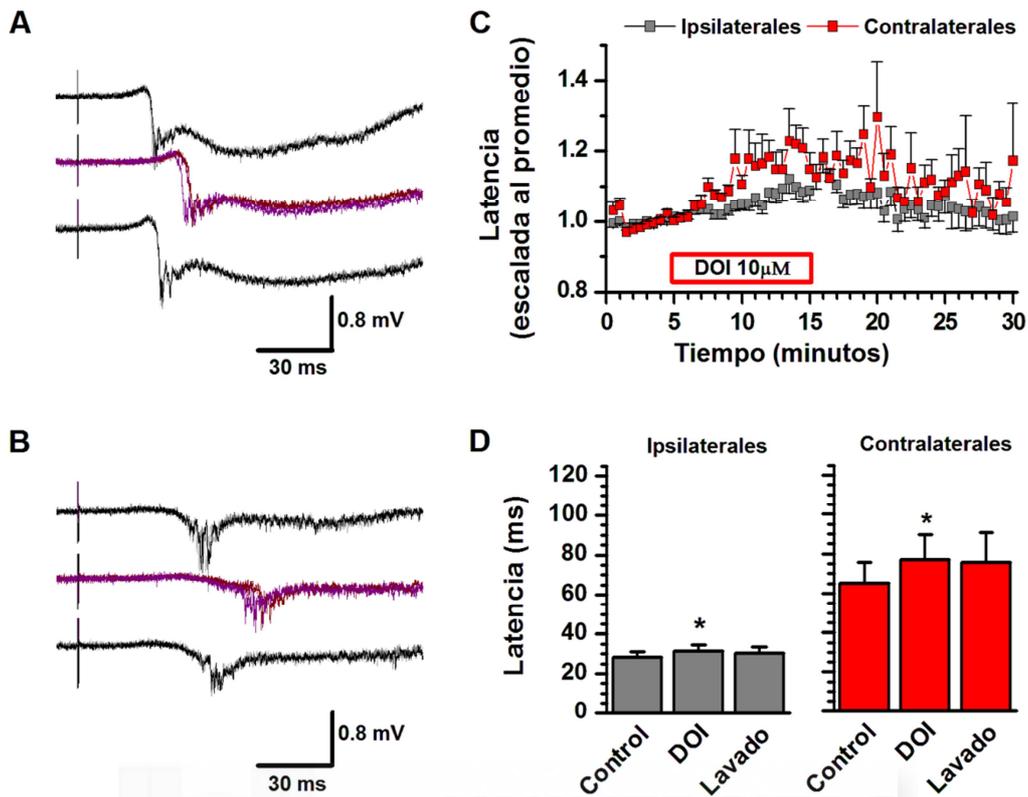


Figura R.23. Efectos de la aplicación de DOI 10µM en la propagación de las descargas sincrónicas evocadas.

A.- Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas ipsilaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de DOI 10µM y al final del lavado. **B.-** Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas consecutivas contralaterales al estímulo en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de DOI 10µM y al final del lavado. **C.-** Curso temporal de las latencias, escaladas al promedio del control de cada registro, durante la aplicación del DOI 10µM en ambos hemisferios. **D.-** Promedio normalizado de las latencias de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales en los registros ipsilaterales (*p=0.008, n=22, t de Student de muestras pareadas) y en los registros contralaterales (*p=0.005, n=10, t de Student de muestras pareadas).

4.1.3.- Receptores 5-HT_{1A}.

Para concluir con la caracterización farmacológica de los receptores serotoninérgicos implicados en la modulación de la actividad aplicamos un agonista y un antagonista de los receptores 5HT-1_A. En primer lugar probamos la aplicación de 8-OH-DPAT 10 μM (agonista selectivo de los receptores 5HT_{1A}). El efecto de la aplicación del 8-OH-DPAT fue bastante heterogéneo. Encontramos un pequeño aumento de la latencia de las descargas sincrónicas en el 50% de los registros realizados (5 de 10 registros), en otro 40% de los registros restantes (4 de 10 registros) el efecto fue una pequeña disminución de las latencias de las descargas sincrónicas, y no observamos cambios en el registro restante. En promedio no observamos ningún efecto en las latencias, como podemos observar en la figura R.24, panel A. Probamos además el efecto de la aplicación de un antagonista serotoninérgico específico para los receptores 5-HT_{1A}, el WAY 100135. La aplicación de WAY a una concentración de 0.5μM produce un aumento de las latencias de un 26.1% en el lado ipsilateral al estímulo, y de un 30.8% en el lado contralateral al estímulo. Este efecto en las latencias parece llegar a un máximo y estabilizarse a los quince minutos a partir de los 15 minutos de aplicación continua del WAY 100135. La aplicación adicional de serotonina 5 μM en la rodaja durante la aplicación del WAY 100135 produce aumento en las latencias mucho mayor que el observado con la aplicación de serotonina 5 μM únicamente (aumento del 97.1% con respecto al control en el lado ipsilateral al estímulo y de un 129.1% en el lado contralateral al estímulo).

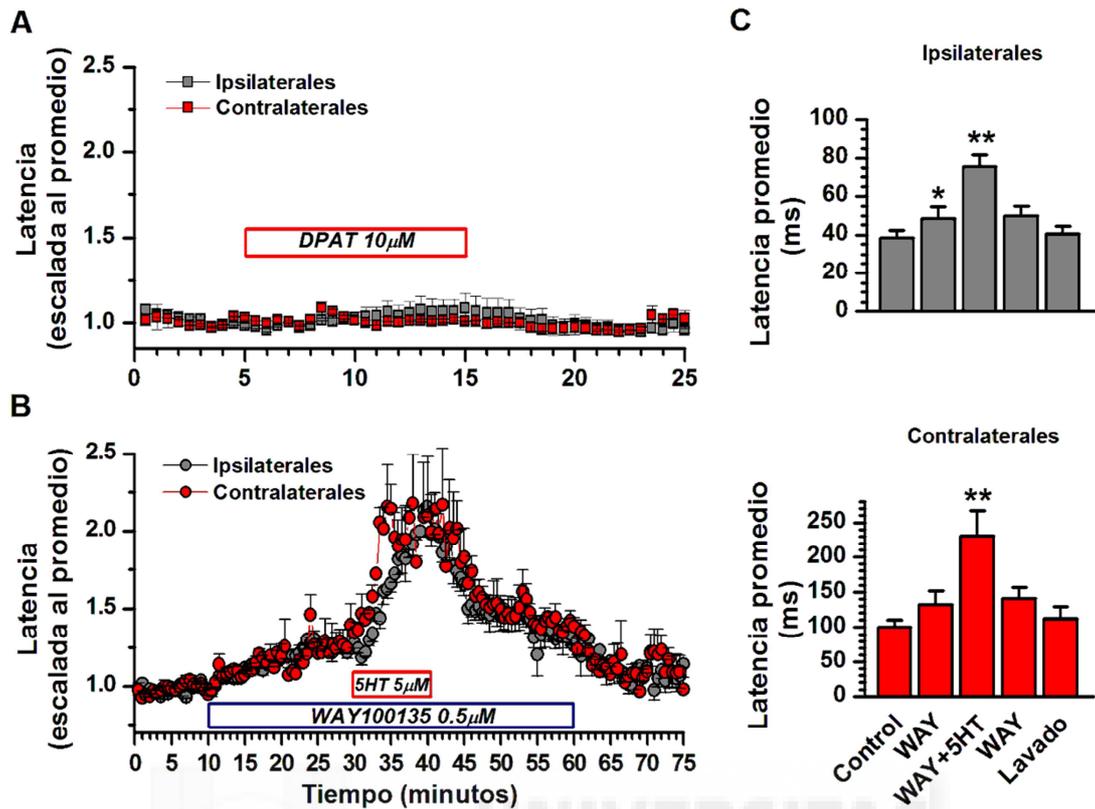


Figura R.24. Efectos de la aplicación de agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} en la modulación serotoninérgica de la propagación de las descargas sincrónicas.

A. Curso temporal de la latencia normalizada durante la aplicación de 8-OH-DPAT 10 μ M en ambos hemisferios (n=4). **B.** Curso temporal de la latencia normalizada durante la aplicación de WAY 100135 0.5 μ M y de serotonina 5 μ M en ambos hemisferios (n=5). **C.** Promedio normalizado de la latencia de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales en ambos hemisferios en los experimentos con WAY 100135 0.5 μ M y de serotonina 5 μ M. Las comparaciones estadísticas en C se han realizado con la prueba t de student para muestras pareadas entre cada condición experimental y la anterior (*p<0.050, **p<0.001, n=5).

El aumento de la latencia causado por la aplicación del WAY 100135 0.5 μ M es estadísticamente significativo en los registros realizados en el hemisferio estimulado (38.4 \pm 4.1 ms control, 48.4 \pm 6.1 ms WAY 100135, p \leq 0.05, n=5), y el aumento de la latencia causado por la aplicación adicional de serotonina 5 μ M a las rodajas es estadísticamente significativo tanto en los registros ipsilaterales (48.4 \pm 6.1 ms WAY 100135, 75.7 \pm 6.2 ms WAY 100135 + 5-HT, p<0.001, n=5) como en

los contralaterales (131.6 ± 19.9 ms WAY 100135, 230.5 ± 37.1 ms WAY 100135 + 5-HT, $p < 0.01$, $n = 5$) al estímulo, como vemos en la figura R.24, panel C.

Al igual que ocurre en varios de los registros con aplicación de serotonina $5 \mu\text{M}$, durante el periodo de máximo efecto de la farmacología las descargas sincrónicas evocadas son, en ocasiones, incapaces de propagarse al hemisferio contralateral. En todos los casos de fallos en la propagación contralateral las descargas sincrónicas evocadas recuperaron la capacidad de propagarse al hemisferio contralateral al estímulo poco después de comenzar el lavado de la serotonina.

4.2.- Ratones SERT knockout.

Además de las pruebas farmacológicas realizadas para comprobar la modulación serotoninérgica de las descargas sincrónicas evocadas en ratones C57BL Wild-Type tuvimos la oportunidad de comprobar los efectos de la aplicación de serotonina en varios ratones C57BL/6J knockout (-/-) de los recaptadores de serotonina (ratones SERT knockout). En estos ratones los recaptadores de serotonina, los principales reguladores de la concentración extracelular de serotonina, están ausentes en el cerebro. En estos ratones tan solo fue posible adquirir registros en el hemisferio estimulado, no apareciendo propagación contralateral de la actividad en ninguna de las rodajas utilizadas ($n = 10$ rodajas, 3 ratones), y por lo tanto todos los resultados que se exponen de estos ratones se refieren a datos del hemisferio ipsilateral al estímulo. Además de esto los registros ipsilaterales fueron muy poco estables y en varias ocasiones la actividad desaparecía a los pocos minutos de aplicar la serotonina, no recuperándose ni siquiera con el lavado de la misma.

Como era de esperar el efecto de la aplicación de serotonina a las rodajas de estos ratones fue mucho mayor que en los ratones Wild-Type. Estas diferencias pueden observarse en la figura R.25, donde se compara el efecto de la aplicación de serotonina 5 μ M en ratones Wild-Type y ratones SERT knockout.

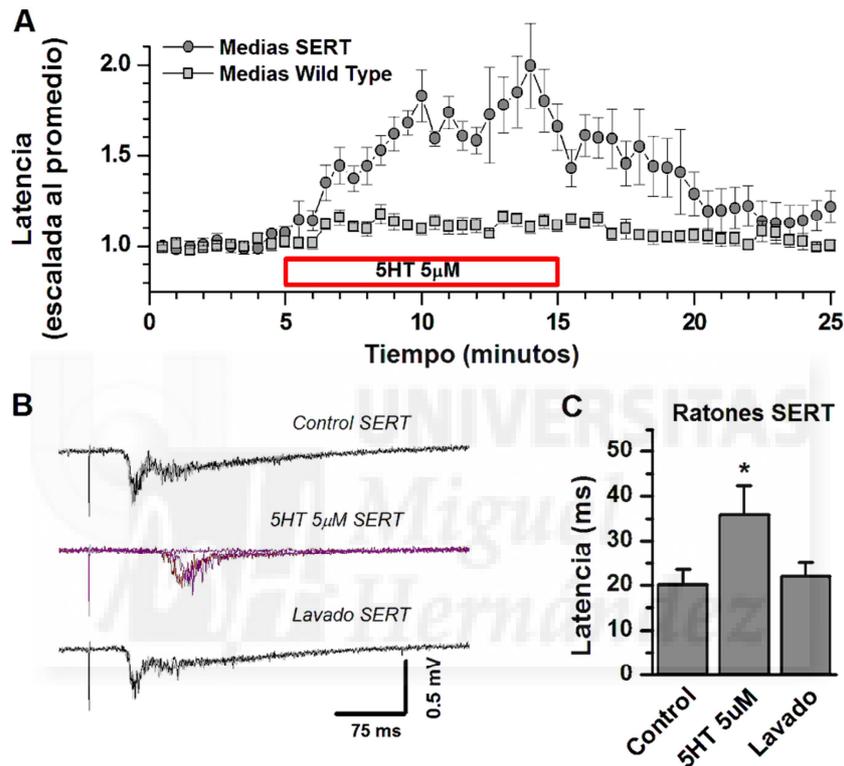


Figura R.25. Efectos de la serotonina 5 μ M en ratones knockout de los recaptadores de serotonina.

A. Curso temporal de la latencia normalizada durante la aplicación de serotonina 5 μ M en ratones wild-type y ratones SERT knockout (knockout de los transportadores de serotonina). **B.** Ejemplo de tres descargas sincrónicas evocadas consecutivas en un ratón SERT knockout en las condiciones control, al final del periodo de aplicación de serotonina 5 μ M y al final del lavado. Se puede observar el fallo en la propagación de las descargas sincrónicas evocadas en uno de los barridos ejemplo de la aplicación de serotonina 5 μ M. **C.** Promedio normalizado de los últimos tres minutos de cada una de las fases experimentales en el hemisferio ipsilateral al estímulo (* $p=0.002$, $n= 11$ registros, 10 rodajas, 3 ratones).

En ninguna de las rodajas utilizadas, obtenidas de tres ratones diferentes, se observó propagación contralateral de las descargas sincrónicas evocadas y por eso todos los datos presentados se refieren a registros realizados en el hemisferio estimulado. Como ya hemos comentado en estos ratones SERT knockout el aumento de latencia ocasionado por la aplicación de serotonina es mucho mayor que en los ratones Wild-Type. Mientras que la aplicación de serotonina a una concentración de 5 μ M en el hemisferio estimulado de los ratones Wild-Type aumenta las latencias de propagación de las descargas sincrónicas evocadas en un 18.9%, en los ratones SERT knockout este aumento de las latencias de los registros ipsilaterales es de un 77.1%. Este aumento de latencias en los ratones SERT es estadísticamente significativo (20.20 \pm 3.3 ms control SERT, 35.8 \pm 6.5 ms SERT 5-HT, $p\leq 0.002$, $n=11$).



En la tabla R.1 se resume el efecto en la latencia de las descargas sincrónicas de la serotonina y los diferentes fármacos serotoninérgicos empleados.

	Registros Ipsilaterales			Registros Contralaterales		
	Latencia control (ms)	Latencia fármaco (ms)	% aumento de la latencia	Latencia control (ms)	Latencia fármaco (ms)	% aumento de la latencia
5-HT 1 μ M	38 \pm 3.6	40.6 \pm 3.7	6.7%	66.8 \pm 16.9	72.9 \pm 17.4	9.1%
5-HT 5 μ M	28.3 \pm 2.5	33.6 \pm 3	18.9%	73.4 \pm 7.2	102.9 \pm 11.9	40.2%
CP 93129 1 μ M	36 \pm 4.8	38.2 \pm 5.2	6%	110.8 \pm 10.3	148.9 \pm 19	34.4%
DOI 1 μ M	28.5 \pm 2.6	31.4 \pm 3.1	10.3%	65.1 \pm 10.6	76.9 \pm 12.7	18.2%
WAY100135 0.5 μ M	38.4 \pm 4.1	48.4 \pm 6.1	26.1%	100.7 \pm 9.1	131.6 \pm 20	30.8%
WAY100135 0.5 μ M + 5-HT 5 μ M		75.7 \pm 6.2	97.1%		230.5 \pm 37.1	129.1%
5-HT 5 μ M en ratones SERT	20.2 \pm 3.3	35.8 \pm 6.5	77.1%			

Tabla R.1. Resumen del efecto de la serotonina y de la farmacología para receptores serotoninérgicos específicos en las latencias de las descargas sincrónicas evocadas.



DISCUSIÓN

Nuestro modelo experimental de rodajas coronales de ratón juvenil con bloqueo parcial de la inhibición por el antagonista de los receptores de GABA_A bicuculina nos ha permitido evocar y estudiar descargas sincrónicas de actividad neuronal en la capa II/III del córtex. Estas descargas sincrónicas se podían generar por la estimulación eléctrica de la capa I del córtex dorso-medial de las rodajas y también aparecían de manera espontánea en la mayor parte de las rodajas. Esta actividad sincrónica se genera por el disparo sincronizado de grupos cercanos de neuronas, como se puede observar en la figura R1.11.

Una de las primeras características observables en estas descargas sincrónicas es la aparición, en aproximadamente un tercio de las rodajas utilizadas, de una fase oscilatoria secundaria asociada a la descarga sincrónica inicial. Esta fase oscilatoria de la actividad, o postdescargas oscilatorias (Castro-Alamancos, 2000), aparece en todo el rango de edades de los ratones utilizados, aunque con mayor frecuencia en los ratones más jóvenes de la muestra (ver figuras R1.1, R1.6).

Utilizando simultáneamente dos electrodos de registro también pudimos comprobar la capacidad de las descargas sincrónicas para propagarse ventralmente a lo largo de la capa II/III del hemisferio donde aparecen inicialmente y para propagarse también al hemisferio no estimulado a través del cuerpo calloso, confirmando los resultados de trabajos previos (Boakes y cols, 1988; Alefeld y cols, 1998; Walker y cols, 2012). Además determinamos que tanto la propagación intrahemisférica como la interhemisférica tienen diferentes características dependiendo de la situación en el eje rostro-caudal de la rodaja utilizada para la obtención de los registros.

En algunos de estos registros simultáneos observamos sincronización entre las postdescargas oscilatorias. Encontramos esta sincronización en todos los registros realizados con ambos electrodos situados en posiciones adyacentes del mismo hemisferio, y en varios de los realizados con los electrodos registrando simultáneamente en las zonas más ventrales del córtex de ambos hemisferios.

También estudiamos en un grupo de rodajas el efecto de la serotonina y diversos agonistas y antagonistas de los receptores específicos de la misma. La aplicación de serotonina aumenta las latencias de propagación de las descargas sincrónicas de manera dosis dependiente. Este efecto depende de la activación de receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}. La activación de los receptores 5-HT_{1A} también parece implicada en la modulación de la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas, aunque de una manera más compleja que en el caso de los receptores mencionados anteriormente.

Por último pudimos probar los efectos de la serotonina en ratones mutantes knockout de los recaptadores de serotonina (ratones SERT Knockout (-/-)). En estos ratones el aumento de latencias ocasionado por la aplicación de serotonina es mucho mayor que en los ratones Wild-Type.

1.- CARACTERÍSTICAS DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS

Las descargas sincrónicas registradas, tanto las evocadas como las espontáneas, consisten en una onda negativa seguida de una fase positiva y, en ocasiones, de postdescargas oscilatorias (figura R.1). Esta onda negativa inicial está formada por el disparo sincronizado de potenciales de acción por grupos cercanos de neuronas, como se puede observar en nuestros registros intracelulares y extracelulares simultáneos (figura R.11), y ha sido descrito previamente por otros autores (Castro-Alamancos, 2000; Castro-Alamancos y Rigas, 2002; Trevelyan y cols, 2006, 2007; Pinto y cols, 2005). Dada la naturaleza del tipo de actividad sincronizada que subyace a las descargas extracelulares hemos tomado el nombre de descargas sincrónicas para referirnos a las mismas. Este tipo de actividad sincronizada se genera en las capas V y II/III de la corteza (Castro-Alamancos, 2000). Estas capas parecen estar conectadas radialmente de una manera especialmente densa en las regiones corticales estudiadas (Caviness, 1975) además de contener una importante población de neuronas piramidales de proyección callosa (Mitchell y Macklis, 2005).

La frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas en nuestros registros fue aproximadamente 0.02 Hz. En nuestros experimentos de aplicación prolongada de bicuculina con estimulación eléctrica de capa I a 0.033 Hz hemos podido observado un aumento de la frecuencia de aparición de descargas sincrónicas espontáneas hasta valores de aproximadamente 0.15 Hz, lo que concuerda con trabajos previos sobre actividad cortical de ondas lentas “in vitro” (Sánchez-Vives y McCormick, 2000) y también “in vivo” (Castro-Alamancos, 2000). Este aumento gradual de la frecuencia de aparición de las descargas sincrónicas espontáneas posiblemente sea debido a la caída gradual del veto inhibitorio cortical, como se ha demostrado que ocurre durante la

aplicación prolongada de antagonistas de los receptores gabaérgicos y también tras cada descarga sincrónica ocurrida en la corteza (Trevelyan y cols, 2006).

En aproximadamente un tercio de las rodajas se observó actividad oscilatoria, o postdescargas oscilatorias, con una frecuencia de oscilación de aproximadamente 13Hz, asociada a las descargas sincrónicas. En trabajos anteriores suele ser necesaria la aplicación de bloqueantes de los receptores de GABA_B o la reducción drástica de la concentración de magnesio en la solución extracelular para poder generar esta actividad oscilatoria de 10-14 Hz en la corteza (Castro-Alamancos, 2000; Castro-Alamancos y Rigas, 2002; Castro-Alamancos y cols, 2007; Trevelyan y cols, 2007), algo que no es necesario en nuestro modelo experimental. En nuestros experimentos la probabilidad de aparición de postdescargas oscilatorias después de la descarga sincrónica parece ser un fenómeno dependiente de la edad del ratón utilizado, siendo alto el porcentaje de rodajas de ratones de 14 y 15 días con postdescargas oscilatorias y siendo cada vez menos comunes según aumenta la edad de los ratones de los que se obtienen las rodajas. Aunque en trabajos anteriores se había demostrado la relación entre la aparición de actividad oscilatoria asociada las descargas sincrónicas y la región cortical estudiada o la farmacología utilizada para generar la actividad epileptiforme en modelos de ratón adultos (Castro-Alamancos, 2002, Castro-Alamancos y Rigas, 2007; Castro-Alamancos y Tawara-Hirawa, 2007) nuestros datos sugieren por primera vez una relación directa entre la edad de los animales utilizados en los experimentos y la probabilidad de obtener actividad oscilatoria de aproximadamente 13 Hz asociada a la descarga sincrónica inicial. Estos datos parecen indicar que los cambios que ocurren durante la segunda y tercera semana del desarrollo postnatal de los ratones afectan a la capacidad de generar oscilaciones asociadas a las descargas sincrónicas de la corteza cingular del ratón. Uno de los cambios que puede ser responsable de esta

disminución de la capacidad de la corteza para generar las oscilaciones en modelos de desinhibición parcial (bloqueo de los receptores GABA_A) en oposición a los modelos de desinhibición total (bloqueo de los receptores GABA_A y GABA_B simultáneamente) es el retraso en el desarrollo de las corrientes inhibitoras de los receptores GABA_B, que raramente aparecen antes de los 17 días postnatales (Fukuda y cols, 1993). Esto parece estar en concordancia con nuestros experimentos, donde las postdescargas oscilatorias son mucho menos probables en rodajas de ratones de 16 días postnatales en adelante. Además el bloqueo de los receptores GABA_B con el antagonista CGP55485 1 μ M hace aparecer las oscilaciones en rodajas en las que no se generaban con desinhibición parcial. Esto es debido al bloqueo de las corrientes de potasio inhibitoras que controlan la aparición de estas postdescargas oscilatorias de 10-14 Hz en diferentes regiones corticales (Castro-Alamancos y Rigas, 2002; Castro-Alamancos y Tawara-Hirata, 2007). En nuestros registros con CGP55485 1 μ M la frecuencia de las postdescargas oscilatorias es mayor que en el caso de las postdescargas oscilatorias en condiciones control (Ver figura R.10) o la generada con la aplicación de antagonistas de los receptores GABA_B en los trabajos referidos previamente.

2.- PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS

Las descargas sincrónicas generadas en nuestro modelo experimental se propagan desde su punto de origen a lo largo de la capa II/III de la corteza cingular. Esta propagación es dependiente de la activación de receptores AMPA (Alefeld y cols, 1998) y está controlada por el sistema inhibitor gabaérgico cortical (Trevelyan y cols, 2006, 2007). Medidas anteriores de la velocidad de propagación de estas descargas sincrónicas muestran velocidades de propagación dependientes del modelo experimental utilizado para generar las mismas (Alefeld y cols, 1998; Sánchez-Vives y McCormick, 2000; Trevelyan y cols, 2006). Nuestros resultados muestran que la velocidad de propagación dorso-ventral de las descargas sincrónicas evocadas en las rodajas coronales también es dependiente de otros factores. Si observamos la propagación de la actividad en el hemisferio estimulado encontramos valores de la velocidad de propagación similares a los encontrados en trabajos previos en modelos similares (Alefeld y cols, 1998), aunque esta velocidad de propagación no es uniforme en toda la corteza cingular. En nuestros experimentos se demuestra que la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas por la corteza cingular del ratón es diferente dependiendo de la localización rostro-caudal de la rodaja utilizada para la obtención de los registros. En el hemisferio estimulado la velocidad a la que se propagan las descargas sincrónicas es mayor cuanto más caudal sea la rodaja utilizada para obtener los registros. Tomando como referencia el atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2001) realizamos registros en rodajas desde el esquema coronal 20 hasta el esquema coronal 46 (desde 1.34 mm hasta -1.82 mm del bregma). Con estos datos se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades de propagación de las rodajas más rostrales (desde 1.34 a 0.38 mm del Bregma) y las

rodajas más caudales (desde -0.58 a -1.82 mm del bregma). Estas dos regiones corticales se corresponden con dos áreas corticales diferenciadas tanto a nivel anatómico (Caviness, 1975), citoarquitectónico (Van de Werd y cols, 2010) y de conectividad funcional (White y cols, 2011), la corteza cingular anterior en el caso de las rodajas rostrales y la corteza retrosplenial en el de las rodajas caudales. Estas diferencias estructurales y funcionales pueden ser la causa de las diferencias en la velocidad de propagación entre los registros rostrales y caudales, ya que una conectividad más abundante o eficiente entre regiones cercanas al foco de la actividad sincrónica facilitaría el reclutamiento de nuevos grupos neuronales y la propagación de las descargas sincrónicas. Adicionalmente la corteza cingular se subdivide en una región ventral y una dorsal citoarquitectónicamente diferenciadas (Van de Werd y cols, 2010), en las que hemos encontrado diferencias en la velocidad de propagación entre los registros correspondientes a estas áreas de la corteza cingular. Esto reforzaría la idea de que las diferencias en la conectividad y estructura entre regiones corticales son responsables, al menos en parte, de las diferencias en las velocidades de propagación de las descargas sincrónicas.

En la mayor parte de las rodajas utilizadas las descargas sincrónicas eran capaces de propagarse al hemisferio no estimulado, y también en el caso de esta propagación contralateral encontramos diferencias dependientes de la posición rostro-caudal de la rodaja de la que se obtuvieron los registros. En las rodajas rostrales, correspondientes a la corteza cingular, la actividad parece propagarse primero a la región más medial de la corteza cingular contralateral a través del cuerpo calloso tras unos 40 ms desde la última descarga sincrónica en el lado ipsilateral y a partir de aquí se propaga al resto de la corteza cingular de una manera secuencial, aunque en dirección contraria y mayor velocidad que en el hemisferio estimulado. En el caso de las rodajas más caudales, correspondientes a la corteza retrosplenial,

aparece un patrón de propagación contralateral bastante diferente. En estas rodajas las descargas sincrónicas aparecen de manera prácticamente simultánea en todas las posiciones de registro utilizadas, tras tan solo unos 20 ms desde la última descarga sincrónica en el hemisferio estimulado. Esto parece indicar que la propagación de las descargas sincrónicas hacia el hemisferio contralateral se realiza de manera independiente hasta cada una de las regiones conectadas. Este tipo de propagación, secuencial en el hemisferio donde se genera la descarga sincrónica y directa entre regiones generalmente homotópicas y/o funcionalmente conectadas de ambos hemisferios a través del cuerpo calloso está en línea con la bibliografía referente a la propagación de la actividad epileptiforme en el hemisferio estimulado (Alefeld y cols 1998; Pinto y cols 2005; Trevelyan y cols, 2006, 2007) y también con los estudios estructurales (Aboitiz y Montiel, 2003; Mitchell y Macklis, 2005) y funcionales (Marcano-Reik y Blumberg, 2008) relativos a la comunicación callosa entre regiones homotópicas de ambos hemisferios. La diferencia en la latencia de aparición de las descargas sincrónicas en el hemisferio contralateral entre las rodajas caudales y rostrales (ver figura R.15) debe estar relacionado con diferencias en la eficacia en el reclutamiento de neuronas para la iniciación de las descargas sincrónicas en estas regiones corticales, ya que la velocidad de conducción callosa en el ratón es de aproximadamente 8 ms (Simmons y Pearlman, 1983), mucho menor que las latencias de iniciación de las descargas sincrónicas en nuestro modelo. Esto estaría en línea con nuestros propios resultados, que muestran una mayor velocidad de propagación intracortical de las descargas sincrónicas en la corteza retrosplenial, indicando que en estas rodajas el reclutamiento de nuevos grupos de neuronas es más eficaz que en las rodajas rostrales.

3.- SINCRONIZACIÓN INTRA E INTERHEMISFÉRICA DE LAS POSTDESCARGAS OSCILATORIAS

En algunos casos las postdescargas oscilatorias estaban sincronizadas entre sí, apareciendo de manera prácticamente simultánea en ambas posiciones de registro. Las postdescargas oscilatorias registradas en posiciones adyacentes del mismo hemisferio están sincronizadas siempre y la diferencia entre las latencias de las descargas sincrónicas es muy similar al tiempo de desfase entre las postdescargas oscilatorias. En ocasiones en los registros con postdescargas oscilatorias sincronizadas realizados simultáneamente en posiciones simétricas de ambos hemisferios las postdescargas se registran primero en el hemisferio no estimulado (figura R.17, panel C, página 83). Esto parece indicar que las postdescargas oscilatorias se generan utilizando otro mecanismo diferente a las descargas sincrónicas o que se trata de un fenómeno más complejo que la simple propagación de la actividad hacia diferentes regiones corticales, ya que esto nunca ocurre con las descargas sincrónicas. Esta sincronización interhemisférica parece dependiente de las regiones corticales donde se realiza el registro. En las regiones más ventrales los desfases entre las postdescargas oscilatorias son significativamente menores que la diferencia entre las latencias de las descargas sincrónicas. En regiones tan solo 400 μ m más dorsales las postdescargas oscilatorias no muestran esta coordinación en la mayoría de los casos, al igual que tampoco se aprecia sincronización interhemisférica en posiciones asimétricas. Esto puede deberse, en primer lugar, a la diferente inervación callosa de estas regiones ya que el cuerpo caloso suele conectar principalmente regiones corticales homotópicas (Marcano y Blumberg, 2008), aunque en ocasiones también conecta regiones heterotópicas (Mitchell y Macklis, 2005). Además de esto la transmisión de la actividad epileptiforme a través del cuerpo caloso no parece ser simplemente un mecanismo de transmisión directa

de las descargas sincrónicas sino de una comunicación constante entre regiones homotópicas, capaces de generar la actividad epileptiforme independientemente en las condiciones adecuadas (Ono y cols, 2002). En nuestros experimentos nunca hemos detectado la aparición de las postdescargas oscilatorias sin la presencia de la descarga sincrónica inicial, así que parece seguro suponer que la descarga sincrónica inicial es necesaria para iniciar el proceso de propagación y la aparición de las postdescargas oscilatorias, aunque las postdescargas oscilatorias parecen depender de factores adicionales de coordinación interhemisférica que permiten su sincronización independientemente de la descarga sincrónica que las precede.



4.- MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE LAS DESCARGAS SINCRÓNICAS

Está demostrado el importante papel que juega la serotonina en el desarrollo y en la modulación de la actividad de la corteza cerebral (revisado en Andrade, 2011; Puig y Gullledge, 2011). Los efectos de la serotonina en la corteza cerebral son diversos y están mediados por una gran variedad de receptores serotoninérgicos específicos con diferentes efectos y localización en la membrana de las neuronas en las que se encuentran (Jacobs y Azmitia, 1992; Pauwels, 2003). Los receptores serotoninérgicos más abundantes en la corteza frontal, que se expresan tanto en neuronas piramidales como en interneuronas gabaérgicas, son los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} (Pazos y Palacios, 1985; Verge, 1986; Pompeiano y cols, 1992; Armagós-Bosch, 2004; Santana, 2004).

En nuestros experimentos la aplicación de serotonina a las rodajas durante la inhibición parcial de las mismas produce un claro descenso, de manera dosis dependiente, de las velocidades de propagación de las descargas sincrónicas a través de la corteza cingular, especialmente al hemisferio no estimulado. La propagación de las descargas sincrónicas depende de mecanismos de excitación anterógrada. (Pinto y cols, 2005) y está controlada por un circuitos de inhibición anterógrada que bloquean o reducen la efectividad de la propagación de las descargas sincrónicas (Trevelyan y cols, 2006, 2007). Dado que la serotonina activa diversos receptores específicos con efectos diferentes es complicado determinar cuál es la dinámica que regula el efecto global de inhibición cortical encontrado tanto en nuestros experimentos como en trabajos anteriores sobre modulación serotoninérgica de la corteza cerebral (Zhou y cols, 1999; Puig y cols, 2004, 2005). Existe bastante evidencia de efectos inhibitorios de la serotonina mediados por diversos receptores en la corteza prefrontal que podrían explicar nuestros resultados. Estos

estudios se han realizado sobre todo con roedores, principalmente en ratas y ratones, los cuales parecen compartir la distribución y características de los receptores serotoninérgicos corticales (Bortolozzi y cols, 2003). En primer lugar, la activación de los receptores 5HT_{1B} produce una reducción de la amplitud de los potenciales espontáneos excitadores a través de la reducción de la liberación de glutamato por las neuronas presinápticas (Tanaka y North, 1993), al igual que parece hacerlo la activación de los receptores 5HT_{1A} en el córtex entorrinal de la rata (Schmitz y cols, 1998). En el caso de la activación de los receptores 5-HT_{2A} la situación es más compleja ya que aunque se han descrito efectos inhibidores de la excitabilidad neuronal (Troca-Marín y Geijo-Barrientos, 2010) el efecto predominante parece ser el aumento de la frecuencia de disparo de potenciales sinápticos excitadores en la neuronas piramidales de capa V (Bèique y cols, 2004a; 2007), principalmente en una subpoblación de neuronas piramidales de proyección callosa/comisural de capa V (Avesar y Gullledge, 2012). Además la activación de los receptores 5-HT_{2A} también ejercen un efecto excitador en las interneuronas inhibitoras que puede ser el causante, de manera indirecta, del efecto inhibitor que hemos observado en la propagación de las descargas sincrónicas (Xiang y Prince, 2003; Weber y Andrade, 2010). Otro efecto inhibitorio de la serotonina está mediado por la activación de los receptores 5HT_{1A} localizados en el soma o el cono axonal de las neuronas piramidales (Puig y Gullledge, 2011), que causan una hiperpolarización de la membrana y por lo tanto dificultan la generación de potenciales de acción (Bèique y cols 2004b). Mientras que el efecto inhibitorio en la corteza prefrontal de la serotonina y de los agonistas específicos de los receptores 5HT_{1B} (CP 93129) y 5HT_{2A} (DOI) es apreciable en nuestros experimentos, causando una reducción significativa de la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas, la aplicación de un agonista de los receptores 5HT_{1A} (8-OH-DPAT) no parece tener efecto en la propagación de las mismas, tal como se había

visto en trabajos anteriores (Alefeld y cols, 1998). En cambio la aplicación de un antagonista de los receptores específicos 5-HT_{1A} sí parece tener un efecto inhibitor en la propagación de las descargas sincrónica, y además magnifica el efecto de la serotonina durante su aplicación conjunta. Dado que una de las funciones de los receptores 5-HT_{1A} es la inhibición de la actividad de las neuronas inhibitoras su inactivación con la aplicación de un antagonista puede facilitar las acciones inhibitoras de la serotonina en otros receptores serotoninérgicos localizados en las neuronas piramidales (Puig y cols, 2011) sin reducir la inhibición específica gabaérgica (Puig y cols, 2010) que puede verse incluso potenciada por la activación de los mismos receptores serotoninérgicos que causan inhibición en las neuronas piramidales (Tanaka y North, 1993; Xiang y Prince, 2003).

Para completar la caracterización de la modulación serotoninérgica de las descargas sincrónicas realizamos pruebas en varios ratones knockout (-/-) de los recaptadores de serotonina. Estos ratones SERT (SERotonin Transporter) knockout son mutantes que no disponen de los recaptadores de serotonina, uno de los principales determinantes del control de la concentración de serotonina en la hendidura sináptica (Mohammad-Zadeh y cols, 2008, Gardier y cols, 2009). Como era de esperar en estos ratones la aplicación de serotonina tiene un efecto en la latencia cuatro veces superior respecto a los ratones wild-type. Un efecto adicional que hemos observado en estos ratones SERT knockout es la falta de propagación de las descargas sincrónicas al hemisferio no estimulado. Aunque durante la aplicación de serotonina a altas concentraciones (5µM) y sobre todo al aplicar la serotonina simultáneamente con un agonista de los receptores 5-HT_{1A} (WAY-100135 0.5µM) habíamos observado fallos en la propagación contralateral, incluso la desaparición de la propagación durante unos minutos, los ratones SERT no tienen propagación contralateral ni siquiera en la situación control de desinhibición parcial con bicuculina. Esta falta

de propagación contralateral puede ser debida a problemas de desarrollo corticales, ya que la ausencia de los recaptadores de serotonina durante el desarrollo del cerebro causa modificaciones en la expresión de algunos receptores serotoninérgicos, como por ejemplo la regulación a la baja de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} del córtex (Rioux y cols, 1999). Como hemos comentado anteriormente los receptores 5-HT_{2A} parecen aumentar la frecuencia de los potenciales sinápticos excitadores de una subpoblación de neuronas piramidales de proyección callosa de la capa V de la corteza cerebral (Avesar y Gullledge, 2012), que son las principales transmisoras de la actividad cortical hacia la corteza contralateral (Mitchel y Macklis, 2005).



CONCLUSIONES

1.- El modelo de rodajas coronales ratones juveniles desinhibidas con bicuculina es adecuado para el estudio tanto de las descargas sincrónicas como de las postdescargas oscilatorias asociadas a las mismas.

2.- Diferentes modelos de generación de postdescargas oscilatorias presentan diferencias en las frecuencias de oscilación de las mismas.

3.- La velocidad de propagación de las descargas sincrónicas a lo largo de la capa II/III del eje dorso-medial del córtex cingular es dependiente de la región citoarquitectónica de la que se obtienen los registros, siendo mayor en la corteza retrosplenial que en la corteza cingular anterior. También existen diferencias en las velocidades de propagación entre las áreas dorsal y ventral de la corteza cingular.

4.- La propagación interhemisférica de las descargas sincrónicas a través del cuerpo calloso es más rápida en los registros realizados en la corteza retrosplenial.

5.- Las postdescargas oscilatorias registradas simultáneamente en las regiones más ventrales de la corteza cingular anterior y de la corteza retrosplenial de ambos hemisferios son capaces de sincronizarse independientemente de la descarga sincrónica inicial.

6.- La velocidad de propagación de las descargas sincrónicas se reduce con la aplicación de serotonina. Esta reducción es dosis-dependiente.

7.- Se puede reproducir parcialmente el efecto inhibitor en la velocidad de propagación de la serotonina con la activación de los receptores específicos de serotonina 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}.

8.- La activación de los receptores 5-HT_{1A} no afecta la velocidad de propagación de las descargas sincrónicas. En cambio la inactivación de los receptores 5-HT_{1A} produce un efecto inhibitorio y además amplifica el efecto de la serotonina al aplicarse de manera simultánea a la misma.

9.- Los recaptadores de serotonina son necesarios para reducir el efecto inhibitorio de la serotonina en la latencia de las descargas sincrónicas. Su ausencia en ratones SERT reduce de manera crónica la capacidad de las descargas sincrónicas para propagarse contralateralmente.



BIBLIOGRAFÍA

Aboitiz F, Montiel J. (2003). One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Brazilian journal of medical and biological research*; 36 (4): 409-20.

Aghajanian GK, Marek GJ. (1999). Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*; 21 (2 Suppl): 16S-23S.

Alefeld M, Sutor B, Luhmann HJ. (1998). Pattern and pharmacology of propagating epileptiform activity in mouse cerebral cortex. *Experimental neurology*; 153 (1): 113-22.

Armagós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F. (2004). Co-expression and In Vivo Interaction of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*; 14 (3): 281-299.

Andrade R. (2011). Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*; 61 (3): 382–6.

- Araneda R, Andrade R. (1991). 5-Hydroxytryptamine 2 and 5-Hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*; 40 (2): 399-412.
- Arvanov VL, Liang X, Magro P, Roberts R, Wang RY. (1999). A pre and postsynaptic modulatory action of 5-HT and the 5-HT_{2A}, 2C receptor agonist DOB on NMDA-evoked responses in the rat medial prefrontal cortex. *European journal of Neuroscience*; 11 (8): 2917-34.
- Avesar D, Gullledge AT. (2012). Selective serotonergic excitation of callosal projection neurons. *Frontiers in neural circuits*; 6 (3): 12.
- Azevedo FC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Filho WJ, Lent R, Herculano-Housel S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*; 513 (5): 532-4
- Barazany D, Basser PJ, Assaf Y. (2009). In vivo measurement of axon diameter distribution in the corpus callosum of rat brain. *Brain: a journal of neurology*; 132 (Pt 5): 1210–20.

- Başar E, Başar-Eroglu C, Karakaş S, Schürmann M. (2001). Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *International journal of psychophysiology: official journal of the International Organization of Psychophysiology*; 39 (2-3): 241-8.
- Béïque J.-C, Chapin-Penick EM, Mladenovic L, Andrade R. (2004a). Serotonergic facilitation of synaptic activity in the developing rat prefrontal cortex. *The Journal of Physiology*; 556: 739-754.
- Béïque J.-C, Campbell B, Perring P, Hamblin MW, Walker P, Mladenovic L, Andrade R. (2004b). Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A, 5-HT2A, and 5-HT7 receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 24 (20): 4807–17.
- Béïque J.-C, Imad M, Mladenovic L, Gingrich JA, Andrade R. (2007). Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104: 9870-5.
- Boakes RJ, Burns BD, Webb AC. (1988). Transmission of burst responses through slices of rat cerebral cortex. *The Journal of physiology*; 404: 467–78.

Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Adell A, Mataix-Díaz LI, Serrats J, Pons S, Artigas F. (2003). In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT_{2A} receptors: effect of antipsychotic drugs. *European Journal of Neuroscience*; 18(5): 1235–1246.

Braak H, Braak E. (1986). Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with ageing and Alzheimer's disease. *Progress in brain research*; 70: 185-212.

Bruns A, Eckhorn R. (2004). Task-related coupling from high to low frequency signals among visual cortical areas in human subdural recordings. *International journal of psychophysiology: official journal of the International Organization of Psychophysiology*; 51 (2): 97-116.

Buzsáki G, Draguhn A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*; 304 (5679): 1926-9.

Castro-Alamancos M. (2000). Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 20 (24): 9195-206.

Castro-Alamancos M, Connors BW. (1997). Thalamocortical synapses. *Progress in neurobiology*; 51(6):581-606.

Castro-Alamancos M, Rigas P. (2002). Synchronized oscillations caused by disinhibition in rodent neocortex are generated by recurrent synaptic activity mediated by AMPA receptors. *The Journal of Physiology*; 542 (2): 567-58

Castro-Alamancos M, Rigas P, Tawara-Hirata Y. (2007). Resonance (approximately 10 Hz) of excitatory networks in motor cortex: effects of voltage-dependent ion channel blockers. *The Journal of physiology*; 578 (Pt 1): 173-9

Castro-Alamancos M, Tawara-Hirata Y. (2007). Area-specific resonance of excitatory networks in neocortex: control by outward currents. *Epilepsia*; 48(8):1572-84.

Caviness JR, Verne S. (1975). Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *Journal of comparative neuroscience*; 164: 247-264.

Chiappedi M, Bejor M. (2010). Corpus callosum agenesis and rehabilitative treatment. *Italian journal of pediatrics*; 36: 1-7.

Connors BW, Malenkat RC, Silva LR. (1988). Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABA_A and GABA_B receptor mediated responses in neocortex of rat and cat. *Journal of physiology*; 406: 443–468.

de Quervain DJ-F, Henke K, Aerni A, Coluccia D, Wollmer MA, Hock C, Nitsch RM, Papassotiropoulos A. (2003). A functional genetic variation of the 5-HT_{2a} receptor affects human memory. *Nature neuroscience*; 6 (11): 1141–2.

de la Peña E, Geijo-Barrientos E. (1996). Laminar localization, morphology, and physiological properties of pyramidal neurons that have the low-threshold calcium current in the guinea-pig medial frontal cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 16: 5301–11.

DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. (2003). Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of neurocytology*; 31 (3-5): 299-316.

DeFelipe J, Fariñas I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in neurobiology*; 39: 563-607.

Engel AK, Fries P. (2010). Beta-band oscillations--signalling the status quo? *Current opinion in neurobiology*; 20 (2): 156-65.

Englot DJ, Blumenfeld H. (2009). Consciousness and epilepsy: why are complex-partial seizures complex? *Progress in brain research*; 177: 147-70.

- Fell J, Klaver P, Elfadil H, Schaller C, Elger CE, Fernández G. (2003). Rhinal-hippocampal theta coherence during declarative memory formation: interaction with gamma synchronization? *European Journal of Neuroscience*; 17 (5): 1082-1088.
- Fukuda T, Kosaka T. (2003). Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. *Neuroscience*; 120 (1): 5-20.
- Gardier AM, Guiard BP, Guilloux J-P, Repèrant, Coudore F, David DJ. (2009). Interest of using genetically manipulated mice as models of depression to evaluate antidepressant drugs activity: a review. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2009; 23 (1): 23–42.
- Gurevich I, Englander MT, Adlersberg M, Siegal NB, Schmauss C. (2002). Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 22 (24): 10529-32.
- Harder JA, Ridley RM. (2000). The 5-HT_{1A} antagonist, WAY100635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Neuropharmacology*; 39: 547–552.

Herculano-Houzel S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. (2009). *Frontiers in human neuroscience*; 3: 1-11.

Issa NP, Trepel C, Stryker MP. (2000). Spatial frequency maps in cat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 20 (22): 8504-14.

Jacobs BL, Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*; 72 (1): 165-229.

Jakab RL, Goldman-rakic PS. (2000). Segregation of Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ Receptors in Inhibitory Circuits of the primate cerebral cortex. *The journal of comparative neurology*; 417: 337–348.

Jia X, Kohn A. (2011). Gamma rhythms in the brain. *PLoS biology*; 9 (4): e1001045.

Johnson-Frey SH. (2003). What's so special about human tool use? *Neuron*; 39 (2): 201-4.

Kahana MJ. (2006). The cognitive correlates of human brain oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 26 (6): 1669-72.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. (2000). Principios de neurociencia. Madrid (ES): McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.

Kawaguchi Y, Kubota Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex*; 7(6):476-86.

Kawaguchi Y, Kubota Y. (1998). Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience*; 85(3):677-70

Kim JH, Ellman A, Juraska JM. (1996). A re-examination of sex differences in axon density and number in the splenium of the rat corpus callosum. *Brain research*; 740 (1-2): 47-56.

Klimesch W, Dopplemayr M, Wimmer H, Schwaiger J, Röhm D, Gruber W, Hutzler F. (2001). Theta band power changes in normal and dyslexic children. *Clinical Neurophysiology*; 112 (7): 1174-85.

Kriegstein AR, Noctor SC. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in neurosciences*; 27 (7): 392-9.

LaMantia A, Rakic P. (1990). Axon overproduction and elimination in the corpus callosum of the developing rhesus monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 10 (7): 2156-2175.

Laurent A, Goillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N. (2002). Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 22 (3): 886–900.

Marcano-Reik AJ, Blumberg MS. (2008). The corpus callosum modulates spindle-burst activity within homotopic regions of somatosensory cortex in newborn rats. *The European journal of neuroscience*; 28 (8): 1457–66.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience*; 5 (10): 793-807.

McNamara JO. (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 14 (6): 3413-25.

Meltzer HY, Massey BW. (2011). The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current opinion in pharmacology*; 11 (1): 59-67.

Meyer HS, Schwarz D, Wimmer VC, Schmitt AC, Kerr JND, Sakmann B, Helmstaedter M. (2011). Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108 (40): 16807-12.

Mitchell BD, Macklis JD. (2005). Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. *The Journal of comparative neurology*; 482 (1): 17-32.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. (2008). Serotonin: a review. *Journal of veterinary pharmacology therapy*; 31: 187–199.

Molnár Z, Clowry G. (2012). Cerebral cortical development in rodents and primates. *Progress in brain research*; 195: 45-70.

Mountcastle VB. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain : a journal of neurology*; 120: 701-22.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL, Parnavelas JG. (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cerebral cortex*; 13 (6): 607-611.

Nishikimi M, Oishi K, Tabata H, Torii K, Nakajima K. (2011). Segregation and pathfinding of callosal axons through EphA3 signaling. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 31 (45): 16251–60.

Ono T, Matsuo A, Baba H, Ono K. (2002). Is a cortical spike discharge “transferred” to the contralateral cortex via the corpus callosum? An intraoperative observation of electrocorticogram and callosal compound action potentials. *Epilepsia*; 43 (12): 1536–42.

Orekhova EV, Stroganova T a, Nygren G, Tsetlin MM, Posikera IN, Gillberg C, Elam M. (2007). Excess of high frequency electroencephalogram oscillations in boys with autism. *Biological psychiatry*; 62 (9): 1022-9.

Owen, R. (1837). On the structure of the brain in marsupials animals. *Philosophical transactions of the royal society of London*; Vol. 127: 87-96.

Parks C, Robinson P, Sibille E, Shenk T, Toth M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95 (September): 10734-10739.

Parnavelas JG. (2002). The origin of cortical neurons. *Brazilian journal of medical and biological research*; 35 (12): 1423-9.

- Pauwels PJ. (2003). 5-HT Receptors and their Ligands. *Tocris Reviews* No 25; (0927): 1-12. <http://www.tocris.com/pdfs/5htreview.pdf>.
- Paxinos G, Franklin KBJ. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates, second edition. *Academic press*.
- Pazos A, Palacios JM. (1985). Quantitative Autoradiographic Mapping of Serotonin Receptors in the Rat Brain. Serotonin-1 receptors. *Brain research*; 346: 205-230.
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM. (1985). Quantitative Autoradiographic Mapping of Serotonin Receptors in the Rat Brain. Serotonin-2 receptors. *Brain research*; 346: 231-249.
- Petersen C. (2002). Short-term dynamics of synaptic transmission within the excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *Journal of neurophysiology*; 87: 2904-2914.
- Pinto DJ, Patrick SL, Huang WC, Connors BW. (2005). Initiation, propagation, and termination of epileptiform activity in rodent neocortex in vitro involve distinct mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 25 (36): 8131-40.

- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 12 (2): 440-53.
- Puelles L, Rubenstein JLR. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in Neurosciences*; 26(9):469-476.
- Puig MV, Artigas F, Celada P. (2005). Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cerebral cortex*; 15 (1): 1-14.
- Puig MV, Celada P, Artigas F. (2004). Control serotoninérgico de la corteza prefrontal. *Revista de Neurología*; 39(6):539-547.
- Puig MV, Celada P, Díaz-mataix L. (2003). In Vivo Modulation of the Activity of Pyramidal Neurons in the Rat Medial Prefrontal Cortex by 5-HT_{2A} Receptors : Relationship to Thalamocortical Afferents. *Cerebral Cortex*; 13 (8): 870-882.
- Puig MV, Gullledge AT. (2011). Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Molecular neurobiology*; 44 (3): 449–64.

Puig MV, Watakabe A, Ushimaru M, Yamamori T, Kawaguchi Y. (2010). Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 30 (6): 2211–22.

Rakic P. (2003). Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cerebral cortex*; 13(6):541-9.

Rakic S, Zecevic N. (2003). Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cerebral cortex*; 13(10):1072-83.

Rockland KS, Pandya DN. (1986). Topography of occipital lobe commissural connections in the rhesus monkey. *Brain research*; 365 (1): 174-8.

Rioux A, Fabre V, Lesch KP, Moessner R, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP. (1999). Adaptive changes of serotonin 5-HT_{2A} receptors in mice lacking the serotonin transporter. *Neuroscience letters*; 262: 113–116.

Salgado D, Alkadhi KA. (1995). Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons. *Brain research*; 669 (2): 176-82.

- Sanchez-Vives MV, McCormick D. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature neuroscience*; 3 (10): 1027-34.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral cortex*; 14 (10): 1100-9.
- Satow T, Ikeda A, Yamamoto J-I, Begum T, Duy Thuy DH, Matsushashi M, Mima T, Nagamine T, Baba K, Mihara T, Inoue Y, Miyamoto S, Hashimoto N, Shibasaki H. (2004). Role of primary sensorimotor cortex and supplementary motor area in volitional swallowing: a movement-related cortical potential study. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*, 287 (2): 459-70.
- Sauseng P, Klimesch W. (2008). What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? *Neuroscience and biobehavioral reviews*; 32 (5): 1001-1013.
- Simmons PA, Pearlman AL. (1983). Receptive-field properties of transcallosal visual cortical neurons in the normal and reeler mouse. *Journal of Neurophysiology*; 50: 838-848.
- Sincich LC, Blasdel GG. (2001). Oriented axon projections in primary visual cortex of the monkey. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 21 (12): 4416-26.

- Singer W. (2009). Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. *Cognitive neurodynamics*; 3 (3): 189-96.
- Schmitz D, Gloveli T, Empson RM, Heinemann UWE. (1998). Serotonin Reduces Polysynaptic Inhibition via 5-HT 1A Receptors in the Superficial Entorhinal Cortex. *Journal of neurophysiology*; 80 (3): 1116-21.
- Stefanics G, Hangya B, Hernádi I, Winkler I, Lakatos P, Ulbert I. (2010). Phase entrainment of human delta oscillations can mediate the effects of expectation on reaction speed. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 30 (41): 13578-85.
- Stepanyants A, Martinez LM, Ferecsko AS. (2009). The fractions of short- and long-range connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 106 (9): 3555-3560.
- Stepanyants A, Tamás G, Chklovskii DB. (2004). Class-specific features of neuronal wiring. *Neuron*; 43 (2): 251-9.
- Steriade M. (1999). Cellular Substrates of Brain Rhythms, en: *Niedemeyer E, Lopes Da Silva FH, ed. Electroencelelography: Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields. Baltimore: Williams & Wilkins: 28-75*

- Tanaka E, Alan N. (1993). Actions of 5-Hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex *Journal of Neurophysiology*; 69 (5): 1749-1757.
- Thomson AM, Bannister AP. (2003). Interlaminar connections in the neocortex. *Cerebral cortex*; 13 (1): 5-14.
- Timofeev I, Steriade M. (2004). Neocortical seizures: Initiation, development and cessation. *Neuroscience*; 123: 299-336.
- Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R. (2006). Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 26 (48): 12447-55.
- Trevelyan AJ, Sussillo D, Yuste R. (2007). Feedforward inhibition contributes to the control of epileptiform propagation speed. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 27 (13): 3383-7.
- Troca-Marín JA, Geijo-Barrientos E. (2010). Inhibition by 5-HT of the synaptic responses evoked by callosal fibers on cortical neurons in the mouse. *Pflugers Archiv European journal of physiology*; 460: 1073-1085.

- Uhlhaas PJ, Haenschel C, Nikolić D, Singer W. (2008). The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*; 34 (5): 927-43.
- Valdés-Sánchez L, Escámez T, Echevarria D, Ballesta JJ, Tabarés-Seisdedos R, Reiner O, Martínez S, Geijo-Barrientos E. (2007). Postnatal alterations of the inhibitory synaptic responses recorded from cortical pyramidal neurons in the Lis1/sLis1 mutant mouse. *Molecular and Cellular Neuroscience*; 35 (2): 220-9.
- Valverde F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revue Neurologique*; 34(8): 758-780.
- Werd, H. J. J. M. Van De, Rajkowska, G., Evers, P., & Uylings, H. B. M. (2010). Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain Structure and Function*; 214: 339–353.
- Van Hooser SD, Heimel JAF, Chung S, Nelson SB, Toth LJ. (2005). Orientation selectivity without orientation maps in visual cortex of a highly visual mammal. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 25 (1): 19-28.

- Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, Mestikawy SE, Gozlan H, Hamon M. (1986); *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 6 (12): 3474-3482.
- Wahl M, Lauterbach-Soon B, Hattingen E, Jung P, Singer O, Volz S, Klein JC, Steinmetz H, Ziemann U. (2007). Human motor corpus callosum: topography, somatotopy, and link between microstructure and function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 27 (45): 12132-8.
- Walker J, Storch G, Quach-Wong B, Sonnenfeld J, Aaron G. (2012). Propagation of epileptiform events across the corpus callosum in a cingulate cortical slice preparation. *PloS one*; 7 (2): e31415.
- Weber ET, Andrade R. (2010). Htr2a Gene and 5-HT (2A) Receptor Expression in the Cerebral Cortex Studied Using Genetically Modified Mice. *Frontiers in neuroscience*; 4 (8): 1–12.
- White, B. R., Bauer, A. Q., Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., Lee, J.-M., & Culver, J. P. (2011). Imaging of functional connectivity in the mouse brain. *PloS one*, 6(1), e16322.
- Williams G, Rao S, PS Goldman-Rakic. (2002). The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*; 22 (7): 2843-2854.

Willins DL, Deutch AY, Roth BL. (1997). Serotonin 5-HT_{2A} receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse*; 27 (1): 79-82.

Xiang Z, Prince Da. (2003). Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *Journal of neurophysiology*; 89 (3): 1278–87.

Zhang ET, Hansen a J, Wieloch T, Lauritzen M. (1990). Influence of MK-801 on brain extracellular calcium and potassium activities in severe hypoglycemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*; 10: 136–9.

Zhou F, Hablitz J. (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*; 82: 2989-2999.

