



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área: Microbiología celular y genética molecular

EFFECTO DEL INCREMENTO DE SEROTONINA EN EL NÚCLEO
HIPOTALÁMICO POSTERIOR Y LA ACTIVIDAD THETA HIPOCAMPAL EN LA
RATA.

TESIS

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta: IBQ. Gloria Isabel Hernández González

Director: D.C. José Miguel Cervantes Alfaro

Co-Directora: D.C. María Esther Olvera Cortés

Morelia Mich.

Junio 2024

Contenido

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
MARCO TEÓRICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
HIPÓTESIS.....	19
METODOLOGÍA	20
Evaluación de la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial.	21
Registro del EEG.....	22
Histología	23
Neuroquímica.....	24
Análisis estadístico.	24
RESULTADOS.....	25
Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial	26
Potencias	33
Coherencias	41
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA	58

RESUMEN

La reducción de serotonina hipocampal y/o septal, induce la facilitación del aprendizaje espacial y el incremento de actividad theta de alta frecuencia subyacente al aprendizaje. Sin embargo, no se ha evaluado la posible modulación de la actividad theta hipocampal y septal, así como sus posibles consecuencias sobre el aprendizaje y la memoria espacial, asociada al incremento de la serotonina en otras estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognitivas. En el presente trabajo se propone evaluar el efecto del incremento de la serotonina del nHP sobre el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo y sobre la actividad theta subyacente generada en el mismo núcleo, en el septo medial y en el hipocampo. Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con electrodos implantados a permanencia en nHP, SM, GD y CA1, así como una cánula guía para la infusión de LCR (0.8 μ l de LCR artificial; Grupo E1), o citalopram (0.8 μ l de citalopram 0.2 mM, disuelto en LCR, Grupo E2) en el nHP. El citalopram se infundió 15 minutos antes del inicio de una tarea de aprendizaje y memoria espacial, efectuada diariamente con registro simultaneo de la actividad eléctrica cerebral, durante 7 días, con inversión de tratamientos durante otros 4 días. La infusión de citalopram en el nHP provocó una reducción significativa de la eficiencia en la ejecución de la tarea en el laberinto acuático de Morris, en el grupo E2, en comparación con el grupo E1. En cuanto a la modificación de la actividad theta fue mayor la potencia de hipocampo específicamente en giro dentado en el grupo E1 y las coherencias de este grupo también fueron mayores entre SM- CA1 y CA1- GD lo que indica el papel funcional del núcleo hipotalámico posterior en la modulación de theta que se ve reflejado en una tarea de aprendizaje espacial.

Palabras clave: hipocampo, serotonina, aprendizaje y memoria espacial.

ABSTRACT

Reduction of hippocampal and/or septal serotonin induces facilitation of spatial learning and increases in high-frequency theta activity underlying learning. However, modulation of hippocampal and septal theta activity, and its potential consequences on spatial learning and memory, associated with increased serotonin in other brain structures involved in cognitive functions, has not been evaluated. This study proposes to evaluate the effect of increased serotonin in the nHP on hippocampus-dependent spatial learning and memory, as well as on theta activity generated in the nHP itself, medial septum, and hippocampus. Twenty male Sprague-Dawley rats were used with permanent implants of electrodes in nHP, SM, GD, and CA1, and a guide cannula for cerebrospinal fluid (CSF) infusion (0.8 μ l of artificial CSF; Group E1) or citalopram (0.8 μ l of 0.2 mM citalopram dissolved in CSF; Group E2) in the nHP. Citalopram was infused 15 minutes before the start of a daily spatial learning and memory task, with simultaneous recording of brain electrical activity, over 7 days, with treatment reversal over another 4 days. Infusion of citalopram in the nHP significantly reduced task performance efficiency in the Morris water maze task in Group E2 compared to Group E1. Regarding theta activity modification, hippocampal theta power was greater specifically in the dentate gyrus in Group E1, and coherence within this group was also higher between SM-CA1 and CA1-GD, indicating the functional role of the posterior hypothalamic nucleus in theta modulation reflected in a spatial learning task.

MARCO TEÓRICO

El hipocampo es una estructura indispensable para la formación de la memoria, se ha demostrado que la lesión de ésta estructura cerebral y sus cortezas asociadas (fimbria fórnix, septum, corteza entorrinal, y complejo subicular), provocan deficiencias graves y permanentes en numerosas habilidades espaciales como la navegación en un ambiente mediante la asociación flexible de las señales que se encuentran en él (en forma de un mapa cognitivo), para llegar a una meta, es decir en el aprendizaje y memoria espaciales (Brandeis *et al.*, 1989, Sutherland and Rodríguez, 1989, Morris *et al.*, 1990). Estos estudios experimentales surgieron a partir de hallazgos clínicos en los que se observó que pacientes con lesiones en el lóbulo temporal (por ejemplo, el famoso paciente HM), presentan la incapacidad para generar nuevas memorias (Corkin *et al.*, 1997).

Se utiliza el término formación hipocampal para denominar al hipocampo junto con un grupo de estructuras del sistema límbico con los que mantiene relación morfológica y funcional estrecha: Giro dentado, Subiculum, Presubiculum, Parasubiculum y Corteza entorrinal (Amaral and Witter, 1995). El término hipocampo propiamente dicho se refiere al cuerno de Ammon (*cornu Ammonis*, CA) que incluye a tres principales subregiones CA1, CA2 y CA3, distinguibles por el tamaño y apariencia de sus neuronas, por su patrón de conexiones y por su posición con respecto al giro dentado. La arquitectura básica de las subregiones hipocampales consiste en una lámina única de neuronas desde la cual se extienden las dendritas apicales hacia una zona con escasas células denominado estrato molecular del giro dentado y el subiculum (Amaral and Witter, 1995).

En el hipocampo (CA1-CA3), la capa de células principales está formada por células piramidales (multipolares) de carácter glutamatérgico (Amaral and Witter, 1995). El giro dentado consiste en tres capas: la capa de células granulares (principalmente monopolares), una gran capa molecular celular localizada sobre la capa de células granulares y una capa difusa de células polimórficas (algunos la llaman región hilar o hilus) que se localiza debajo de la capa de células granulares. Todas las células son glutamatérgicas. En ambos, CA1 y GD existen interneuronas

GABAérgicas (Johnston and Amaral, 1998).

En el circuito básico de la formación hipocampal, la corteza entorrinal (CE) envía información al giro dentado (GD) a través de la vía Perforante (glutamatérgica), y el GD a través de las fibras musgosas al campo CA3, y de éste por las colaterales de Schaffer a CA1, que a su vez proyecta a CE y subículum, siendo esta la vía de salida de información procesada en el hipocampo; esto se conoce como circuito trisináptico (Johnston and Amaral, 1998).

Por otro lado, existen diversas evidencias electrofisiológicas que indican que durante el procesamiento de información y la formación de la memoria que depende del hipocampo en animales y en seres humanos, predomina cierto tipo de actividad eléctrica, denominada actividad theta (Vertes, 1986, Vertes and Kocsis, 1997). La actividad theta se caracteriza por presentar un patrón de actividad rítmica lenta sinusoidal con una amplitud de 1 a 2 mV (cuando se registra en el interior del hipocampo) y una frecuencia de 4 -12 Hz en ratas y de 4-7 Hz en humanos y se presenta generalmente asociada a conductas voluntarias, tales como movimiento de cabeza, desplazamiento, nado, correr, saltar, manipular objetos, cambios de postura, exploración visual, conductas consumatorias, (Bland, 1986, Vanderwolf, 1988). Así mismo, la actividad theta se presenta durante conductas asociadas a la adquisición de información, y tiene un papel muy importante en la potenciación de larga duración (PLD) mecanismo que se ha propuesto sustenta la memoria a largo plazo (O'Keefe and Nadel, 1978).

Existe evidencia que la actividad theta, es generada en el hipocampo, pues cuando se realizan registros a varias profundidades por los diferentes estratos de ésta estructura cerebral, se ha observado una máxima amplitud en la zona del estrato oriens-piramidal del área de CA1 (theta superficial); ventral al theta superficial al nivel de la fisura hipocampal se localiza un segundo generador (theta profundo) y en el estrato molecular de la hoja dorsal del giro dentado se observa un tercer generador (theta profundo II); además se ha visto que los generadores profundos presentan un desfase de aproximadamente 180°, con respecto al theta superficial (Bland and Whishaw, 1976, Monmaur and Thomson, 1986). La actividad theta hipocampal es producida por corrientes inducidas sinápticamente tanto en las

células piramidales como en las granulares dentadas, originadas por las descargas rítmicas de sus aferentes (Vanderwolf, 1988). Ciertas estructuras límbicas tienen propiedades intrínsecas oscilatorias del potencial de membrana y además reciben entradas sinápticas de otras células, las cuales son capaces de sincronizar tales oscilaciones (Vertes and Kocsis, 1997, Vertes *et al.*, 2004).

La actividad theta hipocampal se ha relacionado con la adquisición de información en pruebas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo en numerosos estudios tanto en animales experimentales como en seres humanos (Osipova *et al.*, 2006, Sauseng *et al.*, 2010, Ruan *et al.*, 2011). Entre ellos, se ha encontrado un incremento de la actividad theta de alta frecuencia durante el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo que no se observa cuando el aprendizaje se realiza mediante diferente sistema de memoria y que no se debe a la conducta motora desplegada (Olvera-Cortes *et al.*, 2002, Olvera-Cortes *et al.*, 2004); además, no se observa dicho patrón en animales con deterioro debido al envejecimiento (Olvera-Cortes *et al.*, 2012) o debido a la alteración de los circuitos hipocampales con la administración neonatal de glutamato monosódico (Lopez-Vazquez *et al.*, 2019). De manera que se ha propuesto que el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo requiere de la expresión de la actividad theta en un patrón definido de incremento con el transcurso del aprendizaje.

Diversos estudios, han mostrado que los estados del EEG hipocampal (theta y su desincronización), son controlados por un sistema de conexiones originadas en el tallo del cerebro con relevos en el diencefalo y finalmente al septum/hipocampo, conocido como vías de sincronización ascendente (Bland and Bland, 1986, Kirket al., 1996, Bland and Oddie, 1998, Vertes *et al.*, 2004, Ruan *et al.*, 2017, Muller and Remy, 2018). Tal red ascendente es originada en el núcleo pontis oralis reticularis (nPOR) y el núcleo tegmental pedunculopontino (nTPP) pues la estimulación eléctrica o manipulación farmacológica mediante la aplicación de agonistas colinérgicos en ambos núcleos, inducen la generación de actividad theta en la formación hipocampal, a través de la activación de neuronas del diencefalo caudal como el núcleo hipotalámico posterior (nHP) y núcleo supramamilar (nSuM), los cuales convierten esa entrada en un patrón rítmico de descarga, que es relevado

en células marcapaso GABAérgicas/Colinérgicas del complejo SM/BDBv para generar la ritmicidad característica de la actividad theta (Kirk et al.,1996, Vertes and Kocsis, 1997, Bland and Oddie, 1998). Los componentes principales del sistema sincronizador ascendente y sus relaciones se presentan en la figura 1 y 2.

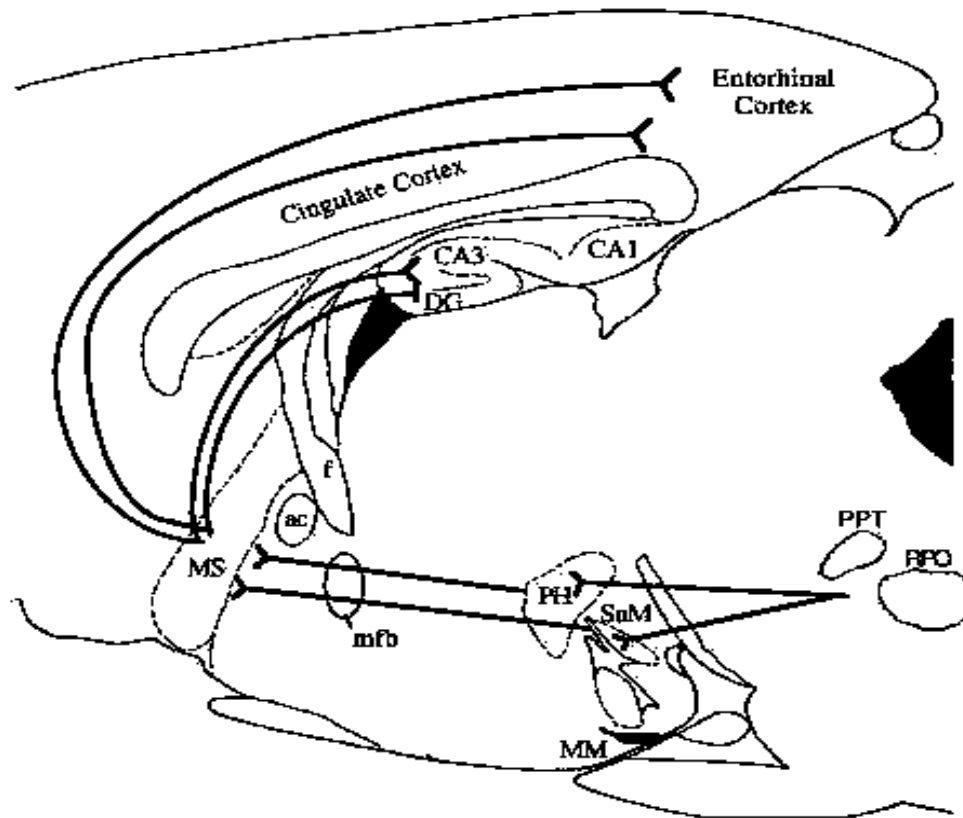


Figura 1. Representación del Sistema sincronizador ascendente, las vías se originan en el núcleo pedúnculo pontino (nTPP) y pontis oralis reticularis (nPOR) y asciende hacia el septo medial/Banda diagonal de broca (MS/vDBB) a través del diencéfalo caudal por el hipotálamo posterior (nHP) y núcleo supramamilar (nSUM). Tomado de (Bland and Oddie, 1998).

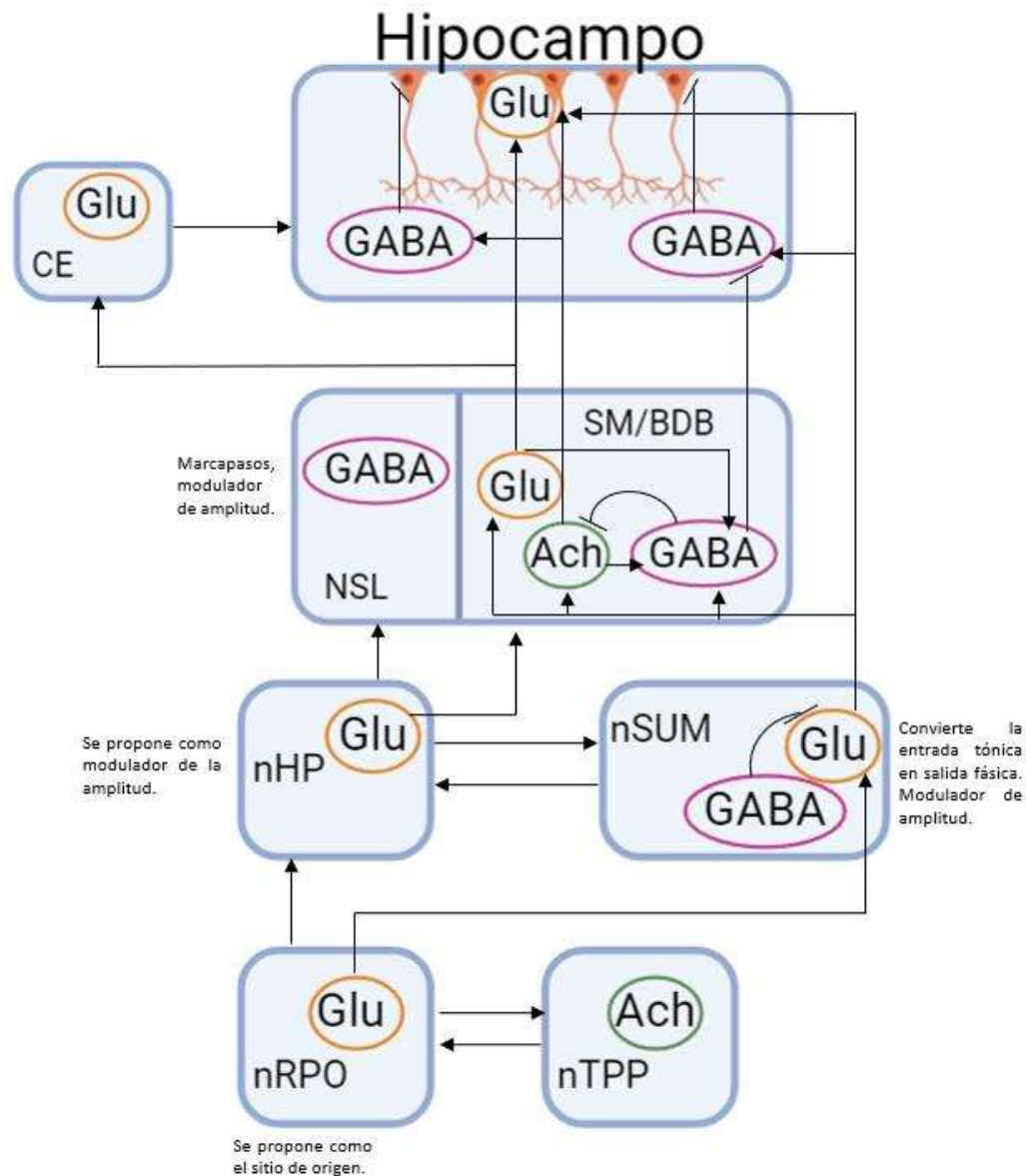


Figura 2. Modificado de: Gutiérrez-Guzmán y cols. (Gutiérrez-Guzmán and Olvera-Cortés, 2007).

La estimulación eléctrica del núcleo reticular pontis oralis (nPOR) genera actividad theta hipocampal (Vertes, 1981, 1982, Takano and Hanada, 2009) cuya frecuencia es proporcional al incremento de la intensidad de estimulación (Oddie *et al.*, 1994), es decir a mayor intensidad de estimulación se incrementa la frecuencia de la actividad theta. Por otro lado, la aplicación de microinyecciones del agonista colinérgico carbacol en nPOR genera actividad theta en el hipocampo por lo que se ha sugerido que nPOR es modulado a su vez por una entrada colinérgica (Nunez

et al., 1991).

Cuando se bloquea reversiblemente al nSUM/nHP mediante la aplicación de procaína y se estimula al nPOR, se atenúa su influencia sincronizadora sobre el septo medial y sobre el EEG hipocampal, por lo que varios autores han propuesto que estas estructuras participan haciendo relevo para la generación de la actividad theta hipocampal (Kirk and McNaughton, 1993, Kirk *et al.*, 1996), todo lo anterior indica que el nPOR es crítico para la generación de actividad theta, y que su actividad es modulada por entradas colinérgicas, provenientes del nTPP. Este último envía además proyecciones al nPOR, al núcleo de rafe medial (nRM), a los núcleos talámicos intralaminar y medial; al nSUM y al complejo SM/BDB (Vertes *et al.*, 1993).

El nSUM tiene una fuerte influencia directa e indirecta sobre la actividad theta del hipocampo, la cual ocurre a través de sus proyecciones sobre células colinérgicas y GABAérgicas del hipocampo (vía supramamilo-hipocampal) y del septo medial (supramamilo-septales) respectivamente. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica o bien la inyección de carbacol en el nPOR de ratas anestesiadas, activa neuronas del nSUM que disparan ráfagas sincrónicas en fase con la actividad theta hipocampal (Kirk and McNaughton, 1991, 1993, Kocsis and Vertes, 1994, Bland *et al.*, 1995), y que la estimulación específica de la región de nSUM produce actividad theta hipocampal (Vertes, 1981, Oddie *et al.*, 1994), por lo que se ha propuesto que éste núcleo actúa como un relevo en las vías de sincronización ascendente.

Diferentes estudios han evaluado la contribución específica del nSUM en la generación y control de la actividad theta, entre ellos Kirk y McNaughton (1993) realizaron inyecciones de procaína en varios niveles en el nSUM en ratas anestesiadas y observaron que se redujo la frecuencia y la amplitud de la actividad theta generada mediante la estimulación del nPOR (Kirk and McNaughton, 1993). Estos autores observaron además que cuando ocurre un bloqueo temporal específico del SM/BDB la actividad de las células del nSUM no se altera, pero la amplitud de la actividad theta en el hipocampo se reduce, mientras que cuando la inyección se hace dentro de sitios entre nPOR y nSUM se reduce la frecuencia de la actividad theta, pero no la amplitud, y que la inyección entre el nSUM y SM/BDB

reduce la amplitud theta, pero no la frecuencia (Kirk and McNaughton, 1993). Por otro lado, Lee y cols. (1994), mostraron que la inyección de neurotoxina colinérgica (neurotoxin 192 immunoglobulin G-saporin) en el SM/BDB significativamente reduce la amplitud, pero no la frecuencia de la actividad theta (Lee *et al.*, 1994). Con base en estos antecedentes se ha propuesto que la frecuencia del ritmo theta es codificada en el nSUM, es decir que la transducción de la intensidad de la activación reticular a la frecuencia de la actividad theta resultante, tiene lugar en tal región, y que la señal que codifica la frecuencia (entrada fásica) es enviada probablemente a través del haz medial frontocerebral (MFB) hacia el complejo SM/BDB (Kirk and McNaughton, 1993, Kirk, 1998).

El nSUM envía proyecciones hacia estructuras como el hipocampo, el núcleo reuniens, el septo medial y lateral (Vertes, 1992) y el núcleo hipotalámico posterior (Vertes *et al.*, 1995). Las proyecciones colaterales de neuronas del nSUM que alcanzan al complejo SM/BDB y a la formación hipocampal, podrían jugar un importante papel en el control directo de la actividad theta (Vertes and McKenna, 2000). El nSUM proyecta predominantemente a la región de CA2/CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo dorsal y a la capa de células granulares del giro dentado (Vertes, 1992, Leranth and Nitsch, 1994, Magloczky *et al.*, 1994, Leranth *et al.*, 1999).

El nSUM recibe proyecciones del septo lateral y medial (Borhegyi and Freund, 1998, Borhegyi *et al.*, 1998, Leranth *et al.*, 1999), también recibe fibras de neuronas serotoninérgicas del núcleo rafe dorsal, así como colinérgicas del complejo SM/BDB y del núcleo tegmental laterodorsal (Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1999).

Además del nSUM, el núcleo hipotalámico posterior (nHP) ha sido considerado como un importante enlace entre el tallo del cerebro y la formación hipocampal, pues existen neuronas de este núcleo que disparan en ritmo con la actividad theta, además, se ha observado que la estimulación eléctrica del nHP genera una intensa activación de células theta-ON en el SM/BDB (Bland *et al.*, 1990, Bland *et al.*, 1994), el hipocampo (Colom *et al.*, 1987, Smythe *et al.*, 1991) y la corteza entorrinal (Dickson *et al.*, 1995). Así la estimulación a alta frecuencia (100Hz) en el nHP genera la descarga tónica enfasada con la actividad theta hipocampal (Bland and

Vanderwolf, 1972, Destrède and Ott, 1981, Smythe *et al.*, 1991), además cuando se aplica estimulación en la formación reticular se incrementa la descarga tónica, la cual persiste después de que el theta hipocámpal fue atenuado mediante la inyección de procaína en el septo (Kirk *et al.*, 1996), mientras que la aplicación de carbachol, (agonista colinérgico), en el nHP genera actividad theta continua en el hipocampo (Bland *et al.*, 1994, Oddie *et al.*, 1994, Kowalczyk *et al.*, 2014, Bocian *et al.*, 2016). En contraste, la lesión electrolítica de nHP atenúa la actividad theta hipocámpal (Anchel and Lindsley, 1972, Robinson and Whishaw, 1974) que presenta además frecuencias más bajas que en las normales (Robinson and Whishaw, 1974). También se ha visto que la inyección de procaína en el nHP bloquea la actividad theta hipocámpal generada por estimulación reticular (Oddie *et al.*, 1994), todo lo anterior en ratas anestesiadas. De lo anterior se deduce que el nHP es un sitio de relevo importante en la modulación de la actividad theta hipocámpal, dentro del sistema sincronizador ascendente (Kowalczyk *et al.*, 2021). La inactivación reversible combinada en el nHP y el nSUM suprime toda la actividad theta hipocámpal inducida espontáneamente, sensorialmente y por estimulación de la formación reticular del tallo del cerebro, en ratas anestesiadas (Bland and Colom, 1993, Kirk and McNaughton, 1993, Oddie *et al.*, 1994, Oddie and Bland, 1998). Estos hallazgos sugieren que la frecuencia de la actividad theta hipocámpal también es codificada en el nHP y, es alimentada al septo medial a través de haces del cerebro anterior medial (Bland *et al.*, 1995, Bland, 2000).

El nHP contiene neuronas grandes glutamatérgicas, neuronas reactivas a hormona concentradora de melanina, a hipocretina, neuronas inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa, putativamente dopaminérgicas, neuronas inmuno-activas a GAD y GABA (Abrahamson and Moore, 2001) y neuronas colinérgicas (Rao *et al.*, 1987).

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

Las proyecciones ascendentes al nHP se originan de núcleos colinérgicos del tallo del cerebro, la formación reticular, núcleo parabraquial y periacueductal y núcleo de rafe mesencefálico (nRM), de éstas últimas, se han encontrado fibras

inmunoreactivas a serotonina a través de toda el área hipotalámica posterior con mayor densidad en las partes ventral y caudal (Abrahamson and Moore, 2001).

Por otra parte, en relación con la influencia de la serotonina y su interacción con receptores 5HT, sobre las características de la actividad theta hipocampal, cabe señalar que el núcleo del rafe contiene neuronas serotoninérgicas y que la activación de este núcleo provoca la desincronización del EEG hipocampal, con reducción de la actividad theta a la vez que se interrumpe la descarga rítmica de las neuronas del área septal medial (Vertes and Kocsis, 1997, Vinogradova *et al.*, 1999, Vertes *et al.*, 2004). Existen evidencias anatómicas de aferentes serotoninérgicos desde el núcleo del rafe medial hacia el hipocampo, complejo SM/BDB, al nSUM, a nHP y a nivel del tallo del cerebro en el nTPP y nPOR (Vertes *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que la serotonina es capaz de modular la actividad de neuronas colinérgicas y ejercer además un efecto inhibitorio sobre las terminales colinérgicas del hipocampo y SM de la rata, ya sea por contactos axónicos directos sobre células piramidales del hipocampo o indirectamente vía interneuronas locales GABAérgicas así como, mediante la difusión a distancia sobre células piramidales que presentan receptores a serotonina (Miettinen and Freund, 1992). Además, recientemente se ha conocido que la serotonina también actúa inhibiendo la actividad de las células glutamatérgicas en los diferentes relevos del sistema sincronizador ascendente, mediante mecanismos semejantes a los observados en el hipocampo (Miettinen and Freund, 1992), (Vertes, 2005).

En diversos experimentos, se ha observado que cuando se estimula al rafe mesencefálico se desorganizan las ráfagas de la actividad theta y disminuye su frecuencia paralelamente a la inhibición de la actividad theta (Vertes, 1986, Vertes *et al.*, 1999), además, la estimulación eléctrica de nRM o bien la aplicación de 5-HT mediante iontoforesis inhiben el disparo de células piramidales hipocampales (Segal, 1975) y desincronizan el EEG hipocampal (Vertes, 1981, Kitchigina *et al.*, 1999). En otros estudios la lesión específica de nRM da lugar a la presencia de actividad theta hipocampal continua y persistente (Maru *et al.*, 1979, Yamamoto *et al.*, 1979, Vertes, 1986, Vinogradova, 1995), mientras que la lesión selectiva de

los aferentes serotoninérgicos al hipocampo, disminuye el umbral mínimo que se necesita para la inducción de actividad theta hipocampal o Potenciación de larga duración (PLD), tras la estimulación septal (de 7.7 HZ a 6.9 Hz) (McNaughton *et al* 1980). Por otro lado, la aplicación de agonistas al receptor 5HT1A en el nRM genera trenes largos y continuos de actividad theta en ratas anestesiadas a través de la inhibición de neuronas serotoninérgicas (Vertes *et al.*, 1994), mientras que disminución de 5HT hipocampal incrementa el tamaño de la población de espigas en GD (Richter-Levin *et al.*, 1994). Vinogradova y colegas concluyen que: “el núcleo de rafe medial puede ser considerado como un antagonista funcional de la formación reticular, suprimiendo poderosamente el disparo theta de neuronas del área septal medial y el ritmo theta hipocampal” (Vinogradova *et al.*, 1999).

Como ya se ha mencionado la actividad theta se presenta durante conductas asociadas a la adquisición de información, y tiene un papel muy importante en la potenciación de larga duración (PLD) y se ha sugerido que la 5HT media la desincronización de la actividad theta suprimiendo la PLD y la memoria (O'Keefe and Nadel, 1978, Staubli and Otaky, 1994), es decir la 5HT podría bloquear o suspender temporalmente los procesos mnémicos del hipocampo (Vertes, 2005). Con relación a esto, se ha propuesto que la información que llega al hipocampo durante estados en que predomina la actividad theta es guardada por lo menos temporalmente en el hipocampo, mientras que aquella información que llega en ausencia de theta no es codificada, al menos no al mismo grado que alcanza la información que llega al hipocampo concurrente con theta (Vertes and Kocsis, 1997). El nRM puede ser una importante parte del sistema directo de conexiones al hipocampo, hasta cierto punto encargado de la capacidad de ignorar eventos ambientales no significativos (Vertes, 2005), como un mecanismo de selectividad de información, solo codificando la información relevante. En este sentido, Jeltsch-David *et al.* (2008), propusieron que dicha modulación podría ocurrir a través de la actividad serotoninérgica sobre el SM, mediante la acción inhibitoria de la serotonina sobre las neuronas colinérgicas, y GABAérgicas que envían aferentes al

hipocampo.

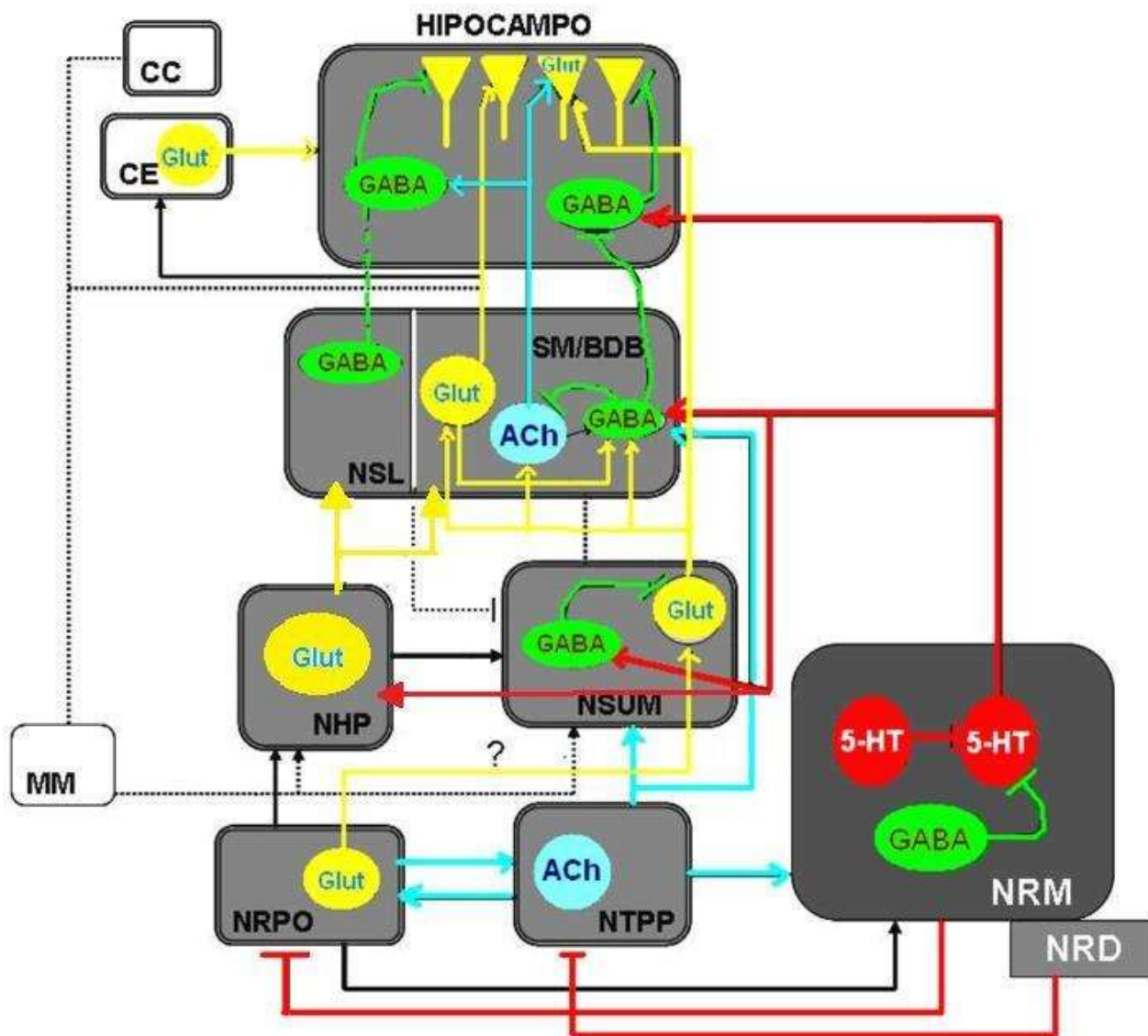


Figura. 3. Ruta serotoninérgica (rojo) en el sistema sincronizador ascendente Modificado de: Gutiérrez-Guzmán y cols. (Gutiérrez-Guzmán and Olvera-Cortés, 2007).

Respecto a esto último sin embargo se ha visto poca repercusión del abatimiento de serotonina sobre el aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. Se ha observado que cuando se abate o se interfiere con el sistema serotoninérgico (y por tanto no desincronizaría la actividad theta hipocámpal), no se afecta, el desempeño en aprendizaje y memoria espacial. Por ejemplo, luego del abatimiento de 5HT mediante la aplicación de 5,7 Dihidroxitriptamina (5,7-DHT) intracerebral (i.c, que

destruye selectivamente las terminales axónicas de las neuronas serotoninérgicas) se ha observado que no hay alteraciones en el desempeño de tareas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y en el laberinto radial de Olton, en la rata (Altman *et al.*, 1990). De igual manera el tratamiento con p-chloroanfetamina (PCA) (Altman *et al.* 1989), con p-chlorophenylalanina (PCPA) (Richter-Levin and Segal, 1989) o la inyección de 5,7-DHT en el rafe, no tienen efecto en el desempeño en tareas de memoria espacial ya sea en el laberinto radial de Olton o en el laberinto acuático de Morris (Asin *et al.*, 1985). Por otro lado, la inyección intraventricular de 5,7-DHT provocó un efecto gradual moderado sobre el aprendizaje y el desempeño de ratas en tareas de laberinto acuático de Morris (Nilsson *et al.*, 1988). La administración intra hipocampal del neurotóxico tampoco genera alteraciones en la prueba del laberinto acuático de Morris; no obstante, Altman sugiere que la serotonina ejerce una influencia negativa sobre una o más vías hipocampales críticas para el procesamiento de información espacial dependiente del hipocampo (Altman *et al.*, 1990). Sin embargo, Gutiérrez-Guzmán y cols., realizaron la reducción de un 98-100% de la serotonina del hipocampo (detectable mediante HPLC), y observaron una facilitación en el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo asociada con una mayor expresión de actividad theta de alta frecuencia en el giro dentado durante fases tempranas del aprendizaje (adquisición de información) y durante la parte final del entrenamiento (almacenamiento a largo plazo) (Gutiérrez-Guzmán *et al.*, 2011, Gutiérrez-Guzmán *et al.*, 2012). Conductualmente los animales experimentales fueron más eficientes que los controles. La modulación de la actividad theta al parecer fue pequeña luego de eliminar la serotonina hipocampal y solo alteró el grado de eficiencia del aprendizaje espacial. Una posibilidad al respecto es que la actividad theta no se altere de manera significativa al manipular la serotonina localmente, a nivel hipocampal. Como se ha mencionado, la serotonina interviene a varios niveles del sistema de sincronización ascendente por lo que es posible que sea en estas regiones donde pueda estar ejerciendo su efecto principal como modulador de la sincronización theta y del aprendizaje. En apoyo a esto, López-Vázquez *et al.* redujeron la serotonina del septo medial mediante la administración del neurotóxico

5,7-DHT y encontraron una facilitación de la memoria de trabajo espacial asociada con un incremento en la expresión de actividad theta en el hipocampo (Lopez-Vazquez *et al.*, 2014). Específicamente a nivel del diencefalo caudal se ha propuesto que la transducción de la intensidad de la activación reticular en la frecuencia de la actividad theta resultante, ocurre en el nHP y nSUM, que juntos forman una crítica área nodal (Gottesmann, 1992), pues el disparo de neuronas del nSUM y el disparo tónico de células de nHP pueden actuar sinérgicamente para relevar la actividad reticular ascendente hacia el SM/BDB en el control de la actividad theta (Vertes and Kocsis, 1997, Bland and Oddie, 1998). Por lo cual es lógico pensar que, si dichos núcleos están participando en la codificación de la amplitud y/o frecuencia en forma conjunta, entonces la influencia serotoninérgica sobre la actividad theta hipocampal resultante, podría ser más evidente a este nivel de nHP y nSUM. Al respecto, se ha reportado que al reducirse la frecuencia de la actividad theta, se altera el desempeño en el laberinto acuático de Morris por lo cual la expresión de la actividad theta a una frecuencia precisa puede ser importante para la función hipocampal (Ruan *et al.*, 2011). Es decir, un acoplamiento de la actividad hipocampal a una frecuencia específica podría alterar la eficiencia en el aprendizaje y memoria, sin embargo, son pocos los trabajos que evalúan a nivel septal e hipocampal el cómo ocurre esta modulación de la actividad theta.

En relación a lo que ocurre a nivel diencefálico, Gutiérrez-Guzmán y cols., redujeron la serotonina del núcleo supramamilar y el hipotálamo posterior de ratas y registraron la actividad theta del hipocampo durante el aprendizaje espacial. Los autores encontraron una deficiencia en el aprendizaje, asociada con una reducción de la actividad theta de alta frecuencia del hipocampo (Gutierrez-Guzman *et al.*, 2012). Posteriormente, evaluaron el efecto de la reducción de serotonina específicamente en el núcleo surpramamilar y observaron deficiencias similares a las observadas con la reducción conjunta del núcleo supramamilar y el hipotálamo posterior. Además de la potencia theta reducida, en este trabajo encontraron una reducción de la coherencia entre regiones septales e hipocampales, así como entre los núcleos supramamilares e hipocampo, indicando que la reducción de serotonina en nSUM modifico el acoplamiento funcional entre las estructuras, impidiendo una

eficiente codificación y recuerdo de la información espacial.

Sin embargo, la participación del hipotálamo posterior en la modulación de la actividad theta hipocampal ha sido menos estudiada, y menos aún el papel que puede desempeñar la serotonina en dicha modulación. En un estudio en preparación, se observó que la reducción de serotonina del nHP mediante la administración de 5,7-DHT produjo un modesto efecto de facilitación del aprendizaje espacial, de manera opuesta a lo que ocurrió en el nSUM en el cual hubo una deficiencia marcada del aprendizaje; esto indica que el papel de ambos núcleos y su modulación de la actividad theta hipocampal a través de la influencia de la serotonina, es de hecho, diferente. En el presente trabajo se plantea evaluar el efecto del incremento de serotonina en el nHP mediante la microinfusión de citalopram, sobre el aprendizaje espacial y la actividad theta subyacente. Como Jeltsch-David y cols., hipotetizaron que el incremento de serotonina en el septo medial produciría un estado de baja codificación de memoria, esperamos que el incremento de serotonina en el nHP produzca una reducción de la expresión de actividad theta del propio nHP, del septo medial y del hipocampo y una reducción del acoplamiento funcional entre dichas estructuras, asociados con una menor eficiencia en el aprendizaje espacial.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios experimentales sugieren que el sistema serotoninérgico actúa como un desincronizador de los patrones de actividad rítmica theta, lo que produce una deficiencia en la codificación de la información que repercute en los procesos de memoria.

De igual forma se sabe de la contribución del hipotálamo posterior en la modulación y origen de la actividad theta, pero no se ha estudiado directamente su participación durante conductas relacionadas con el aprendizaje y la memoria y tampoco se conoce si la serotonina puede modular estos procesos actuando directamente sobre este núcleo.

JUSTIFICACIÓN

Es importante estudiar la participación del sistema serotoninérgico en el núcleo hipotalámico posterior como parte de los diferentes niveles del sistema sincronizador ascendente dado el papel regulador que tiene sobre la fisiología hipocampal y la relación que guarda con la actividad theta, la cual es necesaria para el correcto procesamiento de la información (codificación, almacenamiento y recuperación) y por tanto en los procesos de aprendizaje y memoria.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del incremento de serotonina en núcleo hipotalámico posterior sobre el aprendizaje espacial y la actividad theta del nHP, septo medial e hipocampo, en la rata.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el aprendizaje espacial de ratas después del incremento de serotonina en el área hipotalámica posterior, mediante la administración del inhibidor de la recaptura de serotonina citalopram.
- Evaluar las características de la actividad EEG (frecuencia, potencia, y coherencia) subyacente al aprendizaje espacial, del área hipotalámica posterior, el septo medial y el hipocampo de ratas, después del incremento de la serotonina en el área hipotalámica posterior, mediante la administración del inhibidor de la recaptura citalopram.

HIPÓTESIS

El incremento de serotonina en el área hipotalámica posterior, modificará la potencia, frecuencia y coherencia de la actividad theta en dicha área, en el septo medial y en el hipocampo, y producirá deficiencias en pruebas de memoria espacial, en la rata.

METODOLOGÍA

Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350 a 450 gr de peso, mantenidas en un bioterio bajo condiciones estándar, con un ciclo de luz oscuridad de 12 por 12 horas (7-19 hrs), los cuales fueron asignados a los diferentes grupos al azar, con suministro de alimento y agua *ad libitum* y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio. Todos los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica bajo anestesia con Ketamina/Pentobarbital (50 mg/kg im y 30 mg/kg ip, respectivamente). En cada uno de los animales, con base en el Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1999) se implantó a permanencia una cánula guía cuyo extremo interno quedó ubicado 1 mm por arriba de la región hipotalámica posterior (coordenadas 4 mm posterior, 1.6 mm izquierda, de bregma con un ángulo de 12° de la vertical y una profundidad de 6.27 mm dorsoventral a la superficie del cráneo); asimismo, se implantaron a permanencia electrodos monopares en el nHP (coordenadas 4 mm posterior a Bregma, 1.6 mm lateral derecho a la línea media y la profundidad de 7.27 mm dorsoventral a la superficie del cráneo con un ángulo de 12°), y en el SM (coordenadas 0.4 mm anterior a bregma, 1.5 mm lateral derecho a la línea media y 6.8 mm dorsoventral a la superficie del cráneo con una inclinación de 15° de la vertical); así como, electrodos bipolares concéntricos en la región CA1 del hipocampo (3.5 mm posterior a bregma, 2.6 mm lateral derecho a la línea media, y 2.6 mm dorsoventral a la superficie del cráneo) y en la región de giro dentado (3.5 mm posterior a bregma, 1 mm lateral derecho y profundidad de 4 mm dorsoventral). Un tornillo unido al hueso frontal fue utilizado como tierra eléctrica y otro tornillo en el hueso occipital sirvió como anclaje adicional del implante. Después de un periodo de recuperación de 3 semanas, las ratas fueron asignadas de manera aleatoria al grupo experimental 1 (E1, n = 10; infusión de 0.8 µl de LCR artificial, los días de prueba 1 al 7 e infusión de 0.8 µl de citalopram 0.2 mM, disuelto en LCR, los días de prueba 8 al 11) o al grupo experimental 2 (E2, n=10, infusión de 0.8 µl de citalopram 0.2 mM, disuelto en LCR, los días de prueba 1 al 7 e infusión de 0.8 µl de LCR

artificial los días de prueba 8 al 11) En ambos grupos, la infusión de LCR o citalopram, a través de la cánula guía ubicada en el nHP, se efectuó cada día 15 minutos antes del inicio de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial.

Los electrodos bipolares fueron contruidos con alambre de nicromo de 65 µm de diámetro, fijado dentro de una cánula de acero inoxidable calibre 25 cubierta con resina epóxica, excepto una pequeña superficie de registro en la punta.

Tabla 1. Características de las variables

Variable Independiente	Incremento de serotonina en el nHP por infusión de citalopram	Cuantitativa/continua	Intervalar
Variables Dependientes	Electrofisiológica: Potencia y Coherencia de la actividad theta	Cuantitativa/continua	intervalar
	Conductual: Distancia, latencia de escape y número de cruces sobre la plataforma en el laberinto acuático de Morris.	Cuantitativa/continua	Intervalar

Tipo de estudio: Analítico correlacional.

Evaluación de la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial.

Se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial utilizando el laberinto acuático de Morris: una tina circular de 150 cm de diámetro llena con agua a 28 °C, teñida en azul oscuro, cuya superficie se dividió virtualmente en 4 cuadrantes, con una plataforma circular de 12 cm de diámetro, colocada 2 cm bajo la superficie del agua, en el mismo cuadrante. Además, se colocaron señales espaciales fácilmente perceptibles en el cuarto de registro, en el entorno inmediato del laberinto.

La prueba consistió en 4 ensayos diarios con intervalo inter-ensayo de 2 minutos, durante 6 días consecutivos. En cada ensayo se dejó al animal partir aleatoriamente de diferentes puntos y de cara a la pared de la tina a fin de que la rata pueda aprender a encontrar la plataforma en el término de 60 segundos. En el

caso de que la rata no encontrara la plataforma en 60 segundos, se le colocó y permaneció sobre la plataforma por un periodo de 15 segundos. En el día 7 se realizó solamente un ensayo de prueba, el cual consistió en colocar al animal en la tina, habiendo retirado previamente la plataforma y se le permitió nadar durante 30 segundos en busca de la plataforma.

Luego de 1 día en que no se realizó ninguna prueba (día 8) y habiendo llevado a cabo el entrecruzamiento de tratamientos, se realizaron nuevamente 4 ensayos diarios durante 4 días sucesivos.

La infusión de LCR o citalopram, en cada día de prueba se efectuaron de acuerdo al diseño experimental correspondiente a cada grupo 15 min antes del inicio de los 4 ensayos diarios.

Las rutas de nado fueron grabadas con una cámara de video (Videobench Sciview) y las señales electroencefalográficas fueron capturadas (software de DataWave Tech) de manera simultánea en cada ensayo. Para evaluar la eficiencia en el aprendizaje y la memoria espacial se determinaron y analizaron los siguientes parámetros: Se promediaron los resultados de los 4 ensayos diarios de cada rata por grupo y se analizaron estadísticamente.

Las variables a considerar fueron:

- Latencia de escape: tiempo que toma el animal en localizar la plataforma. Dicha latencia será obtenida por cada ensayo por día de entrenamiento.
- Distancia total recorrida por cada animal durante la búsqueda de la plataforma por cada ensayo, por día.
- Velocidad de nado

Número de cruces por el área del cuadrante donde se ubique la plataforma, en el ensayo de prueba sin plataforma.

Registro del EEG.

El registro de la actividad eléctrica del giro dentado, la región CA1 del hipocampo, el septo medial y el núcleo hipotalámico posterior, se realizó de manera continua durante la ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Antes del inicio del primer ensayo de cada día de entrenamiento se realizó en cada uno de los días de entrenamiento, el registro del EEG, durante 30 segundos, en condición basal, con la rata mojada en estado “*Atento quieto*” en su caja de reposo (basal 1). Posteriormente se procedió a la infusión de citalopram o LCA y se continuó el registro durante 15 minutos (basal 2) luego de los cuales se inició con el primer ensayo. En la etapa de “*búsqueda*” se incluyeron los registros de EEG obtenidos desde la colocación de la rata en el agua de cara a la pared de la tina hasta el momento en que el animal subió a la plataforma de escape, a partir de este momento se registró el EEG, durante 15 segundos, con la rata sobre la plataforma, (etapa de “*meta*”). En el séptimo día, durante el ensayo de prueba (sin plataforma), además de los registros basales, también se efectuó un registro de 30 segundos de duración durante la búsqueda de la plataforma. Se utilizó un amplificador (DataWave Technologies) con los filtros de alta y baja frecuencia colocados a 1 y 100 Hz respectivamente, los registros fueron capturados a una frecuencia de muestreo de 1024 Hz, y almacenados para su análisis posterior (segmentos de 1 segundo). Se obtuvieron espectros de potencia absoluta y mediante la Transformada Rápida de Fourier (FFT) se analizaron, así como la coherencia de la actividad eléctrica en el rango de frecuencias de la actividad theta entre las regiones registradas. (Mathlab).

Tanto para la potencia absoluta, como para la coherencia se obtuvo el promedio de los valores obtenidos de los cuatro ensayos diarios en cada una de las etapas conductuales.

Histología

Terminados los experimentos se realizó el sacrificio de los animales mediante perfusión intracardiaca de una solución lavadora Amortiguador de fosfatos 0.1M con heparina sódica (1000 U/L) y procaína (1 g/L); y la fijación con una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos. Se disecó el cerebro y se obtuvieron bloques de las regiones de estudio. Se realizó la inclusión en parafina y cortes coronales con un micrótomos de deslizamiento (10 micras) posteriormente fueron teñidos con violeta de cresilo, para identificar la posición tanto de la cánula guía como de los electrodos de registro.

Neuroquímica

Para determinar la efectividad de la dosis de citalopram y el volumen administrado a los animales del grupo experimental, se realizó un grupo piloto de animales ($n=3$) a los cuales solamente se les colocó la cánula guía y una cánula de microdiálisis, en las coordenadas del nHP. Estos animales fueron sometidos a la infusión de citalopram; se realizó la colecta de líquido extracelular del nHP a través de la cánula de microdiálisis, se colectó a una velocidad de flujo de 0.1 microlitros por minuto durante 1 hora y 30 minutos para la obtención de una muestra de 30 microlitros.

Del líquido colectado se cuantificó la concentración de serotonina (HPLC) mediante análisis electroquímico utilizando el método de Ase modificado (Ase y cols., 1999). Se empleó una columna analítica de 3 μm de particulado (100 X 4.6 mm, Adsorbosphere Catecholamine; Altech; Deerfield IL, U.S.A.). Se utilizó un gradiente continuo y una fase móvil formada como sigue: ácido monocloroacético 0.1 M, EDTA- Na_2 2mM, octal sulfato sódico 1.0 mM pH 3.3 y alcohol etílico 7 % con una concentración de cloruros de 1M. El flujo fue ajustado a 1.3 ml/m C. El potencial del electrodo de trabajo de la celda electroquímica (Antec Lyden VT-03) estuvo ajustado para que las muestras y estándares fueran oxidados a un potencial de + 680 mV en relación con un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Estándares externos de cada compuesto auténtico fueron inyectados para establecer el orden de elusión y llevar a cabo el cálculo de las concentraciones. Los resultados fueron expresados en concentración mM del dializado.

Análisis estadístico.

Las comparaciones de la concentración de serotonina y Acido 5-Hidroxi-indolascético (5HIA) se realizaron mediante un ANOVA de 1 vía.

Se tomaron en cuenta los valores de una $N=20$, 10 animales en cada grupo. La distancia total recorrida y velocidad de nado fueron comparadas mediante un ANOVA para medias repetidas y Tukey como prueba pareada. Se hicieron las comparaciones intragrupal de la mediana de las latencias promedio por día, mediante la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon. Así mismo, los datos fueron comparados intergrupalmente mediante la prueba "U" de Mann-

Whitney. El número de cruces por la zona de la plataforma durante el ensayo de prueba se comparó mediante un ANOVA y Tukey.

En lo que respecta a la actividad eléctrica hipocampal (Potencia absoluta, relativa y coherencias), fue comparada entre fases en un mismo día de prueba y por día de prueba en una misma fase. Las comparaciones de las potencias absoluta y relativa fueron realizadas mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (días de entrenamiento) y parcelas divididas de tres factores (grupo, etapa, frecuencia), y como prueba *post-hoc* se aplicará la prueba de Tukey.

Todo lo anterior será realizado en el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.1

RESULTADOS

Se verificó histológicamente la posición de los electrodos de registro y cánula con las coordenadas antes mencionadas obtenidas del Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson tanto del hipocampo (GD, CA1), como del septo medial (SM) y del núcleo hipotalámico posterior. Los resultados que se describen a continuación fueron obtenidos en animales de los grupos E1 y E2 en los que se confirmó la correcta ubicación de la cánula guía para la infusión de LCR o citalopram; así como de los electrodos para el registro de la actividad eléctrica cerebral.

LA figura 4 muestra fotomicrografías de las regiones de estudio, en la parte izquierda la cicatriz en la región de CA1 y en la parte derecha en la zona de giro dentado y en la parte inferior la región de septo medial. Por su parte en la figura 5 se puede observar la ubicación donde estaba colocado tanto el electrodo como la cánula de infusión en la zona del núcleo hipotalámico posterior.

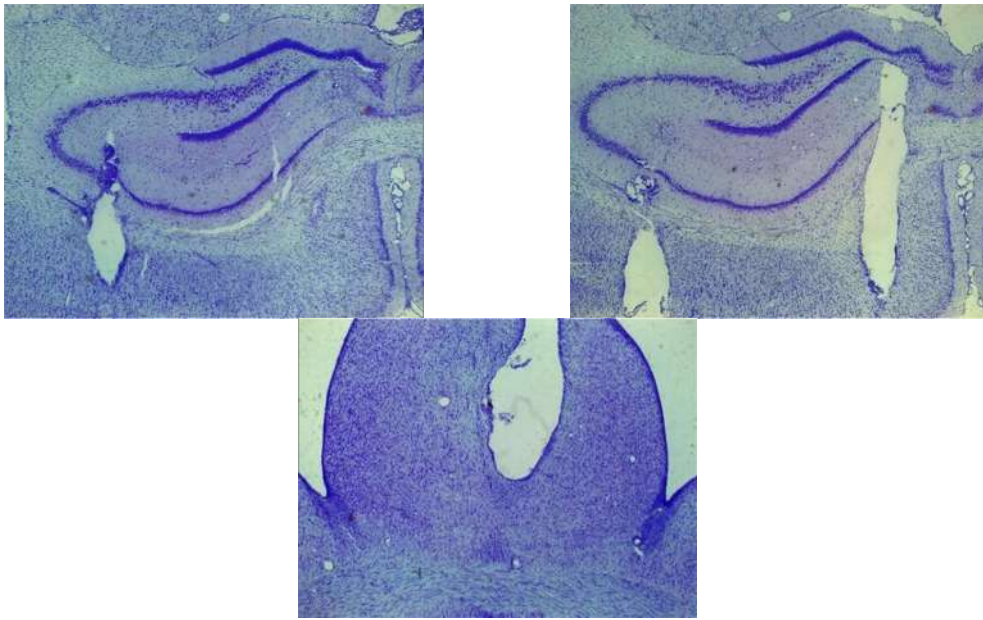


Figura. 4. Verificación histológica, cicatriz de los electrodos en la región CA1 (superior izquierda) giro dentado (superior derecha) y en septo medial (inferior).

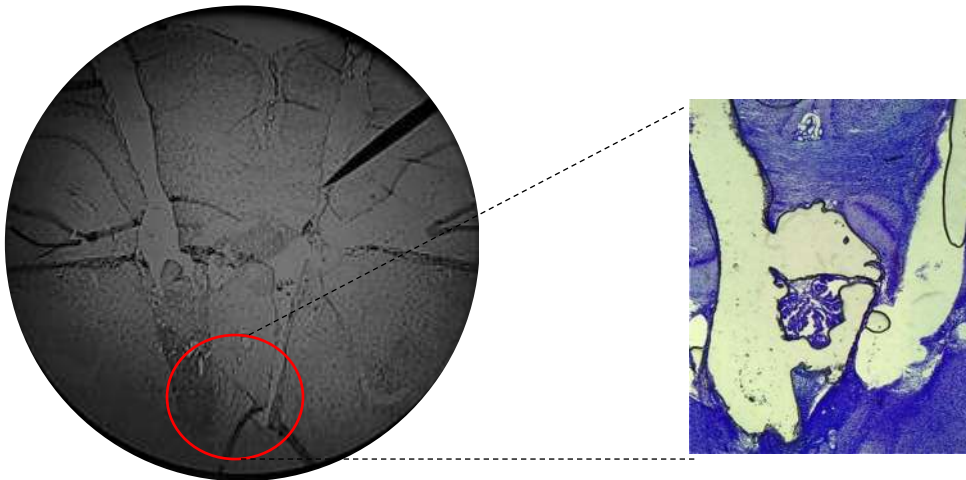


Figura. 5. Verificación histológica, cicatrices bilaterales del electrodo y cánula en la región de núcleo hipotalámico posterior, izquierda 40X.

Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial.

La figura 6 ilustra los resultados obtenidos de la comparación intergrupar de la distancia de nado recorrida para encontrar la plataforma. Se realizó una comparación de los 11 días de entrenamiento juntos mediante un ANOVA para medidas repetidas y la prueba Tukey como prueba pareada. Se encontraron

diferencias por grupo [$F(1,9) = 10.17$, $p = 0.011$], debido a que las distancias de nado totales recorridas por el grupo E2 fueron mayores que las del grupo E1, y también la diferencias por grupo y día [$F(9, 81) = 2.66$, $p = 0.009$], ya que el grupo E2 presentó distancias mayores que el grupo E1 los días 3, 4 y 6 de entrenamiento.

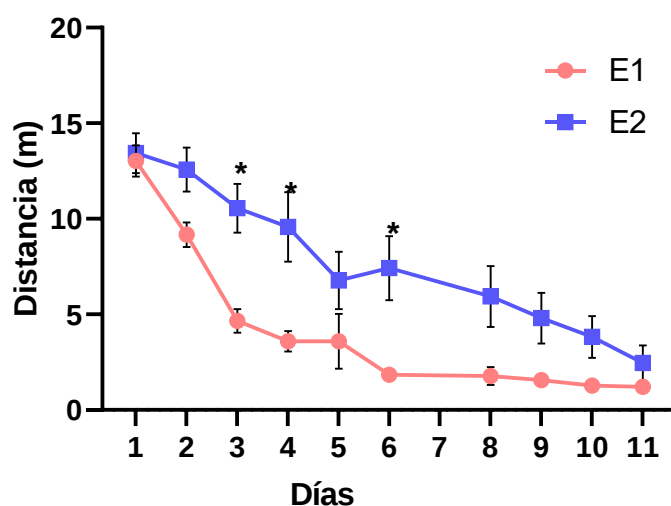


Figura 6. Distancias de nado (Media $\pm$ error estándar) recorridas por los animales de los grupos E1 ($n=9$) y E2 ($n=10$), para localizar la plataforma en los ensayos efectuados en días sucesivos. Pueden observarse las diferencias por grupo que resultaron estadísticamente significativas [$F(1,9) = 10.17$, $p = 0.011$], debido a la mayor distancia recorrida total en el grupo E2. Asimismo, la interacción grupo y día fue estadísticamente significativas ($p=0.011$). +, grupo E1 Vs. E2.

Sin embargo, dado que el entrenamiento se realizó los primeros 6 días bajo un tratamiento y los últimos 4 días se invirtió el tratamiento, se realizaron también comparaciones mediante ANOVA de medidas repetidas independiente de los dos tratamientos. El ANOVA de los primeros 6 días mostró diferencias significativas por grupo [$F(1,13) = 10.470$, $p = 0.007$], y por grupo por día [$F(5,65) = 2.959$, $p = 0.018$]. Las comparaciones pareadas mostraron similarmente que los días 3, 4 y 6 el grupo E2 realizó trayectorias más largas que el E1. Mientras que en el ANOVA de medidas repetidas de los días 4 al 8 hubo un efecto significativo por grupo [$F(1,9) = 5.234$, $p = 0.048$], pero no de la interacción por grupo por día [$F(3,27) = 1.925$, $p = 0.149$]. Las distancias del grupo E2 fueron significativamente mayores que las del grupo E1 (efecto principal), mientras que las comparaciones pareadas de los días 8 al 11,

mostraron que el día 8 las distancias fueron mayores para el grupo E2, mientras que el resto de los días no hubo diferencias significativas.

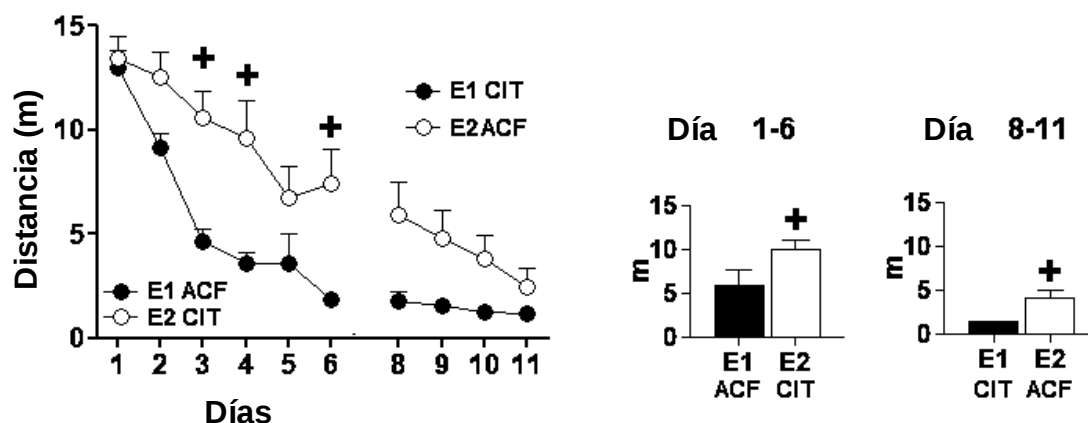


Figura 7. Comparaciones intra-grupo y efecto total de las distancias de nado (Media $\pm$ error estándar) recorridas por los animales de los grupos E1 (n=9) y E2 (n=10), ($p < 0.011$) *ACF (artificial cerebrospinal fluid).

En la figura 7 se muestran los resultados de las comparaciones intra-grupales de la distancia de nado recorrida los primeros 6 días de entrenamiento para localizar la plataforma, en los grupos E1 [$F(5,41) = 28.45$, $p < 0.001$] y E2 [$F(5,47) = 7.750$, $p < 0.001$]. Puede observarse, en el grupo E1, la reducción significativa de la distancia recorrida, en comparación con el primer día de entrenamiento las distancias fueron menores desde el segundo al sexto día de entrenamiento, además con respecto al segundo día también fueron menores del día 3 al 6; mientras que en el grupo E2 la reducción de la distancia fue significativa solo el sexto día con respecto tanto a día 1 como al día 2. En la comparación intra grupal de distancia los 4 días de tratamiento invertido se observaron diferencias significativas en el grupo E2 [$F(3,23) = 4.085$, $p = 0.026$], pero no para el grupo E1 [$F(3,19) = 0.9184$, $p = 0.4613$]. Las comparaciones pareadas mostraron que el grupo E2 redujo significativamente la distancia recorrida para encontrar la plataforma el día 11 con respecto al día 8 de entrenamiento.

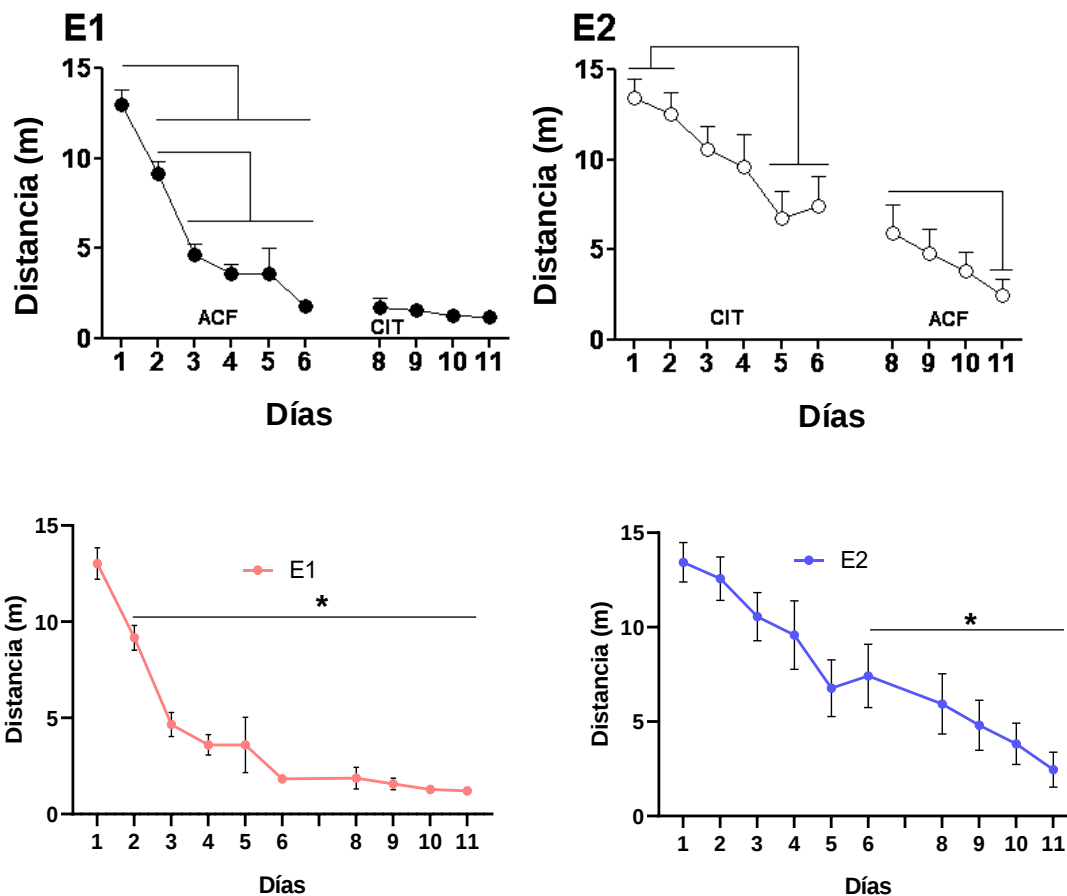


Figura 8. Distancia de nado recorrida (Media $\pm$ error estándar) por cada grupo, en los días de prueba sucesivos. Note la reducción significativa ($p < 0.05$, Prueba de Tukey) de la distancia de nado en el grupo E1 ($n=9$) a partir del día 2 de prueba y en el grupo E2 ($n=10$), a partir del día 6 de prueba.

No hubo diferencias significativas en la velocidad de nado (Figura 8).

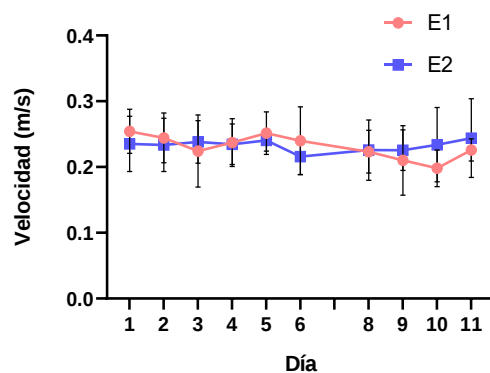


Figura 9. Velocidad de nado (Media $\pm$ error estándar.) en los grupos E1 y E2, sin diferencias significativas.

La figura 9 ilustra las trayectorias de nado de un animal representativo del grupo E1

y otro del grupo E2 durante los primeros 6 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris, bajo los efectos de la infusión de LCA o de citalopram en el nHP, respectivamente. Puede observarse la mayor extensión y una orientación diferente de la trayectoria de nado bajo los efectos de citalopram (E2), en comparación con LCA, en el día 3 de prueba y en los días sucesivos.

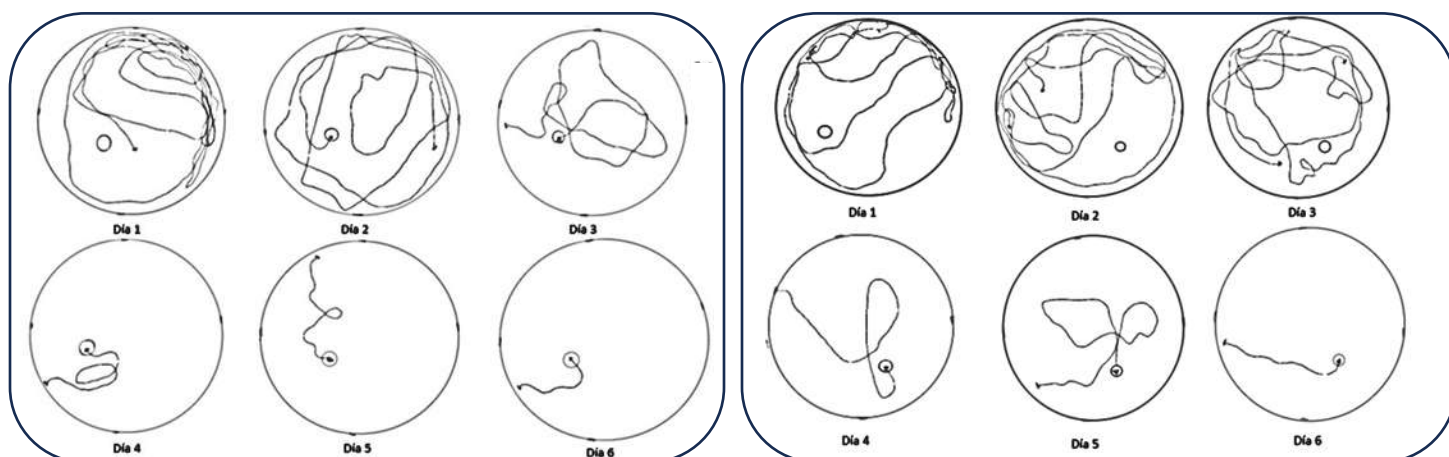


Figura 10. Rutas de nado representativas de cada grupo (E1 y E2) durante los primeros 6 días de entrenamiento.

Con respecto al número de cruces (durante los 30 segundos) por el sitio donde se encontraba la plataforma (Figura 10), en el ensayo de prueba realizado el día 7, habiendo retirado previamente la plataforma, se observaron diferencias significativas entre los grupos E1 y E2. En efecto, el número de cruces efectuado por el grupo E1 (LCA), sobre el sitio donde se encontraba la plataforma, fue significativamente mayor, en comparación con los efectuados por el grupo E2 (citalopram).

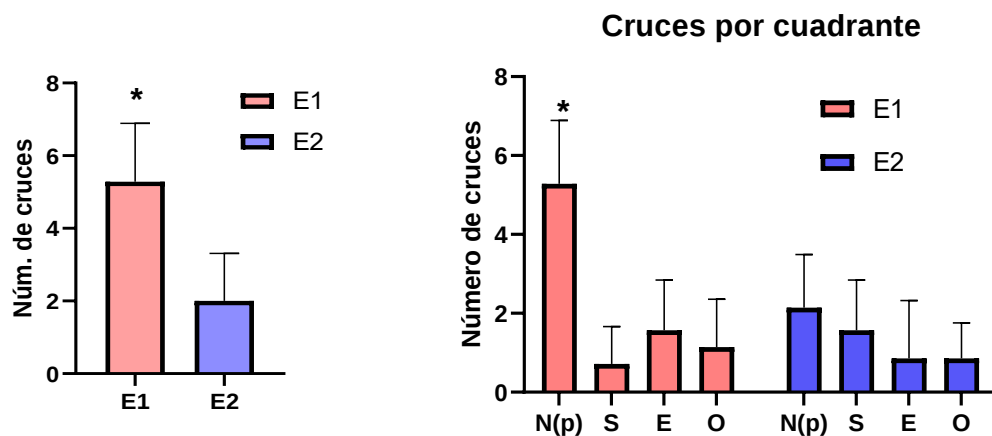
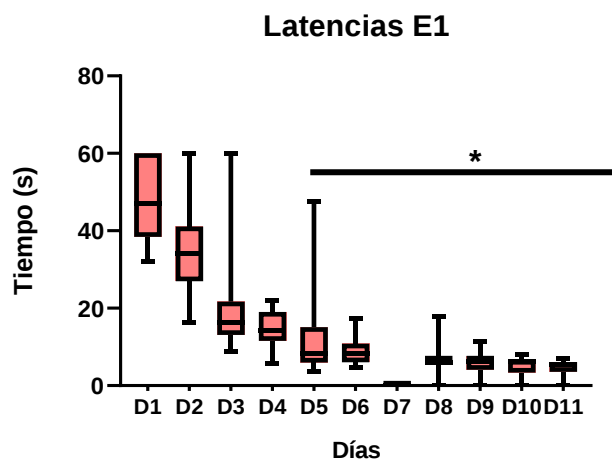


Figura 11. Número de cruces (Media $\pm$ error estándar) por el sitio donde se encontraba la plataforma en los grupos E1 y E2, con valores significativamente mayores en el Grupo E1 ($p=0.0180$).

Para la latencia de escape se realizó la comparación intragrupal de las latencias promedio por día, mediante el ANOVA de Friedman y las pruebas pareadas mediante la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon y se obtuvo un efecto significativo del entrenamiento para el grupo E1 ($p= 0.0001$), la latencia de escape fue menor desde el día 5 con respecto al primer día para este grupo Fig.12



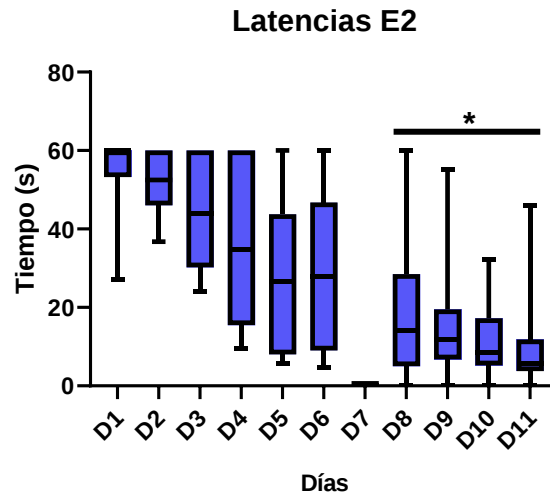
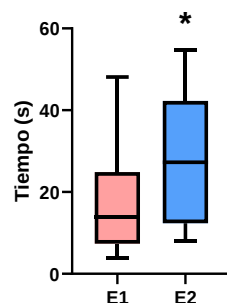


Figura 12. Latencias de escape (Mediana $\pm$ error estándar) de los grupos E1 y E2. Pueden observarse valores significativamente menores ($p=0.0001$) en el grupo E1 a partir del día 5 y en el grupo E2 a partir del día 8, en comparación con el día 1. La comparación intergrupar mostró diferencias significativas con mayores latencias de escape en el grupo E2 ($p=0.0015$).

Sin embargo, en el grupo E2 la reducción significativa de la latencia de escape se observó a partir del día 8, luego de la inversión del tratamiento (LCR en lugar de citalopram).

La comparación entre grupos de las latencias de escape mostró diferencias significativas (Prueba U de Mann-Withney) ya que el grupo E2 obtuvo latencias mayores que el grupo E1 considerando los 10 días de entrenamiento (1-6 y 8-11).



Actividad Eléctrica

Potencias

La figura 12 muestra los resultados de la potencia del EEG (datos normalizados con logaritmo natural) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en el **nHP**. La comparación de potencias mediante un ANOVA de medidas repetidas con los factores día (repeticiones), etapa, frecuencia y grupo de los días 1 al 6, no mostró diferencia significativa por grupo [$F(1,554) = 0.109$, $p = 0.741$], pero si por grupo por día [$F(5,2770) = 4.540$, $p < 0.001$], y por grupo por día y por etapa [$F(5,2770) = 3.864$, $p = 0.002$]. Las comparaciones pareadas por grupo y día (Tukey) mostraron en los días 2, 3 y 4 valores mayores de potencia en el grupo E2 con respecto al E1, bajo los efectos de citalopram. En los días 8 a 11 luego de la inversión de tratamientos la ANOVA mostró un efecto no significativo por grupo [$F(1,537) = 0.001$, $p = 0.969$], pero un efecto significativo por grupo por día [$F(3,1611) = 12.090$, $p < 0.001$] y por día, grupo y etapa [$F(3,1611) = 11.217$, $p < 0.001$]. Las comparaciones pareadas por grupo y día mostraron una menor potencia del grupo E2 con una diferencia significativa el día 9 luego de la inversión de tratamientos (LCA en lugar de citalopram).

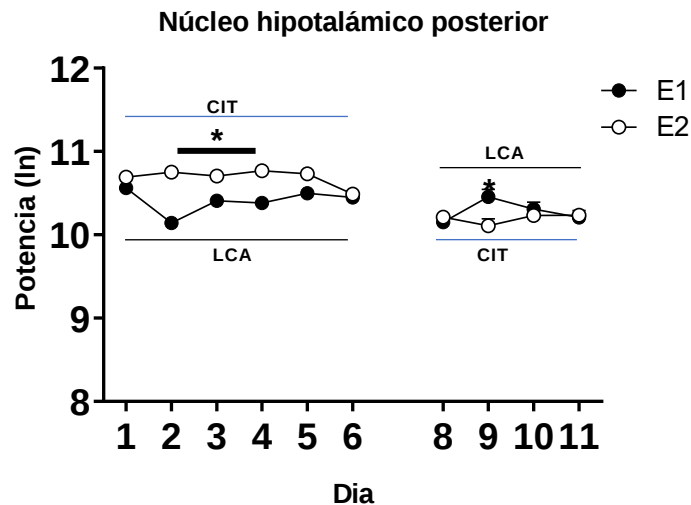


Figura 13. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en nHP. Puede observarse la potencia significativamente mayor ($p=0.0001$) de la actividad theta en el grupo E2 en los días de tratamiento con citalopram.

En las comparaciones pareadas por día por grupo y etapa, el grupo E2 mostró mayor potencia los días 2 y 4 y 10 en el basal pre infusión, los días 2 y 5 en el estado basal post infusión, y los días 2 y 9 en la búsqueda de la plataforma (figura 14).

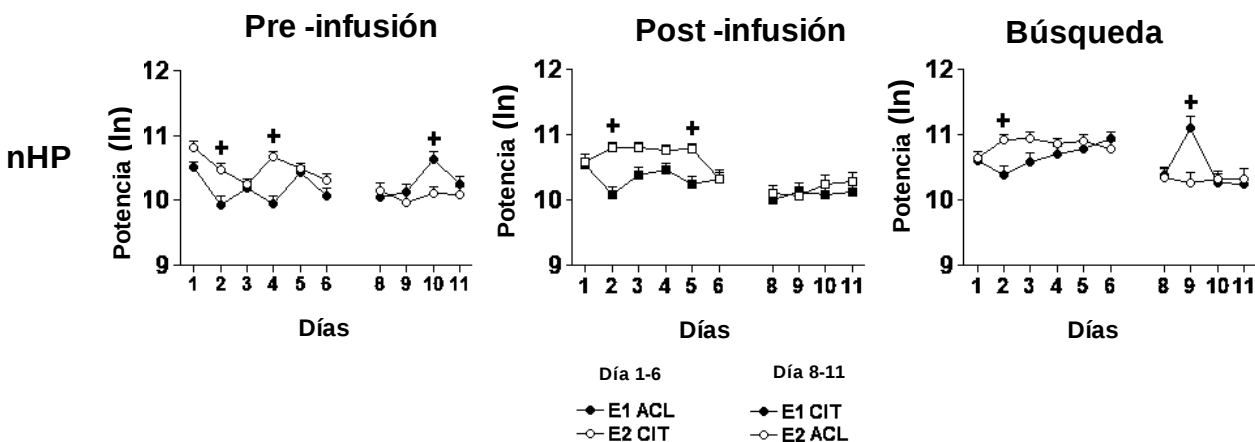


Figura 14. Potencias de la actividad eléctrica cerebral en cada etapa (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en nHP. Puede observarse la potencia significativamente mayor ($p=0.0001$) de la actividad theta en el grupo E2 en los días de tratamiento con citalopram.

En las comparaciones por día en cada una de las etapas: pre-infusión, post-infusión y búsqueda, igualmente hubo diferencias significativas las comparaciones pareadas por grupo y por etapa (Bonferroni), en el grupo E1 entre la etapa pre y post solo el día 10 ($p < 0.05$) y entre la etapa pre y búsqueda los días 4, 6 y 9 ($p < 0.001$) para el grupo E2 entre las etapas pre y post solo fue significativo el día 3 y entre las etapas pre y búsqueda los días 2 ($p < 0.05$), 3 ($p < 0.001$) y 6 ($p < 0.05$).

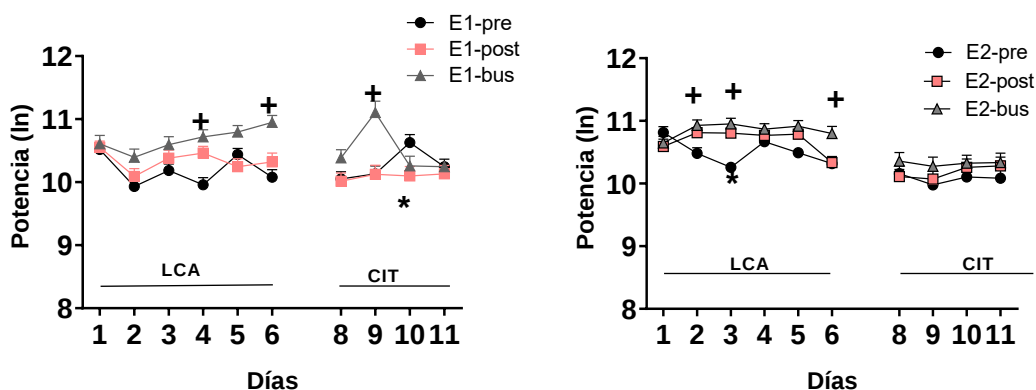


Figura 15. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta en nHP, comparaciones entre las etapas basales pre y post (*) y entre las etapas pre y búsqueda (+) de la plataforma en el laberinto acuático de Morris. Pueden observarse diferencias significativas ($p=0.0001$) intragrupalas entre las diferentes etapas.

En la comparación de potencias por día y por grupo en la región de **SM** durante el primer tratamiento (ANOVA de los primeros 6 días), igualmente no hubo diferencias significativas entre grupos [$F(1,554) = 0.646$, $p = 0.422$] pero si por grupo y día [$F(5,2770) = 5.578$, $p < 0.001$] y por grupo, día y etapa [$F(5,2770) = 4.521$, $p < 0.001$]. Las comparaciones pareadas mostraron mayor potencia para el grupo E1 el día 3 de entrenamiento. En la comparación de los días de entrenamiento después de la inversión de los tratamientos el ANOVA mostró efectos significativos por día por grupo [$F(3,1509) = 10.019$, $p < 0.001$] y por día, grupo y etapa [$F(3,1509) = 8.328$, $p < 0.001$]. las comparaciones pareadas mostraron mayor potencia para el grupo E1 los días 9,10 y 11.

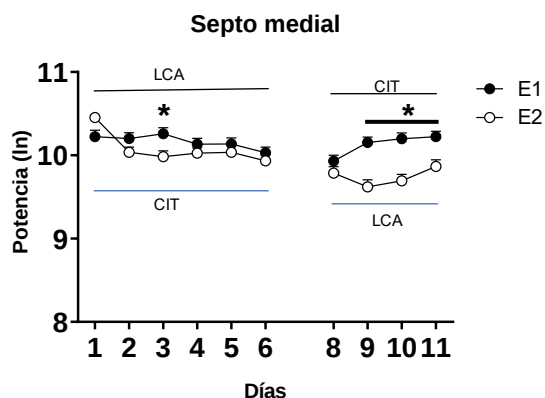


Figura 16. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en SM. Puede observarse la potencia significativamente mayor ($p=0.0001$) de la actividad theta en el grupo E1.

En las comparaciones por día, grupo y etapa, el grupo E2 mostró mayor potencia que el E1 en la basal pre infusión el día 1 y menor potencia que el E1 los días 10 y 11 de entrenamiento. En la etapa basal post infusión el grupo E1 mostró mayor

potencia que el E2 los días 9 y 10, mientras que no hubo diferencias significativas en la etapa de búsqueda (Figura 17).

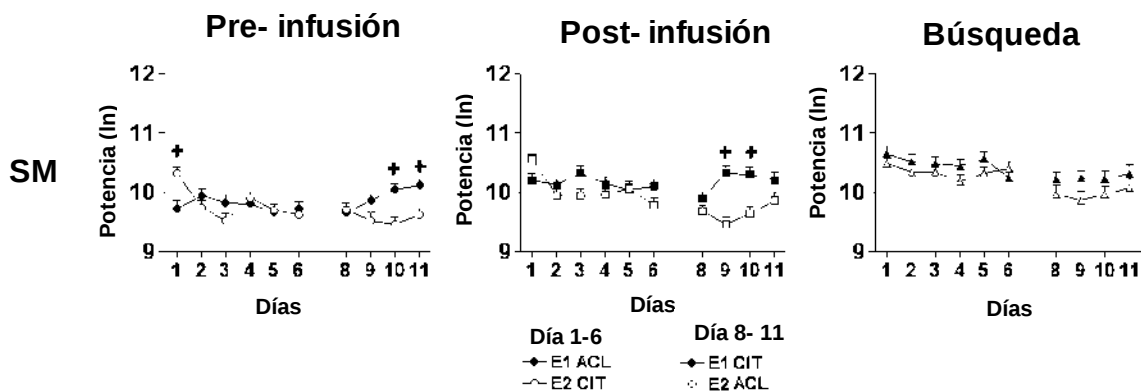


Figura 17. Potencias de la actividad eléctrica cerebral en cada etapa (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en septo medial. Puede observarse la potencia significativamente mayor en el grupo E1 (a excepción del día 1) pero solo después de la inversión del tratamiento, cuando se empezó a infundir citalopram y en el grupo E2 la potencia se mantuvo durante los días y empezó a disminuir al segundo y tercer día de la infusión con LCA y posteriormente aumento al cuarto día.

En las comparaciones por día en cada una de las etapas se observaron diferencias significativas ($p=0.0001$). En la figura 18 se ilustra como en la región de septo medial los valores de la potencia en el grupo E1 se mantienen hasta el día 8, cuando se hace la inversión de tratamientos y la potencia aumenta ligeramente bajo los efectos de citalopram. De la misma manera, en el grupo E2 los valores de potencia bajo los efectos de citalopram se mantienen hasta el día 8, en el que el cambio a la infusión de LCA en lugar de citalopram, da lugar a la reducción de la potencia. Este efecto parece ser un efecto amplificado de lo que pasa en nHP.

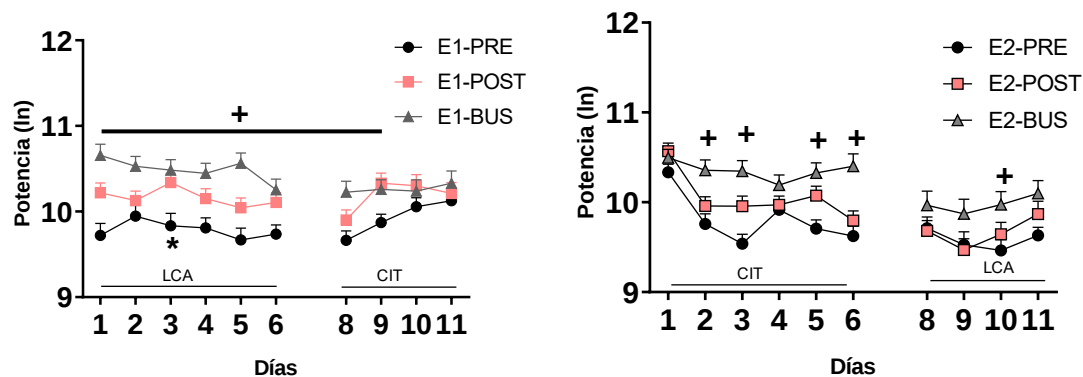


Figura 18. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta en SM prueba post-test Bonferroni, en el grupo E1 entre las etapas basales pre y post hubo diferencias solo el día 3 y entre la etapa de pre y búsqueda del día 1 al 9. Para el grupo E2 entre pre y post no hubo diferencias significativas y entre pre y búsqueda los días 2, 3, 5, 6 y 10.

La comparación de potencia de **CA1** durante los días del primer tratamiento mostró efectos significativos por día y grupo [$F(5,2770) = 9.020, p < 0.001$] y por la interacción de día, grupo y etapa [$F(5,2770) = 12.084, p < 0.001$]. Cuando se compró la potencia durante el segundo tratamiento también se observó un efecto significativo por día por grupo [$F(3,1611) = 3.879, p = 0.003$] y por día por grupo y etapa [$F(3, 1611) = 6.789, p < 0.001$].

En la región de CA1 hubo diferencias significativas por grupo y por día, excepto los días 8,9 y 10 como se muestra en la gráfica Fig. 19 la potencia fue mayor para el grupo E1 durante todos los días de la prueba bajo LCA y el día 11 cuando ya recibía Cit.

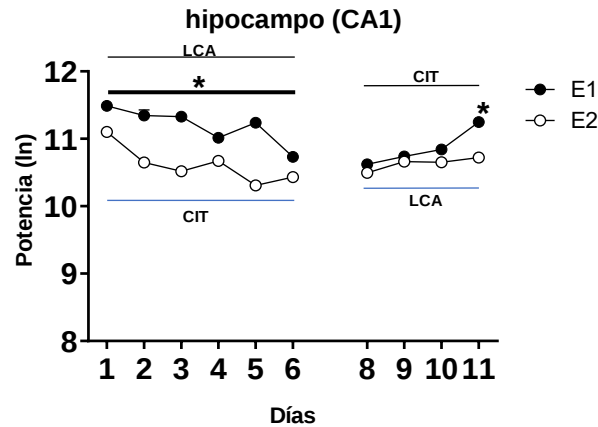


Figura 19. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en la región CA1 de hipocampo. La potencia es significativamente mayor ($p=0.0017$) de la actividad theta en el grupo E1.

En las comparaciones pareadas por grupo etapa y día se observó que el grupo E1 mostró mayor potencia en la banda theta los días 1, 2, 3 y 5 durante el basal pre infusión; los días 2, 3, 5 y 6 durante el registro basal post infusión; y finalmente, los días 2 al 5 durante la búsqueda de la plataforma. Con respecto a los días con el tratamiento invertido la potencia fue igual en los dos grupos en las tres condiciones los días 8 al 10, pero fue mayor para el grupo E1 el día 11, en las tres condiciones (Figura. 20).

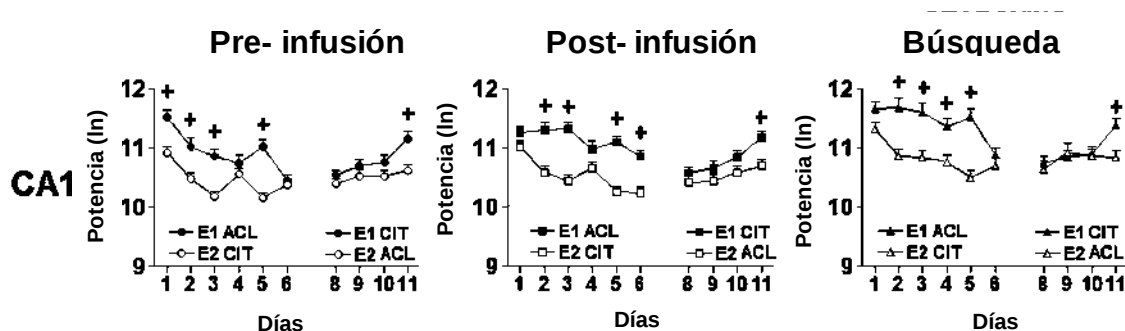


Figura 20. Potencias de la actividad eléctrica cerebral en cada etapa (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en la región de CA1 de hipocampo. Puede observarse la potencia significativamente mayor en el grupo E1 durante los días con infusión de LCA y en el último día después de la inversión de tratamientos, esto se observó en las 3 etapas.

En las comparaciones intragrupales, tanto el grupo E1 como el E2 no mostraron diferencias entre las etapas pre y post solo entre etapas de pre-infusión y búsqueda, el grupo E1 en los días 2,3 y 4, y el grupo E2 solo el día 3. Hubo diferencias significativas en cada una de las etapas cuando las comparaciones fueron entre ambos grupos.

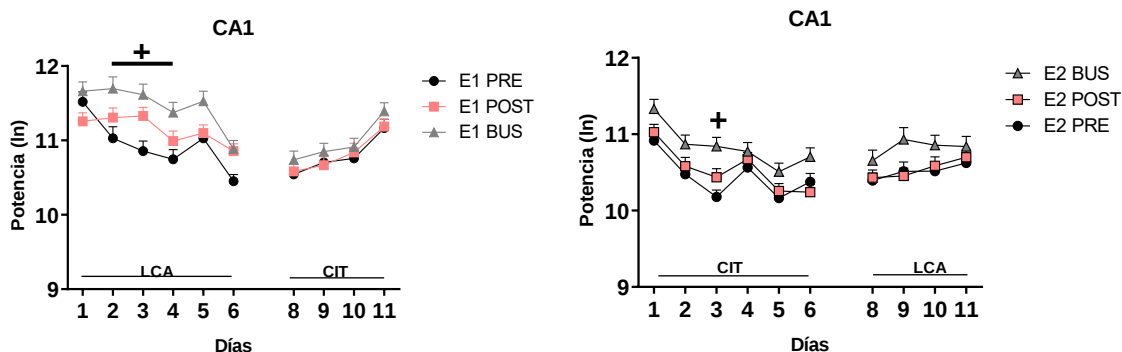


Figura 21. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta en CA1, por etapas en cada uno de los grupos.

En las comparaciones de la potencia del **Giro dentado** durante el primer tratamiento mostraron un efecto significativo por grupo y día [$F(5,2770) = 3.062$, $p = 0.009$] y por día, grupo y etapa [$F(5,2770) = 6.429$, $p < 0.001$]. Mientras que, en los días de inversión del tratamiento, el ANOVA mostró diferencias por grupo [$F(1,537) = 4.241$, $p = 0.040$], pero no por grupo por día [$F(3,1611) = 1.515$, $p = 0.209$] y grupo, día y etapa [$F(3,1611) = 1.819$, $p = 0.142$], esto se debió principalmente a que la potencia en ambos grupos no varió con respecto a los días. Sin embargo, en las comparaciones pareadas hay un claro efecto por grupo para cada etapa.

En la región de GD se observaron diferencias entre los grupos desde el primer día y hasta el día 11 aún con la inversión de tratamientos, en esta zona las diferencias fueron más evidentes incluso más que en CA1, lo que muestra como es el circuito y modulación por los diferentes núcleos de la actividad eléctrica en la banda theta.

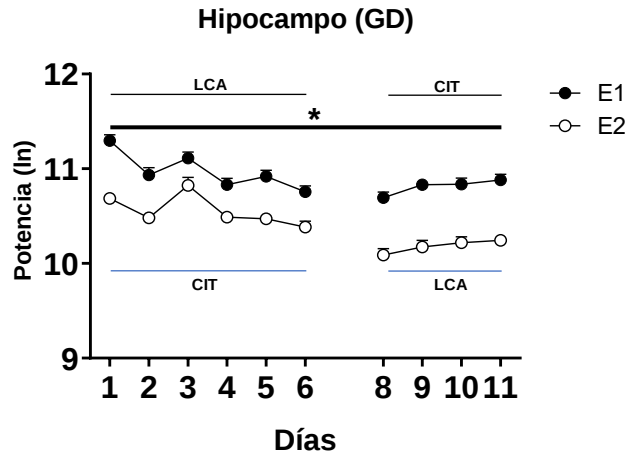


Figura 22. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en la región GD de hipocampo. La potencia es significativamente mayor ($p < 0.0001$) de la actividad theta en el grupo E1 en todos los días de la prueba.

Las comparaciones pareadas por grupo y etapa mostraron que el grupo E1 presentó mayor potencia en la banda theta los días 1 y 3, y del 8 al 11 en la etapa pre infusión; los días excepto el día 4 la potencia de E1 fue mayor en la etapa post infusión; y finalmente, los días 1, 2, 5 y 6 bajo LCA y los días 9 al 11 bajo CIT, el grupo E1 mostró mayor potencia theta que el E2 (Figura 23).

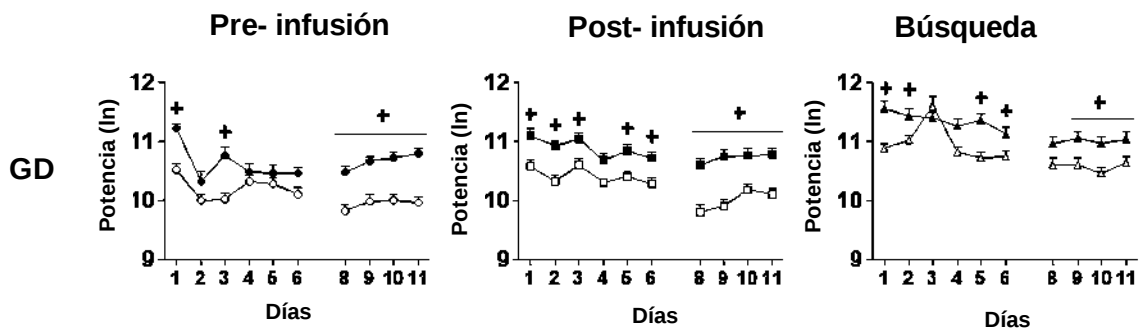


Figura 23. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta, en la región GD de hipocampo, comparaciones entre grupos por etapas.

Las comparaciones intragrupalas en ambos grupos, el grupo E1 tuvo diferencias significativas entre la etapa pre y post solo el día 2 y entre las etapas pre y búsqueda

del día 2 al 8, en el grupo E2 solo el día 3 fue significativa la diferencia entre las etapas pre y post y los días del 2 al 11 tuvieron diferencias significativas entre la etapa pre-infusión y búsqueda.

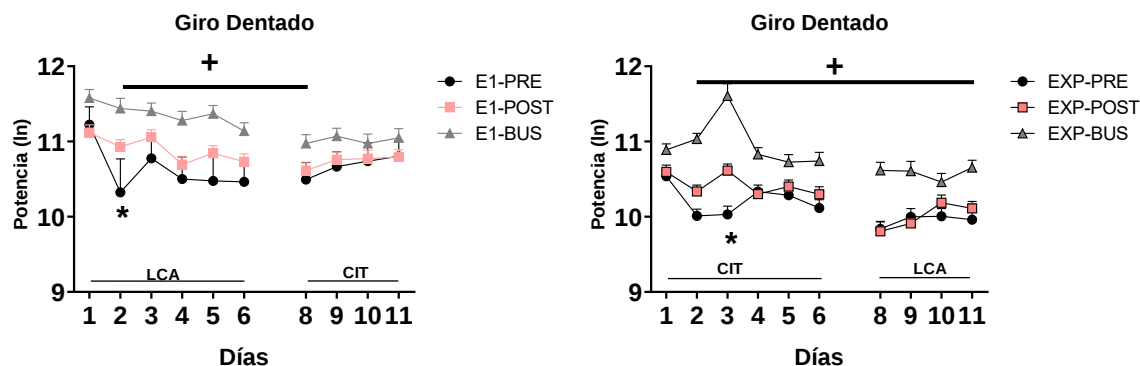


Figura 24. Potencias de la actividad eléctrica cerebral (Media $\pm$ error estándar) en el rango de frecuencias de la actividad theta en giro dentado, puede observarse diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la etapa de pre-infusión y post-infusión solo el día 2 del grupo E1 y el día 3 ($p < 0.001$) en el grupo E2.

Coherencias

Las comparaciones de los primeros 6 días de entrenamiento entre los núcleos **nHP** y **SM** mostraron un efecto significativo por grupo [$F(1,554) = 5.964$, $p = 0.015$], por grupo por etapa [$F(1,554) = 5.744$, $p = 0.018$] y por grupo, día y etapa [$F(5,2770) = 4.156$, $p = 0.001$]. En cuanto a las comparaciones pareadas de las coherencias entre grupos y por día y etapa mostraron diferencias significativas en la etapa de pre-infusión (los días 1, 3, 4), en la etapa post infusión los días 2 y 4 y durante la búsqueda los días 4 y 6). En el ANOVA de los días 8 al 11 (tratamiento invertido), no se observaron diferencias significativas por día grupo y etapa [$F(3,1305) = 0.720$, $p = 0.540$] a pesar de que en las comparaciones pareadas de la búsqueda hubo diferencias entre los grupos, los días 9 y 10. Puede observarse la mayor coherencia de estas estructuras en el grupo E1,

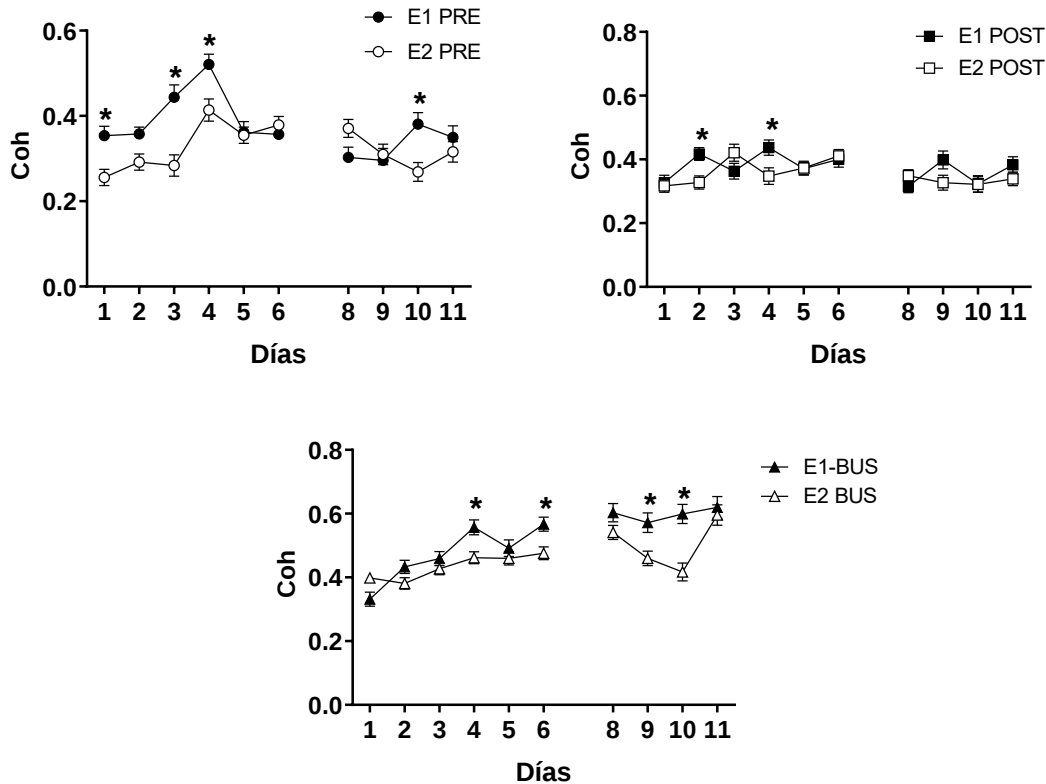


Figura 25. Coherencias de la actividad eléctrica cerebral en el rango de frecuencias de la actividad theta, entre nHP y SM, en las etapas basales 1 y 2 y en la etapa de búsqueda de la plataforma en el laberinto acuático de Morris. Pueden observarse diferencias significativas ($p=0.0001$) entre la etapa pre-infusión y búsqueda.

En las comparaciones de coherencias entre **SM** y **GD** el ANOVA de los días con el primer tratamiento mostró efectos significativos por día y grupo [$F(5,2770) = 10.205$, $p < 0.001$] (datos no mostrados); y por día, grupo y etapa [$F(5,2770) = 12.277$, $p < 0.001$]. Las comparaciones pareadas mostraron que en la etapa pre-infusión en el día 2 la coherencia fue mayor para el grupo E1, mientras que los días 3 y 5 fue mayor para el grupo E2; mientras que en la post-infusión la coherencia fue mayor para el grupo E2 los días 3 y 5. Finalmente en la búsqueda, la coherencia fue menor para el grupo E1 el día 1 y mayor para este mismo grupo el día 5. En el ANOVA para los días de la inversión del tratamiento se observó una tendencia en la interacción de los efectos grupo, día y etapa [$F(3,1302) = 2.528$, $p = 0.056$], las comparaciones pareadas mostraron diferencias entre los grupos E1 y E2 el día 10

de la etapa post infusión y en la etapa de búsqueda del día 9 al 11.

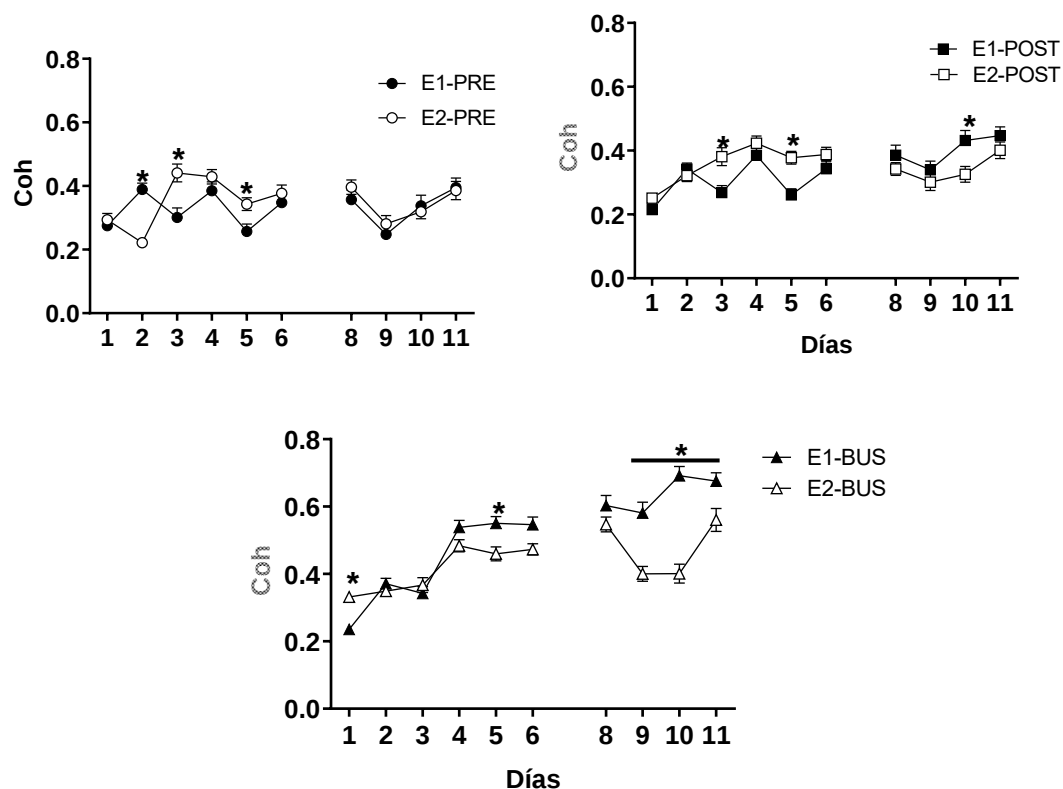


Figura 26. Coherencias de la actividad eléctrica cerebral en el rango de frecuencias de la actividad theta, entre SM y GD, en las etapas basales 1 y 2 y en la etapa de búsqueda de la plataforma en el laberinto acuático de Morris. Pueden observarse cambios significativos ($p=0.001$).

Para las coherencias entre los núcleos **SM** y **CA1** las comparaciones entre grupos del primer tratamiento mostró efectos significativos por día, grupo y etapa [$F(5,2765) = 3.468$, $p = 0.004$].

Se observa en el grupo E1 una coherencia mayor que E2 principalmente en la etapa de pre-infusión todos los días a excepción del día 5, en la etapa de post-infusión la diferencia fue significativa el día 6 y en la etapa de búsqueda la coherencia fue mayor para el grupo E1 los días 4 y 6. En el ANOVA de los días con inversión de tratamiento la interacción de los factores grupo, día y etapa también fue significativa

[F (3, 1302) = 4.351, $p = 0.005$], las comparaciones pareadas mostraron mayor coherencia para el grupo E1 los días 8, 10 y 11 en la pre infusión y los días 8 al 11 en la post infusión. Finalmente, la coherencia fue mayor para el grupo E1 en la búsqueda los días 8 al 11 (Figura 27).

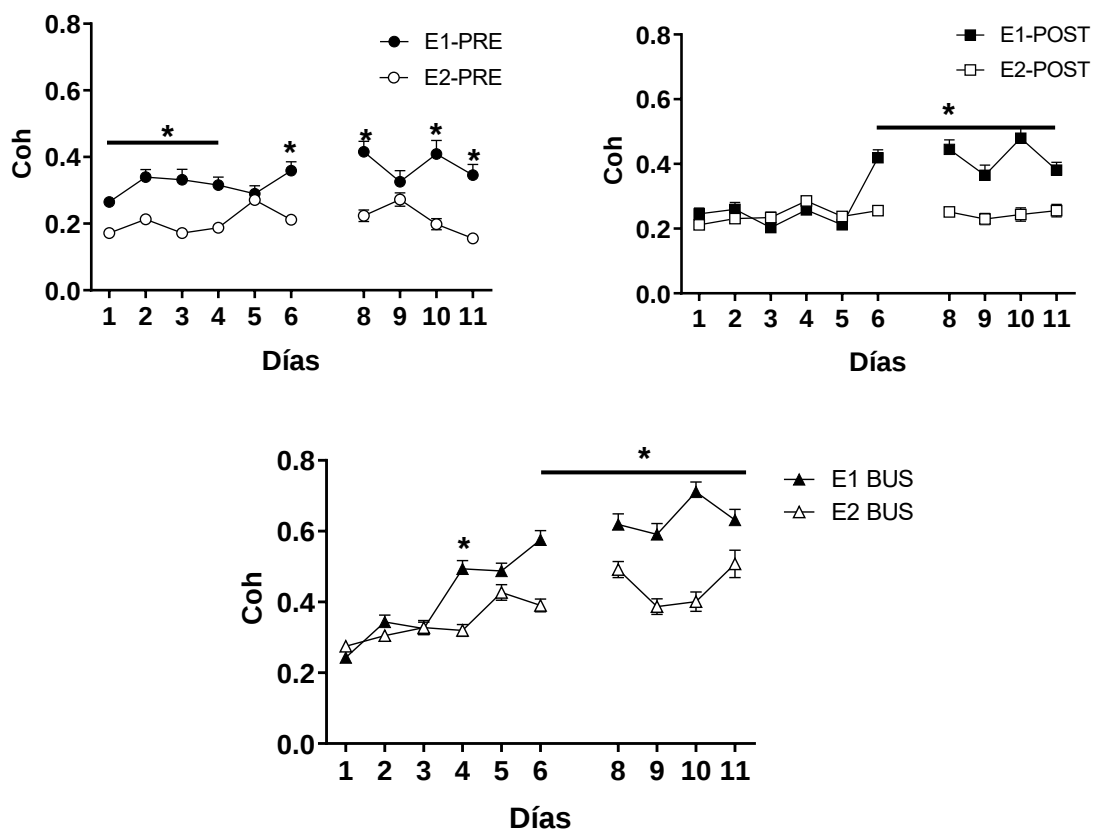


Figura 27. Coherencias de la actividad eléctrica cerebral en el rango de frecuencias de la actividad theta, entre SM y CA1, en las etapas basales 1 y 2 y en la etapa de búsqueda de la plataforma en el laberinto acuático de Morris. Pueden observarse diferencias significativas ($p=0.0001$) Mediana $\pm$ error estándar. Grupo E1 ($n=7$) y Grupo E2 ($n=8$).

Por último, la coherencia **intra hipocampal**, mostró un efecto significativo por día, grupo y etapa en el primer tratamiento [F (5,2765) = 2.191, $p = 0.05$] y en el segundo tratamiento [F (3,1302) = 5.545, $p < 0.001$]. Las diferencias pareadas en la coherencia entre la región de CA1 y GD de hipocampo se observaron de la siguiente manera, en las tres etapas la diferencia fue significativa todos los días excepto el día 5, este comportamiento de los datos se puede observar de manera similar en la coherencia entre la región de SM y CA1 y nHP y SM aquí los datos del día 5 no

presentan diferencias, pero no entre SM y GD, además estos contrastes son más evidentes especialmente en la etapa de búsqueda durante los días de inversión del tratamiento, principalmente los días 9 y 10, esto en los diferentes niveles del SSA hasta llegar a la estructura de hipocampo.

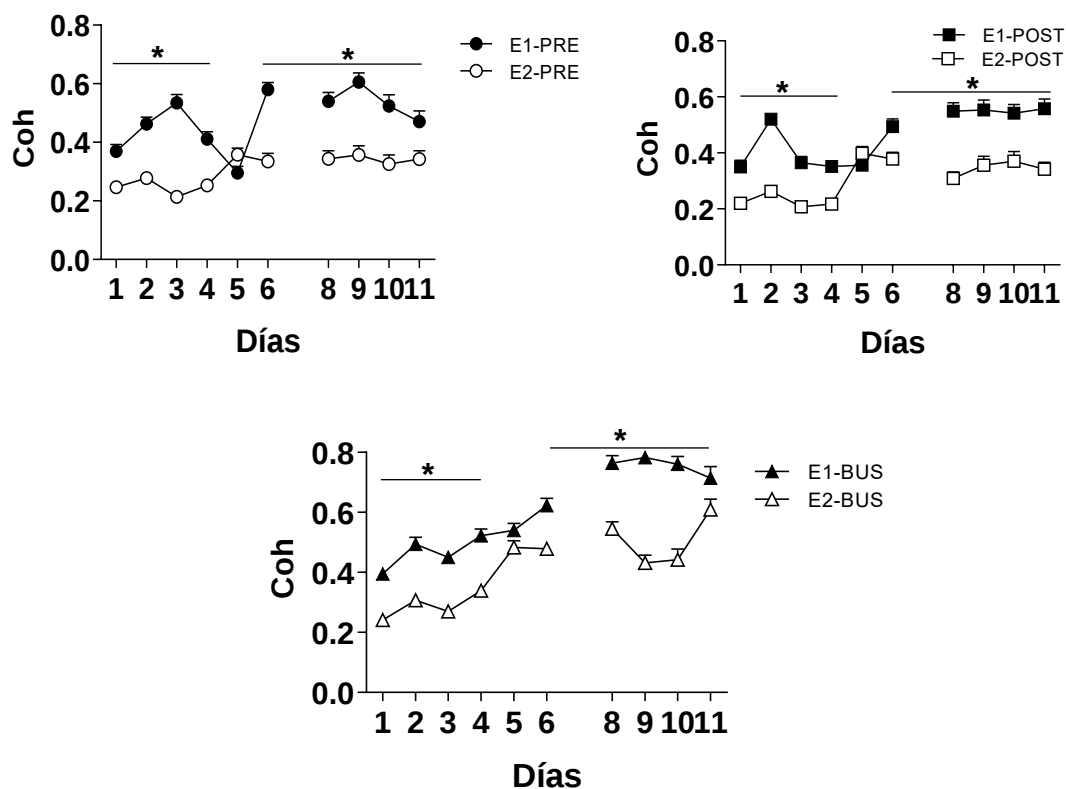


Figura 28. Coherencias de la actividad eléctrica cerebral en el rango de frecuencias de la actividad theta en hipocampo, entre los sustratos CA1 y GD, en las 3 etapas basales observarse diferencias significativas ($p=0.0001$) excepto el día 5. Mediana $\pm$ error estándar. Grupo E1 ($n=7$) y Grupo E2 ($n=8$).

En la siguiente imagen se muestran los efectos totales de las diferencias entre grupos de los diferentes sustratos.

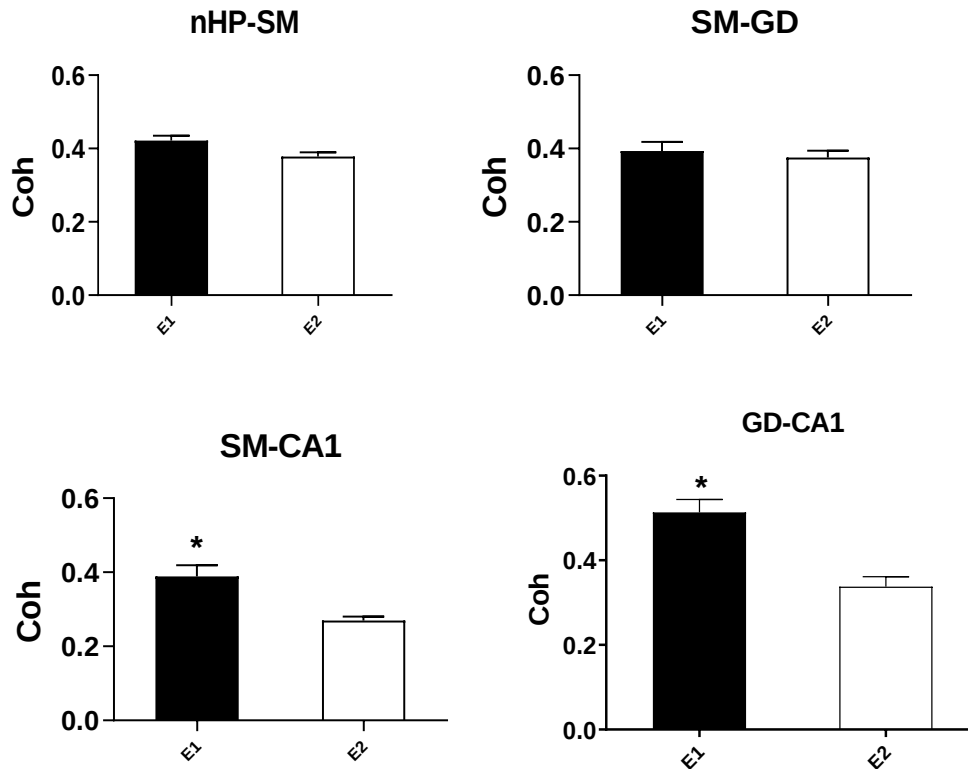


Figura 29. Coherencias de la actividad eléctrica cerebral en el rango de frecuencias de la actividad theta, entre nHP y SM no tuvo diferencia significativa entre grupos, solo entre etapas como se vio anteriormente, se observa algo similar entre los sustratos SM-GD. Solo se observó diferencia entre SM- CA1 ($p=0.0015$) y esta diferencia se fue más evidente en la coherencia intra hipocampo (GD - CA1) ($p=0.0001$) en todos los niveles fue mayor la coherencia en el grupo E1.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos, el incremento de serotonina que se produjo por la infusión del citalopram en el núcleo hipotalámico posterior tiene un efecto sobre el aprendizaje y la memoria, el cual provoca una deficiencia al realizar una tarea de aprendizaje espacial, esto debido a la modulación de la actividad eléctrica, específicamente en la banda theta.

Recordemos que el grupo E1 fue el más eficiente en la tarea de aprendizaje y memoria, desde el segundo día este grupo disminuyo significativamente las distancias para encontrar la plataforma, mientras que el grupo E2 lo realizó hasta el día 6. Con respecto a la variable latencia de escape este grupo tuvo tiempos significativamente menores solo después de la inversión de tratamientos, también

presento menos cruces por el cuadrante donde se ubicaba la plataforma durante el ensayo de prueba (día 7) lo que indica una menor precisión en la codificación de la información para realizar el mapa cognitivo de la ubicación de la plataforma.

Con esto se puede entender que los animales del grupo E2 fueron eficientes en la tarea solo hasta que los niveles de serotonina no estaban incrementados en el nHP, esta inversión de tratamientos demuestra que la serotonina actúa como modulador de la información que se codifica, pero no tiene un efecto en la recuperación de la misma, ya que el grupo E1 no tuvo cambios significativos cuando se infundió el citalopram (días 8-11) una vez que ya había aprendido la posición de la plataforma. Este resultado concuerda con lo reportado en la región de SM cuando la serotonina se incrementa en este núcleo se produce una deficiencia en la memoria espacial solamente durante el aprendizaje, pero no en la recuperación (Solorzano *et al.*, 2022).

El papel del nHP en los procesos de memoria ha sido poco estudiado, sin embargo, hay trabajos en los que se ha evaluado el proceso de memoria en la región supramamilar (núcleo hipotalámico posterior + núcleo supramamilar) y/o cuerpos mamilares.

En 2010 Aranda-Garrido realizó la lesión permanente de la región supramamilar y observó que no afecta a la adquisición ni a la consolidación y recuerdo de un aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia, posteriormente estudiaron los efectos de la lesión permanente y de la inactivación temporal de la región supramamilar en tareas de memoria de referencia espacial. En este trabajo se usaron lesiones electrolíticas para alterar de forma permanente esta región hipotalámica y microinyecciones intracerebrales de tetrodotoxina para la inactivación funcional de dicha zona. En ambas condiciones experimentales, se estudió el efecto de estos tratamientos sobre la memoria de referencia espacial en donde encontraron que la inactivación temporal de esta región perjudica el recuerdo de un aprendizaje espacial previamente consolidado (Aranda- Garrido, 2010).

De acuerdo con evidencia anteriormente descrita, se sabe que en los procesos de aprendizaje la actividad theta tiene un papel fundamental en cuanto a la eficiencia en la codificación de la información, y se ha demostrado una relación entre la

funcionalidad de ambos núcleos (nHP y nSUM) en la modulación de la actividad theta hipocampal y por tanto en las funciones cognitivas (McNaughton *et al.*, 2006; Pan y McNaughton, 1997). Aunque el nHP no envía proyecciones directas al hipocampo, inerva el nSUM y el septo medial (Vertes *et al.*, 1995) y se ha demostrado que la inactivación reversible tanto del nSUM como del nHP suprime toda la actividad theta espontánea e inducida (sensorial o estimulación reticular), en ratas anestesiadas (Bland y Colom, 1993; Kirk y McNaughton, 1993; Oddie *et al.*, 1994).

Varios autores sugieren que los núcleos nSUM y nPH del diencefalo caudal parecen ser las estructuras más importantes involucradas en el control de las oscilaciones theta generadas en la corteza límbica (Kowalczyk *et al.*, 2014), de acuerdo a la relación anatómica y funcional que hay entre el núcleo supramamilar y el núcleo hipotalámico posterior con el hipocampo (HPC).

Los cambios conductuales observados en el presente trabajo tuvieron un trasfondo producido por la modulación de la actividad eléctrica en la banda theta, ya que se observaron cambios en la potencia conforme avanzaron los días del experimento, para el día 6 los animales del grupo E1 ya tenían la ubicación de la plataforma aprendida y cuando se hizo la inversión de tratamiento y recibieron la infusión de citalopram, la potencia no disminuyó y la coherencia incluso fue en aumento.

También se obtuvo una diferencia en el efecto global de la comparación de coherencias entre el complejo SM y CA1, al igual que la coherencia intra hipocampal (DG-CA1) siendo mayores en E1. En el grupo E2 la coherencia iba gradualmente aumentando conforme el paso de los días, pero con un retraso en comparación con el grupo E1, esto se observó bajo los efectos del citalopram (Días 1–6) pero los días de LCA (8-11) la coherencia disminuyó aún más, este efecto fue más evidente en la etapa de búsqueda y se puede observar como la coherencia entre todos los sustratos vuelve a aumentar al cuarto día de haber infundido el LCA (día 11). Esto podría apoyar la idea de que el aumento de serotonina en nHP tiene influencia solo en la etapa de codificación de la información y no en la recuperación y también demuestra que este efecto parece ser reversible al menos con 6 días de tratamiento. De acuerdo a los resultados actuales los animales del grupo E2 tuvieron una

codificación exitosa solo hasta que los niveles de serotonina se normalizaron (días 8 al 11). Lo anterior indica que el nHP tiene un papel en dictar la forma en que se comunican los siguientes núcleos del SSA y por lo tanto en el aprendizaje.

Como ya se mencionó nuestros resultados muestran diferencias significativas especialmente en la etapa de búsqueda esto parece explicarse con el trabajo de Bland en 2015, en el que se investigaron los efectos conductuales y electrofisiológicos producidos por la estimulación eléctrica del nHP o del rafe medial (MR), de forma independiente y durante la estimulación combinada de ambos (nHP y MR). Estas tres condiciones de estimulación se aplicaron durante el comportamiento espontáneo en un campo abierto y durante la carrera inducida por estimulación de nHP. Encontraron que la inhibición motora suprime la actividad theta hipocampal principalmente de tipo 1 (7-12 Hz) y que, en la prueba de carrera en una rueda giratoria, la estimulación de estos sitios no produjo una carrera consistente en comparación con la estimulación eléctrica de solo el nPH. Esto entonces revela el papel evidente del nHP con la acción motriz y la modificación de la actividad theta tipo 1. Los presentes resultados muestran que la serotonina actuando en el PH modula el aprendizaje realizado a través de conductas tipo 1, además de la conducta motora.

Existen trabajos en los que igualmente se evalúa la participación del nHP en conjunto con nSUM, en los que se demuestra ampliamente que la región supramamilar (nSUM/nPH) modula la frecuencia de la actividad theta del hipocampo tanto en ratas anestesiadas como despiertas (Bland *et al.*, 1994; Kirk y McNaughton, 1993; McNaughton *et al.*, 2006; Oddie *et al.*, 1994; Pan y McNaughton, 1997).

Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a la función del nHP y los cambios observados que obtuvimos en la potencia, pero nuestros datos no proporcionan evidencia de como estaría actuando el nSUM o si estarían actuando en conjunto.

En 2006 se evaluaron las diferentes regiones de la región supramamilar con respecto a la excitabilidad sináptica de hipocampo y encontraron que la región del nSUM medial pero no lateral puede mediar la supresión de la excitación sináptica de las células piramidales de CA1 a la estimulación de las colaterales de Schaffer

inducida por la estimulación reticular. Se utilizaron ratas anestesiadas con uretano, y se investigó el efecto de la estimulación química directa en la región del nHP-SUM en la excitabilidad de las células piramidales de CA1. Se observó que la microinyección del agonista de receptores muscarínicos colinérgicos, carbachol (0,1 µl, concentración de 0,0052, 0,156 o 0,625 µg/µl), provocó una supresión dependiente de la concentración de la excitabilidad de las células piramidales de CA1. Además, la microinyección de carbachol reclutó preferentemente la región SUM lateral en comparación con la SUM medial y las regiones del hipotálamo posterior. En este contexto, se observaron las latencias más cortas para la supresión en la concentración más baja de carbachol y la supresión más fuerte en concentraciones más altas (Jiang, 2006), estos resultados sugieren entonces que las diferentes regiones de un mismo núcleo pueden tener funciones distintas que repercuten en diferentes regiones de hipocampo en este caso la región de SUM lateral a la región CA1 de hipocampo.

Recordemos también que la modulación serotoninérgica de la actividad theta del hipocampo también ha sido establecida (Vanderwolf *et al.*, 1986; Vinogradova *et al.*, 1999). Sin embargo, cómo este sistema regula la actividad theta del hipocampo a través de cada relevo del SSA ha sido poco estudiado.

Se ha informado que la serotonina ejerce influencias tanto inhibitorias como excitatorias en las interneuronas GABAérgicas del hipocampo a través de los receptores 5-HT_{1A} (Segal, 1975) y 5-HT₃ (Staubli y Otaki U, 1994), respectivamente; y se ha sugerido que la serotonina que llega al SUMn y nHP, ejerce influencias inhibitorias sobre la liberación de acetilcolina a través de la activación de neuronas GABAérgicas, similar a lo que ocurre en el hipocampo (Jeltsch-David *et al.*, 2008; Miettinen y Freund, 1992; Vertes, 2005) y que incluso es un mecanismo semejante al que ocurre a nivel septal (Solorzano *et al.*, 2022; Vertes, 2005; Jeltsch-David, Koenig & Cassel, 2008). Similarmente se ha reportado la expresión de receptores 5HT_{1A} en el nHP (Woodnorth *et al.*, 2005), aunque no existen datos sobre los diferentes tipos neuronales que expresan estos receptores en nHP, y recientemente se ha reportado una diversidad de neuronas en el nHP, dentro de las cuales la mayoría son neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Abrahamsom *et al.*, 2001), y

los previos reportes de neuronas colinérgicas en nPH (Rao *et al.*, 1987), los receptores 5HT_{1A} podrían expresarse en estos tipos neuronales además de las neuronas GABAérgicas. Los receptores 5-HT_{1A} están acoplados a la proteína Gi/o, cuya activación induce la hiperpolarización celular a través de la salida de K⁺ (Baumgarten HG. *et al.*, 1995). Por lo tanto, es posible que el aumento de 5-HT inducido por la infusión de citalopram resultara en la inhibición directa de las neuronas GABAérgicas e indirecta en las células glutamatérgicas a través de su acción en los receptores 5-HT_{1A}.

En un estudio farmacológico de Ferraro *et al* (1996) se encontró evidencia de la activación de receptores 5HT₃ en neuronas GABAérgicas del nHP. Así, el incremento de serotonina por la infusión de citalopram podría actuar al menos sobre receptores 5HT_{1A} ya mencionados e inhibir neuronas colinérgicas, GABAérgicas y Glutamatérgicas, al tiempo que excita neuronas GABAérgicas actuando a través de receptores 5HT₃, produciendo una mayor inhibición global del nHP.

Otro posible mecanismo regulatorio de la serotonina a nivel de nHP, la modulación de la liberación de acetilcolina (mediante receptores presinápticos sobre las terminales colinérgicas) del SUM y NTPP, ambos núcleos envían inervación colinérgica al nHP y se ha reportado que la infusión local de agonistas colinérgicos en el nHP induce actividad theta hipocampal (Kowalczyk *et al*, 2014).

Esto puede ayudar a entender como es el diferente funcionamiento del nSUM y el nHP y como la serotonina puede modular la actividad eléctrica en ambos núcleos, lo que repercute en la expresión de actividad theta hipocampal, pero que lo hace de forma diferente en cada uno.

Con respecto a estas diferencias, los resultados de Gutiérrez-Guzmán y cols. en 2012 en los que se evaluó el efecto de la disminución de serotonina con el neurotóxico 5,7- Dihidroxitriptamina en ambos núcleos (nSUM y nHP) y posteriormente se sometieron a pruebas de aprendizaje en el laberinto acuático, se observó una actividad theta de alta frecuencia sustancial en la etapa de búsqueda no solo en el CA1 sino también en el giro dentado en ratas controles (sin abatimiento de serotonina), pero no en las ratas con serotonina reducida (5HT-D). Las ratas con

reducción de serotonina en SUMM/nHP no redujeron significativamente sus distancias en los 6 días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. Los cambios relacionados con el aprendizaje en CA1 fueron más prominentes que los observados en el giro dentado en ratas control, consistiendo en un aumento en la proporción de actividad theta de alta frecuencia durante los días de entrenamiento y una correlación positiva entre la actividad theta de alta frecuencia y la distancia recorrida.

Las ratas 5HT-D no mostraron un aumento en la proporción de theta entre los días ni una correlación significativa entre la actividad theta de alta frecuencia y la distancia recorrida. Por lo tanto, no se observó una actividad theta continua en el hipocampo después de la depleción de serotonina en el SUMn/PHn, es importante mencionar que no se observaron cambios en la actividad theta en condiciones basales luego de reducir la serotonina, y solamente se observaron durante las conductas tipo 1 asociadas con la extracción de información espacial, lo cual indicaría que la serotonina es importante para la actividad theta relacionada con el aprendizaje pero no en la expresada durante conductas reflexivas o en estados pasivos (atento quieto).

Por lo tanto, parece que la serotonina está modulando la actividad theta de una manera más compleja que simplemente actuando como un inhibidor general en cada relevo del SSA, en la actividad eléctrica de la banda theta, ya que reducir la serotonina en hipocampo y SM facilita el aprendizaje y la expresión de actividad theta hipocampal, pero reducirla en SUMM/nHP produce deficiencias en aprendizaje y alteraciones en el patrón de actividad theta, con una menor expresión de la misma. Mientras que, incrementar la serotonina en el nHP produce deficiencias en la memoria y alteraciones en la expresión de actividad theta y en la coherencia en el circuito, la reducción de serotonina en el nSUM reproduce las deficiencias reportadas previamente para la lesión de terminales 5HT de ambos nSUM/nHP.

Una posible explicación de los resultados obtenidos por Gutiérrez-Guzmán y colaboradores en contraste con los resultados actuales podría ser que, en efecto, el SUMn/PHn participan en la capacidad de aprendizaje de lugar mediante la modulación de la actividad theta concurrente a cuando se consolida la información

pero que el papel del nSUM puede ser de distinta forma dependiendo si la manipulación farmacológica se realiza en una zona medial o lateral del núcleo y probablemente esto repercute en diferentes zonas de hipocampo (CA1 o GD). Con esto también se podría entender que sus resultados posiblemente fueron provocados en mayor medida por el nSUM en lugar del nHP, ya que la respuesta conductual de la reducción de serotonina específica en nHP es una facilitación de la memoria (datos del laboratorio en proceso de publicación).

Aunque ambos núcleos presentan células theta-ON el nSUM contiene en su mayoría células fásicas y en nHP tónicas (Kowalczyk *et al.*, 2014). Así, la modulación de la serotonina de las células fásicas del nSUM repercute de manera más marcada en la actividad theta y el aprendizaje, en comparación con la de las células del nHP que son tónicas.

Varios autores concluyeron que las células theta activadas de manera tónica en los núcleos HP actúan en sinergia con las células theta activadas de manera fásica en el núcleo SUM, impulsando la theta hipocampal para transmitir entradas ascendentes hacia el área septal (Bland *et al.*, 1995). Los resultados de este trabajo, apoyan la participación del nHP en el aprendizaje espacial, y el efecto del incremento de serotonina, posiblemente asociado con una inhibición aumentada de la actividad del nHP produce alteraciones en la potencia del circuito, así como la reducción de la coherencia en el circuito nHP-SM-HPC.

En estudios recientes se identificaron otro tipo de células que pueden modular theta, denominadas "*timing cells*" o células de tiempo en la región de nHP y nSUM.

Caban y colaboradores sugirieron que la actividad theta en ambos núcleos depende y es controlado por tres subtipos de células. El primer grupo serían las neuronas theta on- fásicas, que expresan un patrón de disparo correlacionado con las oscilaciones de campo de theta locales. El segundo subgrupo theta on-tónicas que son células que disparan en correlación con theta del hipocampo y el tercer subtipo de neuronas del PHa consiste en las "células de temporización", que probablemente estén involucradas en los mecanismos de regulación de la frecuencia del ritmo theta del HPC (Caban *et al.*, 2018).

Datos recientes también muestran claramente que la contribución de ambos

núcleos (nHP y nSUM) en la generación de potenciales de campo theta podría ser más compleja de lo que se pensaba. En 2021 se demostró que tanto el nSUM como los nHP no son solo simples moduladores/transductores de la información tónica que va a las estructuras límbicas desde las regiones del tronco encefálico del sistema de sincronización ascendente, sino que también desempeñan un papel de generadores locales responsables de la producción de actividad oscilatoria rítmica theta (Kowalczyk *et al.*, 2021).

Específicamente, se descubrieron potenciales de campo theta generados localmente, tanto en ratas anestesiadas con uretano como en cortes del área hipotalámica posterior (PHa, que incluye nHP + nSUM). Los estudios *in vivo* mostraron que la actividad theta observada en la PHa puede generarse de forma independiente de la actividad theta hipocampal en curso. Esta observación fue confirmada en estudios *in vitro*, en los cuales se observaron oscilaciones theta bien sincronizadas y sensibles a la atropina tanto en el SUM como en el nHP en ausencia completa de cualquier entrada aferente (Kowalczyk *et al.*, 2014).

Los resultados de este trabajo no aportan evidencia sobre el papel de nHP como generador de theta ni pueden explicar como la serotonina afectaría este tipo de células y que probablemente lo haga de manera distinta en cada una de las subpoblaciones, sin embargo, es importante tomar en cuenta esta información ya que la modulación que se produjo por el incremento de serotonina en nHP sería provocada por al menos dos subtipos de células (theta- ON tónicas y *timing cells*) y a través de al menos los receptores 5HT_{1A} y 5HT₃, que provocan cambios en la potencia y podrían tener participación en la modulación de la sincronización en la comunicación entre estructuras, específicamente entre SM-CA1 e intra-hipocampo. Es decir, el nHP participa tanto en la modulación de la amplitud, como en la frecuencia de la actividad theta del hipocampo.

De acuerdo con nuestros resultados y como se mencionó anteriormente se puede destacar también el papel del movimiento en la funcionalidad diferente del nHP y nSUM. En 1995, se encontró que las lesiones supramilares no afectaron la actividad theta del hipocampo que ocurre espontáneamente en animales con movimiento libre (Thinschmidt *et al.*, 1995). Se propuso que, en roedores, el SUM

está involucrado en el proceso de programación de la frecuencia del ritmo theta del hipocampo, pero solo durante el comportamiento relacionado con la inmovilidad (Kirk y McNaughton, 1993; Bland *et al.*, 1994; McNaughton *et al.*, 1995; Kirk 1998; Pan y McNaughton, 2002; Woodnorth *et al.*, 2003; Woodnorth y McNaughton, 2005; Ruan *et al.*, 2011). Y se proponía que, en el caso del comportamiento locomotor, el MS/vDBB puede asumir ese papel (McNaughton *et al.*, 1995; Woodnorth *et al.*, 2003).

Esto podría sugerir que, en animales en movimiento, la actividad rítmica de nSUM es necesaria para modular la frecuencia de theta del hipocampo, pero no es necesaria para la expresión de theta *per se* y ahí es donde podría actuar la participación del nHP. En estudios posteriores se concluye nHP podría estar particularmente involucrado en complementar nSUM en la determinación de la frecuencia de theta del hipocampo durante actividades locomotoras (Woodnorth *et al.*, 2003; Woodnorth y McNaughton, 2005).

También se demostró que la inhibición optogenética de las células del SUM no afectan el ritmo theta del hipocampo, esto en ratones en movimiento libre (Ito *et al.*, 2018). Sin embargo, la estimulación optogenética de las células glutamatérgicas del SUM lateral resultó en un aumento significativo de la potencia y frecuencia theta en el DG dorsal cuando los ratones fueron estimulados durante el sueño paradójico (Billwiller *et al.*, 2020).

Sin embargo, parece que el componente de GABA en el circuito del PHa (nHP+ nSUM) no tiene una influencia importante en las señales que el PHa emite hacia el MS/vDBB y el hipocampo, pero podría servir para afinar la salida generada principalmente por las neuronas colinérgicas, se demostró que la inyección de clordiazepóxido (CDP; aumenta la unión endógena de GABA a los receptores GABAA) en el nHP de ratas anestesiadas resultó en una ligera disminución de la frecuencia (y parcialmente también de la amplitud) de las oscilaciones theta evocadas en el hipocampo por la estimulación reticular. La disminución observada fue mucho menor que cuando se inyectaba procaina en el nSUM (McNaughton *et al.*, 1995). El experimento se recreó utilizando ratas en movimiento libre y resultó en

una disminución aún menos pronunciada en la frecuencia y amplitud de theta en el hipocampo (McNaughton *et al.*, 1995; Woodnorth and McNaughton, 2002).

A partir de esto, es posible suponer que tanto los cambios conductuales como los cambios en el EEG observados en los resultados actuales se deben a un cambio en la modulación finamente ajustada de todos los tipos de neuronas del nHP, pero que hasta ahora solo se ha demostrado el papel de neuronas de tipo GABAérgico. Es importante mencionar y tomar en cuenta que datos recientes indican que además del SuM y el PH, otra parte del hipotálamo, los cuerpos mamilares, están involucrados en la modulación de la frecuencia del theta del hipocampo en cierta medida, pero solo durante la locomoción y el sueño paradójico en roedores (Dillingham *et al.*, 2019). Por otro lado, también las inyecciones de procaína en los cuerpos mamilares de ratas bajo anestesia resultaron en una disminución de la amplitud y potencia theta del HPC (Zakowski *et al.*, 2017).

Con todo lo anterior y en comparación con nuestros resultados se puede señalar que el nHP parece tener una participación en la modulación de la potencia en hipocampo especialmente en la zona de GD y también tiene un papel en la modificación de la coherencia entre la región de SM-CA1 y CA1-GD en frecuencias theta por el incremento de serotonina que parece tener una participación más evidente que en el nSUM al menos cuando el animal está en movimiento, y que se refleja en la realización de una tarea de aprendizaje espacial modificando la actividad theta en mayor medida en la etapa de codificación de información. Se tendrían que hacer más estudios para aclarar la función del tipo de neuronas que participan en esta modulación y evaluar el papel del incremento endógeno de serotonina en los otros componentes del hipotálamo posterior, y también específicamente los de la región mamilar, en los procesos cognitivos como la memoria.

CONCLUSIÓN

La acumulación de serotonina en el núcleo hipotalámico posterior mediante la infusión local de citalopram reduce la eficiencia del aprendizaje espacial y altera los patrones theta relacionados con el aprendizaje, pero no afecta la recuperación de la información. Estos resultados sustentan el papel de la 5-HT en la modulación del aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo, actuando sobre las neuronas GABAérgicas y presumiblemente las glutamatérgicas y colinérgicas, modulando tanto la coherencia como la potencia de la actividad teta hipocámpal. La alteración de la eficiencia del aprendizaje es consistente con un mecanismo selectivo de procesamiento de información y demuestra la participación de este núcleo en las funciones de aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson EE, Moore RY (2001) The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Res* 889:1-22.
- Aranda Garrido, ML. (2010). Implicación de la región supramamilar en la memoria espacial y en la respuesta de ansiedad en ratas. Tesis doctoral. Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Facultad de Psicología. Universidad de Málaga.
- Altman HJ, Normile HJ, Galloway MP, Ramirez A, Azmitia EC (1990) Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT-induced serotonergic deafferentation of the hippocampus. *Brain Res* 518:61-66.
- Amaral DG, Witter M, P. (1995) The rat nervous system. ((Ed.), G. P., ed), pp 442-493.
- Anchel H, Lindsley DB (1972) Differentiation of two reticulo-hypothalamic systems regulating hippocampal activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:209-226.
- Asin KE, Wirtshafter D, Fibiger HC (1985) Electrolytic, but not 5,7-dihydroxytryptamine, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of radial maze task. *Behav Neural Biol* 44:415-424.
- Billwiller F, Castillo L, Elseedy H, Ivanov AI, Scapula J, Ghestem A, Carponcy J, Libourel PA, et al. (2020) GABA-glutamate supramammillar y neurons control theta and gamma oscillations in the dentate gyrus during paradoxical (REM) sleep. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02146-y>.
- Bland HB, Bland EC y McIver E (2015) Median Raphe Stimulation-Induced Motor Inhibition Concurrent With Suppression of Type 1 and Type 2 Hippocampal Theta. Wiley Periodicals, INC. DOI 10.1002/hipo.22521
- Bland B (2000) The medial septum: Node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. In: *The behavioral neuroscience of the septal region* (R.Numan, E., ed), pp 115-145 New York: Springer Verlag-NY.
- Bland BH (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation

theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26:1-54.

- Bland BH, Colom LV (1993) Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol* 41:157-208.
- Bland BH, Colom LV, Ford RD (1990) Responses of septal theta-on and theta-off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Res Bull* 24:71-79.
- Bland BH, Konopacki J, Kirk IJ, Oddie SD, Dickson CT (1995) Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 74:322-333.
- Bland BH, Oddie SD (1998) Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci Biobehav Rev* 22:259-273.
- Bland BH, Oddie SD, Colom LV, Vertes RP (1994) Extrinsic modulation of medialis septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus* 4:649-660.
- Bland BH, Vanderwolf CH (1972) Diencephalic and hippocampal mechanisms of motor activity in the rat: effects of posterior hypothalamic stimulation on behavior and hippocampal slow wave activity. *Brain Res* 43:67-88.
- Bland BH, Whishaw IQ (1976) Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anaesthetized and freely moving rat. *Brain Res* 118:259-280.
- Bland SK, Bland BH (1986) Medial septal modulation of hippocampal theta cell discharges. *Brain Res* 375:102-116.
- Bocian R, Klos-Wojtczak P, Caban B, Kowalczyk T, Kazmierska P, Konopacki J (2016) Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm recorded in anesthetized rats and brain slices. *Hippocampus* 26:1354-1369.
- Borhegyi Z, Freund TF (1998) Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 46:453-459.
- Borhegyi Z, Magloczky Z, Acsady L, Freund TF (1998) The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-

diagonal band of Broca complex. *Neuroscience* 82:1053-1065.

- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S (1989) The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 48:29-69.
- Caban B, Staszeli A, Kazmierska P, Kowalczyk T, Konopacki J (2018) Postnatal development of the posterior hypothalamic theta rhythm and local cell discharges in rat brain slices. *Dev Neurobiol* 78:1049–1063. <https://doi.org/10.1002/dneu.22628>.
- Colom LV, Ford RD, Bland BH (1987) Hippocampal formation neurons code the level of activation of the cholinergic septohippocampal pathway. *Brain Res* 410:12-20.
- Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, Hyman BT (1997) H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 17:3964-3979.
- Destrad C, Ott T (1981) Quantitative analysis of hippocampal rhythmical slow activity induced by stimulation of different diencephalic structures. *Neuroscience* 6:1089-1094.
- Dickson CT, Kirk IJ, Oddie SD, Bland BH (1995) Classification of theta-related cells in the entorhinal cortex: cell discharges are controlled by the ascending brainstem synchronizing pathway in parallel with hippocampal theta-related cells. *Hippocampus* 5:306-319.
- Dillingham CM, Milczarek MM, Perry JC, Frost BE, Parker GD, Assaf Y, Sengpiel F, O'Mara SM, et al. (2019) Mammillothalamic disconnection alters hippocampocortical oscillatory activity and microstructure: implications for diencephalic amnesia. *J Neurosci* 39:6696–6713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0827-19.2019>.
- Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor T, Antonelli T, Rambert F y Fux K. (1999). The vigilance promoting drug modafinil decreases GABA release in the medial preoptic area and in the posterior hypothalamus of the awake rat: possible involvement of the serotonergic 5-HT₃ receptor.
- Gonzalo-Ruiz A, Morte L, Flecha JM, Sanz JM (1999) Neurotransmitter

characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 200:377-392.

- Gottesmann C (1992) Theta rhythm: the brain stem involvement. *Neurosci Biobehav Rev* 16:25-30.
- Gutiérrez-Guzmán B, Olvera-Cortés M (2007) Efecto de la eliminación de serotonina hipocámpal sobre la actividad theta subyacente al aprendizaje espacial, en la rata. Tesis de licenciatura. In: *Biology*, vol. Lic., p 66
- Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A, Medina R, Guevara MA, Lopez-Vazquez MA, Olvera-Cortes ME (2011) Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in CA1 high frequency theta activity expression in the rat. *Eur J Pharmacol* 652:73-81.
- Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Lopez-Vazquez MA, Fregozo CS, Guevara MA, Olvera-Cortes ME (2012) Serotonin depletion of supramammillary/posterior hypothalamus nuclei produces place learning deficiencies and alters the concomitant hippocampal theta activity in rats. *Eur J Pharmacol* 682:99-109.
- H.G. Baumgarten, Z. Grozdanovic, *Psychopharmacology of central serotonergic systems*, *Pharmacopsychiatry* 28 (Suppl 2) (1995) 73–79.
- Ito HT, Moser EI, Moser M-B (2018) Supramammillary nucleus modulates spike-time coordination in the prefrontal-thalamo hippocampal circuit during navigation. *Neuron* 99:576–587.e5.
- Jeltsch-David H, Koenig J, Cassel JC (2008) Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT(1A) receptors of the medial septum. *Behav Brain Res* 195:86-97.
- Jiang F, Khanna S. Microinjection of carbachol in the supramammillary region suppresses CA1 pyramidal cell synaptic excitability. *Hippocampus*. 2006;16(10):891-905. doi: 10.1002/hipo.20219. PMID: 16967497.
- Johnston D, Amaral DG (1998) Hippocampus. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, pp 417-458.

- Kirk IJ (1998) Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neurosci Biobehav Rev* 22:291-302.
- Kirk IJ, McNaughton N (1991) Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport* 2:723-725.
- Kirk IJ, McNaughton N (1993) Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus* 3:517-525.
- Kirk IJ, Oddie SD, Konopacki J, Bland BH (1996) Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci* 16:5547-5554.
- Kitchigina VF, Kudina TA, Kutyreva EV, Vinogradova OS (1999) Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience* 94:453-463.
- Kocsis B, Vertes RP (1994) Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J Neurosci* 14:7040-7052.
- Kowalczyk T, Bocian R, Caban B, Konopacki J (2014) Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: in vivo and in vitro studies. *Hippocampus* 24:7-20.
- Kowalczyk T, Staszelis A, Kazmierska-Grebowska P, Tokarski K, Caban B (2021) The Role of the Posterior Hypothalamus in the Modulation and Production of Rhythmic Theta Oscillations. *Neuroscience* 470:100-115.
- Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 62:1033-1047.
- Leranth C, Carpi D, Buzsaki G, Kiss J (1999) The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience*

88:701-718.

- Leranth C, Nitsch R (1994) Morphological evidence that hypothalamic substance P-containing afferents are capable of filtering the signal flow in the monkey hippocampal formation. *J Neurosci* 14:4079-4094.
- Lopez-Vazquez MA, Gama-Garcia CE, Estrada-Reyes Y, Gaytan-Tocaven L, Alfaro JMC, Olvera-Cortes ME (2019) Neonatal Monosodium Glutamate Administration Disrupts Place Learning and Alters Hippocampal-Prefrontal Learning-Related Theta Activity in the Adult Rat. *Neuroscience* 414:228-244.
- Lopez-Vazquez MA, Lopez-Loeza E, Lajud Avila N, Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Reyes YE, Olvera-Cortes ME (2014) Septal serotonin depletion in rats facilitates working memory in the radial arm maze and increases hippocampal high-frequency theta activity. *Eur J Pharmacol* 734:105-113.
- Magloczky Z, Acsady L, Freund TF (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4:322-334.
- Maru E, Takahashi LK, Iwahara S (1979) Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Res* 163:223-234.
- McNaughton N, Logan B, Panickar KS, Kirk IJ, Pan WX, Brown NT, Heenan A (1995) Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus* 5:534–545. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050605>.
- McNaughton, N., Ming Ruan., & Woodnorth, M.A. (2006). Restoring Theta-Like Rhythmicity in Rats Restores Initial Learning in the Morris Water Maze. *Hippocampus*, 16, 1102-1110.
- Miettinen R, Freund TF (1992) Convergence and segregation of septal and median raphe inputs onto different subsets of hippocampal inhibitory interneurons. *Brain Res* 594:263-272.
- Monmaur P, Thomson MA (1986) Spatial distribution of hippocampal-dentate theta rhythm following colchicine injection into the hippocampal formation of the rat. *Brain Res* 365:269-277.

- Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE (1990) Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci* 2:1016-1028.
- Muller C, Remy S (2018) Septo-hippocampal interaction. *Cell Tissue Res* 373:565-575.
- Nilsson OG, Strecker RE, Daszuta A, Bjorklund A (1988) Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in a spatial learning task in the rat. *Brain Res* 453:235-246.
- Nunez A, de Andres I, Garcia-Austt E (1991) Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Exp Brain Res* 87:303-308.
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*: Oxford University Press.
- Oddie SD, Bland BH (1998) Hippocampal formation theta activity and movement selection. *Neurosci Biobehav Rev* 22:221-231.
- Oddie SD, Bland BH, Colom LV, Vertes RP (1994) The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus* 4:454-473.
- Olvera-Cortes E, Cervantes M, Gonzalez-Burgos I (2002) Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* 58:261-270.
- Olvera-Cortes E, Guevara MA, Gonzalez-Burgos I (2004) Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res Bull* 62:379-384.
- Olvera-Cortes ME, Garcia-Alcantar I, Gutierrez-Guzman B, Hernandez-Perez JJ, Lopez-Vazquez MA, Cervantes M (2012) Differential learning-related changes in theta activity during place learning in young and old rats. *Behav Brain Res* 226:555-562.
- Osipova D, Takashima A, Oostenveld R, Fernandez G, Maris E, Jensen O (2006) Theta and gamma oscillations predict encoding and retrieval of declarative memory. *J Neurosci* 26:7523-7531.

- Pan W-X, McNaughton N (1997) The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. *Brain Res* 764:101–108. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00431-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00431-9).
- Pan WX, Mcnaughton N (2002) The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behavior in rats. *Eur J Neurosci* 16:1797–1809. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02267>.
- Paxinos G, Watson C (1999) *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Elsevier.
- Rao ZR, Yamano M, Wanaka A, Tatehata T, Shiosaka S, Tohyama M (1987) Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker. *Neuroscience* 20:923-934.
- Richter-Levin G, Greenberger V, Segal M (1994) The effects of general and restricted serotonergic lesions on hippocampal electrophysiology and behavior. *Brain Res* 642:111-116.
- Richter-Levin G, Segal M (1989) Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. *Brain Res* 477:404-407.
- Robinson TE, Whishaw IQ (1974) Effects of posterior hypothalamic lesions on voluntary behavior and hippocampal electroencephalograms in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 86:768-786.
- Ruan M, Young CK, McNaughton N (2011) Minimal driving of hippocampal theta by the supramammillary nucleus during water maze learning. *Hippocampus* 21:1074-1081.
- Ruan M, Young CK, McNaughton N (2017) Bi-Directional Theta Modulation between the Septo-Hippocampal System and the Mammillary Area in Free-Moving Rats. *Front Neural Circuits* 11:62.
- Sauseng P, Griesmayr B, Freunberger R, Klimesch W (2010) Control mechanisms in working memory: a possible function of EEG theta oscillations. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1015-1022.
- Segal M (1975) Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res* 94:115-131.

- Smythe JW, Cristie BR, Colom LV, Lawson VH, Bland BH (1991) Hippocampal theta field activity and theta-on/theta-off cell discharges are controlled by an ascending hypothalamo-septal pathway. *J Neurosci* 11:2241-2248.
- Solorzano-Hernández E, Cervantes-Alfaro J, Figueroa R, Gutierrez- Gúzman B, Lopez-Vazquez M y Olvera- Cortes ME (2022) Septal medial/diagonal band of Broca citalopram infusion reduces place learning efficiency and alters septohippocampal theta learning-related activity in rats. *Behavioural Brain Research* 435 (2022) 114056.
- Staubli U, Otaky N (1994) Serotonin controls the magnitude of LTP induced by theta bursts via an action on NMDA-receptor-mediated responses. *Brain Res* 643:10-16.
- Sutherland RJ, Rodriguez AJ (1989) The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behav Brain Res* 32:265-277.
- Takano Y, Hanada Y (2009) The driving system for hippocampal theta in the brainstem: an examination by single neuron recording in urethane-anesthetized rats. *Neurosci Lett* 455:65-69.
- Thinschmidt JS, Kinney GG, Kocsis B (1995) The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience* 67:301–312. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00045-K](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00045-K).
- Vanderwolf CH, Baker GB (1986) Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, noncholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behavior. *Brain Res* 374:342–356. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90428-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90428-2).
- Vanderwolf CH (1988) Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int Rev Neurobiol* 30:225-340.
- Vertes RP (1981) An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J Neurophysiol* 46:1140- 1159. Vertes RP (1982) Brain stem generation of the hippocampal EEG. *Prog Neurobiol* 19:159-186.

- Vertes RP (1986) Brainstem modulation of the hippocampus. Anatomy, physiology, and significance. In: The hippocampus, pp 41-75 New York: Plenum.
- Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595-622.
- Vertes RP (2005) Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus* 15:923-935.
- Vertes RP, Colom LV, Fortin WJ, Bland BH (1993) Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res* 96:419-429.
- Vertes RP, Crane AM, Colom LV, Bland BH (1995) Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* 359:90-116.
- Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 407:555-582.
- Vertes RP, Hoover WB, Viana Di Prisco G (2004) Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav Cogn Neurosci Rev* 3:173-200.
- Vertes RP, Kinney GG, Kocsis B, Fortin WJ (1994) Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin 1A agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience* 60:441-451.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893-926.
- Vertes RP, McKenna JT (2000) Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synapse* 38:281-293.
- Vinogradova OS (1995) Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* 45:523-583.
- Vinogradova OS, Kitchigina VF, Kudina TA, Zenchenko KI (1999)

Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta- rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience*94:745-753.

- Yamamoto T, Watanabe S, Oishi R, Ueki S (1979) Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats. *Brain Res Bull* 4:49.
- Woodnorth MA, McNaughton N (2002) Similar effects of medial supramammillary or systemic injection of chlordiazepoxide on both theta frequency and fixed-interval responding. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2:76-83. <https://doi.org/10.3758/CABN.2.1.76>.
- Woodnorth M-A, McNaughton N (2002) Benzodiazepine receptors in the medial-posterior hypothalamus mediate the reduction of hippocampal theta frequency by chlordiazepoxide. *Brain Res* 954:194–201. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03267-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03267-5).
- Woodnorth M-A, Kyd RJ, Logan BJ, Long MA, McNaughton N (2003) Multiple hypothalamic sites control the frequency of hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 13:361–374. <https://doi.org/10.1002/hipo.10111>.
- Woodnorth Mary-Anne y McNaughton Neil (2005). Different systems in the posterior hypothalamic nucleus of rats control theta frequency and trigger movement. *Behavioural Brain Research* 163 (2005) 107–114.
- Zakowski W, Zawistowski P, Braszka Ł, Jurkowlaniec E (2017) The effect of pharmacological inactivation of the mammillary body and anterior thalamic nuclei on hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized rats. *Neuroscience* 362:196–205.
- Rao ZR, Yamano M, Wanaka A, Tatehata T, Shlosakat S y Tohyama M. (1987) Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker *Neuroscience* Vol.20, No. 3, pp. 923-934.