



Cambios en la descarga de las espigas complejas del giro dentado y de la region ca1 del hipocampo inducidos por estimulacion nociva

Rafael Salas¹.

¹Cátedra de Fisiología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. UCV
rasalas@cantv.net

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 20 de Febrero del 2010 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Registros electrofisiológicos convencionales de la actividad neuronal en la región CA1 del hipocampo y del giro dentado en ratas anestesiadas con uretano nos permitió identificar cuatro tipos de actividad neuronal, que de acuerdo a su patrón de descarga se corresponde con las denominadas espigas complejas. La estimulación nociva mediante la aplicación de calor en la cola del animal, induce un incremento en la duración de algunos intervalos inter-espigas de las espigas complejas. Nuestros resultados muestran que en el giro dentado el intervalo inter-espiga de las células que descargan ráfagas de dos potenciales de acción, incrementa su duración al inicio del estímulo nocivo, mientras que después de haber transcurrido más de la mitad del EN se incrementó la duración del segundo intervalo inter-espiga de las espigas complejas que

descargan tres potenciales de acción. Por otra parte, en la región CA1 del hipocampo las espigas complejas que presentan ráfagas de cuatro espigas, incrementan la duración del tercer intervalo inter-espigas, lo cual permite suponer que estas células también estarían participando en la codificación temporal de información nociceptiva. Estos hallazgos sugieren que al menos en ratas anestesiadas con uretano, algunas neuronas de la formación hipocámpica que descargan espigas complejas parecen señalar el inicio y un tiempo crítico de la duración de la información nociceptiva, mediante la modificación específica de algunos de los intervalos inter-espigas.

PALABRAS CLAVE: Giro dentado, región CA1, espigas complejas, estímulo nocivo

CHANGES IN THE ACTIVITY OF COMPLEX SPIKES OF THE DENTATE GYRUS AND CA1 REGION OF HIPPOCAMPUS INDUCED BY NOXIOUS STIMULATION

SUMMARY

Extracellular recordings in the CA1 region of the hippocampus and dentate gyrus, in urethane anaesthetized rats, identified four types of neuronal activity, which according to their firing pattern corresponded to the so-called complex spikes. This report shows that a brief noxious stimulus, applied to the tail of the animal, induced an increase in the duration of the inter-spike intervals of some complex spikes. Inter-spike intervals of cells that discharged bursts of two action potentials in the dentate gyrus was increased at the beginning of the noxious stimulus, while the end of the stimulus seems to be signaled by an increase in the duration of the second inter-spike interval of neurons that discharge three action potentials. Moreover, in the CA1 region of the hippocampus, complex spike cells discharging bursts of four spikes, increased the duration of the third inter-spikes interval at the end of the noxious stimulus, suggesting that these cells too, would be involved in temporal coding of the noxious stimulus. These findings suggest that at least, in urethane anesthetized rats, some neurons in the hippocampal formation discharging complex spikes appear to signal the onset and duration of nociceptive information by changes in the duration of some inter-spike intervals.

KEY WORDS: Dentate gyrus, CA1 region, complex spike, noxious stimuli

CAMBIOS EN LA DESCARGA DE LAS ESPIGAS COMPLEJAS DEL GIRO DENTADO Y DE LA REGION CA1 DEL HIPOCAMPO INDUCIDOS POR ESTIMULACION NOCIVA

Introducción

En la formación hipocámpica se ha identificado una actividad neuronal que de acuerdo a su patrón de descarga se ha denominado como espigas complejas. Una espiga compleja es una descarga neuronal en forma de ráfaga, en series de dos a seis potenciales de acción que usualmente decrecen en amplitud, con intervalos inter-espiga entre 1.5 a 6 ms. ^(1,9). Cada espiga compleja tiende a mostrar una distribución única del número de espigas en cada ráfaga, y estable en tiempo ⁽¹⁰⁾. Algunas poblaciones de células que descargan espigas complejas han sido descritas como células de lugar, ya que ellas incrementan su actividad solamente cuando el animal está en un área específica, y estarían relacionadas con su ubicación espacial ^(6,7), además con la rotación del cuerpo, dirección de la cabeza, inicio o terminación de movimientos del animal ⁽²⁾. Por otra parte, se ha observado que otros estímulos parecen ser codificados por las

espigas complejas de la formación hipocámpica ⁽¹²⁾. Evidencias experimentales muestran que la aplicación de un estímulo nocivo intenso de corta duración en la cola de animales anestesiados con uretano induce aumento en la frecuencia de descarga de un grupo de espigas complejas, mientras que en otro la reduce en la región CA1 del hipocampo ⁽³⁾. Un efecto parecido es producido por la inyección subcutánea de formalina ^(3,4). De acuerdo a estos hallazgos, algunas células que descargan espigas complejas parecen contribuir con el procesamiento de información nociceptiva en la formación hipocámpica. Sin embargo no existen evidencias concluyentes de que los cambios en la actividad de las espigas complejas de formación hipocámpica, sea la única característica de las espigas complejas que se corresponda con la modulación de la información nociceptiva. El procesamiento de la información nociceptiva a nivel de la formación hipocámpica podría implicar cambios en otras características de las espigas complejas. En este sentido nos propusimos estudiar por medio de registros electrofisiológicos convencionales, otros aspectos en la descarga de las espigas complejas en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo, bajo estimulación nociva de la cola en ratas anestesiadas con uretano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los sujetos experimentales fueron 12 ratas machos de la cepa Sprague Dawley de peso entre 250-300 g, suministrados por el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mantenidos en un ritmo luz: oscuridad 12:12 horas y alimentados ad libitum. Los animales fueron anestesiados con una solución de uretano (1.0 g/kg, i.p.), lo cual se comprobó por la arreflexia corneal, luego se colocó en un aparato estereotáxico con fijación craneana, y se procedió a realizar una craneotomía de acuerdo a las coordenadas del atlas para el cerebro de ratas ⁽⁸⁾, usando como punto de referencia el Bregma. Se realizaron registros extracelulares de la actividad neuronal con microelectrodos de vidrio borosilicato, llenos con una solución de NaCl 2,5 M, más azul de pontamina, y cuya resistencia medida con un voltímetro digital convencional era de 4 a 10 M Ω . Con ayuda de un micromanipulador se colocaron los microelectrodos en la zona de registro en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo, de acuerdo a las siguientes coordenadas: AP=3.3-4.3; L=1-2; DV=3-4. Los microelectrodos fueron conectados a un pre-amplificador (Mentor® N-950). La señal obtenida fue amplificada por medio de un amplificador (Tektronix®, AM502), y registrada en forma continua a través de una tarjeta genérica de sonido de dos canales con una velocidad de muestreo de 48 KHz conectada a una computadora Pentium que disponía de un programa editor de señales de audio (CoolEdit 1.5 and 95, syntrillium). Típicamente se registró 1 minuto de actividad control, luego se aplicó el estímulo nocivo (EN) el cual consistió en introducir la parte final de la cola en un vaso con agua a 54 °C por 10 segundos, y se continuó el registro por 5 minutos. Una vez concluido cada experimento se procedió a marcar la zona de registro, haciendo pasar una corriente a través de los microelectrodos llenos con azul de pontamina (2,5 M), una corriente negativa entre 50 a 100 μ A, durante 10 min. Luego se extrajo el cerebro y se fijo en formaldehído al 10 %. Posteriormente se realizaron cortes de 100-150 μ m utilizando un criostato, cada corte así obtenido, fue observado bajo microscopio de luz para ubicar la marca dejada por el colorante. Cada señal adquirida fue filtrada con un filtro pasa banda de 0,3 a 5 KHz. Tomando en cuenta algunos de los criterios propuestos por Ranck ⁽⁹⁾, para la caracterización de las espigas complejas en la formación hipocámpica de ratas moviéndose libremente, se evaluaron aquellas espigas complejas que presentaron ráfagas de dos, tres y cuatro potenciales de acción con una duración del intervalo

inter-espiga ≤ 6 ms, y amplitud decreciente. Las espigas complejas se agruparon en cuatro tipos (Tabla 1): N2, espigas con dos potenciales de acción; N3, espigas que presentan tres potenciales; N4, espigas que descargan cuatro potenciales; N4a, espigas complejas con cuatro potenciales de acción, de los cuales los tres primeros son de amplitud decreciente, mientras que el cuarto es de mayor amplitud que el tercero. La duración de cada intervalo inter-espiga se determinó entre los dos picos adyacentes de los potenciales de acción en cada ráfaga. Evaluaciones preliminares de nuestros datos mostraron que, en algunas poblaciones neuronales, la duración de los intervalos durante la estimulación nociva, se modificaba durante el inicio de la aplicación del estímulo, luego no se observaban cambios significativos, posteriormente reaparecían modificaciones en la duración de los intervalos. En otras poblaciones los cambios se observaban después de haber transcurrido más de la mitad de la duración del EN. Con base a estas observaciones, la evaluación de la duración de los intervalos inter-espigas se realizó en dos partes, una en el primer tercio de la duración del EN y la otra en el último tercio. La media y el error estándar de la duración de los intervalos inter espiga, como de la frecuencia de descarga (ráfagas/s) fueron cuantificados y graficados utilizando el programa GraphPad Prisma 4. Los datos obtenidos se compararon aplicando la prueba estadística “t de Student” para muestras no pareadas. Se consideraron estadísticamente diferentes cuando el nivel de significación (P) fue menor de 0,05.

RESULTADOS

Se realizaron 11 experimentos independientes, en los cuales se pudieron evaluar 153 espigas complejas. El análisis histológico confirmó que la punta del microelectrodo penetró apropiadamente hasta el giro dentado y la región CA1 del hipocampo. La figura 1 muestra un arreglo de tres dibujos de diferentes cortes coronales obtenidos del atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (8), donde se indica la localización de la zona de registro en el giro dentado (n = 5) y en la región CA1 del hipocampo (n = 6). Se identificaron dos tipos de espigas complejas en el giro dentado y cuatro en la región CA1 del hipocampo.

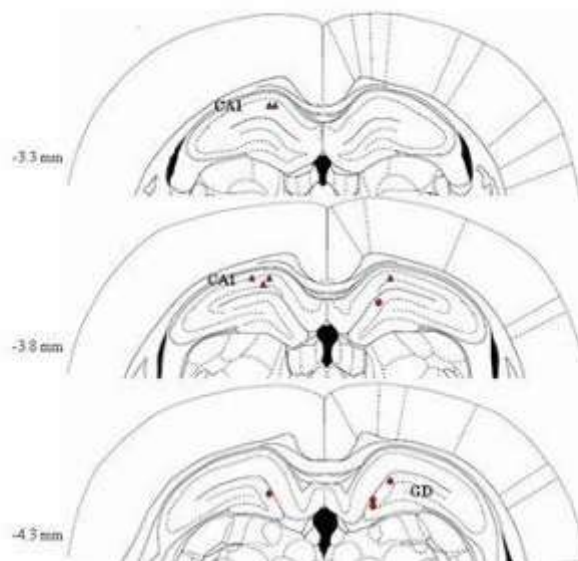


Figura 1. Localización de las zonas de registro en la región CA1 del hipocampo ▲ y en el giro dentado (GD) ●. Figuras tomadas del atlas de Paxinos y Watson (8). Los números al lado izquierdo de la figura indican la coordenada antero-posterior, tomando como referencia el Bregma.

La tabla 1 muestra un resumen de las características de algunas espigas complejas registradas en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo.

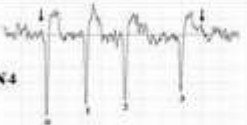
TABLA 1					
Características de las Espigas Complejas					
Tipo de Espiga	Actividad espontánea			Frecuencia Ráfagas/s	Duración Ráfaga (ms)
	Duración intervalo (ms)				
	Primer	Segundo	Tercer		
Giro Dentado					
N2 	3,51 ± 0,067			1,04 ± 0,2	5,5 ± 0,5
N3 	3,69 ± 0,11	3,85 ± 0,09		0,72 ± 0,25	8,34 ± 0,35
Región CA1 del Hipocampo					
N4 	3,71 ± 0,09	4,3 ± 0,09	5,25 ± 0,08	0,57 ± 0,15	13,69 ± 0,44
N4a 	3,78 ± 0,06	4,43 ± 0,07	5,66 ± 0,09	0,46 ± 0,15	14,03 ± 0,19

Tabla 1. La columna de la izquierda muestra cuatro registros independientes de la descarga de espigas complejas, tipo N2 y N3 del giro dentado, y tipo N4, N4a de la región CA1 del hipocampo. Los números debajo de los registros indican los intervalos, las flechas el inicio y final del sitio donde se determinó la duración de la ráfaga. En los recuadros al lado derecho de las figuras se indica la media y su error estándar.

Las espigas complejas se ordenaron de acuerdo al número de potenciales de acción en cada ráfaga. En el giro dentado se evaluaron 28 espigas complejas tipo N2, que en condición pre-estímulo descargaban a una frecuencia de $1,04 \pm 0,2$ ráfagas/s (Tabla 1). La aplicación del EN redujo en forma no significativa la frecuencia a $0,7 \pm 0,07$ ráfagas/s y produjo un incremento significativo en la duración del intervalo inter-espiga. La duración se incrementó de $3,51 \pm 0,067$ ms en condición control a $3,90 \pm 0,21$ ms ($P = 0,041$) durante el primer tercio de la aplicación del estímulo, sin cambios significativos durante el resto de la duración del estímulo (Figura 2A).

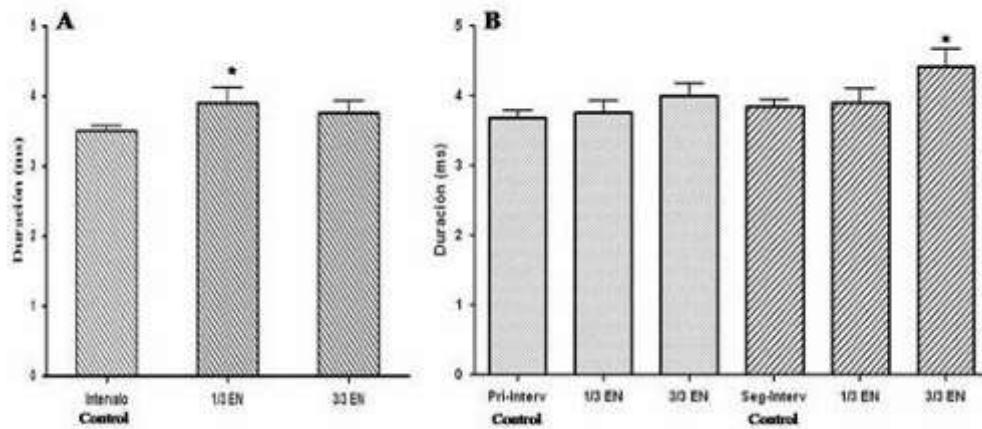


Figura 2. Efecto de la estimulación nociva sobre la duración de los intervalos inter-espigas de las espigas complejas del giro dentado. (A) espigas complejas tipo N2; (B) espigas complejas tipo N3. En la abscisa se indica: Pri-Interv (primer intervalo); Seg-Interv (segundo intervalo); 1/3 EN (primer tercio del EN); 3/3 EN (último tercio del EN). Las barras sobre cada columna indican el error estándar (* $P < 0,05$).

En 36 espigas tipo N3 el promedio de la frecuencia de descarga fue de $0,72 \pm 0,25$ ráfagas/s, con duración de cada ráfaga de $8,34 \pm 0,35$ ms y de $3,69 \pm 0,11$ ms el primer intervalo inter-espiga y de $3,85 \pm 0,09$ ms el segundo intervalo en condición previa al estímulo. Estos parámetros no parecen modificarse al inicio del EN. Sin embargo, después de haber transcurrido más de mitad de la duración del EN, el segundo intervalo se incrementó a $4,42 \pm 0,25$ ms ($P = 0,026$), como se muestra en la Figura 2B. Además las ráfagas incrementaron su duración a $9,85 \pm 0,9$ ms, sin cambios significativos en su frecuencia de descarga. En la región CA1 del hipocampo se realizaron seis experimentos en los cuales se evaluaron 17 espigas complejas tipo N2 que descargaban espontáneamente a una frecuencia de $0,33 \pm 0,13$ ráfagas/s, y una duración de su intervalo inter-espiga de $4,03 \pm 0,1$ ms. El EN redujo su descarga a $0,1 \pm 0,04$ ráfagas/s ($P = 0,16$), la duración del intervalo inter-espiga se incrementó a $5,01 \pm 0,3$ ($P = 0,001$), después de haber transcurrido más de la mitad de la duración del estímulo (Figura 3A). Mientras que en 22 espigas tipo N3 la frecuencia se estimó en $0,4 \pm 0,11$ ráfagas/s, las ráfagas presentaron una duración de $9,08 \pm 0,27$ ms. La duración del primer intervalo inter-espiga fue de $3,74 \pm 0,09$ ms y de $4,57 \pm 0,08$ ms el segundo intervalo. El EN no produjo cambios significativos en su frecuencia de descarga, duración de las ráfagas y de sus intervalos inter-espigas (Figura 3B).

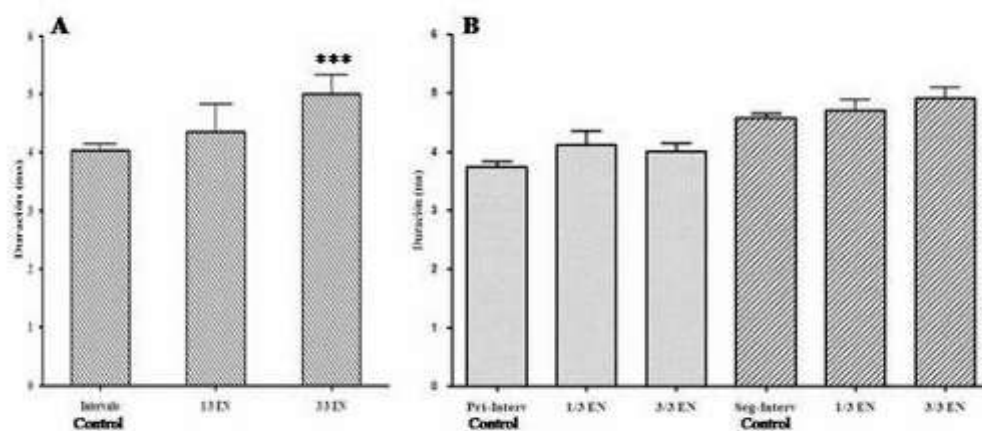


Figura 3. Efecto de la estimulación nociva sobre la duración de los intervalos inter-espigas de las espigas complejas de la región CA1 del hipocampo. (A) espigas complejas tipo N2; (B) espigas complejas tipo N3. En la abscisa se indica: Pri-Interv (primer intervalo); Seg-Interv (segundo intervalo); 1/3 EN (primer tercio del EN); 3/3 EN (último tercio del EN). Las barras sobre cada columna indican el error estándar (**P < 0,001).

En 19 espigas complejas tipo N4 la frecuencia de descarga en condición control fue de $0,57 \pm 0,15$ ráfagas/s, con una duración por ráfaga de $13,69 \pm 0,44$ ms. La duración de los intervalos inter-espigas fue la siguiente: primer intervalo $3,71 \pm 0,09$ ms; segundo intervalo $4,3 \pm 0,09$ ms y tercer intervalo $5,25 \pm 0,08$ ms (Tabla1). La aplicación del EN redujo la frecuencia a $0,53 \pm 0,1$ ráfagas/s, mientras que la duración de la ráfaga se incrementó a $14,84 \pm 0,43$ ms ($P=0,095$), y el tercer intervalo a $5,812 \pm 0,2836$ ($P = 0,035$) después de haber transcurrido más de la mitad de la duración del EN. Sin embargo la duración del primer y segundo intervalo no se modificaron significativamente (Figura 4A).

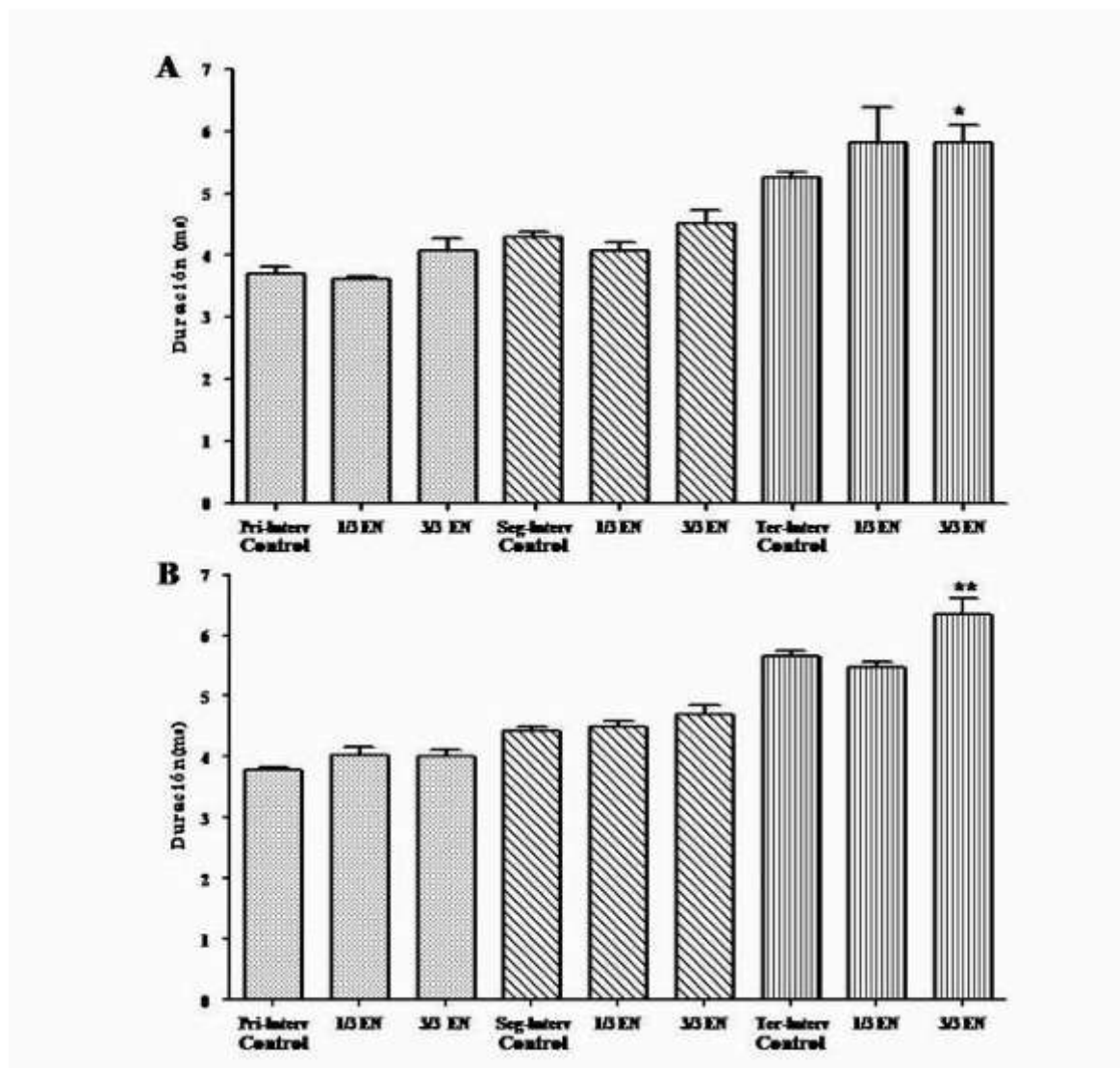


Figura 4. Efecto de la EN sobre la duración de los intervalos inter-espigas de las células complejas de la región CA1 del hipocampo, en A tipo N4 y en B el tipo N4a. En la abscisa se indica: Pri-Interv (primer intervalo); Seg-Interv (segundo intervalo); Ter-Interv (tercer intervalo); 1/3 EN (primer tercio del EN); 3/3 EN (último tercio del EN). Las barras sobre cada columna indican el error estándar (* $P < 0,05$; ** $P < 0,003$).

En este trabajo se evaluaron 31 espigas complejas tipo N4a que presentaron una frecuencia espontánea de $0,46 \pm 0,15$ ms y una duración por ráfaga de $14,03 \pm 0,19$ ms, sus intervalos inter espigas tenían la siguiente duración: primer intervalo $3,78 \pm 0,06$ ms; segundo intervalo $4,43 \pm 0,07$ ms y el tercero $5,66 \pm 0,09$ ms (Tabla1). El EN incrementó significativamente la duración de la ráfaga a $15,70 \pm 0,36$ ($P = 0,0013$) y del tercer intervalo inter-espiga a $6,36 \pm 0,26$ ms ($P = 0,003$) como se muestra en la Figura 4B. Por otra parte no se observaron cambios significativos en el primer y segundo intervalos inter-espiga, y en la frecuencia de descarga.

DISCUSIÓN

En la formación hipocámpica las poblaciones neuronales que descargan espigas complejas parecen contribuir con el procesamiento de información sensorial. Algunos hallazgos muestran que las espigas complejas podrían contribuir con la codificación de la información espacial

acerca de la orientación del animal ^(6,7). Por otra parte se ha observado que espigas complejas de la región CA1 y CA3 del hipocampo modifican su frecuencia de descarga ante estímulos visuales y táctiles, así como rotación del cuerpo, inicio o terminación de un movimiento, dirección de la cabeza y dirección del movimiento. Estos cambios en la actividad neuronal no parecen estar asociados solo con la localización espacial del animal; este hecho implica que estas espigas procesan otros tipos de información ^(12,2). Registros extracelulares de la actividad neuronal de la región CA1 del hipocampo, indican que algunas espigas complejas aumentan su descarga, mientras otras la reducen después de la inyección subcutánea de formalina ^(3,4). Los resultados mostrados en este trabajo son en parte consistentes con lo mencionado anteriormente. En el giro dentado el intervalo inter-espiga de las espigas complejas con un solo intervalo (tipo N2) incrementa su duración al inicio del EN, junto a una reducción en la frecuencia de descarga. Mientras que después de haber transcurrido más de la mitad del EN se incrementó la duración del segundo intervalo inter-espigas de las neuronas tipo N3 del giro dentado, posiblemente a expensas del incremento en la duración de la ráfaga. En la región CA1 del hipocampo el intervalo de las espigas tipo N2 incrementaron su duración, asociado una reducción en su frecuencia de descarga. Las espigas complejas que descargaban ráfagas de cuatro espigas (tipo N4 y N4a), incrementan la duración del tercer intervalo inter-espigas, este cambio parece ocurrir a expensas de la duración de la ráfaga. Estos hallazgos sugieren, que estas células estarían participando en la codificación temporal del EN. El giro dentado es el primer estadio del circuito neuronal intrahipocámpico y blanco principal de la mayoría de las aferencias de la corteza entorrinal, y de aferentes subcorticales y comisurales, que transportan información de múltiples modalidades sensoriales acerca del mundo exterior ^(4,10). Es de suponer que parte de la información nociceptiva que llega a la formación hipocámpica es procesada por las espigas complejas del giro dentado, las cuales parecen estar indicando el inicio del EN y señalando un tiempo crítico relacionado con la permanencia de la información nociceptiva, y cuyos cambios en la duración de los intervalos inter-espiga funcionarían como un mecanismo de señalización. Estos hallazgos sugieren que al menos en ratas anestesiadas con uretano, algunas neuronas de la formación hipocámpica que descargan espigas complejas parecen señalar el inicio y un tiempo crítico de la duración de la información nociceptiva, mediante la modificación específica de algunos de los intervalos inter-espigas.

CONCLUSIONES

- La estimulación nociva mediante la aplicación de calor en la cola de ratas anestesiadas, induce un incremento en la duración de intervalos inter-espigas específicos de las espigas complejas tanto del giro dentado como de la región CA1 del hipocampo.
- La codificación temporal de la información nociceptiva en la formación hipocámpica estaría asociada a cambios en el código de descarga de las espigas complejas tanto del giro dentado como de la región CA1 del hipocampo.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) y la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS

1. Fox SE and Ranck JB Jr. Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Exp Brain Res*.1981; 41: 399-410.
2. Gavrilov VV, Wiener SI and Berthoz A. Discharge correlates of hippocampal complex spike neurons in behaving rats passively displaced on a mobile robot. *Hippocampus* 1998; 8:475-490
3. Khanna S. Dorsal hippocampal field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute nociceptive stimulus and their septal modulation. *Neuroscience* 1997; 77: 713-721.
4. Kahana S and Zheng F. Morphine reversed formalin-induced CA1 pyramidal cell suppression via an effect on septo-hippocampal neural processing. *Neuroscience* 1999; 89: 61-71.
5. Leranth C and Hajszan T. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus *Prog Brain Res* 2007; 163:63-84
6. OKeefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*.1976; 51: 78-109
7. OKeefe J and Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*.1971; 34: 171-175.
8. Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. N.Y. 1982
9. Ranck J Jr. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. *Experimental Neurology* 1973; 41: 461-555.
10. Suzuki S and Smith GK. Burst characteristics of hippocampal complex spike cells in the awake rat. *Exp Neur* 1985; 89: 90-95.
11. Witter MP. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research* 2007; 163:43-61.
12. Young BJ, Fox GD and Eichenbaum H. Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task. *Journal of Neuroscience* 1994; 14: 6553-6563