



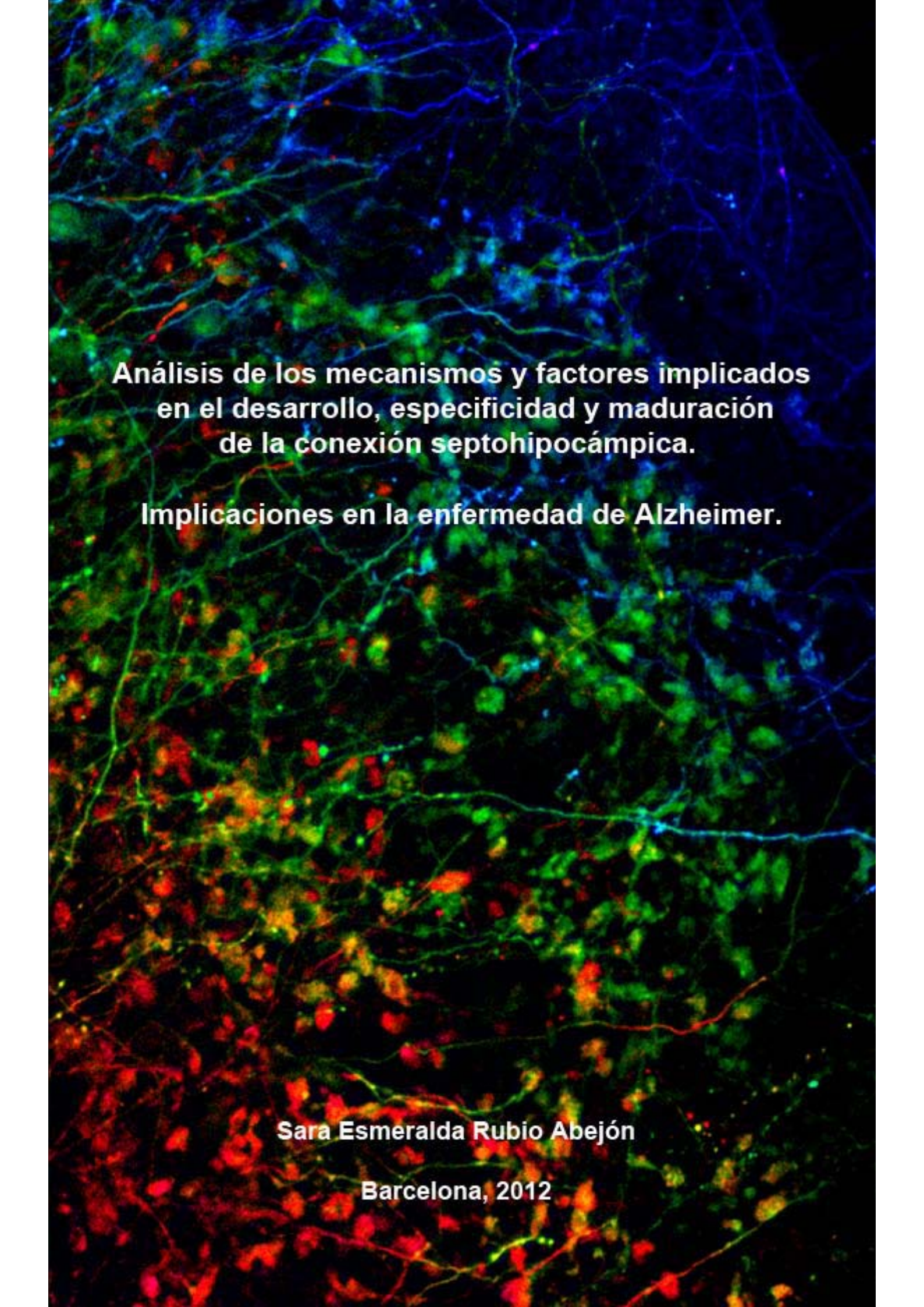
Análisis de los mecanismos y factores implicados en el desarrollo, especificidad y maduración de la conexión septohipocámpica. Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer

Sara Esmeralda Rubio Abejón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A fluorescence microscopy image of neural tissue. The image shows a dense network of neurons and their processes. The neurons are stained with three different colors: blue, green, and red. The blue staining highlights the nuclei of the neurons, while the green and red staining highlights the cytoplasm and processes of the neurons. The overall appearance is a complex, interconnected network of cells against a dark background.

**Análisis de los mecanismos y factores implicados
en el desarrollo, especificidad y maduración
de la conexión septohipocámpica.**

Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer.

Sara Esmeralda Rubio Abejón

Barcelona, 2012

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

**Análisis de los mecanismos y factores implicados en
el desarrollo, especificidad y maduración
de la conexión septohipocámpica.
Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer.**

Sara Esmeralda Rubio Abejón
Barcelona, Septiembre 2012

Programa de Doctorado en Biomedicina
Bienio 2007-2008

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

**Análisis de los mecanismos y factores implicados en el desarrollo,
especificidad y maduración de la conexión septohipocámpica.
Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer.**

Memoria presentada por **Sara Esmeralda Rubio Abejón**, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Los estudios de tercer ciclo se han enmarcado en el programa de doctorado en Biomedicina, bienio 2007-2008, de la Universidad de Barcelona y el proyecto de Tesis Doctoral está adscrito al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de esta memoria han sido dirigidos y supervisados por la **Dra. Marta Pascual Sánchez**, Profesora Titular del departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y por el **Dr. Eduardo Soriano García**, Catedrático del departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, Septiembre de 2012.

Visto bueno de los directores de Tesis:

La candidata a Doctora:

Dra. Marta Pascual Sánchez Dr. Eduardo Soriano García

Sara Esmeralda Rubio Abejón

AGRADECIMIENTOS

Aunque en esta memoria escrita hay gran parte del trabajo realizado durante muchos años, la Tesis es mucho más que resultados. Quizá por curiosidad, por ganas de saber, de descubrir... uno se echa al mar. Y acaba dándose cuenta de que no sólo ha conocido nuevos océanos, sino que ha aprendido a navegar.

Y eso es lo más divertido.

Muchas personas han estado presentes en mi vida durante estos más de siete años, y quisiera agradecer a todas las que, consciente o inconscientemente, me han ayudado a llegar hasta aquí.

- En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis. A Eduardo Soriano por darme la oportunidad de unirme a su equipo, tiempo atrás, y por todo lo que me ha enseñado durante estos años. A Marta Pascual, por acogerme en su proyecto de la única manera que sabe hacer: involucrándose al cien por cien, dándolo todo. He sido muy afortunada de trabajar contigo y, sobre todo, de tenerte como directora de tesis. No está de más decir que gran parte de lo que hoy soy en este mundillo de la ciencia (aunque me queda muchísimo por navegar) es gracias a ti.

- A José María Delgado y Agnès Gruart, de la división de Neurociencias de la UPO; y a Luis de Lecea, del laboratorio de Psicología y Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Stanford: gracias a los tres por darme la oportunidad de aprender en vuestros grupos de investigación y, sobre todo, a afrontar nuevos retos. He aprendido mucho.

- Cómo no, quiero dar las gracias a aquellos que han compartido el proyecto septohipocámpico conmigo. A Natalia: tu trabajo, esfuerzo y dedicación forman parte de esta tesis y, en definitiva, del genial recuerdo que me llevo por haber trabajado contigo. A Germán: tantas horas en el animalario, al final han servido... y no sólo por el trabajo científico que ha resultado, sino (sobre todo) por los buenos momentos compartidos. Gracias por aguantar a esta friki en ciertos momentos. A Diogo: aunque ha sido breve, he aprendido mucho de ti: ¡muito obrigada!

- A Patricia y Sally (I wonder if you ever get to read this, but thanks a lot for your kindness and help!).

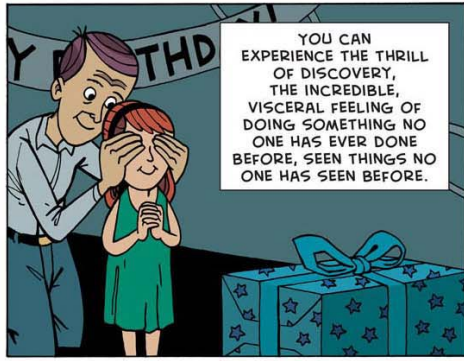
- Durante estos años, mucha gente ha ido llegando y marchando del laboratorio. A los que ya se han marchado, en especial a Eva, Willy (no puede ser esta hora... ¡me hago Doctora!) y Anna (ets una mica la culpable de tot això, ja ho saps... gràcies per l'empenta que em vas donar en aquelles pràctiques. Cal més gent amb la teva passió per la ciència, en aquest món!). A la gente del grupo de José Antonio del Río (incluido él mismo), con quienes compartimos mucho tiempo. Oscar, tu siempre serás de los nuestros, ya lo sabes... como sabes que nunca será igual, allá adonde vayamos :-)

- A todos y cada uno de los compañeros de laboratorio "del sótano", muchas gracias por el día a día y los momentos vividos, tanto dentro como fuera del lab. Aunque compartamos demasiadas horas (¿o será por eso?), con algunos la relación va más allá de lo laboral. Oscar (ya te he dicho que eras de los nuestros? Aquí, en Pekín y en Pokón!), Carles, Bea, Mar, Esther (he aprendido mucho de ti, gracias!) y Oriol (gràcies per les flors compartides, no només discutint de ciència i de la vida... hi ha hagut un abans i un després, i ho saps. Ets de les millores coses que m'emporto d'aquest viatge).

- A mis amigos de la facultad (Jeni, Feri, Laura M.), donde todo empezó. Especialmente a Laura, Xavi, Roser, Gemma, Kistiñe. Muchas veces habéis tenido que soportar las consecuencias de esta tesis, y aún así habéis estado ahí. Gracias.

- A quienes compartieron conmigo gran parte del camino para llegar aquí: Alex, Mari, Edu.

- Por último, y más importante, quiero dar las gracias a mi hermana y a mis padres. Especialmente a mis padres, porque ellos son en última instancia responsables de todo esto. (No sólo durante esta tesis,) me han guiado durante el camino, mientras me inculcaban unos valores sin los cuales hoy no sería quien soy, ni estaría donde estoy. No hay palabras para agradecerlos. Os debo mucho, y aunque esta tesis no sea apenas nada, es para vosotros. Espero que os haga ilusión.



WELCOME TO SCIENCE.



WORDS © PHIL PLAIT. ARTWORK © GAVIN AUNG THAN 2012

zenpencils.com

*"If the brain were simple enough for us to understand it,
we would be too simple to understand it"*
*(Si el cerebro fuese lo suficientemente sencillo para que nosotros lo pudiésemos comprender,
seríamos demasiado simples como para comprenderlo)*
— Ken Hill

pero...

"Μυαλό δεν είναι ένα δοχείο για γέμισμα, αλλά μια φωτιά για άναμμα"
(La mente es un fuego por encender, no un vaso que se ha de llenar)
— Plutarco

A mis Padres.

A Marta.

ÍNDICE

Índice general

Título	1
Agradecimientos	5
Índice	17
Índice general	17
Lista de figuras y tablas	20
Lista de abreviaturas	22
INTRODUCCIÓN	23
Capítulo 1: La conexión septohipocámpica	25
1.1 Anatomía	25
1.1.1 Septum medial. Neuronas septohipocámpicas	25
1.1.2 Anatomía básica del hipocampo	29
1.2 Aferencias de las neuronas septohipocámpicas	35
1.2.1 Circuito local	35
1.2.2 Aferencias externas	35
1.2.2.1 Septum lateral	35
1.2.2.2 Hipocampo	36
1.2.2.3 Hipotálamo	37
1.2.2.4 Tronco encefálico	37
1.2.2.5 Otras aferencias	37
1.3 Desarrollo del sistema septohipocámpico	38
1.4 Función de la conexión septohipocámpica	40
1.4.1 Circuito desinhibidor de la conexión GABAérgica septohipocámpica	40
1.4.2 Actividad rítmica de hipocampo	42
1.4.2.1 Ritmo theta hipocámpico	43
1.4.2.2 Ritmo gamma hipocámpico	45
1.4.3 Otras funciones	46
Capítulo 2: Enfermedad de Alzheimer y envejecimiento fisiológico	47
2.1 Enfermedad de Alzheimer	47
2.1.1 Introducción	47
2.1.2 Características neuropatológicas	48

2.1.2.1 Placas seniles	48
2.1.2.2 Ovillos neurofibrilares	50
2.1.3 Características patofisiológicas	51
2.1.3.1 Disfunción sináptica	51
2.1.3.2 Déficits colinérgicos	52
2.1.4 Modelos animales de Enfermedad de Alzheimer	53
2.1.4.1 La línea transgénica J20	53
2.2 Envejecimiento fisiológico	56
2.3 Estado del prosencéfalo basal y la conexión septohipocámpica en el envejecimiento y Alzheimer	58
OBJETIVOS	61
RESULTADOS	65
Resultados - I	85
Semaforina 3C no es imprescindible para el establecimiento y especificidad de contacto de la vía GABAérgica septohipocámpica <i>in vitro</i>	
Resultados - II	67
Envejecimiento acelerado de la conexión GABAérgica septohipocámpica y disminución de ritmos hipocampales en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer	
Apéndice de Resultados - I	99
Propiedades sinápticas <i>in vivo</i> del hipocampo de un modelo de Alzheimer y sus alteraciones ante la autoestimulación de septum medial	
RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
Capítulo 1: Desarrollo postnatal de la conexión septohipocámpica	137
1.1 Moléculas implicadas en la especificidad de contacto de la conexión septohipocámpica	137
1.2 Relevancia funcional de la especificidad del contacto de la conexión GABAérgica septohipocámpica	139
1.3 Caracterización del crecimiento y sinaptogénesis de los axones septohipocámpicos <i>in vitro</i>	141

Capítulo 2: Conexión GABAérgica septohipocámpica en envejecimiento y enfermedad de Alzheimer	145
2.1 Estado de la conexión septohipocámpica en envejecimiento y EA	145
2.1.1 Componente colinérgico de la conexión	145
2.1.2 Componente GABAérgico de la conexión en envejecimiento	146
2.1.2 Componente GABAérgico de la conexión en EA	147
2.2 Mecanismos patogénicos sobre el componente GABAérgico	150
2.3 Implicaciones funcionales del fallo GABAérgico septohipocámpico	152
2.4 La conexión septohipocámpica como sistema - alteraciones a nivel de circuitos y redes neuronales	154
2.4.1 Aferencias de las neuronas septohipocámpicas: estado en envejecimiento y EA	155
2.5 Otras consideraciones	156
2.5.1 La EA como un proceso de envejecimiento acelerado	156
2.5.2 Uso de modelos animales para el estudio de la EA	157
Capítulo 3: Función hipocámpica en el modelo j20. Alteraciones ante procesos de autoestimulación septal	159
3.1 Función sináptica en el modelo de EA J20. Implicaciones funcionales	160
- Propiedades de la sinapsis colateral de Schaffer en ratones J20	160
- Potenciación a largo plazo en la sinapsis colateral de Schaffer en ratones J20	161
- LTP y déficits cognitivos en ratones J20	163
3.2 El septum medial como parte del sistema de refuerzo interno	164
3.3 Efecto de la LTP sobre la autoestimulación septal	166
3.4 Consideraciones finales	166
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
INFORME SOBRE LAS PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	187
APÉNDICE 1: Contenido multimedia incluido en el material suplementario	191
APÉNDICE 2: Financiación disfrutada para la elaboración de esta Tesis Doctoral	195

Lista de figuras y tablas

INTRODUCCIÓN

<i>Figura 1. Anatomía del septum medial de ratón</i>	25
<i>Figura 2. Distribución de los somas y axones de las neuronas septohipocámpicas</i>	25
<i>Figura 3. Contactos GABAérgicos septohipocámpicos</i>	27
<i>Figura 4. Selección de diana de los componentes de la conexión septohipocámpica</i>	28
<i>Figura 5. Citoarquitectura básica de la formación hipocámpal</i>	30
<i>Figura 6. Circuito trisináptico de hipocampo</i>	31
<i>Figura 7. Distribución de las subpoblaciones de interneuronas de hipocampo según su contenido en proteínas secuestradoras de calcio</i>	34
<i>Figura 8. Moléculas implicadas en la guía de los axones septohipocámpicos durante el desarrollo embrionario</i>	39
<i>Figura 9. Proceso de desinhibición mediado por el sistema GABAérgico septohipocámpico</i>	40
<i>Figura 10. Control de los circuitos de hipocampo por parte de aferencias inhibitorias subcorticales</i>	41
<i>Figura 11. Registro encefalográfico del hipocampo de rata durante diferentes comportamientos</i>	43
<i>Figura 12. Ondas theta y gamma del EEG</i>	44
<i>Figura 13. Mecanismo septohipocámpico de generación del ritmo theta</i>	44
<i>Figura 14. Acoplamiento theta-gamma en el hipocampo</i>	46
<i>Figura 15. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP) y formación del péptido β-amiloide</i>	49
<i>Figura 16. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el cerebro de pacientes de enfermedad de Alzheimer</i>	51
<i>Figura 17. Mutaciones de hAPP en la cepa J20 y patología amiloide en hipocampo</i>	54
<i>Tabla 1. Líneas transgénicas utilizadas como modelos de enfermedad de Alzheimer</i>	55

DISCUSIÓN

<i>Figura 18. Monitorización de la dinámica axonal en cultivos organotípicos</i>	144
--	-----

septohipocámpicos

Figura 19. Inervación colinérgica del hipocampo en la cepa J20 146

Figura 20. Expresión de la recombinasa Cre en el MS/DBB de varias líneas transgénicas de ratón 168

Lista de abreviaturas

- AChE**, acetilcolinesterasa
- AMPA**, ácido 2-amino-3-(3-hydroxi-5-metil-isoxazol-4-il)propanoico
- APP**, proteína precursora del amiloide
- CA1, 2 ó 3**, *Cornu Ammonis*
- CAM**, molécula de adhesión celular
- CBF**, prosencéfalo basal colinérgico
- ChAT**, colinacetiltransferasa
- EA**, enfermedad de Alzheimer
- EEG**, electroencefalografía o electroencefalograma
- eGFP**, proteína verde fluorescente mejorada
- e-LTP**, fase temprana de la potenciación a largo plazo
- GABA**, ácido gammaaminobutírico
- GAD**, decarboxilasa del ácido glutámico
- HFS**, estimulación de alta frecuencia
- LIA**, actividad irregular de gran amplitud
- I-LTP**, fase tardía de la potenciación a largo plazo
- MCI**, deterioro cognitivo leve
- MS/DBB**, complejo del septum medial / banda diagonal de Broca
- NFT**, ovillo neurofibrilar
- NGF**, factor de crecimiento nervioso
- NMDA**, N-metil-D-aspartato
- NRP-1, -2**, neuropilina-1, -2
- PDGFβ**, cadena beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PHF**, filamentos helicoidales pareados
- PSEN**, presenilina
- Sema 3C**, semaforina 3C
- SIA**, actividad irregular de pequeña amplitud
- WT**, *wild-type* o control

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: La Conexión Septohipocámpica

1.1 ANATOMÍA

1.1.1 SEPTUM MEDIAL. NEURONAS SEPTOHIPOCÁMPICAS

El septum o septo (del latín *sæptum*: pared, tabique) es una estructura cerebral que conforma la pared interventricular medial en el cerebro humano. El septum forma parte de la región denominada "cerebro anterior basal" o "prosencefalo basal" (denominado *basal forebrain* en inglés). El prosencefalo basal corresponde a una región anatómicamente compleja que incluye diversas poblaciones neuronales muy heterogéneas en cuanto a morfología, contenido de neurotransmisor y patrones de proyección. En general, el cerebro anterior basal está implicado en procesos de activación cortical, atención, motivación, memoria y otras funciones de control homeostático (Zaborszky, 2012).

En el cerebro de rata o ratón, el septum es una estructura con forma de barril situada en la parte anteromedial del prosencefalo basal, limitada dorsalmente por el cuerpo calloso y lateralmente por los ventrículos laterales. Se distinguen cuatro grandes regiones dentro del septum: región medial, región lateral, región ventral y región posterior o caudal (Risold and George, 2004). Esta tesis versa sobre la conexión septohipocámpica, localizada en la región medial del septum, por lo que apenas se entrará en detalle sobre las otras regiones septales.

La región medial del septum consta de varios núcleos de células, de los cuales los más importantes son el núcleo medial septal y el núcleo de la banda diagonal de Broca (denominados en conjunto "MS/DBB", siglas en inglés de *Medial Septum /*

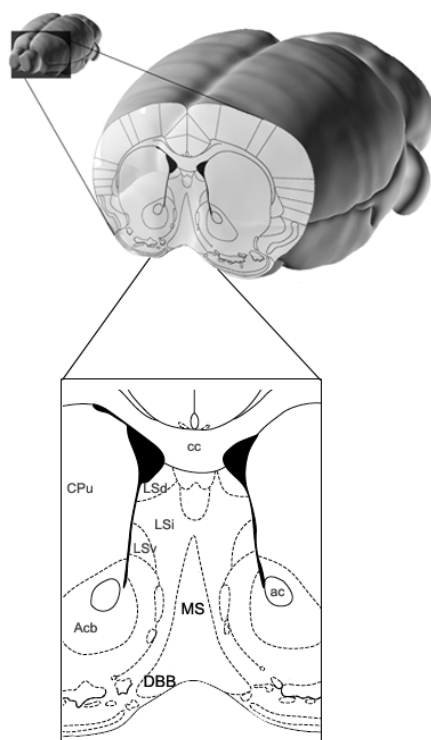


Figura 1. Anatomía del septum medial de ratón.

Localización del septum medial (MS) y banda diagonal de Broca (DBB) en un corte coronal del cerebro de ratón correspondiente al punto medio del área septal en el eje rostrocaudal (bregma + 0.98). Modificado de Paxinos and Franklin, 2001 y Brain Explorer®.

Diagonal Band of Broca). El primero se dispone en forma de banda vertical situada entorno a la línea medial y ocupa las dos terceras partes más ventrales del septum. El segundo núcleo contiene una porción vertical y otra horizontal, que ocupan la zona más medial o lateral, respectivamente, de la parte basal del septum (Paxinos and Franklin, 2001). Al estar situadas las neuronas septohipocámpicas únicamente en la porción vertical de la banda diagonal de Broca, y para facilitar la lectura, a lo largo del texto se empleará el término "banda diagonal de Broca" en referencia a la porción vertical de dicho núcleo. El núcleo medial septal y la banda diagonal de Broca, en conjunto, adoptan una morfología típica de "Y" invertida al ser visualizados en cortes coronales (figura 1 y Paxinos and Franklin, 2001).

La conexión septohipocámpica consta de neuronas de proyección situadas en el MS/DBB que inervan todas las regiones de la formación hipocámpica (figura 2), tal y como se demostró en la década del 1970 mediante técnicas de trazado *in vivo* en roedores (Mosko et al., 1973; Meibach and Siegel, 1977; Swanson and Cowan, 1979). Los axones de las neuronas septohipocámpicas se extienden hasta el hipocampo a través del fórnix dorsal y la fimbria mayoritariamente, pero algunos siguen la estría supracallosa o bien una ruta ventral a través del complejo amigdalino. Aunque la conexión es mayoritariamente ipsilateral (es decir, permanece en el mismo hemisferio), una parte de los axones inervan el hipocampo de manera

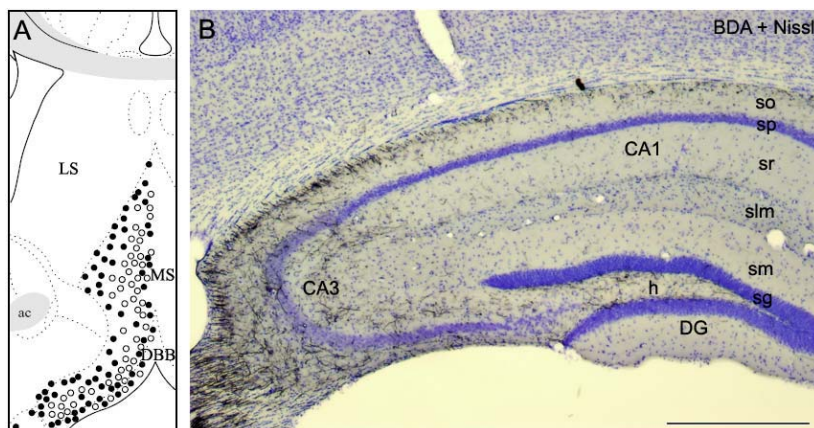


Figura 2. Distribución de los somas y axones de las neuronas septohipocámpicas.

(A) Localización de los somas de neuronas colinérgicas (círculos negros) y GABAérgicas (círculos blancos) en el MS/DBB de rata. (B) Los estudios de trazado *in vivo* permiten detectar las fibras septales (BDA, en negro) que invaden profusamente el hipocampo, en especial la región CA3, el hilus y los estratos oriens y lacunosum-moleculare de CA1. BDA, dextranamina biotinilada (trazador anterógrado); DG, giro dentado; h, hilus; sg, capa granular; sl, estrato lúcido; slm, estrato lacunosum-moleculare; so, estrato oriens; sp, capa piramidal; sr, estrato radiado; sm, capa molecular. Escala: 300 μ m. Modificado de Risold, 2004 (A).

contralateral. La región central y más anterior del núcleo medial septal proyecta mayoritariamente a regiones más dorsales del hipocampo; las neuronas localizadas en la zona lateral y más posterior del septum medial inervan mayoritariamente la porción ventral de la formación hipocámpica. Las neuronas situadas en la banda diagonal de Broca, en cambio, inervan tanto la región dorsal como la

ventral del hipocampo por igual (Gaykema et al., 1990; Yoshida and Oka, 1995).

Se han descrito dos tipos mayoritarios de neuronas septohipocámpicas, clasificadas según el neurotransmisor que utilizan:

Neuronas GABAérgicas

Utilizan el neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico (GABA, siglas en inglés de *Gamma-Amino Butyric Acid*). Se encuentran diseminadas por todo el MS/DBB y constituyen el 45-65% del total de neuronas septohipocámpicas (Amaral and Kurz, 1985). A diferencia de otras neuronas inhibitorias septales de circuito local, las neuronas GABAérgicas que proyectan a la formación hipocámpica contienen la proteína secuestradora de calcio Parvalbúmina (Freund, 1989).

Sus axones son gruesos y

mielinizados, y muestran un alto grado de especificidad de contacto en el hipocampo ya que inervan únicamente el soma y las dendritas proximales de neuronas GABAérgicas (figura 3 y 4), como se ha demostrado mediante técnicas de microscopía electrónica combinadas con trazado de la conexión (Freund and Antal, 1988). Estos contactos, denominados sinapsis *en cesto*, constan de numerosos y gruesos botones sinápticos localizados sobre el soma y las dendritas proximales de sus células diana (figura 3). La exquisita especificidad de contacto de este componente de la conexión sobre sus células diana es crucial para la función de la conexión septohipocámpica (véase el apartado 1.4.1, *Circuito desinhibidor de la conexión GABAérgica septohipocámpica*). En cuanto a sus características electrofisiológicas, cabe destacar que las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas muestran un patrón de disparo de potenciales de acción en ráfagas o *bursts*, y disparan a frecuencias altas en comparación con el resto de neuronas septales. Por este motivo se las denomina células "de disparo rápido" o

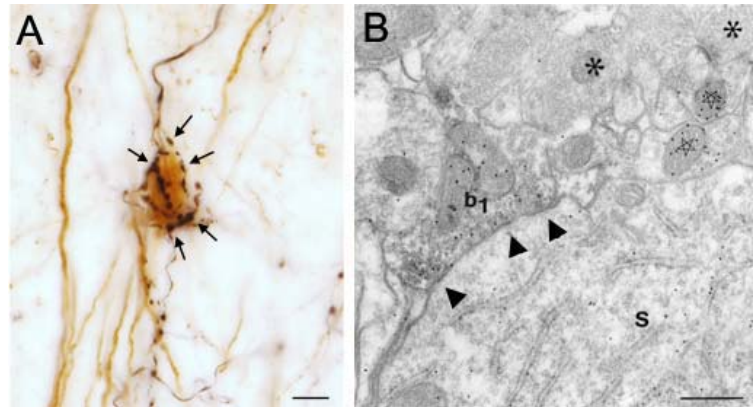


Figura 3. Contactos GABAérgicos septohipocámpicos.

(A) Los contactos de tipo cesto de los axones GABAérgicos septohipocámpicos (en negro) pueden llegar a constar de decenas de botones sinápticos (flechas), que se localizan en el soma y dendritas proximales de interneuronas de hipocampo —en este caso, una célula inmunorreactiva para Parvalbúmina, en marrón. (B) Mediante técnicas de microscopía electrónica se pueden observar las sinapsis simétricas (puntas de flecha) que los botones sinápticos GABAérgicos septales (b1) establecen sobre el soma (S) de neuronas de hipocampo. Las partículas de oro (puntos negros) señalan la presencia del neurotransmisor GABA tanto en el componente presináptico (b1) como en el postsináptico (S). Escala: 10 μm en (A), 500 nm en (B). Modificado de Freund and Antal, 1988 (B).

fast-spiking, una característica que suelen presentar numerosas neuronas GABAérgicas que contienen Parvalbúmina en otras regiones cerebrales.

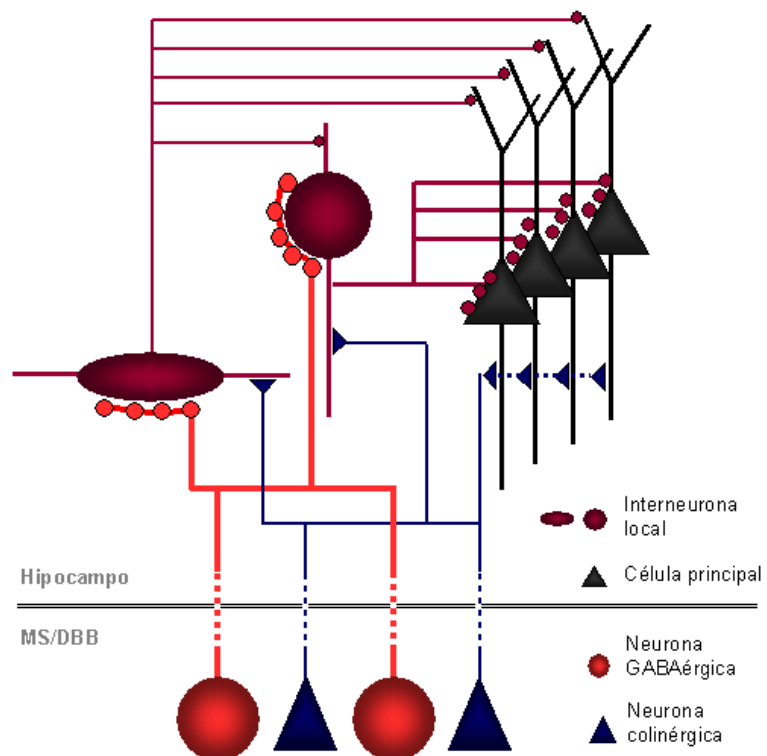
Neuronas colinérgicas

Utilizan el neurotransmisor excitador acetilcolina. Se distribuyen también a lo largo de todo el MS/DBB, y representan el 35-45% de la conexión (Amaral and Kurz, 1985). Se caracterizan por la expresión de enzimas esenciales en el metabolismo de la acetilcolina, como la colinacetiltransferasa (ChAT, siglas en inglés de *Choline AcetylTransferase*) o la acetilcolinesterasa (AChE, siglas en inglés de *AcetylCholinEsterase*). Sus axones son de menor diámetro que los de las neuronas GABAérgicas y no están mielinizados. En el hipocampo contactan con todos los tipos neuronales (células piramidales, granulares e interneuronas; figura 4) mediante botones sinápticos finos, que se localizan en numerosas capas del hipocampo, especialmente en las capas de células principales y estratos adyacentes (Frotscher and Léránth, 1985; Frotscher and Léránth, 1986). La frecuencia de disparo de estas neuronas es menor que las del componente GABAérgico y parecen actuar de manera tónica sobre sus dianas en hipocampo.

Figura 4. Selección de diana de los componentes de la conexión septohipocámpica.

Los terminales colinérgicos septales establecen contacto con todos los tipos neuronales en hipocampo. En cambio, las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas únicamente contactan con el soma de interneuronas locales, que a su vez inervan diferentes compartimentos de las células principales de hipocampo. Las líneas discontinuas indican el trayecto de los axones hasta el hipocampo (no a escala).

Cedido por M. Pascual, modificado.



Recientemente se ha propuesto la existencia de un tercer componente de la conexión, supuestamente glutamatérgico ya que expresa transportadores vesiculares para el neurotransmisor glutamato (VGLUT1 y 2, *Vesicular GLUtamate Transporter 1 y 2*; Sotty et al., 2003; Colom et al., 2005). Aunque su existencia es controvertida debido a que estas

neuronas coexpresan frecuentemente marcadores de otros tipos celulares (GAD, ChAT), la mayor evidencia a favor de este componente se deriva de estudios electrofisiológicos *in vitro* (Sotty et al., 2003; Manseau et al., 2005) y concuerda con datos sobre el desarrollo embrionario temprano del septum medial (Medina and Abellán, 2012). De momento, se desconocen las posibles dianas de este componente en hipocampo.

1.1.2 ANATOMÍA BÁSICA DEL HIPOCAMPO

La formación hipocámpica es una estructura telencefálica presente en cada uno de los hemisferios, de organización laminar y que incluye a la corteza entorrinal, el complejo subicular, el giro dentado y el hipocampo propio.

Citoarquitectura del hipocampo

El hipocampo propio (o simplemente "hipocampo") consta de tres regiones divididas según su conectividad: *cornu ammonis* (CA)1, CA2 y CA3 (estas últimas agrupadas normalmente como región CA2/CA3). Estas regiones tienen una estructura similar organizada en capas que se disponen, unas encima de otras, de manera paralela a la superficie del ventrículo lateral (figura 5). Desde la zona ventricular hacia la fisura hipocámpica, las capas de las regiones CA son las siguientes:

-**Alveus**: contiene axones aferentes y eferentes del hipocampo. Raramente se encuentran neuronas en esta capa.

-**Estrato oriens** (so, del latín *Stratum Oriens*): adyacente al alveus, este estrato contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales así como neuronas inhibitoras, entre ellas las que proyectan al septum medial (véase el apartado 1.2, *Aferencias del sistema septohipocámpico*).

-**Capa piramidal** (sp, *Stratum Pyramidale*): contiene los somas de las neuronas piramidales, de naturaleza glutamatérgica. Entremezcladas entre ellas se encuentran algunas interneuronas inhibitoras.

-**Estrato lúcido** (sl, *Stratum Lucidum*): presente únicamente en la región CA3, por debajo de la capa piramidal, el SL aloja las fibras musgosas del giro dentado y algunas interneuronas inhibitoras.

-**Estrato radiado** (sr, *Stratum Radiatum*): es el estrato adyacente al piramidal, en la región CA1, y al lúcido, en CA3. Contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales,

los axones colaterales de Schaffer en CA1 y las conexiones asociacionales en CA3. También hay interneuronas en esta capa.

-Estrato lacunosum-moleculare (slm, *Stratum Lacunosum-Moleculare*): se encuentran en ella la parte más distal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales y las fibras provenientes de la corteza entorrinal. También hay interneuronas y células de Cajal-Retzius.

El giro dentado, por su parte, está formado por la *fascia dentata* (o giro dentado propiamente dicho) y el hilus o capa polimórfica. Las capas que lo componen son:

-Capa molecular (sm, *Stratum Moleculare*): se sitúa adyacente a la fisura hipocámpica y contiene las dendritas de las células granulares, además de diversos tipos de interneuronas. A esta capa llegan axones provenientes de la corteza entorrinal y del hilus.

-Capa granular: formada por los pequeños somas de las neuronas granulares, de naturaleza glutamatérgica y densamente empaquetados, y algunas interneuronas inhibitorias.

Las capas granular y molecular se disponen de manera plegada, adoptando una forma en "V".

-Hilus o capa polimórfica: se refiere a la región más interna del giro dentado, englobada por la capa granular. Contiene los axones de las células granulares (denominados *fibras musgosas*), que proyectan a la región CA3. Además, en el hilus se encuentran las células musgosas (glutamatérgicas) e interneuronas inhibitorias.

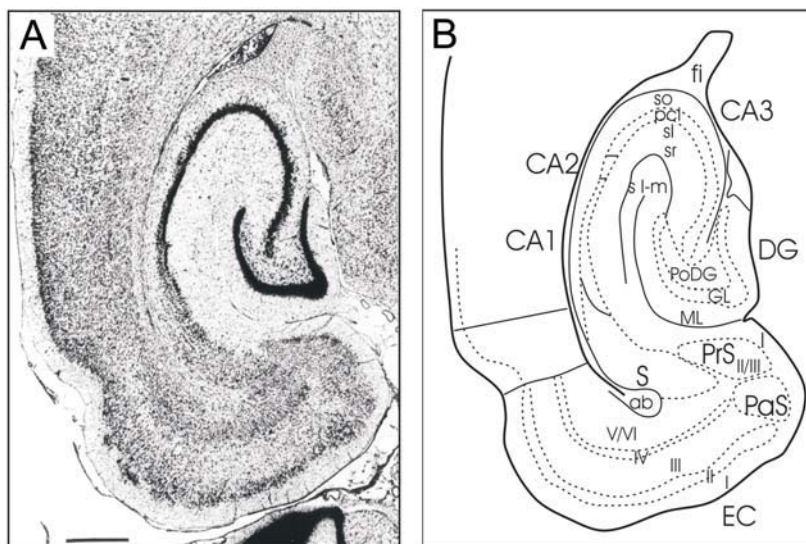


Figura 5. Citoarquitectura básica de la formación hipocámpica.

La tinción de Nissl pone de manifiesto la organización laminada del hipocampo(A). Las diferentes capas y regiones se indican en (B). Abreviaturas adicionales: ab, fascículo angular; EC, corteza entorrinal; fi, fimbria; PaS, parasubiculum; pcl, capa piramidal; PoDG, capa polimórfica del giro dentado; PrS, presubiculum; S, subículum. Escala: 500 μ m. Modificado de Amara and Witter, 2004 (A y B).

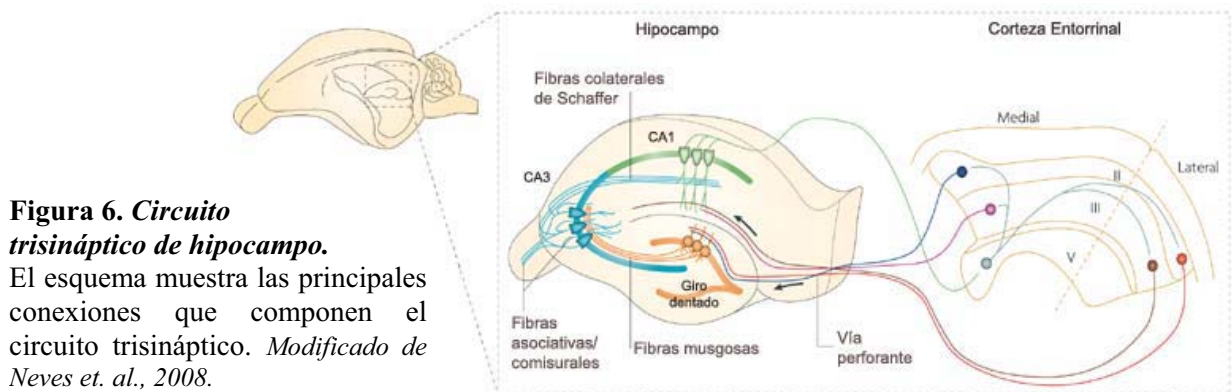
Circuitos de hipocampo

La formación hipocampal destaca por la extraordinaria complejidad de los circuitos locales (revisada exhaustivamente en Amaral and Witter, 2004). El llamado circuito trisináptico (figura 6) está formado básicamente por tres conexiones unidireccionales que permiten a la formación hipocámpica el procesamiento de información proveniente de regiones neocorticales, y el envío de información de vuelta a la neocorteza:

-La **conexión entorrinohipocámpica**, también llamada *vía perforante*, está formada por los axones de las células piramidales de capa II de la corteza entorrinal (EC) que contactan con las dendritas de células granulares, situadas en la capa molecular del giro dentado, y con algunas interneuronas de esa misma capa.

-La **vía de las fibras musgosas**: los axones de las células granulares, no mielinizados, reciben el nombre de *fibras musgosas*. Éstos atraviesan el hilus e inervan el estrato lúcido de CA3, donde contactan con las dendritas de las neuronas piramidales e interneuronas.

-La **vía asociativa o colateral de Schaffer** está formada por axones de las neuronas piramidales de CA3 que proyectan a las dendritas de células piramidales localizadas en los estratos oriens y radiatum de la región CA1 ipsilateral.



La información que llega a la región CA1 a través de este circuito trisináptico es proyectada de nuevo hacia la corteza entorrinal, tanto por conexiones directas (CA1-EC) como indirectamente a través del subículo. De esta manera se cierra el bucle trisináptico, en el cual la información fluye de manera unidireccional. Sin embargo, esta visión de los circuitos de hipocampo es extremadamente simplista, puesto que existen numerosos circuitos superpuestos al circuito trisináptico. Por citar un ejemplo, las neuronas piramidales de CA3 —a diferencia de las de CA1— se caracterizan por emitir numerosos colaterales que inervan las dendritas de células piramidales situadas en el SO y SR de esa misma región (conexión

asociativa de CA3), pero también de las regiones CA3, CA2 y CA1 del hipocampo contralateral (conexiones comisurales de CA3), incluyendo también contactos con interneuronas.

Otro ejemplo importante a considerar en el marco de la presente tesis es la entramada red de interneuronas inhibitorias de hipocampo, que conforman multitud de circuitos locales capaces de modular la actividad de otras interneuronas o de células principales. De esta manera, las interneuronas inhibitorias locales controlan tanto los niveles de excitación como la ventana espaciotemporal en que la actividad de hipocampo tiene lugar (para una revisión extensa del tema, véase Freund and Buzsáki, 1996). Aunque las interneuronas inhibitorias están presentes en numerosas regiones cerebrales, donde desempeñan funciones esenciales dentro de los circuitos, en el siguiente apartado se profundiza en la población de interneuronas presentes en el hipocampo.

Interneuronas de hipocampo. Clasificación según su contenido en proteínas secuestradoras de calcio

Distribuidas por todas las capas de la formación hipocámpica se encuentran numerosas células GABAérgicas, denominadas en este caso interneuronas porque la mayoría son de circuito local. Todas ellas utilizan el neurotransmisor inhibitor GABA y, por tanto, expresan marcadores GABAérgicos como el enzima *decarboxilasa del ácido glutámico* (GAD, siglas en inglés de *Glutamic Acid Decarboxylase*). Sin embargo, la población de interneuronas hipocámpicas es muy heterogénea en cuanto a su conectividad, distribución, neuroquímica y fisiología (Freund and Buzsaki, 1996; Mátyás et al., 2004). Uno de los criterios utilizados clásicamente para clasificar las interneuronas hipocámpicas es su contenido en proteínas secuestradoras de calcio (figura 7). Es la clasificación que se ha utilizado en el presente trabajo y define tres subpoblaciones básicas no solapadas entre sí:

Interneuronas Parvalbúmina-positivas

Estas interneuronas representan el 20-24% de la población total de interneuronas de hipocampo. Se distribuyen mayoritariamente en la capa piramidal, estrato oriens, capa granular e hilus, y sus somas suelen ser grandes en comparación con los de otras interneuronas. En cuanto a conectividad se refiere, forman parte de la población de "células en cesto" (interneuronas que presentan un terminal axónico en forma de cesto con numerosos botones que envuelve el soma de células principales) y de las "interneuronas axo-axónicas" (las que contactan con el segmento inicial del axón de neuronas principales mediante

terminales sinápticos en forma de hilera con numerosos botones sinápticos; Freund and Buzsaki, 1996).

Cada una de las neuronas inmunopositivas para Parvalbúmina (*Parvalbúmina*⁺) contacta con cientos de neuronas principales diferentes, con lo que la misma información llega a muchas células a la vez, favoreciendo su sincronización. Además, las neuronas que contienen Parvalbúmina presentan uniones en hendidura* (*gap junctions*) que permiten una comunicación eléctrica directa entre células, y por tanto la sincronización de la propia población Parvalbúmina⁺.

Interneuronas Calretinina-positivas

Conforman, aproximadamente, el 13% de todas las interneuronas hipocámpicas. Se distribuyen por todas las capas del hipocampo, aunque más densamente en la capa piramidal. Forman parte de la subpoblación de interneuronas especializadas en inervar otras interneuronas, denominadas en conjunto *interneurona-selectivas* (IS). Concretamente, las interneuronas que contienen Calretinina son del tipo IS-1: inervan el compartimento somatodendrítico de otras interneuronas especializadas en inervar las dendritas de células principales (Gulyás et al., 1996).

Es importante destacar que las células de Cajal-Retzius, localizadas en la capa molecular externa del giro dentado y cerca de la fisura hipocámpica, también contienen Calretinina (Soriano et al., 1994). A pesar de ser una población transitoria, muy abundante durante el desarrollo embrionario, en estadio adulto se mantiene una pequeña población. En cualquier caso, no son células GABAérgicas y por tanto no pertenecen a la población de interneuronas inhibitoras descritas aquí. De manera similar, las células musgosas del hilus también expresan Calretinina en numerosas especies excepto en rata (Mátyás et al., 2004), pero son de naturaleza glutamatérgica y tampoco se consideran interneuronas inhibitoras.

Interneuronas Calbindina-positivas

Su soma se localiza en el estrato radiado, el lacunosum-moleculare y las capas granular y piramidal. Aunque su número no está claramente definido, se estima que el 10-12% de las interneuronas de hipocampo contienen Calbindina. En cuanto a su conectividad, estas células forman parte del grupo "interneuronas que inervan las dendritas de neuronas

* Las *uniones en hendidura* son uniones intercelulares compuestas por canales de membrana que comunican el citoplasma de las dos células implicadas. Permiten el paso de iones y algunas moléculas a través de ellos, procurando un acoplamiento eléctrico y metabólico entre el grupo de células conectadas.

principales", aunque una subpoblación ubicada en el estrato oriens proyecta al septum medial (véase el apartado 1.2, *Aferencias del sistema septohipocámpico*).

Como ocurre con las neuronas Calretinina-positivas, existen neuronas hipocámpicas de naturaleza no inhibitora que contienen Calbindina: las neuronas granulares y las piramidales superficiales de CA1 más cercanas al estrato radiado (Baimbridge and Miller, 1982).



Figura 7. Distribución de las subpoblaciones de interneuronas de hipocampo según su contenido en proteínas secuestradoras de calcio.

Dibujos a cámara lúcida que muestran la distribución de interneuronas inmunorreactivas para Parvalbúmina, Calretinina y Calbindina en cortes coronales de hipocampo de rata. Cada punto representa una célula. *Modificado de Freund and Buzsáki, 1996.*

El sistema GABAérgico septohipocámpico ejerce un extraordinario control sobre la red de interneuronas locales de hipocampo, por lo cual es crucial para determinados aspectos de la función hipocámpica (véase el apartado 1.4, *Función de la conexión septohipocámpica*).

1.2 AFERENCIAS DE LAS NEURONAS SEPTOHIPOCÁMPICAS

Como otros núcleos del prosencéfalo basal, el septum es una región altamente interconectada con otras áreas más o menos distantes, de manera que actúa como integrador de información ascendente y descendente, responsable de numerosos procesos cognitivos, de control homeostático y del comportamiento del individuo.

En concreto, las neuronas septohipocámpicas reciben aferencias tanto de neuronas de circuito local, situadas en el núcleo medial del septum y en la banda diagonal de Broca, como de neuronas de proyección situadas en otras regiones.

Circuitos locales

Las neuronas glutamatérgicas de circuito local, situadas en la región medial del septum, contactan con el soma y dendritas de neuronas septohipocámpicas tanto colinérgicas como GABAérgicas, activándolas de manera tónica (Hajszan et al., 2004). Las neuronas colinérgicas septohipocámpicas, por su parte, también emiten fibras colaterales que activan a las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas (Alreja, 1996; Alreja et al., 2000). La activación del componente GABAérgico septohipocámpico a través de estos circuitos locales es clave para la generación del ritmo theta hipocámpico dependiente de septum medial, como se describe más adelante (véase el apartado 1.4, *Función de la conexión septohipocámpica*).

Aferencias externas

Las principales aferencias externas del sistema septohipocámpico son las siguientes:

1. Septum lateral

La existencia de una conexión septal lateromedial es materia de debate desde hace años. Hay estudios que muestran que determinadas neuronas GABAérgicas del septum lateral contactan con otras neuronas GABAérgicas situadas en el septum medial y banda diagonal de Broca, entre ellas las neuronas septohipocámpicas (Risold and Swanson, 1997). La activación de estas células GABAérgicas de septum lateral tendría un efecto inhibitorio sobre las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas y formaría parte del bucle septo-hipocampo-septal (véase el siguiente apartado). Sin embargo, otros estudios de trazado de conexiones han demostrado que esta conexión lateromedial septal es escasa, o incluso ponen en duda su existencia (Staiger and Nürnberg, 1991; Leranth et al., 1992).

2. Hipocampo

La conexión recíproca hipocamposeptal constituye una de las principales aferencias del sistema septohipocámpico, y surge de células piramidales y no piramidales durante el desarrollo embrionario (Supèr and Soriano, 1994).

Por una parte, una conexión hipocamposeptal directa surge de una subpoblación de neuronas GABAérgicas localizadas en el estrato oriens de CA1 y CA3 de hipocampo y en el hilus del giro dentado (Alonso and Kohler, 1982). La subpoblación de la capa oriens expresa la proteína secuestradora de calcio Calbindina (Toth and Freund, 1992) y también el péptido Somatostatina en algunos casos (Gulyás et al., 2003). Estas neuronas GABAérgicas hipocamposeptales establecen contacto directo (*i.e.*, monosináptico) mayoritariamente sobre las dendritas y somas de neuronas GABAérgicas septohipocámpicas (Toth et al., 1993). Esta inervación, aunque de naturaleza inhibitoria, tiene como resultado una activación rítmica de las células diana, ya que tras la inhibición inicial, tiene lugar un "efecto rebote" que causa una despolarización y la consecuente generación de un potencial de acción. Las células GABAérgicas hipocamposeptales también contactan, aunque en menor medida, con células septohipocámpicas colinérgicas, pero en este caso ejercen un efecto neto inhibitorio (Manseau et al., 2008). Las neuronas hipocamposeptales son una población abundante durante el desarrollo embrionario, momento en que sirven de guía para los axones septohipocámpicos en desarrollo. En estadios posteriores, y especialmente en la etapa adulta, la población de neuronas GABAérgicas hipocamposeptales es considerablemente menor.

Por otra parte, células piramidales del hipocampo propio y del subículum establecen contactos excitadores con neuronas GABAérgicas del septum lateral (Leranth and Frotscher, 1989). Como se ha indicado en el apartado anterior, las neuronas GABAérgicas del septum lateral podrían inhibir a neuronas GABAérgicas del septum medial. De esta manera, una mayor actividad de las neuronas piramidales de hipocampo causaría la inhibición de la conexión GABAérgica septohipocámpica para modular a la baja la señal ejercida desde el septum medial hacia el hipocampo.

Estas conexiones directas e indirectas desde el hipocampo hacia el septum medial completan el bucle septo-hipocampo-septal que garantiza el intercambio de información entre ambas estructuras para asegurar que el sistema funciona dentro de unos niveles y patrones de actividad fisiológicos.

3. Hipotálamo

El área hipotalámica lateral emite axones hipocretinérgicos que activan, mediante receptores Hcrt-R2, a una población de neuronas septales GABAérgicas que proyectan a hipocampo (Wu et al., 2002). Estos axones hipotalámicos también son capaces de activar a las células colinérgicas septohipocámpicas, que emiten a su vez colaterales hacia las neuronas GABAérgicas septales. Este aumento del tono en septum causado por la activación directa e indirecta desde el hipotálamo es importante para la generación de oscilaciones theta hipocámpicas y otros procesos de alerta y vigilia.

4. Tronco encefálico

Las aferencias septales desde el tronco encefálico incluyen axones serotoninérgicos provenientes del núcleo medial del rafe que contactan con el compartimiento somatodendrítico de las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas. Esta inervación es excitadora y mediada por receptores 5-HT_{2A} (Alreja, 1996). Se ha descrito que el núcleo medial del rafe también inerva algunas interneuronas de hipocampo, en este caso inhibiéndolas. Así, el núcleo medial del rafe ejerce un efecto excitador sobre la actividad global de hipocampo de manera directa pero también indirectamente, a través del septum medial (Leranth and Vertes, 1999).

5. Otras aferencias

El septum medial recibe aferencias, en mayor o menor medida y de manera directa o indirecta (a través de la conexión desde el septum lateral), de otras regiones tales como la corteza entorrinal (Leranth et al., 1999), la amígdala y el área tegmental ventral (Gaykema and Zaborszky, 1996). Estas aferencias colaboran en la integración de información entre áreas subcorticales y corticales llevada a cabo en el septum, tanto para procesos relacionados con funciones cognitivas como para la integración del estado homeostático y emocional del individuo.

1.3 DESARROLLO DEL SISTEMA SEPTOHIPOCÁMPICO

La región medial del septum se origina, mayoritariamente, a partir del subpalio embrionario. Las neuronas GABAérgicas y colinérgicas del septum medial y la banda diagonal de Broca se generan a partir de progenitores existentes en el sector palidal del subpalio entre los días embrionarios (E) 12 y 16 en rata, aunque se desconoce el momento concreto en que se genera cada tipo neuronal y los factores de transcripción responsables de su especificación y diferenciación (Medina and Abellán, 2012).

Una vez las neuronas se han diferenciado y localizado en su ubicación final, tiene lugar el proceso de crecimiento axonal. Una de las características más importantes del sistema nervioso, y de la cual depende en gran medida la función de éste, es la exquisita precisión con que las neuronas se conectan entre sí durante el desarrollo. Las neuronas en desarrollo deben extender sus proyecciones axonales hacia el área que han de inervar. Una vez han llegado al área diana, han de reconocer las células, e incluso el dominio subcelular de éstas, con que han de establecer contacto. En este último paso se induce la formación de los contactos sinápticos *per se*, un proceso denominado sinaptogénesis, y posteriormente se refinan estos contactos de manera que se estabilizan o se acaban eliminando.

Numerosas moléculas y mecanismos gobiernan estos pasos para garantizar el correcto reconocimiento entre los elementos que se han de conectar. Por ejemplo, el crecimiento y direccionamiento de axones está finamente controlado por mecanismos de guía axonal que pueden tener un efecto atrayente o repelente, y funcionar tanto a distancia como por contacto. Estos efectos son mediados en la mayoría de casos por las denominadas *moléculas guía*: moléculas que desencadenan diferentes procesos intracelulares en el cono de crecimiento responsables del direccionamiento del axón.

En el sistema septohipocámpico en concreto, los axones colinérgicos y GABAérgicos en desarrollo se extienden hacia el hipocampo en etapas embrionarias: se dirigen desde el MS/DBB hacia el complejo fimbria/fórnix gracias al efecto coordinado de Semaforinas y Netrina (figura 8 y Pascual et al, 2005), y seguramente ayudados por la presencia de los axones hipocamposeptales que han inervado previamente el septum. Los axones septales llegan a hipocampo en E17 (Supèr and Soriano, 1994). Es a partir de entonces, y durante estadios postnatales tempranos, cuando tiene lugar la selección de diana. Los axones septales

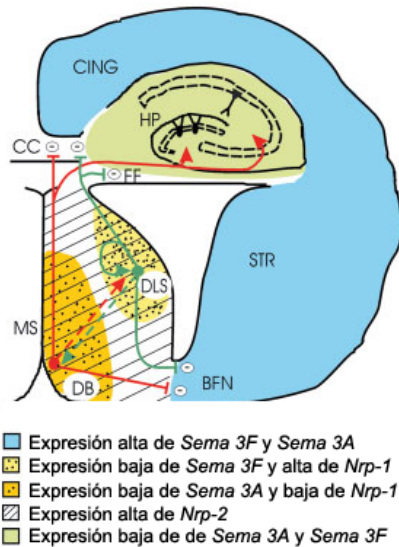


Figura 8. Moléculas implicadas en la guía de los axones septohipocámpicos durante el desarrollo embrionario.

La expresión de diversas moléculas de guía axonal y sus receptores en diferentes regiones del cerebro es responsable de la guía de los axones septales hacia el hipocampo en etapas embrionarias. Abreviaturas: BFN, núcleos del *forebrain basal*; CC, cuerpo caloso; CING, corteza cingulada; DB, banda diagonal de Broca; DLS, septum dorsolateral; EC, corteza entorrinal; FF, complejo fimbria/fórnix; HP, hipocampo; MS, septum medial; STR, estriado. Modificado de Pascual et al., 2004.

colinérgicos contactan con todos los tipos celulares de hipocampo. En cambio, los axones GABAérgicos muestran uno de los procesos de selección de diana más exquisitos del sistema nervioso, tanto a nivel celular como subcelular: aunque estos axones invaden todas las capas del hipocampo y el número de células principales supera con creces el de las interneuronas, los axones GABAérgicos septales contactan únicamente con interneuronas GABAérgicas (especificidad a nivel celular), y lo hacen sobre el compartimento somático y las dendritas proximales de éstas (especificidad a nivel subcelular), formando los contactos de tipo cesto característicos de los axones GABAérgicos septohipocámpicos (Freund and Antal, 1988; Gulyás et al., 1991).

Las moléculas que controlan estos procesos de especificidad de contacto no se conocen todavía con detalle. Se han descrito algunas moléculas expresadas en mayor o menor medida por las neuronas diana de los axones septohipocámpicos GABAérgicos: Semaforina 3C, factor de crecimiento nervioso (NGF, siglas en inglés de *Nerve Growth Factor*)... (Rocamora et al., 1996) Sin embargo, se desconoce todavía qué factores están implicados en los procesos de selección y reconocimiento de diana, tanto a nivel de célula como de dominio de contacto, de los axones GABAérgicos septohipocámpicos.

Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido estudiar el proceso de reconocimiento de diana de estos axones. Para ello, hemos desarrollado un modelo *in vitro* donde se han analizado el papel que ejercen la molécula Semaforina 3C y las aferencias entorrinales sobre la especificidad de contacto del componente GABAérgico septohipocámpico (véase el apartado *Resultados-I*).

1.4 FUNCIÓN DE LA CONEXIÓN SEPTOHIPOCÁMPICA

En términos generales, el septum es una estructura involucrada en procesos relevantes, por una parte, para el control homeostático y comportamientos sociales del individuo, debido a conexiones descendentes hacia áreas tales como hipotálamo, amígdala, etc. Por otra parte, en concreto el septum medial y especialmente la conexión septohipocámpica están implicados en procesos de aprendizaje y memoria, al estar conectados con áreas corticales como el hipocampo.

1.4.1 CIRCUITO DESINHIBIDOR DE LA CONEXIÓN GABAÉRGICA SEPTOHIPOCÁMPICA

Debido a su peculiar conectividad, la conexión septohipocámpica es capaz de modular y controlar la actividad de un gran número de neuronas hipocámpicas. El componente colinérgico de la conexión ejerce una activación tónica, en ocasiones referida como "neuromoduladora", sobre células principales e interneuronas de hipocampo. El componente GABAérgico, en cambio, contacta únicamente con los cuerpos celulares de interneuronas de hipocampo, que a su vez establecen sinapsis inhibitorias sobre neuronas principales. Esta situación es el sustrato ideal para un proceso de desinhibición, tal y como propusieron que ocurría en este sistema Freund y Antal (Freund and

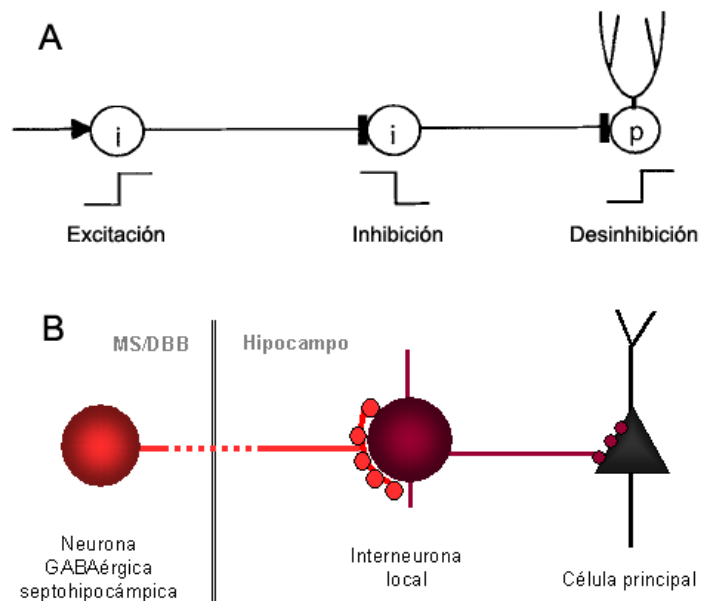


Figura 9. Proceso de desinhibición mediado por el sistema GABAérgico septohipocámpico.

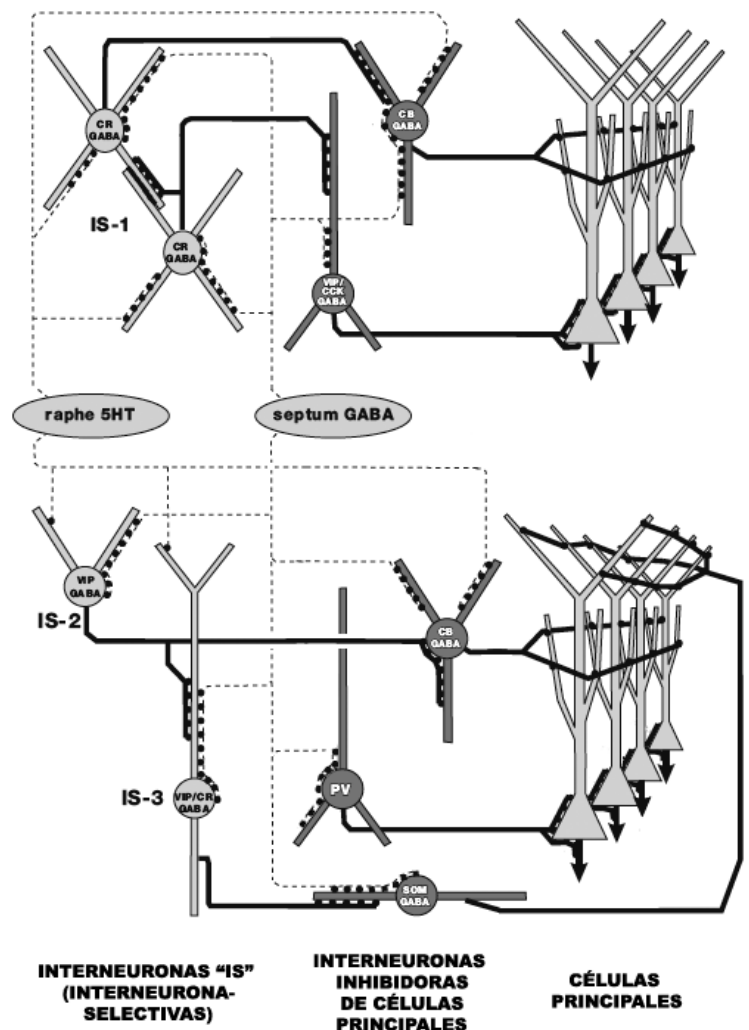
El esquema de (A) representa un circuito en serie de dos interneuronas inhibitorias (i) y una célula principal (p). Cuando la primera interneurona se excita, causa la inhibición de la segunda interneurona. Esto elimina la inhibición tónica que existía sobre la célula principal, es decir, se *desinhibe*. (B) Los elementos que componen este circuito de desinhibición en el sistema septohipocámpico. La activación de la neurona GABAérgica septohipocámpica inhibe a la interneurona local de hipocampo, resultando la célula piramidal desinhibida. Modificado de Freund and Buzsáki, 1996 (A) y de M. Pascual (B).

Antal, 1988): las neuronas GABAérgicas del septum inhiben únicamente a interneuronas de hipocampo, que también son GABAérgicas e inhiben, a su vez, a multitud de neuronas principales. De esta manera, al activarse las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas se elimina la inhibición ejercida sobre las neuronas principales de hipocampo, que se activan así indirectamente (figura 9). Esta teoría ha sido demostrada posteriormente *in vitro* mediante estudios de electrofisiología en rodajas de cerebro (Toth et al., 1997).

Cabe destacar que la morfología "en cesto" de los contactos GABAérgicos septohipocámpicos es especialmente adecuada para causar una inhibición eficaz sobre las interneuronas hipocámpicas. Esto se debe a que constan de múltiples botones sobre una misma diana y están localizados en el soma y dendritas proximales de la neurona diana: la inhibición recae sobre regiones de la célula claves para la integración sináptica, al situarse próximas al segmento inicial del axón, donde se genera el potencial de acción. Cada una de las neuronas GABAérgicas septales establece este tipo de contacto con múltiples interneuronas de hipocampo simultáneamente, y cada interneurona de hipocampo inerva, a su vez, a cientos de neuronas principales. Este proceso de divergencia y amplificación de la señal permite gobernar la actividad de grandes poblaciones neuronales, controlando tanto el nivel de

Figura 10. Control de los circuitos de hipocampo por parte de aferencias inhibitoras subcorticales.

Las aferencias GABAérgicas de septum controlan todos los tipos de interneuronas de hipocampo mediante contactos en el compartimento somatodendrítico. Las interneuronas IS (gris claro) contactan con otras interneuronas (gris oscuro) que inervan diferentes compartimentos de las células principales. De esta manera las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas son capaces de afectar profundamente la actividad de los circuitos inhibidores locales de hipocampo y, por tanto, de las células principales. El esquema también muestra las aferencias desde el rafo sobre interneuronas positivas para CB, CR y VIP. Abreviaturas adicionales: 5HT, serotonina; CCK, colecistoquinina; SOM, somatostatina; VIP, polipéptido intestinal vasoactivo. Modificado de Freund and Gulyás, 1997.



excitación como el marco espacial y temporal en que la información fluye.

Todo esto, junto con el hecho de que las células diana de esta conexión sean interneuronas de hipocampo, densamente interconectadas entre ellas y con otras células principales, permite a la conexión septohipocámpica integrar la información proveniente del septum medial, y otras áreas subcorticales conectadas a él, junto con información existente en el hipocampo en ese momento (figura 10).

Por todo ello, y gracias también a ciertas características electrofisiológicas propias de las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas, la conexión septohipocámpica resulta un elemento clave para controlar la actividad del hipocampo. Esta actividad está basada, y se refleja, en determinados patrones oscilatorios de actividad neuronal explicados en el siguiente apartado.

1.4.2 ACTIVIDAD RÍTMICA DE HIPOCAMPO

Si se colocan electrodos en diferentes áreas del hipocampo de un roedor, se pueden observar distintos patrones de actividad eléctrica a lo largo del tiempo, conocidos en general como "EEG" (siglas de *ElectroEncefaloGrafía*; figura 11). El EEG refleja la actividad de un gran número de neuronas, especialmente cuando éstas están dispuestas en una configuración laminar y, sobre todo, actúan de manera sincrónica, como ocurre con las neuronas principales de hipocampo. Existen complejos circuitos de control retroactivo (*feedback*) y anticipativo (*feedforward*) de la actividad neuronal, compuestos mayoritariamente por interneuronas locales, que estabilizan y sincronizan la actividad oscilatoria de las células principales (Buzsáki, 2006). En paralelo, conjuntamente, y a veces *a través* de esas interneuronas hipocámpicas, neuronas del septum y otras áreas como el tronco cerebral o el hipotálamo proporcionan las aferencias moduladoras o necesarias para garantizar la correcta oscilación de la actividad del hipocampo.

La actividad neuronal del hipocampo se divide en rítmica y no rítmica, según los patrones de EEG que pueden ser visibles en ratas no anestesiadas durante diferentes comportamientos del individuo (figura 11). A su vez, se han clasificado seis tipos de actividad rítmica según su frecuencia (definida en ciclos por segundo o *herzios*); la mayoría de ellas toman el nombre de una letra griega: delta (frecuencias inferiores a 4 Hz), theta (4.1 a 8 Hz), alpha (8.1 a 12 Hz), beta (12.1 a 26 Hz), gamma (26.1 a 100 Hz) y oscilaciones rápidas o *ripples* (100–200 Hz) (Buzsáki, 2006). Para lo que concierne a la presente tesis, se tratarán únicamente los ritmos theta y gamma hipocámpicos (figura 12). La actividad no rítmica se clasifica en actividad irregular de gran o pequeña amplitud (LIA y SIA, respectivamente, siglas en inglés de *Large Irregular Amplitude-* y *Small Irregular Amplitude activiy*), pero no se tratará aquí ya que queda fuera del ámbito de este trabajo; para una revisión exhaustiva véase (O'Keefe, 2007)

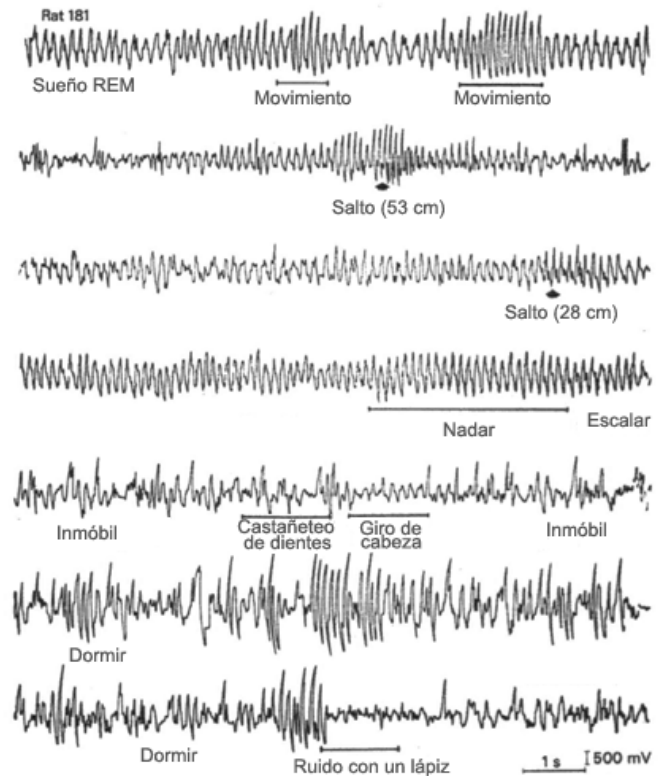


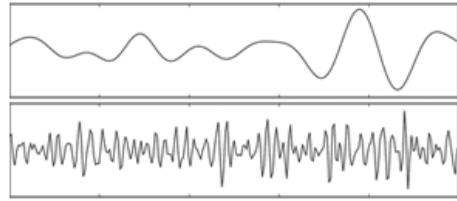
Figura 11. Registro encefalográfico del hipocampo de rata durante diferentes comportamientos.

Se muestran fragmentos del EEG de hipocampo de una rata registrados en diferentes comportamientos del animal. Nótese el patrón característico *theta* en actividades exploratorias (movimiento, salto, nadar) y durante el sueño REM. Modificado de Whishaw and Wanderswolf, 1973.

Ritmo theta hipocámpico

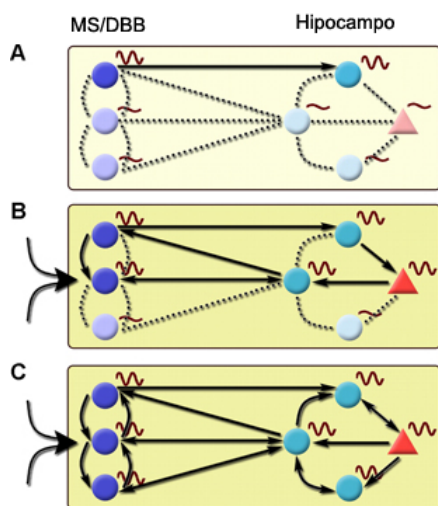
La actividad oscilatoria de hipocampo en frecuencia theta (de 4 a 10 Hz en roedores) depende del comportamiento del individuo. En general, se presenta durante el sueño REM y durante actividades locomotoras de tipo exploratorio o "voluntarias" (Vanderwolf, 1969). Las ondas theta de hipocampo se han relacionado también con procesos mnémicos, especialmente memoria y aprendizaje visuoespaciales (Buzsáki, 2005).

Figura 12. Ondas theta y gamma del EEG. Cada ventana comprende 1 segundo de registro EEG, y la señal se ha filtrado para mostrar ondas theta (7 ciclos/s, arriba) y gamma (~42 ciclos/s, abajo). *Imágenes de Hugo Gamboa, 2005.*



La actividad registrada en hipocampo a frecuencia theta procede de los potenciales postinápticos (tanto excitadores como inhibidores) de las células principales del giro dentado y CA1, mayoritariamente, aunque también de subículum y corteza entorrinal (Buzsáki, 2002). A estas células, por tanto, se les denomina *generadores de corriente*, puesto que es la corriente eléctrica derivada de su actividad, y no la de otras células, la que constituye el registro electrofisiológico. Hay que distinguir este tipo de células de los llamados *generadores de ritmo* —esto es, los mecanismos (celulares o de circuito) responsables de la aparición y control del patrón oscilatorio a una frecuencia determinada. En el caso del ritmo theta, se han descrito diversos mecanismos intra- y extrahipocámpicos generadores de ritmo, que involucran tanto a células principales como a interneuronas inhibitoras.

Se sabe que el complejo del septum medial y la banda diagonal de Broca (MS/DBB) es necesario para que tenga lugar la actividad theta hipocámpica, ya que las lesiones del MS/DBB o del complejo fimbria-fórnix (que comunica septum e hipocampo entre sí)



eliminan la actividad theta hipocámpica (Green and Arduini, 1954; M'Harzi and Monmaur, 1985). El mecanismo responsable de este control septal del ritmo theta hipocámpico subyace en una subpoblación de células GABAérgicas del MS/DBB que proyectan a hipocampo y actúan de marcapasos, transmitiendo actividad rítmica del septum al hipocampo. La visión actual del mecanismo sostiene que el aumento de la excitación del septum medial (tanto por activación de

Figura 13. Mecanismo septohipocámpico de generación del ritmo theta.

Los círculos representan neuronas GABAérgicas; los triángulos, células piramidales. (A) En estados no-theta, sólo las células que disparan constitutivamente (en color oscuro) muestran oscilaciones en frecuencia theta (representado por la onda de gran amplitud al lado de la célula), pero de manera independiente unas de otras. (B) Las células GABAérgicas septohipocámpicas se activan bruscamente por la excitación proveniente de vías ascendentes (flechas a la izquierda) y del tono colinérgico local (intensidad del color amarillo de fondo). (C) Las oscilaciones theta dictadas por las células GABAérgicas septales se extienden por el MS/DBB y el hipocampo, involucrando a diferentes tipos neuronales. Las conexiones recíprocas desde hipocampo contribuyen al mantenimiento del ritmo theta. *Modificado de Hangya, 2009 (A, B y C).*

neuronas de circuito local como por aferencias desde el propio hipocampo, rafe medial, hipotálamo u otras regiones) provoca una activación brusca de las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas, comienza la actividad marcapasos septal que se transmite al hipocampo y, en ese momento, otros osciladores intrahipocámpicos se sincronizan a las oscilaciones dictadas por el septum para aumentar la actividad de las células generadoras de corriente a frecuencia theta y en fase (Hangya et al., 2009). En esta situación, las conexiones recíprocas de hipocampo a septum colaboran con las septohipocámpicas para mantener ambas estructuras oscilando de manera sincrónica (figura 13).

Ritmo gamma hipocámpico:

A diferencia de la actividad theta, las oscilaciones en frecuencia gamma (40-100 Hz) presentes en el hipocampo no son el resultado de una actividad generalizada de las células principales a esa frecuencia, sino que sus generadores de corriente son pequeños conjuntos de neuronas que se activan al unísono; varias de estas agrupaciones neuronales activas simultáneamente son capaces de generar el patrón gamma visible en el EEG de hipocampo. El hecho de tratarse de pequeños grupos neuronales, junto con la alta frecuencia de actividad, atribuye a las oscilaciones gamma una capacidad de coordinar rápidamente grupos neuronales concretos. Se cree que esto sirve para seleccionar de manera rápida las aferencias que llegan a ciertas áreas de hipocampo, asociar neuronas en grupos funcionales, recuperar recuerdos necesarios para realizar una tarea previamente aprendida o determinar qué aspectos de una experiencia se memorizarán (Colgin and Moser, 2010).

Las oscilaciones gamma hipocámpicas se observan durante comportamientos tanto asociados al ritmo theta como no asociados a él. Frecuentemente la actividad gamma coincide con el ritmo theta, y entonces varios parámetros de las oscilaciones gamma se modulan en función de, o conjuntamente con, las oscilaciones theta (Chrobak and Buzsáki, 1998). A esta situación se la denomina "acoplamiento theta-gamma" (figura 14). Sin embargo, ambas actividades tienen generadores rítmicos independientes. Actualmente, se propone que existen al menos dos generadores independientes de oscilaciones gamma hipocámpicas: el giro dentado (cuya actividad depende, a su vez, de la información proveniente desde la corteza entorrinal) y la región CA3 (Colgin and Moser, 2010). La compleja red de interneuronas de hipocampo es crucial para las oscilaciones gamma. En concreto, las interneuronas de tipo

cesto (Parvalbúmina⁺) muestran actividad resonante* en frecuencias gamma y presentan uniones de tipo hendadura, o *gap junctions*, que permiten una rápida sincronización de las células que las comparten y son necesarias para una correcta actividad gamma (Buhl et al., 2003). La conexión GABAérgica septohipocámpica, al inervar densamente la red de interneuronas de hipocampo y en especial las interneuronas hipocámpicas de tipo cesto, puede tener un papel en la modulación del ritmo gamma, como se verá más adelante en la presente tesis (véase el apartado *Resultados-II*).

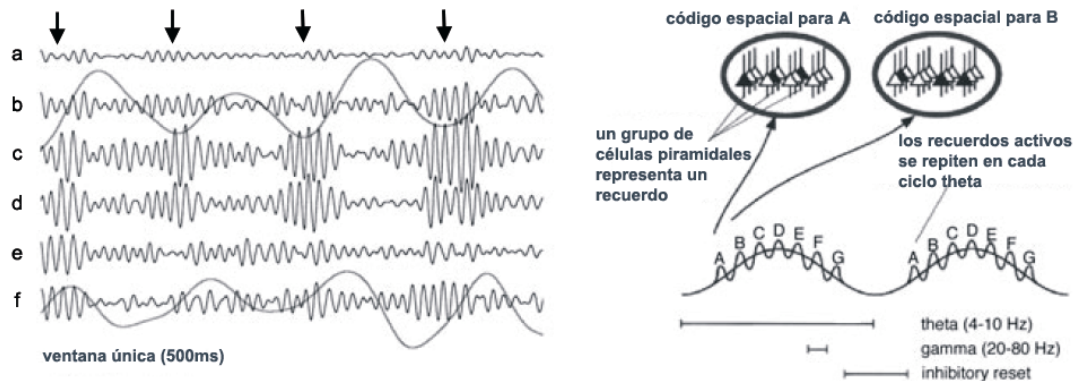


Figura 14. Acoplamiento theta-gamma en el hipocampo.

A la izquierda se muestra la señal de EEG registrada simultáneamente en diferentes puntos (a-f) de la corteza entorrinal de una rata. La señal se ha filtrado para mostrar actividad gamma (ondas rápidas) y theta (ondas lentas). Las ondas gamma presentan mayor amplitud en determinadas fases del ciclo theta (flechas). A la derecha se muestra en detalle la codificación de recuerdos mediado por ondas gamma y su acoplamiento con la fase de las ondas theta. *Modificado de Buzsáki, 2006.*

1.4.3 OTRAS FUNCIONES

A principios de los años 1950, Olds y Milner demostraron que la estimulación eléctrica de la región septal de ratas tiene un efecto de recompensa, hasta tal punto que podían entrenar a los animales para que se estimularan ellos mismos mediante un comportamiento operante como presionar una barra (Olds and Milner, 1954). Estos experimentos se denominan de *autoestimulación* y permiten analizar qué áreas del cerebro están implicadas en circuitos de refuerzo positivo o recompensa.

En la presente tesis se pretende determinar el mecanismo por el cual la conexión GABAérgica septohipocámpica interviene en procesos de refuerzo operante y motivación, y cómo el septum modula la actividad de hipocampo durante tales comportamientos (véase *Apéndice de Resultados-I*).

* Se define *resonancia* como la tendencia de un sistema, en este caso las interneuronas de tipo cesto, a oscilar con mayor amplitud preferentemente en una frecuencia que en otras. En las frecuencias resonantes, incluso mecanismos débiles de generación del ritmo son capaces de producir oscilaciones de gran amplitud.

Capítulo 2: Enfermedad de Alzheimer y

Envejecimiento Fisiológico

Este capítulo no pretende ser una revisión exhaustiva sobre la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento, sino presentar en primer lugar una visión básica de la enfermedad, resaltando algunos de sus aspectos neuropatológicos más relevantes en el contexto de esta tesis. Se expone a continuación, brevemente, el proceso de envejecimiento fisiológico del cerebro y sus consecuencias. Por último, se describen los datos existentes sobre el estado de la conexión septohipocámpica durante el envejecimiento fisiológico y la enfermedad de Alzheimer, tanto en humanos como en modelos animales de experimentación.

2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1.1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA; o AD, siglas en inglés de *Alzheimer's Disease*) es una enfermedad neurodegenerativa que fue descrita por primera vez por el médico alemán Aloysius "Alois" Alzheimer a principios del siglo XX (Alzheimer, 1907). Las características patofisiológicas típicas de la EA son una deposición progresiva de placas seniles y ovillos neurofibrilares en áreas específicas del tejido cerebral, acompañada de una pérdida de la función sináptica y degeneración neuronal.

La EA se ha posicionado en los últimos años como el tipo de demencia más frecuente: en 2009 afectaba a 36 millones de personas en todo el mundo (casos diagnosticados) (Prince M., 2009). Esta enfermedad se caracteriza, clínicamente, por una pérdida de memoria episódica que cursa acompañada de otros déficits cognitivos: fallos en la resolución de problemas, la atención, el cálculo, el lenguaje, la percepción y procesamiento visuoespaciales o el comportamiento. En algunos casos se presentan síntomas psicóticos como alucinaciones o delirios. Se ha descrito una situación patológica previa a la EA llamada "deterioro cognitivo leve" (o MCI, siglas en inglés de *Mild Cognitive Impairment*), que en un alto porcentaje de pacientes deriva en EA.

La mayoría de casos de EA se diagnostican en personas mayores de 65 años y toman, por tanto, el nombre de *EA de aparición tardía*. En el 5-10% de los casos, sin embargo, los síntomas clínicos aparecen a mediana edad. El término *EA de aparición temprana* se refiere a estos casos, que frecuentemente están relacionados con mutaciones u otras alteraciones en algunos de los genes involucrados en la patofisiología de la EA (*APP*, *PSEN-1* y *PSEN-2*; se describirán más adelante en el texto). Por este motivo también se los denomina casos de Alzheimer *familiar*, en contraste con los casos de aparición tardía, llamados también *esporádicos* y no relacionados con la historia familiar y genética previa del paciente.

Actualmente existen sólo tratamientos paliativos que disminuyen los síntomas pero no limitan ni revierten el avance de la enfermedad. Por esta razón, y debido al gran impacto social y económico de la EA, se está haciendo un gran esfuerzo por parte de la comunidad investigadora a nivel mundial con el objetivo de determinar las causas, mecanismos patológicos involucrados y posibles terapias de la enfermedad. Una de las estrategias más explotadas para conseguirlo ha sido la creación y análisis de modelos animales de EA, en especial de cepas transgénicas de ratones con alteraciones en genes relacionados con la EA familiar (véase el apartado 2.1.4, *Modelos animales de enfermedad de Alzheimer*)

2.1.2. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS

La confirmación del diagnóstico de EA sólo puede obtenerse mediante la autopsia del cerebro del paciente, para comprobar si se presentan en el tejido nervioso las características neuropatológicas típicas de la enfermedad:

Placas seniles

También llamadas *placas amiloides*, son acumulaciones extracelulares de proteínas insolubles, mayoritariamente péptido beta (β)-amiloide, y otros elementos celulares patológicos. Son visibles histológicamente mediante tinciones con compuestos aromáticos como la tioflavina T o el rojo congo, además de mediante inmunodetecciones específicas de sus componentes (figura 16, A). Las placas amiloides o placas neuríticas tienen una composición heterogénea, con un núcleo de fibrillas de proteínas β -amiloide* entorno al cual

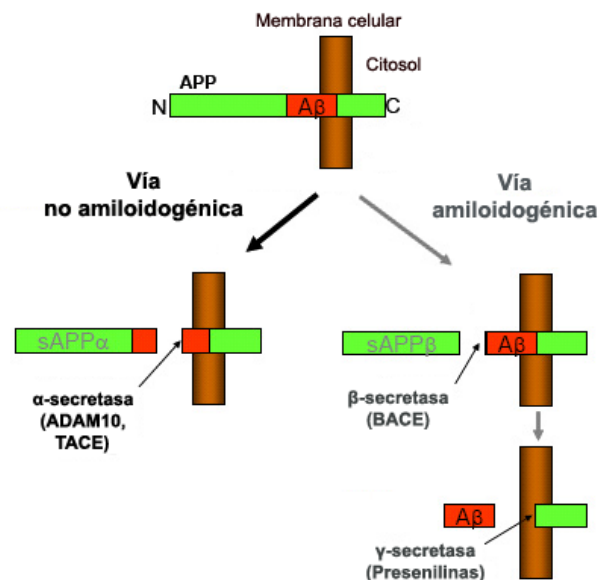
* Se define *amiloide* como la acumulación (típicamente extracelular) de material proteico que polimeriza anormalmente en estructura de lámina β cruzada, altamente insoluble. Este proceso no es exclusivo de APP, sino que numerosas proteínas pueden sufrir este cambio conformacional y resultar amiloidogénicas.

se encuentran axones distróficos y procesos astrocíticos y microgliales (Masters and Selkoe, 2012).

La Proteína precursora del β -amiloide (APP, siglas en inglés de *Amyloid Precursor Protein*) es una proteína integral de membrana presente en los terminales sinápticos que está codificada por el gen *APP*. Aunque su función fisiológica no se conoce con detalle, se sabe que está involucrada en la formación y función de sinapsis (Priller et al., 2006). Distintas proteasas de la familia de las secretasas procesan secuencialmente la APP en diferentes dominios. En la vía amiloidogénica de procesamiento de APP (figura 15), la proteólisis secuencial por parte de los complejos enzimáticos β - y γ -secretasa produce un fragmento final de entre 36 y 42 aminoácidos, llamado *péptido A β* , que es liberado al espacio extracelular (Haass et al., 2012). La subunidad catalítica del complejo γ -secretasa es la proteína Presenilina (PSEN), codificada por los genes *PSEN-1* y *PSEN-2*. Determinadas mutaciones tanto de *APP* como de *PSEN-1* y *PSEN-2* se han asociado a la variante familiar de EA.

Figura 15. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP) y formación del péptido β -amiloide.

En la vía amiloidogénica, el complejo β -secretasa procesa la proteína APP; la subsecuente proteólisis mediada por γ -secretasa produce el péptido β -amiloide ($A\beta$). En la vía no amiloidogénica, el complejo α -secretasa proteoliza el dominio $A\beta$ de APP, impidiendo la formación de péptido β -amiloide por parte del complejo γ -secretasa. Modificado de N. Hooper y T. Turner, http://www.fbs.leeds.ac.uk/staff/Hooper_N/alzheimers.htm.



Diversos mecanismos que aún no se conocen con detalle provocan un cambio de conformación del péptido $A\beta$, de hélice alfa a lámina beta, disminuyendo así su solubilidad. Cabe destacar que diferentes formas del péptido $A\beta$ tienen mayor o menor tendencia a agregar, dependiendo de qué modificaciones postraduccionales hayan sufrido (p.ej., sitio de proteólisis), siendo el péptido $A\beta_{1\rightarrow42}$ más agregante que el $A\beta_{1\rightarrow40}$, por mencionar dos de las formas más comunes. Sucesivos pasos de agregación de estos péptidos, que incluyen especies intermedias denominadas oligómeros y protofibrillas, culminan en la formación de fibrillas altamente insolubles que se acumulan en forma de agregados en el espacio extracelular

(Masters and Selkoe, 2012). Estos agregados acaban formando núcleos amiloides densos entorno a los cuales se asocian otros componentes proteicos o celulares en proceso de degeneración, componiendo así las denominadas *placas neuríticas*. El término *placa difusa* se aplica a las acumulaciones de péptido A β insoluble que no presentan un núcleo denso amiloide, y parecen ser la forma previa a las placas neuríticas.

Actualmente se propone que las formas solubles del péptido A β también son capaces de afectar la función sináptica, incluso más que las formas insolubles (fibrillas) presentes en las placas neuríticas maduras. La "hipótesis de la cascada amiloide" postula que el péptido A β es el responsable de desencadenar la cascada de eventos que da lugar a la EA, aunque a día de hoy se desconocen los mecanismos a través de los cuales se daría este proceso (Hardy and Selkoe, 2002; Citron, 2004).

En las primeras fases (preclínicas) de EA se detectan depósitos de péptido A β en áreas corticales (neocórtex, hipocampo), diencefalo y ganglios basales. En estados más avanzados, las placas amiloides se extienden hacia el cerebro medio y posterior (Thal et al., 2004). Hay que remarcar que las placas amiloides están presentes asimismo durante el envejecimiento normal, y aunque también se acumulan de manera progresiva, lo hacen de manera más homogénea en el cerebro.

Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT, siglas en inglés de *NeuroFibrillar Tangles*) son inclusiones fibrilares intracelulares que se extienden a lo largo del soma y dendritas proximales de neuronas, principalmente piramidales de hipocampo pero también en otras regiones cerebrales (figura 16, B). Se pueden detectar mediante tinciones de plata.

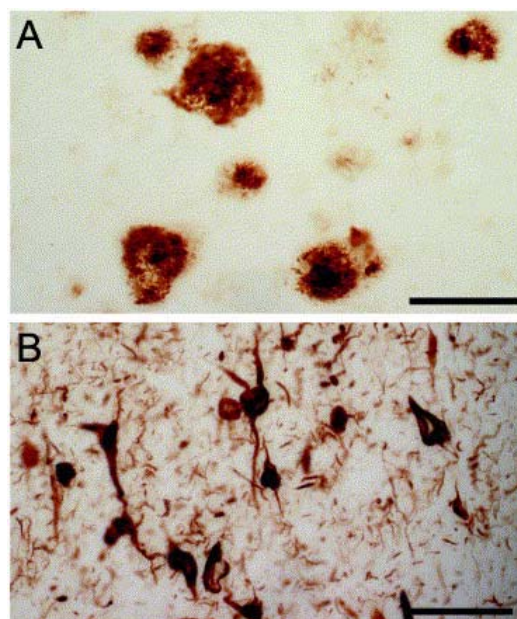
El componente mayoritario de los ovillos neurofibrilares es la proteína Tau, una proteína de unión a microtúbulos involucrada en el transporte axonal. La fosforilación anormal de Tau causa su agregación en forma de fibras de naturaleza amiloide, denominadas filamentos pareados helicoidales (PHF, siglas en inglés de *Paired Helical Filaments*),. Estos PHF se agregan formando los ovillos neurofibrilares (Mandelkow and Mandelkow, 2012). Los NFT también contienen otros componentes, en su mayoría elementos asociados al citoesqueleto neuronal. Cuando la neurona que los contiene degenera, los NFT persisten en el neuropilo. En la EA también se observan PHF en neuritas distróficas asociadas a placas seniles.

Los NFT no son exclusivos de la EA, sino que son un elemento característico de numerosas demencias, denominadas en general *taupatías*, e incluso se pueden observar

durante el envejecimiento normal. Sin embargo, es característico de la EA que la presencia de NFT esté restringida a determinadas regiones, extendiéndose desde la corteza entorrinal e hipocampo hasta invadir buena parte del neocórtex y otras áreas subcorticales a medida que la enfermedad progresa (Braak and Braak, 1994).

Figura 16. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el cerebro de pacientes de enfermedad de Alzheimer.

(A) La detección del péptido A β 42 permite visualizar placas amiloides presentes en tejido cerebral afectado por EA. (B) Los ovillos neurofibrilares se presentan como agregados de Tau, acumulados especialmente en el compartimento somatodendrítico de las neuronas. Escala: 125 μ m (A), 62.5 μ m (B). Modificado de LaFerla, 2005 (A y B).



2.1.3. CARACTERÍSTICAS PATOFISIOLÓGICAS

Disfunción sináptica

Se ha comprobado que hay una disminución de la densidad sináptica (*i.e.*, cantidad de botones sinápticos por unidad de volumen) en pacientes de EA y animales modelo de la enfermedad. Esta disminución correlaciona con los déficits cognitivos mejor que otras características neuropatológicas, como por ejemplo la presencia de placas seniles o la actividad del enzima ChAT (Scheff SW, 1996).

Los defectos en el número y funcionamiento de las sinapsis son uno de los factores responsables de fallos en la transmisión sináptica. Estudios funcionales realizados en modelos animales de EA que sobreexpresan el gen *APP* humano han demostrado alteraciones en los parámetros funcionales de algunas sinapsis hipocámpicas, incluyendo cambios en los fenómenos de potenciación y depresión sináptica a largo plazo implicados en procesos de aprendizaje y memoria (Larson et al., 1999; Giacchino et al., 2000; Mucke et al., 2000). Dichas disfunciones sinápticas se observan antes de que se produzcan los cambios patológicos asociados a la EA. Este hecho apoya la teoría de que formas solubles del péptido A β , previas a la formación de placas amiloides, son suficientes para causar daño en el compartimento

sináptico, tal y como se ha demostrado con experimentos funcionales en que estas especies solubles de péptido A β son aplicadas a determinadas sinapsis *in vitro* (Shankar et al., 2008).

En los últimos años se ha propuesto que las disfunciones sinápticas observadas en esta enfermedad tienen consecuencias en un nivel de organización superior y afectan además a otros elementos no glutamatérgicos: causarían una disfunción de determinados circuitos y, en último término, una actividad aberrante de redes neurales, como se ha observado por ejemplo en algunos pacientes y modelos animales de EA (Palop et al., 2007).

Déficits colinérgicos

El sistema colinérgico del prosencéfalo basal está formado por neuronas colinérgicas situadas en el MS/DBB y en el núcleo basal de Meynert (llamado *núcleo magnocelular del prosencéfalo basal* en ratones). Estas neuronas proyectan a regiones corticales tales como hipocampo y neocórtex, y a otras regiones del sistema límbico como la amígdala. Su efecto es neuromodulador, activando de manera uniforme y tónica las regiones diana.

Como se ha comentado en el capítulo de la conexión septohipocámpica, tanto las somas de las neuronas colinérgicas como sus axones contienen las enzimas ChAT y AChE (Zaborszky, 2012), ampliamente utilizadas como marcadores para comprobar el estado del sistema colinérgico en varias situaciones, incluida la enfermedad de Alzheimer. Una de las características descritas desde hace más tiempo en la EA son los déficits en el sistema colinérgico (Davies and Maloney, 1976): disminución de las fibras colinérgicas y de la enzima ChAT, menor concentración del neurotransmisor acetilcolina en el tejido, e incluso degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Schliebs and Arendt, 2006).

Estas observaciones llevaron a postular la "hipótesis colinérgica de la disfunción de memoria en la EA", en que los déficits cognitivos observados durante la enfermedad se atribuyen a estas alteraciones colinérgicas (Bartus et al., 1982; Bartus, 2000). De hecho, la mayoría de fármacos utilizados en EA son inhibidores de enzimas que degradan acetilcolina (colinesterasas), con objeto de aumentar la cantidad de acetilcolina disponible en las regiones que han sufrido una reducción del tono colinérgico (Thal, 1994). Sin embargo, nuevas técnicas de detección de marcadores colinérgicos y el uso de mejores controles en estudios con humanos han llevado a un cambio en la visión actual sobre el tema: la disminución de la inervación colinérgica en regiones corticales y la muerte de estas neuronas son fenómenos que suceden en estadios más avanzados de la enfermedad. En las fases tempranas de EA, en general, no se ha reportado una disminución de los marcadores colinérgicos. En ocasiones, en

estas fases tempranas se han descrito niveles de las enzimas ChAT o AchE incluso superiores a los de pacientes no dementes (DeKosky et al., 2002). Por tanto, la muerte de neuronas colinérgicas es efectivamente una característica patofisiológica de la EA, pero ocurre únicamente en estados moderados o avanzados de la enfermedad.

En conclusión, la perspectiva actual es que el sistema colinérgico sufre alteraciones funcionales en EA, y hay pérdida de neurona colinérgicas, pero esto sucede en estados moderados o avanzados de la enfermedad y no explica por completo la patogénesis ni los síntomas clínicos del Alzheimer, especialmente en sus fases más tempranas (Davies, 1999; Mesulam, 2004).

2.1.4. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Como en otras enfermedades, es crucial disponer de modelos animales de EA válidos para investigar los mecanismos de la enfermedad y evaluar tratamientos y estrategias preventivas. Por ello, se han creado numerosos modelos animales que intentan reproducir los síntomas y características patofisiológicas de la EA mediante técnicas de manipulación genética, tratamientos bioquímicos y farmacológicos, o lesiones, entre otras (Woodruff-Pak, 2008).

Tras el descubrimiento de algunas de las mutaciones asociadas a las formas familiares de EA, se han creado cepas de ratones alterados genéticamente, especialmente cepas transgénicas que sobreexpresan uno o varios de los genes y proteínas implicadas en la patofisiología de la enfermedad: APP, ApoE4, PSEN1/2, Tau, En la tabla 1 se sumarian algunos ejemplos. Aunque se han reproducido muchas de las características neuropatológicas de la enfermedad, a día de hoy no existe ningún modelo animal que reproduzca todos los procesos patológicos descritos en la EA (Duyckaerts et al., 2008; Woodruff-Pak, 2008).

La línea transgénica J20

Para llevar a cabo los experimentos de la presente tesis se ha utilizado la cepa de ratón transgénico J20, desarrollada por el equipo investigador del Dr. Mucke en la Universidad de California, San Francisco (EE.UU.). Los ratones transgénicos de esta cepa sobreexpresan el gen *APP* humano portador de las mutaciones de Alzheimer familiar Swedish (K670N y M671L) e Indiana (V717F), bajo el control del promotor humano de la cadena beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF β* , siglas en inglés de *Platelet-Derived Growth*

Factor Beta chain; figura 17, A), que dirige la expresión del transgén en neuronas (Mucke et al., 2000).

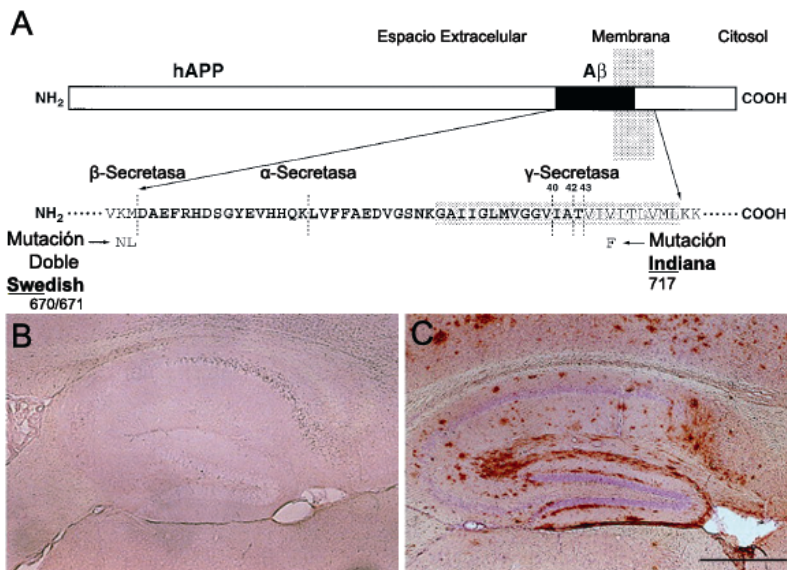


Figura 17. Mutaciones de hAPP en la cepa J20 y patología amiloide en hipocampo.

(A) Mutaciones presentes en el gen hAPP que se sobreexpresa en los ratones de la cepa J20. (B, C) La detección de placas amiloides con el anticuerpo 3D6 (en marrón) muestra numerosas placas seniles en el hipocampo de transgénicos J20 de 10 meses (C), en comparación con un ratón WT de 15 meses (B). Escala: 300 μm. Modificado de Mucke, 2000 (A, B y C).

Los animales positivos para el transgén muestran altos niveles de péptido Aβ en el tejido cerebral a partir de los 5-6 meses de edad y presentan deposición de placas amiloides en el hipocampo y neocórtex a los 8 meses, que aumentan progresivamente con la edad (figura 17; Mucke et al., 2000; Leissring et al., 2003). En el hipocampo de estos animales se ha detectado una disminución de marcadores presinápticos, así como un recrecimiento anómalo de determinados axones. Experimentos *in vitro* con rodajas de hipocampo de transgénicos de la línea J20 muestran, además, alteraciones funcionales en algunas de las sinapsis de los circuitos hipocámpicos (Palop et al., 2007).

Los déficits cognitivos de estos animales se presentan a partir de los 4-5 meses de edad, e incluyen fallos en el aprendizaje espacial y la memoria de reconocimiento de objetos, hiperactividad e hiperexcitabilidad inducida por fármacos (Palop et al., 2007; Sanchez-Mejia et al., 2008).

En la presente tesis se investiga el estado de la conexión GABAérgica septohipocámpica en el modelo J20 y se aborda la caracterización de la función hipocámpica de estos ratones por primera vez *in vivo* (véase los apartados *Resultados-II* y *Apéndice de Resultados-I*).

Modelo	Gen/Mutación	Estrategia	Promotor	Neuropatología destacada	Referencias
hAPP - línea J20	hAPP K670N/M671 (Swe) + V717F (Ind)	Sobreexpresión	PDGF- β	Placas amiloides en hipocampo y neocórtex a 6-8 m.	Mucke et al. (2000)
hAPP - línea J9	hAPP K670N/M671 (Swe) + V717F (Ind)	Sobreexpresión	PDGF- β	Placas amiloides en hipocampo y neocórtex a 10-12 meses.	Hsia et al. (1999); Mucke et al. (2000)
Tg2576	hAPP695 + K670N/M671 (Swe)	Sobreexpresión	PrP	Placas amiloides a 9-12 m, deposición vascular de A β .	Hsiao et al. (1996), Borchelt et al. (1997)
Tau VLW	hTau4R0N P301L/G272V/R406W	Sobreexpresión	Thy-1	Patología neurofibrilar y alteraciones lisosomales en hipocampo y neocórtex	Lim et al. (2001)
APP/PS1	hAPP K670N/M671 (Swe) + V717I; PSEN1 M233T/L235P	Sobreexpresión hAPP; Knockin PS1	Thy-1	Placas amiloides y acumulación A β intraneuronal a 6m. Pérdida neuronal en CA1/CA2 a 6 m.	Casas et al. (2008)
3xTg-AD	hAPP695 + K670N/M671 (Swe); hTau4R0N P301L; PSEN1 M146V	Sobreexpresión (hAPP y hTAU); Knockin PSEN1	Thy-1	Placas amiloides a 9 m, acumulación A β intraneuronal. Patología neurofibrilar en hipocampo.	Oddo et al. (2003)
TauPS2APP	hAPP695 + K670N/M671 (Swe); PSEN2 N141I; hTau P301L	Sobreexpresión	Thy-1, PrP	Placas amiloides a 12-16 m. Patología neurofibrilar a 8-12 m.	Grueninger et al. (2010)

Tabla 1. Líneas transgénicas utilizadas como modelos animales de enfermedad de Alzheimer

2.2 ENVEJECIMIENTO

Aunque actualmente existe un gran esfuerzo científico dedicado a investigar la enfermedad de Alzheimer, cada vez más se pone de manifiesto la necesidad de estudiar la situación no patológica del cerebro en edades avanzadas no sólo para establecer las diferencias, similitudes o posible relación entre ambos procesos, sino también para conocer y tratar el declive que tiene lugar durante el envejecimiento, especialmente en una población mundial cada vez más envejecida.

El envejecimiento fisiológico o "normal" es un proceso natural, no patológico, que engloba las transformaciones que sufre un organismo como consecuencia de diversos cambios de naturaleza física, química o biológica que tienen lugar a nivel celular. Se considera que el envejecimiento comienza en humanos a los 65 años de edad. En otros animales este parámetro no está tan bien definido, pero de manera general se sitúa en la edad correspondiente a un 50% de la esperanza de vida de la especie considerada. Un aspecto muy importante a destacar es la enorme variabilidad entre individuos en cuanto al momento en que comienza el proceso de envejecimiento, su evolución a lo largo del tiempo y el grado de afectación.

El sistema nervioso es uno de los numerosos órganos afectados por el envejecimiento normal. Como consecuencia de ello, se desarrollan una serie de alteraciones en las funciones cerebrales del individuo, sin que llegue a considerarse un proceso patológico. En humanos, las principales funciones cognitivas afectadas en el envejecimiento son la atención y la memoria (Kensinger, 2009). Se ven especialmente perjudicadas las tareas que requieren un control flexible de la atención, por lo que se cree que está afectada de alguna manera la memoria de trabajo (working memory) (Hertzog et al., 2003). Sin embargo, los fallos cognitivos por excelencia del envejecimiento se refieren a la memoria episódica, es decir, la memoria declarativa referente a determinados eventos o experiencias vividas. Tanto en humanos como en animales de experimentación envejecidos se han observado, además, fallos en el aprendizaje y la memoria visuoespaciales (*i.e.*, referentes al entorno y la orientación espacial del individuo con ayuda de información visual; Barnes, 1988; Newman and Kaszniak, 2000).

Íntimamente ligadas a estas alteraciones cognitivas subyacen alteraciones en la estructura y función del cerebro. Aunque existen datos contradictorios al respecto (Smith et al., 2004), actualmente se admite que no existe muerte y pérdida de neuronas corticales durante el envejecimiento (West et al., 1994; Rapp and Gallagher, 1996; Kecker et al., 2003).

En cambio, existen alteraciones en la conectividad de las neuronas existentes, ya sea a nivel estructural, fisiológico o molecular. Estas alteraciones incluyen déficits de determinados neurotransmisores, cambios en el compartimento dendrítico de las sinapsis, fallos en la transmisión sináptica y una menor plasticidad sináptica (a corto y largo plazo), según datos obtenidos en estudios sobre hipocampo de humanos pero, sobretodo, de animales de experimentación (Burke and Barnes, 2006; Penner et al., 2007).

Algunas de las características neuropatológicas típicas de la enfermedad de Alzheimer están presentes durante el envejecimiento, como las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. En este último caso, sin embargo, la densidad de ovillos por neurona es menor que la observada en individuos con EA y su distribución difiere, restringiéndose únicamente a los núcleos olfatorios, zona parahipocámpica, amígdala y corteza entorrinal (Price et al., 1991).

Por último, hay que tener en cuenta que la edad es un factor de riesgo para desarrollar demencias seniles, y por ello en ocasiones es difícil discernir entre el envejecimiento fisiológico (y los déficits cognitivos asociados a él) y los procesos patológicos. De hecho, el deterioro cognitivo leve (MCI) es un concepto médico que podría considerarse como enlace entre ambas situaciones (Petersen Rc, 1999). Mientras que algunos expertos consideran que determinadas enfermedades neurodegenerativas son un proceso diferenciado del envejecimiento normal, otros consideran que tales enfermedades son causadas por la acumulación de insultos o alteraciones a los cuales un sistema envejecido no sería capaz de hacer frente, produciéndose entonces la situación patológica (Herrup, 2010).

2. 3. ESTADO DEL PROSENCÉFALO BASAL Y LA CONEXIÓN SEPTOHIPOCÁMPICA EN ENVEJECIMIENTO Y ALZHEIMER

El prosencéfalo basal es una región especialmente afectada en la EA. En humanos, este sistema está compuesto por varios núcleos, incluyendo el MS/DBB y el núcleo basal de Meynert (NBM). La mayoría de estudios de envejecimiento y Alzheimer realizados en pacientes humanos se han centrado en el componente colinérgico de esta región, debido a los estudios pioneros de Davies y Maloney en autopsias de afectados de EA que sentaron las bases para la hipótesis colinérgica de la enfermedad (Davies and Maloney, 1976).

Como se ha apuntado anteriormente, actualmente se asume que no es la muerte, sino los cambios degenerativos de estas neuronas a nivel funcional, uno de los responsables de las deficiencias de memoria asociadas con el envejecimiento. Esto ocurre durante el deterioro cognitivo leve y las primeras fases de EA esporádica: hay un fallo en la función colinérgica, especialmente en el soporte neurotrófico de estas neuronas (NGF y sus receptores p75, trkA), cambios en la liberación y recaptación de acetilcolina y en los receptores nicotínicos y muscarínicos (Schliebs and Arendt, 2011). En cambio, durante las fases moderadas y avanzadas de la EA esporádica, y ya en el inicio de la variante familiar de EA, se observa menor inervación colinérgica cortical y, finalmente, una muerte de neuronas colinérgicas, especialmente en el MS/DBB (Mufson et al., 2003). Los estudios en animales de experimentación también muestran fallos en el sistema colinérgico en ratas envejecidas (Greferath et al., 2000), ratones transgénicos modelo de EA, sobretodo a edades avanzadas (Aucoin et al., 2005), y en ratas sometidas a inyecciones de péptido β -amiloide en el septum medial (Colom et al., 2008).

En cuanto al estado del componente GABAérgico del prosencéfalo basal en envejecimiento y EA, hay pocos datos disponibles y la mayoría de ellos son recientes.

En general, durante el envejecimiento humano y la EA, disminuye la expresión de marcadores GABAérgicos en varias áreas del cerebro (Rissman et al., 2007; Loerch et al., 2008; Rissman and Mobley, 2011), y experimentos en ratas o ratones envejecidos han demostrado una disminución en el número de células del MS/DBB que contienen mRNA de GAD67 (Han et al., 2002) o la proteína Parvalbúmina (Krzywkowski et al., 1995; Madhusudan et al., 2009; Stanley and Fadel, 2011). También algunas subpoblaciones de

interneuronas hipocámpicas, diana de los axones GABAérgicos septohipocámpicos, se han visto disminuidas o funcionalmente alteradas en varios estudios de envejecimiento (Stanley and Shetty, 2004; Stanley et al., 2011).

Algunos trabajos ya demostraron, hace muchos años, ciertas alteraciones a nivel electrofisiológico (disminución del ritmo theta hipocámpico) y comportamental que sugerían defectos en la conexión septohipocámpica en procesos de envejecimiento (Miles and Dement, 1980; Bliwise, 1993; Abe and Toyosawa, 1999). Más recientemente, en ratones de la cepa esporádica SAMP8, que muestran una senescencia acelerada y además sobreexpresan *App* en diversas áreas del cerebro, se han detectado déficits de memoria e indicios de una alteración funcional de la conexión septohipocámpica (Flood and Morley, 1997), como también se observa en registros electrofisiológicos de células del MS/DBB en ratas envejecidas (Aparis et al., 2000).

En los últimos años, y sobretodo durante el transcurso de esta tesis doctoral, se han publicado varios estudios de EA utilizando modelos animales, algunos de los cuales apuntan a una susceptibilidad específica de la conexión GABAérgica septohipocámpica y/o de sus dianas en hipocampo. Además, un punto importante a tener en cuenta es que gracias al uso de animales de experimentación se ha podido analizar más exhaustivamente la función de estas neuronas, mediante estudios electrofisiológicos o comportamentales más adecuados que los que se pueden llevar a cabo en pacientes humanos.

Por un lado, la amiloidosis inducida en ratas mediante inyecciones de péptido β -amiloide en el hipocampo causa un fallo en el ritmo theta hipocámpico y peor reconocimiento visuoespacial por parte de los animales tratados. Lo que es más importante: en esta situación, se ha visto que la actividad de las células GABAérgicas septohipocámpicas está reducida en cuanto a la frecuencia de disparo (Villette et al., 2010). Además, en este mismo modelo, las células hipocámpicas que proyectan de vuelta al septum (inmunopositivas para Calbindina y/o Somatostatina) también están afectadas, con lo que el diálogo entre septum e hipocampo, tan importante para el correcto funcionamiento del bucle septo-hipocampo-septal, se vería comprometido (Villette et al., 2011). Cabe destacar que otros estudios de amiloidogénesis, inducida en este caso en el septum medial aunque con diferentes especies de β -amiloide, no han demostrado apenas pérdida o daño de neuronas GABAérgicas (según inmunorreactividad para GAD67) pero sí de neuronas totales y, específicamente, colinérgicas. En estos animales, sin embargo, también se observó un descenso de la actividad theta en hipocampo en las frecuencias máximas (Colom et al., 2008).

Por otro lado, se han realizado diversos estudios en ratones transgénicos que sobreexpresan genes asociados a la forma familiar de EA, ya sea de manera aislada o combinada. En cuanto a las interneuronas hipocámpicas (dianas de la conexión GABAérgica septal) existen datos contradictorios en diferentes modelos de EA. Por lo general, no existe apenas pérdida de interneuronas en cepas transgénicas que expresan únicamente formas mutadas del gen *hAPP*. En cambio, en modelos de doble transgénesis (*hAPP* junto con *PSEN1/2* o *Tau*) estas alteraciones son más frecuentes (Wirhth and Bayer, 2010).

Muy pocos estudios, por el contrario, se han centrado en el análisis de las neuronas septohipocámpicas en estos modelos. En ratones transgénicos de 13 meses de la cepa Thy-Tau22 (Schindowski et al., 2006) se observan menos células septales que proyectan a hipocampo, aunque lamentablemente no se estudió la naturaleza de esas neuronas en cuanto al neurotransmisor utilizado (Belarbi et al., 2009). En otro caso, un estudio reciente realizado con ratones de la cepa TauPS2APP (Grueninger et al., 2009), los animales transgénicos de 12 y 18 meses de edad presentan menos células GABAérgicas septohipocámpicas (inmunorreactivas para Parvalbúmina) y una menor cantidad de neuronas del giro dentado positivas para Neuropeptido Y (NPY). A nivel funcional, estos animales presentan una mayor potenciación de la sinapsis de la vía perforante del hipocampo (Loreth et al., 2012).

Los escasos datos sobre el estado de la conexión GABAérgica septohipocámpica de que se dispone, junto con la importancia funcional de esta vía en procesos cognitivos que se ven afectados durante el envejecimiento y la EA, han llevado a plantear el segundo objetivo de esta tesis: estudiar exhaustivamente esta conexión durante el envejecimiento normal y en la cepa transgénica J20 de ratón, tanto a nivel histológico como funcional (véase el apartado *Resultados-II*).

OBJETIVOS

La conexión GABAérgica septohipocámpica es un elemento crucial para el correcto funcionamiento del hipocampo y, en concreto, para determinados procesos de aprendizaje y memoria. La exquisita especificidad de contacto de este componente es la piedra angular que determina su función, pero los datos existentes sobre los mecanismos que rigen la selección de diana y sinaptogénesis de estos axones son escasos. Aunque esta conexión desempeña un papel elemental en procesos cognitivos que están afectados durante el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer, en el momento en que iniciamos este proyecto había un sorprendente vacío en la literatura sobre el estado de la vía GABAérgica septohipocámpica en estas situaciones. Por último, y durante fases más avanzadas de esta tesis, los primeros resultados que obtuvimos sobre la función hipocámpica de animales J20 nos alentaron a ampliar el estudio funcional de la conexión septohipocámpica *in vivo*, en este caso investigando su papel en procesos de refuerzo operante.

Por todo ello, los objetivos planteados para esta tesis son los siguientes:

1. Estudiar los mecanismos de desarrollo postnatal y sinaptogénesis de la conexión septohipocámpica.

1.1 Desarrollar y caracterizar un modelo *in vitro* de la conexión.

1.2 Testar la implicación de la molécula de guía Semaforina 3C en la sinaptogénesis de los axones GABAérgicos septohipocámpicos.

1.3 Conocer el papel de las aferencias entorrinohipocámpicas en la sinaptogénesis de los axones GABAérgicos septohipocámpicos.

2. Analizar el estado de la conexión GABAérgica septohipocámpica durante el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (EA).

2.1 Análisis histológico de la conexión durante el envejecimiento normal.

2.2 Análisis histológico de la conexión en un modelo animal de EA (cepa de ratón transgénico J20).

2.3 Estudio funcional de la conexión GABAérgica septohipocámpica en ratones J20: análisis de los patrones de actividad rítmica en el hipocampo.

3. Estudiar el efecto de la autoestimulación septal sobre la función hipocámpica en ratones control y J20.

3.1 Caracterizar la función sináptica del hipocampo de ratones transgénicos J20.

3.2 Analizar el efecto de la conexión septohipocámpica sobre la función hipocámpica en un paradigma de refuerzo operante por autoestimulación septal en ratones control y J20.

3.3 Analizar el efecto de LTP sobre el paradigma de refuerzo operante en ratones control y J20.

RESULTADOS

Resultados - I

Semaforina 3C no es imprescindible para el establecimiento y especificidad de contacto de la vía GABAérgica septohipocámpica in vitro

Sara E. Rubio^{1,2,3}, Albert Martínez^{1,2,3}, Sophie Chauvet⁴, Fanny Mann⁴,
Eduardo Soriano^{1,2,3}, Marta Pascual^{1,2,3}

¹ Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo y de la Regeneración Neuronal, Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB), E-08028 Barcelona, España.

² Departamento de Biología Celular, Universidad de Barcelona, E-08028 Barcelona, España.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCI), España.

⁴ Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy (IBDML), Université de la Méditerranée, UMR 6216 Case 907, Parc Scientifique de Luminy, 13288 MARSEILLE Cedex 09, France

RESUMEN

La vía septohipocámpica (SH) consta de fibras colinérgicas y GABAérgicas. Mientras las primeras establecen contactos sinápticos con todos los tipos de neuronas hipocámpicas, las GABAérgicas forman complejos contactos en forma de cesto específicamente sobre interneuronas. La función de la Vía GABAérgica SH está asociada con el control de redes hipocámpicas sincrónicas. Se conoce poco sobre los mecanismos involucrados en la formación de la conexión GABAérgica septohipocámpica. Semaforina 3C (Sema 3C) se expresa en la mayoría de interneuronas contactadas por estos axones. Para determinar si Sema 3C tiene un papel en la formación de la vía SH, hemos analizado el desarrollo de la conexión en ratones deficientes en Sema 3C. Como estos animales mueren en el nacimiento, hemos desarrollado un modelo de co-cultivo organotípico *in vitro* que reproduce el desarrollo postnatal de la vía SH. En estos co-cultivos septohipocámpicos la conexión GABAérgica SH se desarrolla con una especificidad de contacto similar a la que ocurre *in vivo*. Los axones SH forman contactos incipientes en varios tipos de interneuronas hipocámpicas a 7 días *in vitro* (DIV), cuya complejidad aumenta en estadios de 18-25 DIV. Estos axones SH forman contactos sinápticos simétricos sobre las interneuronas GABAérgicas, y dicha especificidad de contacto no está afectada por la ausencia de aferencias entorrinales sobre hipocampo. Por

último, ni la ausencia de Sema 3C en las células diana ni el bloqueo funcional de ésta mediante ectodominios Neuropilina-1 y -2 aplicados sobre los co-cultivos provocan cambios graves en la especificidad de contacto de la conexión ni en la densidad de la inervación. Por todo ello, afirmamos que la formación y la especificidad sináptica de la conexión GABAérgica septohipocámpica se basa en mecanismos moleculares robustos, independientes de Semaforina 3C, que se mantienen en el modelo de co-cultivo *in vitro* desarrollado en este estudio.

Este manuscrito ha sido publicado en la revista *European Journal of Neuroscience*:

Rubio SE, Martínez A, Chauvet S, Mann F, Soriano E, Pascual M. *Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway in vitro*. Eur J Neurosci. 2011 Dec;34(12):1923-33. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07906.x

Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway *in vitro*

Sara E. Rubio,^{1,2,3} Albert Martínez,^{1,2,3} Sophie Chauvet,⁴ Fanny Mann,⁴ Eduardo Soriano^{1,2,3} and Marta Pascual^{1,2,3}

¹Developmental Neurobiology and Regeneration Laboratory, Institute for Research in Biomedicine, Baldiri i Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain

²Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIII), Baldiri i Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain

⁴Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy (IBDML), Université de la Méditerranée, UMR 6216 Case 907, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, 13288 France

Keywords: hippocampal interneurons, mouse, organotypic cultures, synaptogenesis

Abstract

The septohippocampal (SH) pathway comprises cholinergic and GABAergic fibers. Whereas the former establish synaptic contacts with all types of hippocampal neurons, the latter form complex baskets specifically on interneurons. The GABAergic SH function is associated with the control of hippocampal synchronous networks. Little is known about the mechanisms involved in the formation of the GABAergic SH pathway. Semaphorin (Sema) 3C is expressed in most hippocampal interneurons targeted by these axons. To ascertain whether Sema 3C influences the formation of the SH pathway, we analyzed the development of this connection in Sema 3C-deficient mice. As these animals die at birth, we developed an *in vitro* organotypic co-culture model reproducing the postnatal development of the SH pathway. In these SH co-cultures, the GABAergic SH pathway developed with target specificity similar to that present *in vivo*. SH axons formed incipient baskets on several types of hippocampal interneurons at 7 days *in vitro*, which increased their complexity by 18–25 days *in vitro*. These SH fibers formed symmetric synaptic contacts on GABAergic interneurons. This synaptic specificity was not influenced by the absence of entorhinal afferents. Finally, the absence of Sema 3C in target neurons or its blockage by neuropilin-1 and -2 ectodomains in slice co-cultures did not lead to major changes in either the target specificity of the GABAergic SH pathway or its density of innervation. We conclude that the formation and synaptic specificity of the GABAergic SH pathway relies on robust molecular mechanisms, independent of Sema 3C, that are retained in our *in vitro* co-culture model.

Introduction

The establishment of specific synaptic connections is a critical step during the development of the nervous system. An increasing number of molecules have been shown to be involved in the guidance of growing axons to their final destinations [semaphorins (Semas), netrin, ephrins, etc.] (Goodman, 1996; Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Song & Poo, 2001), but less is known about the factors that control the recognition and selection of specific synaptic targets (Waites *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2009; Shen & Cowan, 2010). The hippocampus receives three major afferent systems, the entorhino-hippocampal pathway, commissural-associational pathway, and septohippocampal (SH) connection (Amaral & Witter, 2004). The SH pathway, which arises from the medial septum/diagonal band (MS/DB) complex, includes the cholinergic and GABAergic fibers (Frotscher & Léránth, 1986; Freund & Antal, 1988; Gulyás *et al.*, 1990). The cholinergic SH

pathway establishes synapses with all of the types of hippocampal neurons. In contrast, the GABAergic SH fibers establish complex synaptic baskets exclusively around the perisomatic region of GABAergic interneurons (Frotscher & Léránth, 1986; Freund & Antal, 1988; Gulyás *et al.*, 1990). Hippocampal interneurons are inhibitory neurons responsible for modulating the neuronal excitability of hippocampal networks. The high degree of target cell specificity of the GABAergic SH fibers confers on this pathway high efficiency in controlling hippocampal interneuron activity. Thus, for instance, the GABAergic SH pathway has been implicated in the synchronization and regulation of hippocampal rhythmic activity (Buzsáki, 2002; Hangya *et al.*, 2009).

Previous studies have shown that, during embryonic development, both types of septal fibers respond to the similar guidance cues that direct their growth from the septum to the hippocampus (Pascual *et al.*, 2005). Thus, for instance, Sema 3A and 3F, expressed in regions near the septum, have a chemorepulsive effect on septal axons, whereas netrin-1, expressed in the fimbria, chemoattracts these axons (Pascual *et al.*, 2004b). However, nothing is known about the factors that govern the exquisite target selection of GABAergic interneurons

Correspondence: M. Pascual, ¹Institute for Research in Biomedicine, Baldiri i Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: marta.pascual@irbbarcelona.org

Received 31 May 2011, revised 1 September 2011, accepted 14 September 2011

by the GABAergic SH pathway in the hippocampus. A large percentage of GABAergic SH target cells express the class III *sema* 3C, and SH neurons in the MS/DB complex co-express the *Sema* 3C receptors, *neuropilin-1* and *-2*, at postnatal stages (Pascual *et al.*, 2005). Because *Sema* 3C is a secreted guidance cue implicated in repulsion and attraction in various kinds of axons (Bagnard *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Niquille *et al.*, 2009), we hypothesized that this *Sema* might be involved in target cell selection by the GABAergic SH pathway.

Here we studied the relevance of *Sema* 3C in the establishment of the GABAergic SH pathway. However, because this molecule is critical for correct embryonic heart development, mice deficient in *Sema* 3C die at birth (Feiner *et al.*, 2001). Thus, in order to analyze the role of *Sema* 3C in the maturation of the GABAergic SH pathway, we first developed an *in vitro* system that allows the reconstruction and analysis of the SH pathway in organotypic slice co-cultures of septal and hippocampal tissue.

Materials and methods

Animals

The *Sema* 3C^{+/−} mice were maintained in a CD1 background and mated to obtain *Sema* 3C^{−/−} embryos (Feiner *et al.*, 2001). Control mice (OF-1 strain; Charles River, France) were also used. The genotype of the offspring was determined by polymerase chain reaction as described previously (Feiner *et al.*, 2001). The day on which a vaginal plug was detected was designated as embryonic day (E)0. The day of birth was considered as postnatal day (P)0. All of the experiments using animals were performed in accordance with the European Community Council directive and the National Institute of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Experiments were also approved by the local ethical committees (C.E.E.A., Comitè Ètic d'Experimentació Animal, University of Barcelona).

Detection of septohippocampal axons

To detect SH GABAergic fibers, we deeply anesthetized [mixture 10/1 Ketolar (Parke-Davis)/Rompun (Bayer), 0.003 mL/g] OF-1 mice and injected them with an anterograde tracer by iontophoresis (Freund & Antal, 1988). The P5 (*n* = 4), P10 (*n* = 5), P18 (*n* = 3) and adult (*n* = 3) mice received midline injections of 10% biotinylated dextran amine (BDA) (10 000 MW, Molecular Probes) in the medial septum at two anteroposterior levels and at two dorsoventral points by iontophoresis (7 μ A positive direct current, 7 s on/off cycle). Stereotaxic coordinates for the injections were (from Bregma): adult animals, anteroposterior + 0.5 and + 0.9, dorsoventral 3.0 and 3.7; P15 mice, anteroposterior + 0.6, dorsoventral 2.6 and 3.2; and P5 mice, anteroposterior + 0.5, dorsoventral 2.5 and 3. This protocol results in strong BDA labeling in the medial septum and the diagonal band area that contains the highest proportion of GABAergic SH neurons (Freund & Antal, 1988; Gulyás *et al.*, 1990; Pascual *et al.*, 2005). After 3 or 4 days, the animals were deeply anesthetized with Ketolar (Parke-Davis)/Rompun (Bayer) and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were dissected and frozen, and 30- μ m-thick sections were obtained and stored in a cryoprotectant solution at -70°C until use. SH fibers were detected by BDA immunodetection. After washing and blocking, sections were incubated overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ with the avidin–biotin peroxidase complex (1 : 100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Peroxidase activity was developed with 0.03% 3,3'-diaminobenzidine intensified with ammonium nickel sulfate and cobalt

chloride, and 0.005% H₂O₂ yielding a black reaction product. Sections were mounted onto gelatinized slides, Nissl stained, dehydrated, and coverslipped with Eukitt (Panreac). In some sections, following the detection of BDA, the immunostaining of distinct neuronal markers was performed (see below).

Immunodetection

For all of the histological procedures, mice were perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were removed and postfixed in the same solution, cryoprotected with 30% sucrose and sectioned at 30 μ m as previously described for BDA-injected mice.

Immunohistochemistry was performed as described elsewhere (Pascual *et al.*, 2005). After blocking, or after the detection of BDA tracer, the tissue was incubated overnight with well-characterized rabbit polyclonal antibodies against parvalbumin (PARV, 1 : 3000, Swant Antibodies, Bellinzona, Switzerland), calbindin (CALB, 1 : 1000, Swant Antibodies), calretinin (CALR, 1 : 1000, Swant Antibodies), *Sema* 3C (1 : 1000, Abcam plc, Cambridge, UK), glutamic acid decarboxylase (GAD)65/67 (1 : 1000, Chemicon International, Temecula, CA, USA) or goat anti-choline acetyltransferase antibodies (1 : 150, Chemicon International, Temecula, CA, USA). Primary antibodies were visualized by sequential incubation with biotinylated secondary antibodies (1 : 200) and the avidin–biotin peroxidase complex (diluted 1 : 100) (2 h each, Vector Laboratories). The peroxidase reaction was developed with 0.03% 3,3'-diaminobenzidine and 0.005% H₂O₂, yielding a brown end-product. The sections were mounted onto gelatinized slides, dehydrated and coverslipped with Eukitt (Panreac). For double immunofluorescent detection of *Sema* 3C and PARV, after blocking, the sections were incubated overnight with rabbit anti-*Sema* 3C (1 : 500) combined with goat anti-PARV (1 : 1000, Swant Antibodies, Bellinzona, Switzerland) and then incubated with swine anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC, 1 : 250, DAKO, Glostrup, Denmark) and Alexa Fluor 568 donkey anti-goat (1 : 750, Invitrogen). The sections were mounted onto slides with Mowiol 4-88 (Merck) and viewed under a confocal microscope. All of the slices were permeabilized with Triton X-100 (0.5%) during the immunohistochemistry procedure, except for the GAD 65/67 immunodetections, where a freeze/thawing protocol was performed before the blocking.

Organotypic septohippocampal cultures

Mouse pups (P1) were decapitated and brains dissected out of the skull. Brains were kept in cold dissection medium (minimum essential medium containing glutamine) during the dissection procedure. Slices (250 μ m) of the hippocampus–entorhinal complex were cut using a McIlwain tissue chopper. For the dissection of the septum, the anterior half of the brain was embedded in 3% low-melting agarose (Cambrex Corporation, USA) and cut into 250 μ m slices using a vibratome (VT100S; Leica, Nussloch, Germany). The tissue was kept cold during all of this process. After further dissection, the septum and hippocampus–entorhinal cortex were placed onto a plate insert (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and arranged as shown in Fig. 1A. The ventral region of the septum was positioned in contact with the fimbria. Inserts were placed in a six-well plate containing 1 mL of culture medium per well [minimum essential medium containing 25% horse serum, 35% neurobasal, 12.5% Hank's Balanced Salt Solution, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin (1 U/1 μ g per mL), 0.04% NaHCO₃, B27 and N2 (all from Gibco Life Technologies), and 0.55% D-glucose (Sigma-Aldrich)].

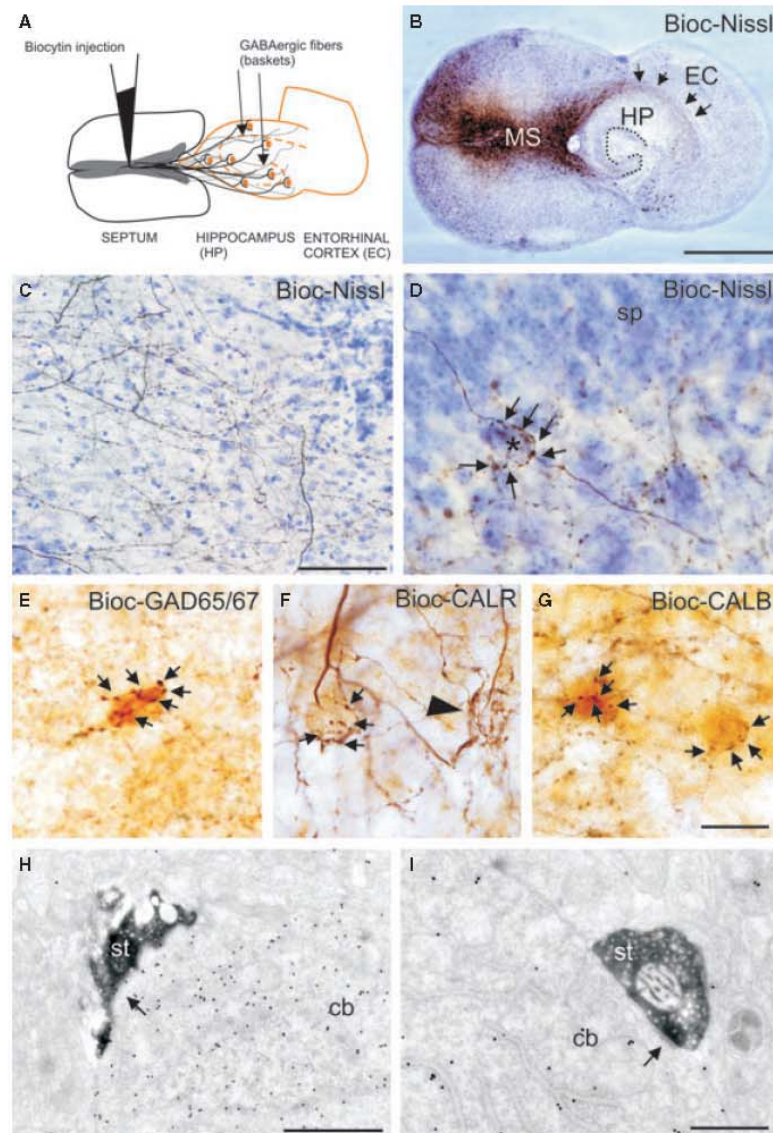


FIG. 1. Reconstruction of the GABAergic SH axons *in vitro*. (A) Diagram showing the components of the *in vitro* model of the SH connection. The organotypic co-cultures include the septum, hippocampus (HP) and entorhinal cortex (EC) slices taken from P1 mice. (B) Photomicrograph of a Nissl-stained 15 DIV organotypic culture showing biocytin (Bioc) injection (black) in the medial septum (MS) and diagonal band complex, and some stained fibers in the stratum oriens (arrows) of the HP. (C) Higher magnification photomicrograph illustrating the massive septal innervation (black fibers) throughout the layers of the hippocampus in a 15 DIV culture. (D) Photomicrograph of a 15 DIV culture showing a thick fiber forming a basket with abundant boutons (arrows) contacting a neuron located close to the stratum pyramidale (sp) of CA3. (E) Immunostaining for the enzyme GAD65/67 allows the detection of all GABAergic hippocampal interneurons (brown). The combined detection of GAD65/67 and biocytin shows biocytin-positive septal baskets (black) with abundant boutons (arrows) contacting GAD65/67-immunoreactive cells in the cultures. (F) Micrograph showing the hippocampal region of a 15 DIV organotypic culture in which biocytin detection (black) was combined with the immunodetection of CALR (brown). Several CALR-positive cells receive GABAergic SH contacts with some boutons (arrows) around the soma of CALR-immunopositive neurons. Some complex baskets containing biocytin can be seen in distinct layers of the hippocampus; some of them contact neurons that are immunonegative for this marker (arrowhead). (G) Double detection of biocytin and calbindin (CALB) showing a GABAergic SH basket contacting the perisomatic region of CALB-positive interneurons. (H) Electron micrograph showing a biocytin-containing septal synaptic terminal (st) that establishes synapses on the cell body (cb) of a GABAergic postembodied hippocampal interneuron in the organotypic culture. (I) High-magnification electron photomicrograph showing the synaptic terminal of a medial septum neuron establishing a symmetric synapse (arrow) with the cell body of a GABA-positive interneuron. Scale bars: 1000 μm in B; 50 μm in C; 20 μm in D-F; 1 μm in H and 50 nm in I.

Co-cultures were maintained for 5–25 days in a 37 °C, 5% CO₂, humidified atmosphere and the medium was changed three times per week. For the Sema 3C blocking experiments, neuropilin-1 ectodo-

main and neuropilin-2 ectodomain (Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2)-enriched media or control medium (Pascual *et al.*, 2004b) were applied to the cultures every time the medium was changed. For the

Sema 3C experiments, the protocol was as described above except that the co-cultures consisted of septa taken from P1 wild-type mice and hippocampi taken from either Sema 3C^{+/+} or Sema 3C^{-/-} E18 mice. For the establishment of the co-cultures without the entorhinal cortex, this region was removed from the entorhino hippocampal slices before plating them on the culture inserts.

Detection of septohippocampal fibers in organotypic cultures

To trace the SH component in the organotypic co-cultures, a small crystal of biocytin (Sigma-Aldrich) was placed in the MS/DB complex region of the co-culture, in order to label septal neurons projecting to the hippocampus. The culture medium was changed several times per day. After 24 h, co-cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 h and kept in phosphate buffer until sectioned at 30–40 μ m using a vibratome.

Biocytin immunodetection was performed to detect SH fibers in the co-cultures. After washing, sections were permeabilized with increasing concentrations of dimethylsulfoxide and blocked. Free-floating sections were incubated overnight at 4 °C with the avidin biotin peroxidase complex (1 : 100; Vector Laboratories). Peroxidase activity was developed with 0.03% 3,3'-diaminobenzidine intensified with ammonium nickel sulfate and cobalt chloride, and 0.005% H₂O₂ yielding a black reaction product. Sections were mounted onto gelatinized slides, Nissl stained when needed, dehydrated, and coverslipped with Eukitt (Panreac). In some experiments, BDA detection was combined with the detection of PARV, calbindin (CALB), calretinin (CALR), Sema 3C or GAD65/67 using the protocol described for tissue sections. The double-immunofluorescent detection of Sema 3C and PARV was performed as described above.

Quantification of the septohippocampal innervation

The complexity of the GABAergic SH baskets was assessed in the CA3 area of sections from P5, P10, P18 and adult mice, and sections from co-cultures maintained for 7, 10, 16 and 25 days *in vitro* (DIV). Briefly, the number of boutons per basket was quantified in some sections ($n = 2$ –3 per condition) and the average was calculated for the *in vivo* and *in vitro* situation for each age. The percentage of hippocampal interneurons contacted by GABAergic axons was calculated in organotypic cultures lacking entorhinal cortex, in the co-cultures established for Sema 3C experiments, and in the co-cultures treated with Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 or control media. For this purpose, the total number of GAD65/67-, PARV- or CALR-positive cells and the number of these cells contacted by SH baskets were quantified in 14–15 DIV co-cultures ($n = 4$ –10 co-cultures per experimental group). Cajal Retzius, mossy and immature granular cells were excluded from CALR quantification. Overall comparisons and posthoc two-sample Student's *t*-test (two-tailed) were used to examine differences between the experimental groups, with $P < 0.05$ considered as significant.

Detection of cholinergic neurons

Acetylcholinesterase histochemistry was performed as described by Tago *et al.* (1986) with some modifications. After inactivation of the endogenous peroxidase activity, tissue was rinsed in 100 mM maleate buffer and incubated for 40 min in a solution of maleate buffer containing 20 μ M acetylthiocholine iodide, 0.002% tetraisopropyl pyrophosphoramidate (both from Sigma-Aldrich), 5 μ M potassium ferricyanide, 50 μ M sodium citrate dihydrate (both from Merck) and 30 μ M copper sulfate (Panreac). After washing in 50 mM Tris-HCl

buffer (pH 7.5), the peroxidase activity of the precipitate was developed with 0.04% 3,3'-diaminobenzidine intensified with 0.3% ammonium nickel sulfate and 0.01% H₂O₂, yielding a black reaction product. Sections were mounted onto gelatinized slides, Nissl stained when needed, dehydrated, and coverslipped with Eukitt (Panreac).

Results

Target specificity in the generation and reconstruction of the GABAergic septohippocampal pathway in organotypic slice cultures

As Sema 3C-deficient mice die at around birth, we developed an *in vitro* SH slice culture model to analyze the relevance of the absence of Sema 3C in the postnatal development of the SH pathway. We obtained slices from the septal area and the hippocampus entorhinal cortex complex from newborn mice (P0–1). The ventral septum was positioned near the fimbria of hippocampal slices to facilitate

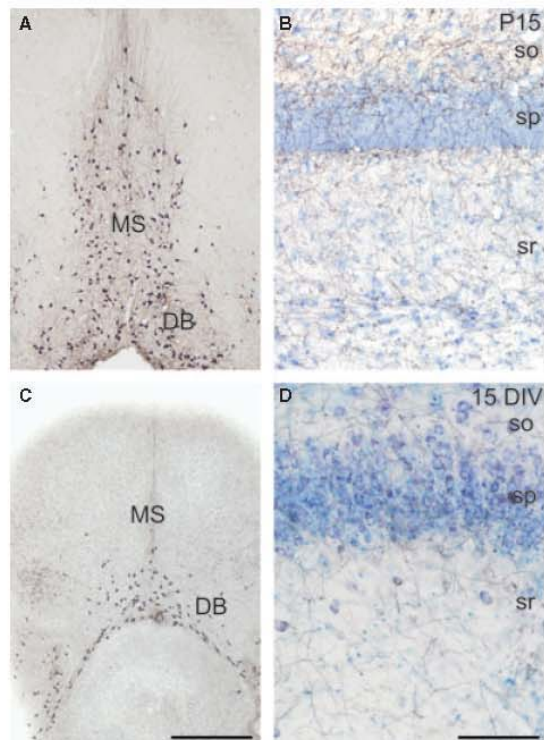


FIG. 2. The SH cholinergic component is maintained in the *in vitro* model. (A) Photomicrograph illustrating the distribution of cholinergic neurons in the medial septum (MS) and diagonal band (DB) of P15 mice. (B) High-magnification photomicrograph showing the cholinergic innervation (in black) of the CA3 hippocampal region in a Nissl-stained section from a P15 mouse; a myriad of thin fibers with some 'en-passant' boutons innervate the entire hippocampus, mainly close to the stratum pyramidale (sp). (C) Choline acetyltransferase immunodetection in an SH organotypic culture shows a similar distribution of cholinergic septal neurons as illustrated *in vivo*. (D) Enzymatic detection of acetylcholinesterase in a 15 DIV organotypic culture reveals a distribution of cholinergic fibers similar to the *in vivo* situation, with massive innervation of cholinergic septal afferents onto all of the hippocampal layers, mainly close to the pyramidal cell layer. so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. Scale bars: 1000 μ m in C (also applies to A); 100 μ m in D (also applies to B).

innervation of the target (Fig. 1A). After 15–25 DIV, septal fibers were traced by biocytin injection in the medial region of the septum (Fig. 1B). As described previously *in vivo* (Freund & Antal, 1988;

Rocamora *et al.*, 1996; Pascual *et al.*, 2005), the organotypic culture showed fibers formed in the medial septum entering the hippocampus through the fimbria and invading all layers of the hippocampus,

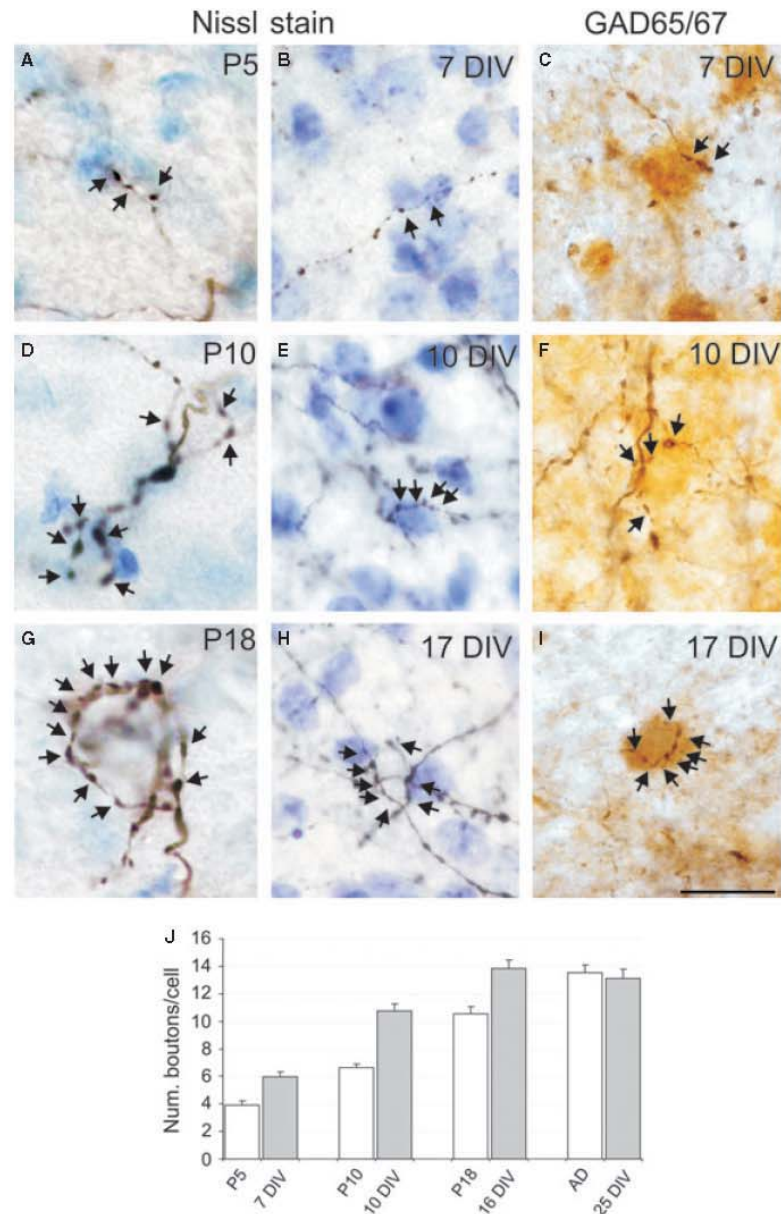


FIG. 3. Postnatal development of the GABAergic SH contacts *in vivo* and *in vitro*. (A, D and G) *In vivo* tracing of the SH pathway at distinct developmental stages. (A) Photomicrograph showing incipient GABAergic SH baskets (arrows) on somata of hippocampal neurons in P5 mice. (D) At P10, the complexity has increased and prominent baskets with more and larger synaptic boutons (arrows) are established. (G) At P18, extremely complex baskets with as many as 20 synaptic boutons (arrows) around a single soma are frequent. (B, E and H) Photomicrographs of the hippocampal region of cultures simultaneously immunostained for biocytin (black) and Nissl stain or combined with GAD65/67 immunodetection (brown; C, F and I) at various time-points of the cultures. Arrows indicate synaptic boutons. (B) In 1-week-old cultures, immature baskets with few synaptic boutons (arrows) are observed. (C) These incipient baskets contact specifically with the perisomatic region of GAD65/67-positive cells. (E) In 10 DIV cultures, the complexity of the contacts has increased notably. (F) Baskets display some thick synaptic boutons (arrows) around GAD65/67-positive somata. (H) In 17 DIV cultures, the baskets are very complex. (I) GABAergic basket fibers display a large number of boutons covering GAD65/67-immunoreactive somata. (J) The number of GABAergic SH boutons per cell was quantified in the hippocampus of co-cultures at 7, 10, 17 and 25 DIV, and in the CA3 of the hippocampus of P5, P10, P18 and adult (AD) mice. Scale bar: 20 μ m in I (also applies to A–H).

mainly the stratum oriens and the hilar region close to the granule cell layer (Fig. 1B). Closer inspection allowed us to identify two types of biocytin-labeled fibers. One group of axons was small and displayed numerous small 'en-passant' varicosities, these possibly corresponding to cholinergic fibers. To confirm these observations, some cultures were immunostained for choline acetyltransferase or histochemically reacted for the enzymatic detection of acetylcholinesterase. In agreement with *in vivo* studies, neurons immunoreactive for choline acetyltransferase were present in the MS/DB complex *in vitro* (Fig. 2A and C). Moreover, cholinergic fibers had similar distributions and shapes in sections from P15 brains and in SH organotypic co-cultures (Fig. 2B and D). These data indicate that the establishment of organotypic SH co-cultures leads to a pattern of cholinergic innervation similar to that observed *in vivo*.

We identified a second group of biocytin-labeled axons. These were thicker and formed complex baskets characteristic of the GABAergic SH component (Fig. 1C and D). Some of these baskets exhibited a high degree of complexity, resembling the perisomatic contacts described in mice (Freund & Antal, 1988; Gulyás *et al.*, 1990; Pascual *et al.*, 1998). To analyze the degree of specificity of GABAergic septal fibers in organotypic cultures, biocytin detection was combined with immunohistochemistry against several specific markers for hippocampal interneurons. These experiments showed that about 40% of GAD65/67-positive neurons ($n = 25\ 111$ cells, 17 co-cultures) in the hippocampus received specific input from the GABAergic SH fibers (Fig. 1E). Remarkably, we did not detect SH baskets surrounding the somata of GAD65/67-negative cells, thus indicating that the GABA-

ergic SH pathway generated *in vitro* maintains a high degree of target specificity for GABAergic interneurons.

Further immunohistochemical analyses with the interneuronal markers CALR, PARV and CALB demonstrated that all types of hippocampal interneurons were contacted by the GABAergic SH pathway (Fig. 1F and G). These markers identify non-overlapping populations of GABAergic hippocampal interneurons.

Quantitative analyses revealed that approximately 31% of PARV-positive interneurons ($n = 3717$ cells, 6 co-cultures) and 50% of CALR-positive cells ($n = 2221$ cells, 7 co-cultures) in the hippocampus of the co-cultures received GABAergic SH input. Finally, and to study whether GABAergic SH baskets reconstructed *in vitro* established synaptic contacts, we performed an immunohistochemical ultrastructural analysis, combining the pre-embedding detection of biocytin and postembedding immunogold detection of GABA. These analyses showed that the GABAergic septal axon terminal established symmetric synaptic contacts with cell bodies immunopositive for GABA antibodies (Fig. 1H and I). We conclude that the GABAergic SH pathway reconstitutes *in vitro* with target and synaptic specificity similar to that *in vivo*.

Pattern of postnatal maturation of the GABAergic septohippocampal pathway *in vivo* and *in vitro*, and its independence from the entorhinal cortex inputs

Previous tracing studies in mice have shown that septal axons reach the hippocampus at around E16 (Super & Soriano, 1994). At early

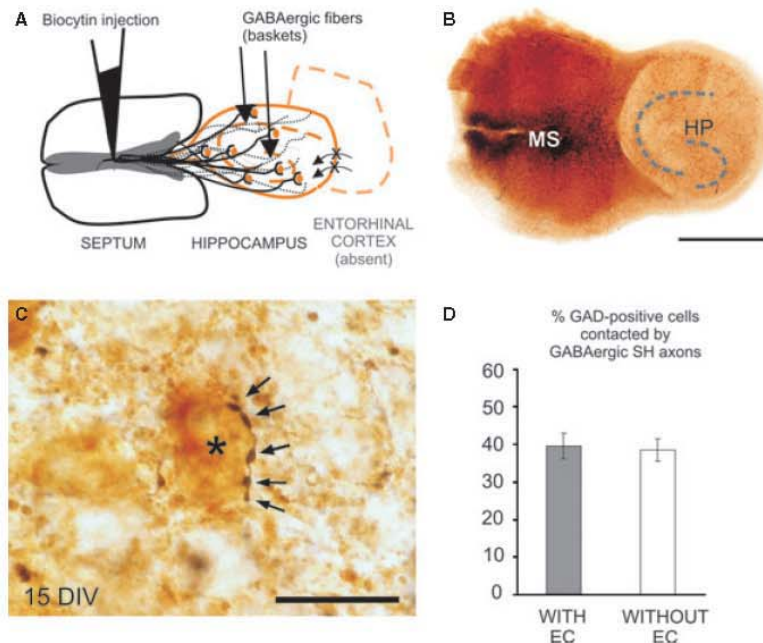


FIG. 4. Entorhinal cortex (EC) afferents are not essential for the development and target specificity of the GABAergic SH pathway. (A) Diagram showing the elements of the organotypic co-culture without the EC. The procedure is the same as in the standard culture except for the removal of the EC from the entorhino-hippocampal slice prior to culturing. As a result, the perforant pathway is removed in these cultures. (B) Micrograph showing an entire SH organotypic co-culture without the EC. Double immunohistochemical detection was performed against biocytin (black staining) and GAD65/67 (brown). (C) High-magnification micrograph showing a septal axon contacting with the somatic region of a GAD65/67-immunopositive hippocampal interneuron (asterisk) in an organotypic culture without the EC. Note the morphology of the basket contacting the interneuron, with thick synaptic boutons around the soma (arrows). (D) After immunohistochemical detection of biocytin and GAD65/67, the percentage of hippocampal interneurons received by a septal GABAergic contact was calculated. As shown in the histogram, the absence of the EC in the cultures did not affect the percentage of GABAergic hippocampal neurons contacted by septal baskets. Scale bars: 1000 μ m in B; 20 μ m in C. HP, hippocampus; MS, medial septum.

postnatal stages (P0–P5), SH fibers invade their target hippocampal layers, although pericellular baskets were not noticeable at these stages. To determine the onset and maturation of the GABAergic SH pathway *in vitro*, we first analyzed the postnatal maturation of this connection in mice at P5, P10, P18 and in adults. For this purpose, we performed iontophoretic injections with BDA in the MS/DB complex. As previously described (Pascual *et al.*, 2005), at P5, thick septal fibers, presumably corresponding to the GABAergic SH component, invaded the hippocampus and occasionally formed incipient pericellular baskets formed by three to four boutons around the somata of interneurons (Fig. 3A and J). At P10, the number and complexity of the baskets increased throughout all hippocampal layers (Fig. 3D and J). At P18, the complexity of the GABAergic SH baskets was increased, with some formed by more than 10 boutons (Fig. 3G and J). In adult mice, complex baskets formed by an average of 14 boutons were present in all hippocampal layers but were concentrated near the main cell layers (Fig. 3J). These baskets were similar to the pericellular SH baskets described previously (Freund & Antal, 1988; Gulyás *et al.*, 1990; Rocamora *et al.*, 1996; Pascual *et al.*, 1998). Thus, during early postnatal stages, GABA-

ergic septal fibers establish specific contacts with the perisomatic region of hippocampal interneurons, which achieve maximal complexity in adult mice.

In order to determine whether the temporal sequence of maturation *in vitro* correlates with the above *in vivo* pattern, we analyzed the development of the GABAergic SH pathway at 7, 10, 16–17 and 25 DIV. At 7 DIV, some thick fibers invaded the hippocampus through the stratum oriens and formed incipient baskets in distinct layers of the hippocampus, mainly close to the principal cell layers; these axons formed baskets composed of five to six boutons, which surrounded GAD65/67-positive interneurons (Fig. 3B, C and J). At 10 DIV, the number and complexity of the pericellular baskets was markedly increased (Fig. 3E, F and J). At 16–17 DIV, GABAergic SH axons formed complex baskets containing an average of 12–14 boutons (Fig. 3H, J). Slices cultured for 25 DIV did not show apparent differences when compared with cultures aged 16 DIV. A semi-quantitative evaluation of basket complexity (number of boutons per neuron) revealed that the pattern of maturation of the GABAergic SH pathway *in vitro* was roughly similar to that observed in postnatal mice, although slightly accelerated in the *in vitro* condition (Fig. 3J).

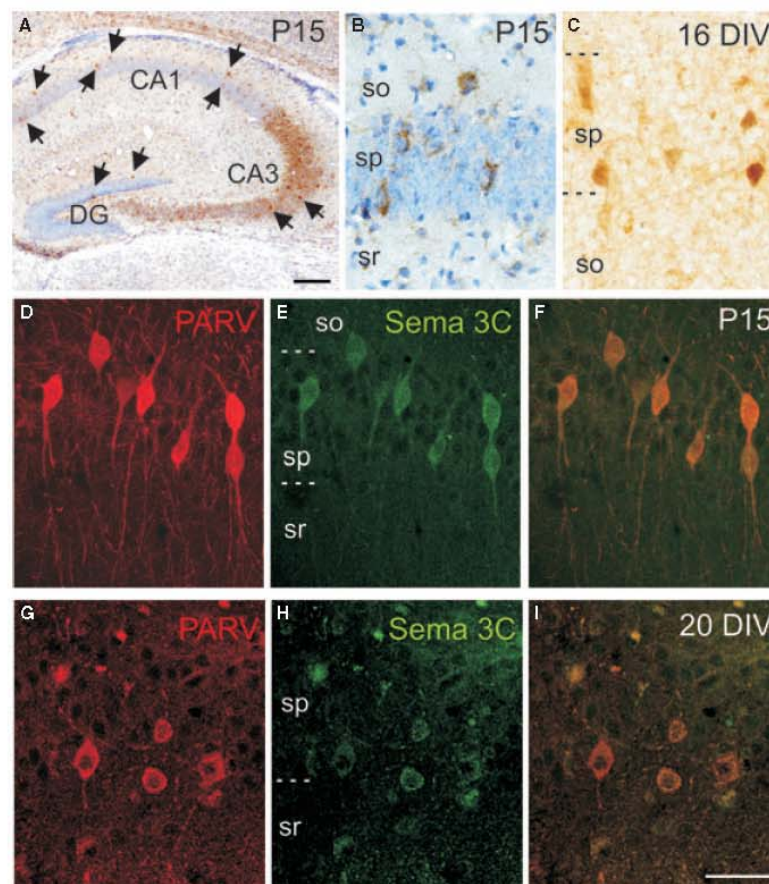


FIG. 5. Sema 3C expression pattern at postnatal stages of development *in vivo* and *in vitro*. (A) Immunodetection of Sema 3C (brown) in a Nissl-stained hippocampus of a P15 mouse. Some hippocampal interneurons express Sema 3C (arrows). (B) A higher magnification micrograph shows Sema 3C-positive somata displaying typical interneuron morphology distributed in or close to the pyramidal cell layer. (C) Immunodetection of Sema 3C in a 16 DIV culture reveals similar morphology and distribution of the immunopositive cells compared with the *in vivo* situation. (D–I) Double Sema 3C and PARV immunodetection shows that most PARV-positive interneurons express Sema 3C in the hippocampus of a P15 mouse (D–F) and in a 16 DIV organotypic culture (G–I). DG, dentate gyrus; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Scale bars: 200 μ m in A, 50 μ m in I (also applies to B–H).

Target-cell selection and synaptogenesis require both target recognition by specific molecules and appropriate levels of neuronal activity (Easter *et al.*, 1985; Spitzer, 2004; Lu *et al.*, 2009). In line with this, a previous study, in which hippocampal slice cultures did not contain the entorhinal cortex, concluded that the GABAergic SH pathway does not reconstitute in SH slice cultures (Heimrich *et al.*, 1996). Thus, we addressed whether the high degree of target selectivity depended on entorhinal cortex inputs. To this end, we compared the formation of the GABAergic SH pathway using hippocampal co-cultures with or without the entorhinal cortex (see Fig. 4A and B). Biocytin anterograde tracing combined with GAD65/67 immunohistochemistry did not reveal any apparent difference between the two groups of co-cultures. Thus, perisomatic baskets were recognizable in both groups (Fig. 4C). To substantiate these observations, we quantified the percentage of GABAergic hippocampal interneurons contacted by septal baskets. This percentage was similar in the presence or absence of the entorhinal cortex ($n = 13\,553$ cells in 7 co-cultures and $n = 13\,264$ cells in 10 co-cultures with and without entorhinal cortex, respectively; $P = 0.82$, Student's *t*-test, Fig. 4D). This observation indicates that entorhinal cortex afferents do not influence the correct formation of the GABAergic SH connection.

Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity (selection) of GABAergic septohippocampal axons

Previous data showed that *sema 3C* mRNA is abundantly expressed by hippocampal interneurons during the postnatal development, corresponding to the stage at which SH fibers initiate the establishment of synaptic contacts (Pascual *et al.*, 2005). In order to substantiate the distribution of *Sema 3C* protein during postnatal development, we performed immunohistochemistry on P15 mouse sections. Our data showed that *Sema 3C* was expressed in some neurons scattered throughout all layers of the hippocampus (Fig. 5A). *Sema 3C*-positive neurons were located mainly in or close to the pyramidal layer and granule cell layer (Fig. 5B). We performed double-immunofluorescent detection of *Sema 3C* and interneuronal markers, and concluded that virtually all *Sema 3C*-positive neurons were also PARV-positive (Fig. 5D–F). We next examined the expression and distribution of *Sema 3C* in organotypic SH cultures at 16 DIV. As in the *in vivo* hippocampus, *Sema 3C* was expressed in neurons resembling interneurons (Fig. 5C). These *Sema 3C*-positive neurons were PARV-positive, indicating that the expression pattern of this guidance cue *in vitro* parallels what occurs *in vivo* (Fig. 5G–I).

To study the involvement of *Sema 3C* in the formation of the GABAergic SH pathway, we co-cultured wild-type septal slices with hippocampal slices taken from *Sema 3C*^{-/-} E18 embryos or their *Sema 3C*^{+/+} littermates (Fig. 6A and D). After 15 DIV, the hippocampi from *Sema 3C*-deficient mice were innervated by septal fibers, which reached their target regions through the fimbria, innervating all hippocampal layers in a way that was indistinguishable from that seen in wild-type slices (Fig. 6B and E). Thus, in both experimental groups, axons formed complex pericellular contacts around the somata of hippocampal interneurons (Fig. 6C and F). We further quantified the percentage of GABAergic septal baskets on hippocampal interneurons in these groups. Similar percentages of hippocampal GAD65/67-positive interneurons were targets of the GABAergic SH pathway in either the presence or absence of *Sema 3C* ($n = 7151$ cells in 8 co-cultures and $n = 11558$ cells in 10 co-cultures for the *Sema 3C*^{-/-} and *Sema 3C*^{+/+} condition, respectively; $P = 0.31$, Student's *t*-test, Fig. 6G). We also confirmed that the PARV-positive subpopulation of interneurons, which expressed *Sema 3C*, was contacted in the *Sema 3C*-deficient mice, with no quantitative

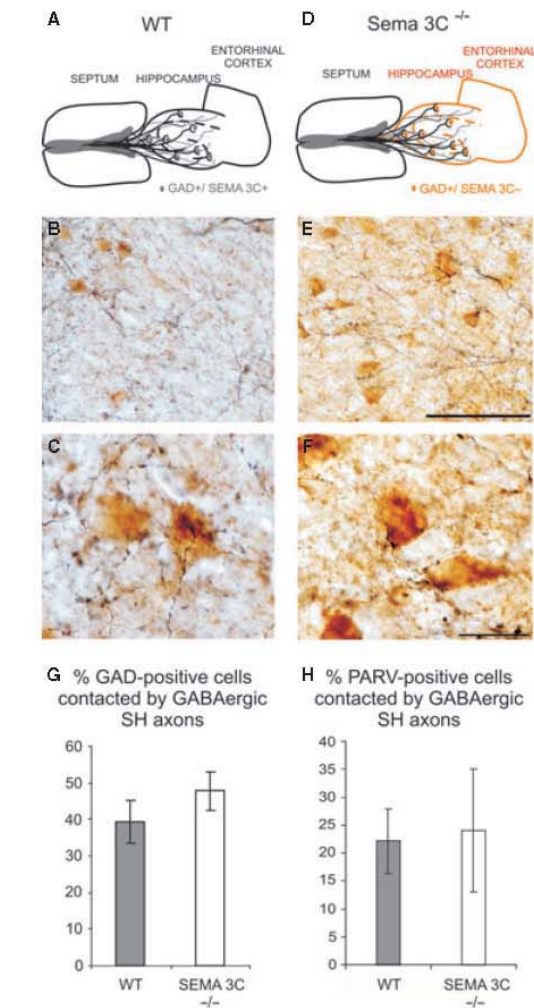


FIG. 6. The development of the GABAergic SH connection and its target cell specificity is independent of *Sema 3C* expression. Comparison of the target specificity of the GABAergic SH axons in the presence [wild-type (WT), A–C] or absence (*Sema 3C*^{-/-}, D–F) of *Sema 3C* in the hippocampus. (A) Diagram of the standard co-culture, in which GABAergic septal axons contact interneurons (gray circles) in the WT hippocampus, where *Sema 3C* is present. (B) Photomicrograph of a 16 DIV co-culture (biocytin staining in black, GAD65/67 in brown) displaying the dense septal innervation in the hippocampus. (C) Higher magnification micrograph shows complex SH baskets. (D) Organotypic culture including the septal region from WT mice and an entorhino-hippocampal slice from a *Sema 3C*^{-/-} mouse. WT septal GABAergic axons contact GABA-positive interneurons lacking *Sema 3C* (orange circles). (E) The combined detection of biocytin (black) and GAD65/67 (brown) in a 16 DIV culture shows a dense innervation of the hippocampus. (F) The typical SH baskets are present in *Sema 3C*^{-/-} cultures. The percentage of the total interneuronal population (GAD-positive cells) (G) or the PARV-positive interneurons (H) that are contacted by GABAergic septal axons is not affected in *Sema 3C*-deficient cultures in the hippocampus. Scale bars: 100 μ m in E (also applies to B); 20 μ m in F (also applies to C).

differences from their wild-type littermates ($n = 1897$ cells in 5 co-cultures and $n = 1997$ cells in 4 co-cultures for the *Sema 3C*^{-/-} and *Sema 3C*^{+/+} condition, respectively, $P = 0.90$, Student's *t*-test, Fig. 6H).

The next approach to test the role of Sema 3C in the development and maturation of the SH pathway was by functionally blocking this guidance cue with well-characterized recombinant ectodomains of its receptors, namely Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 (Pascual *et al.*, 2004b). Control medium or Ecto-NRP1- and Ecto-NRP2-enriched medium (diagrams in Fig. 7A and C) were applied on top of the co-cultures. When analyzing the SH pathway in the co-cultures after the treatments, we found that the connection formed properly in both conditions. Septal axons invaded the hippocampus of the organotypic co-cultures and formed typical complex GABAergic SH baskets on the perisomatic region of interneurons (Fig. 7B and D). The percentage of the GAD65/67-positive interneurons contacted by GABAergic SH axons was not altered when Sema 3C was blocked with Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 ($n = 6179$ cells in 4 co-cultures and $n = 13\,553$ cells in 7 co-cultures for Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 and control treatment, respectively; $P = 0.54$, Student's *t*-test; Fig. 7E). We thus conclude that Sema 3C is dispensable for the formation and maturation of the GABAergic SH pathway.

Discussion

Semaphorin 3C in the development and maturation of GABAergic septohippocampal axons

During embryonic development, distinct factors orchestrate the guidance of SH pathway fibers. Thus, whereas secreted Sema 3A and 3F are believed to chemorepel septal axons towards dorsal regions, netrin-1, expressed mainly in the fimbria, chemoattracts the same axons, thereby allowing their entry into the target hippocampus (Pascual *et al.*, 2004b). Once GABAergic SH fibers reach their target region, little is known about the molecules implicated in their target selection specifically for the perisomatic region of the GABAergic hippocampal interneurons. In previous studies, we have shown that the formation of this pathway is independent of the expression of Reelin, an extracellular matrix protein expressed by some hippocampal interneurons (Pascual *et al.*, 2004a). Conversely, GABAergic SH axons terminate preferentially onto nerve growth factor-positive interneurons, although their role is unknown (Rocamora *et al.*, 1996; Pascual *et al.*, 1998). In contrast to Sema 3A and 3F, Sema 3C is permissive for the growth of GABAergic SH axons and, at later postnatal stages, many pericellular SH baskets are formed on Sema

3C-expressing interneurons (Pascual *et al.*, 2005). Moreover, Sema 3C has been described as either a chemoattractive or chemorepulsive molecule, depending on the types of axons tested and on the developmental stage studied (Bagnard *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Niquille *et al.*, 2009), and neurons in the MS/DB complex express Sema 3C receptors, neuropilin-1 and -2, at postnatal stages (Pascual *et al.*, 2005). These observations prompted the present study, in which we used Sema 3C-deficient mice. However, we found that the absence of Sema 3C in the target neurons does not influence the formation of or target selection by GABAergic SH axons. The results obtained by blocking Sema 3C function in the entire co-cultures with Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 confirm that Sema 3C is not essential for the development and target specificity of the GABAergic SH pathway.

We conclude that the development, maturation and synaptic connectivity of the GABAergic SH pathway occur in a Sema 3C-independent manner. The present findings, in conjunction with the observation that hippocampal interneurons express different combinations of growth factors and guidance molecules (Rocamora *et al.*, 1996; Alcántara *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1998), suggest that the specificity of the GABAergic SH pathway is the result of either redundant axonal guidance-related mechanisms or a still unknown crucial functional cue.

Robust reconstruction of the GABAergic septohippocampal pathway in *in vitro* slice cultures

Here we set up an *in vitro* culture model of the GABAergic SH pathway, by using organotypic slice co-cultures. The *in vitro* model retains the target cell specificity of the GABAergic SH pathway and the formation of specific symmetric synaptic contacts in the perisomatic compartment. The present data obtained *in vitro*, particularly the percentage of interneurons contacted by GABAergic SH axons, are highly coincident with those reported *in vivo* for GAD65/67- and PARV-positive neurons (around 40 and 30%, respectively; Rocamora *et al.*, 1996 and our unpublished results). However, we found that the percentage of CALR-positive neurons contacted by the GABAergic SH component *in vitro* is higher than that *in vivo* (50% vs. 25%, respectively; Rocamora *et al.*, 1996 and our unpublished results). Some specific features of the slice co-cultures (e.g. differential neuronal survival *in vitro* and *in vivo*,

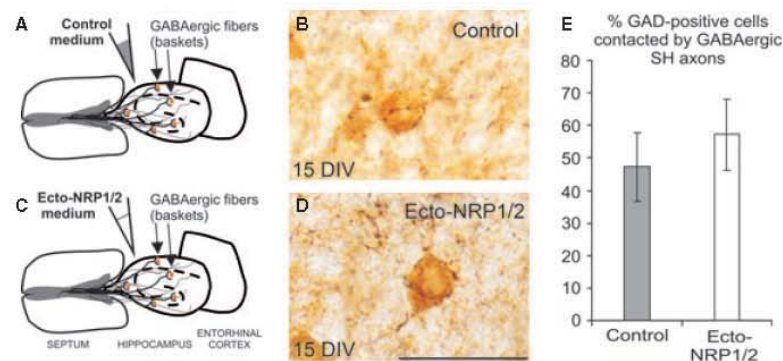


FIG. 7. Blocking Sema 3C effects in the co-cultures does not affect the development or the target cell selection of the GABAergic SH component. Diagrams showing the application of control (A) or Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2-enriched medium (C) in the entire co-cultures. High-magnification micrographs of 15 DIV co-cultures (biocytin staining in black, GAD65/67 in brown) allow for the detection of complex GABAergic SH baskets in the hippocampus of both control (B) and Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2 (D) treated co-cultures. (E) Quantification of the percentage of GAD65/67-positive interneurons contacted by GABAergic SH axons reveals no differences in the cultures where Sema 3C protein is blocked (Ecto-NRP1 and Ecto-NRP2) with respect to the control. Scale bar: 50 μ m in D (also applies to B).

altered temporal expression of some calcium-binding proteins) might account for these differences.

Regarding the temporal development of the connection in the model described here, the time-course of maturation of the GABAergic SH baskets is slightly accelerated compared with the *in vivo* situation but, in 3–4 weeks, they reach an identical degree of complexity to that seen *in vivo*. Previous studies have shown that neuronal activity-dependent mechanisms shape the fine tuning and complexity of most connections in the brain (Wang *et al.*, 2007; Huang & Scheffele, 2008; Huang, 2009; Blankenship & Feller, 2010). To keep the hippocampal activity as physiological as possible, our organotypic SH cultures included the entorhinal cortex, and thus entorhino-hippocampal input (Del Rio *et al.*, 1997; Del Rio & Soriano, 2010), which is critical for the main trisynaptic hippocampal pathway (Chrobak *et al.*, 2000; Canto *et al.*, 2008). However, we found that the formation of the GABAergic SH pathway is independent of the entorhinal cortex. This observation suggests that the expression and biological activity of the factors responsible for orchestrating target neuron selection by GABAergic SH axons are not controlled by the synaptic activity driven by entorhinal afferents. Furthermore, the GABAergic SH fibers formed complex pericellular baskets in our *in vitro* co-culture model, reaching a similar level of complexity to that in adult mice. This finding suggests that the *in vivo* activity-dependent related mechanisms required to finely sculpt the GABAergic perisomatic baskets were preserved in the *in vitro* model.

Similarly, we also show that the cholinergic SH pathway develops in a correct manner *in vitro*, with an axonal distribution similar to that observed *in vivo* (Woolf *et al.*, 1984; Frotscher & Léránth, 1986). Taken together, our results provide evidence that the development and maturation of the GABAergic SH pathway rely on robust molecular mechanisms that are retained in our *in vitro* co-culture model.

By terminating on most types of hippocampal interneurons, the GABAergic SH pathway is believed to inhibit their activity, thereby allowing the firing of large numbers of pyramidal neurons (Freund & Antal, 1988; Tóth *et al.*, 1997). Such disinhibition is believed to allow the synchronous activity of large areas of the hippocampus, thereby permitting the regulation of rhythmic activities, including theta and gamma oscillatory activity (Buzsáki, 2002; Hangya *et al.*, 2009). Furthermore, the GABAergic SH pathway and the theta and gamma rhythms are largely preserved during phylogeny, including humans (Stewart & Fox, 1991; Tesche & Karhu, 2000), and are believed to be involved in complex cognitive functions such as learning and memory and in rapid eye movement sleep, the disruptions of which have been associated with distinct stages of disease, including Alzheimer's disease (Prinz *et al.*, 1982; Buzsáki, 2002; Cantero *et al.*, 2003). Thus, the high degree of target specificity, the addressable manipulation of the system and the accessibility to several techniques of the co-culture model developed here lead us to propose that our model would greatly contribute to research not only into the development of the GABAergic SH pathway, but also into functional parameters related to its physiological significance.

Acknowledgements

We thank Natalia Ruiz for excellent technical support, Tanya Yates for editorial assistance, and the personnel of the Advanced Digital Microscopy Facility at the Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) for support. This study was funded by Grant BFM02008-3980 [Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)] and a grant from the Caixa Catalunya-Obra Social Foundation to E.S., the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de la Méditerranée to S.C. and F.M., and P108/1891 (Fondo de Investigaciones Sanitarias, MICINN) to M.P.

Abbreviations

BDA, biotinylated dextran-amine; CALR, calretinin; DIV, days *in vitro*; E, embryonic day; Ecto-NRP1, neuropilin-1 ectodomain; Ecto-NRP2, neuropilin-2 ectodomain; GAD, glutamic acid decarboxylase; MS/DB, medial septum/diagonal band; P, postnatal day; PARV, parvalbumin; Sema, semaphorin; SH, septohippocampal.

References

- Alcántara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., De Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C. & Soriano, E. (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.*, **18**, 7779–7799.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P. (2004) Hippocampal formation. In Paxinos, G. (ed), *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. Xvii.
- Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A.W. & Bolz, J. (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development*, **125**, 5043–5053.
- Blankenship, A.G. & Feller, M.B. (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat. Rev.*, **11**, 18–29.
- Buzsáki, G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, **33**, 325–340.
- Cantero, J.L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M.J., Madsen, J.R. & Kocsis, B. (2003) Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.*, **23**, 10897–10903.
- Canto, C.B., Wouterlood, F.G. & Witter, M.P. (2008) What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast.*, **2008**, 381243.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A. & Tessier-Lavigne, M. (1998) Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class iii semaphorins. *Neuron*, **21**, 1283–1290.
- Chrobak, J.J., Lörincz, A. & Buzsáki, G. (2000) Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus*, **10**, 457–465.
- Del Rio, J.A. & Soriano, E. (2010) Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat. Protoc.*, **5**, 217–226.
- Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano, E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, **385**, 70–74.
- Easter, S.S., Purves, D., Rakic, P. & Spitzer, N.C. (1985) The changing view of neural specificity. *Science*, **230**, 507–511.
- Feiner, L., Webber, A.L., Brown, C.B., Lu, M.M., Jia, L., Feinstein, P., Mombaerts, P., Epstein, J.A. & Raper, J.A. (2001) Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development*, **128**, 3061–3070.
- Freund, T.F. & Antal, M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, **336**, 170–173.
- Frotscher, M. & Léránth, C. (1986) The cholinergic innervation of the rat fascia dentata: identification of target structures on granule cells by combining choline acetyltransferase immunocytochemistry and Golgi impregnation. *J. Comp. Neurol.*, **243**, 58–70.
- Goodman, C.S. (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 341–377.
- Gulyás, A.I., Görös, T.J. & Freund, T.F. (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by gabaergic septal afferents. *Neuroscience*, **37**, 31–44.
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T.F. & Varga, V. (2009) GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J. Neurosci.*, **29**, 8094–8102.
- Heimrich, B., Papp, E.C., Freund, T.F. & Frotscher, M. (1996) Regeneration of the GABAergic septohippocampal projection *in vitro*. *Neuroscience*, **72**, 409–417.
- Huang, Z.J. (2009) Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond. *J. Physiol.*, **587**, 1881–1888.
- Huang, Z.J. & Scheffele, P. (2008) GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **18**, 77–83.
- Lu, B., Wang, K.H. & Nose, A. (2009) Molecular mechanisms underlying neural circuit formation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **19**, 162–167.
- Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J.-P., Otsmane, B., Chevalley, S.B., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y. & Lebrand, C.C. (2009)

- Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol.*, **7**, e1000230.
- Pascual, M., Rocamora, N., Acsády, L., Freund, T.F. & Soriano, E. (1998) Expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNAs in hippocampal interneurons: morphological characterization, levels of expression, and colocalization of nerve growth factor and neurotrophin-3. *J. Comp. Neurol.*, **395**, 73–90.
- Pascual, M., Pérez-Sust, P. & Soriano, E. (2004a) The GABAergic septohippocampal pathway in control and reeler mice: target specificity and termination onto reelin-expressing interneurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, **25**, 679–691.
- Pascual, M., Pozas, E., Barallobre, M.J., Tessier-Lavigne, M. & Soriano, E. (2004b) Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. *Mol. Cell. Neurosci.*, **26**, 24–33.
- Pascual, M., Pozas, E. & Soriano, E. (2005) Role of class 3 semaphorins in the development and maturation of the septohippocampal pathway. *Hippocampus*, **15**, 184–202.
- Prinz, P.N., Vitaliano, P.P., Vitiello, M.V., Bokan, J., Raskind, M., Peskind, E. & Gerber, C. (1982) Sleep, EEG and mental function changes in senile dementia of the Alzheimer's type. *Neurobiol. Aging*, **3**, 361–370.
- Rocamora, N., Pascual, M., Acsády, L., de Lecea, L., Freund, T.F. & Soriano, E. (1996) Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J. Neurosci.*, **16**, 3991–4004.
- Shen, K. & Cowan, C.W. (2010) Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a001842.
- Song, H.-J. & Poo, M.-M. (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nat. Cell Biol.*, **3**, E81–E88.
- Spitzer, N.C. (2004) Coincidence detection enhances appropriate wiring of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5311–5312.
- Stewart, M. & Fox, S.E. (1991) Hippocampal theta activity in monkeys. *Brain Res.*, **538**, 59–63.
- Super, H. & Soriano, E. (1994) The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J. Comp. Neurol.*, **344**, 101–120.
- Tago, H., Kimura, H. & Maeda, T. (1986) Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**, 1431–1438.
- Tesche, C.D. & Karhu, J. (2000) Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 919–924.
- Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science*, **274**, 1123–1133.
- Tóth, K., Freund, T.F. & Miles, R. (1997) Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J. Physiol.*, **500**, 463–474.
- Waites, C.L., Craig, A.M. & Garner, C.C. (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 251–274.
- Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S.-M., Xiong, Z.-Q. & Ding, Y.-Q. (2007) Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J. Neurosci.*, **27**, 11334–11342.
- Woolf, N.J., Eckenstein, F. & Butcher, L.L. (1984) Cholinergic systems in the rat brain: I. Projections to the limbic telencephalon. *Brain Res. Bull.*, **13**, 751–784.

Resultados - II

Envejecimiento acelerado de la conexión GABAérgica septohipocámpica y disminución de ritmos hipocámpales en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer

Sara E. Rubio^{a,b,c}, Germán Vega-Flores^d, Albert Martínez^{a,b,c}, Carles Bosch^{a,b,c}, Alberto Pérez-Mediavilla^{c,e}, Joaquín del Río^{c,e}, Agnès Gruart^d, José María Delgado-García^d, Eduardo Soriano^{a,b,c}, Marta Pascual^{a,b,c}

^a Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo y de la Regeneración Neuronal, Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB), E-08028 Barcelona, España.

^b Departamento de Biología Celular, Universidad de Barcelona, E-08028 Barcelona, España.

^c Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIH), España.

^d División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide, E-41013 Sevilla, España.

^e División de Neurociencias, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) Universidad de Navarra, E-31080 Pamplona, España.

RESUMEN

Los pacientes de enfermedad de Alzheimer (EA) muestran alteraciones en el funcionamiento de las redes corticales, incluidos patrones de actividad sincrónica alterados y un déficit grave en la innervación colinérgica septohipocámpica (SH). No obstante, se desconocen en gran medida los mecanismos que subyacen a estas alteraciones, así como la implicación del componente GABAérgico SH en EA. La conexión GABAérgica septohipocámpica (GSHP, siglas en inglés de *GABAergic septohippocampal pathway*) regula la actividad sincrónica en hipocampo ya que controla la actividad de las interneuronas. En este estudio se demuestra, mediante experimentos bien caracterizados de trazado de la conexión, que la innervación por parte de la GSHP disminuye durante el envejecimiento normal. Además, en un modelo murino de EA (*hAPP_{Sw,Ind}*; cepa J20), la disminución de esta conexión es más acentuada y prematura, en individuos de 8 meses de edad. Este declive no está causado por una pérdida de neuronas, sino por una reducción en el número y complejidad de los terminales axónicos de la GSHP en hipocampo. Por último, se demuestra que la potencia de los ritmos theta y gamma hipocámpicos está notablemente disminuida en los ratones de 8 meses no anestesiados que expresan el gen *hAPP* mutado. Junto con la reconocida pérdida de innervación colinérgica en el hipocampo en AD, estos datos sugieren que algunas de las alteraciones en los patrones de

actividad sincrónica presentes en pacientes de EA podrían estar causados por la pérdida de axones GSHP, que modulan a su vez la actividad de las redes hipocámpicas.

Este manuscrito ha sido publicado en la revista *The FASEB Journal*:

Rubio SE, Vega-Flores G, Martínez A, Bosch C, Pérez-Mediavilla A, Del Río J, Gruart A, Delgado-García JM, Soriano E, Pascual M. *Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease*. FASEB J. 2012 Nov; published online before print July 26, 2012. DOI: 10.1096/fj.12-208413

Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease

Sara E. Rubio,^{*,†,‡} Germán Vega-Flores,[§] Albert Martínez,^{*,†,‡} Carles Bosch,^{*,†,‡}
Alberto Pérez-Mediavilla,^{‡,||} Joaquín del Río,^{‡,||} Agnès Gruart,[§]
José María Delgado-García,[§] Eduardo Soriano,^{*,†,‡} and Marta Pascual^{*,†,‡,1}

^{*}Developmental Neurobiology and Regeneration Laboratory, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain; [†]Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; [‡]Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain; [§]Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, Seville, Spain; and ^{||}Division of Neurosciences, Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

ABSTRACT Patients with Alzheimer's disease (AD) display altered functioning of cortical networks, including altered patterns of synchronous activity and a serious deficit in cholinergic septohippocampal (SH) innervation. However, the mechanisms underlying these alterations and the implication of the GABAergic SH component in AD are largely unknown. In addition, the GABAergic septohippocampal pathway (SHP) is believed to regulate synchronous hippocampal activity by controlling the activity of interneurons. Here we show, using well-characterized pathway tracing experiments, that innervation of the GABAergic SHP decreases during normal aging. Furthermore, in an AD mouse model (hAPP^{Sw,Ind}; J20 mice), the GABAergic SHP shows a dramatic and early onset of this decrease in 8-mo-old mice. This decline is not caused by neuronal loss, but by the reduced number and complexity of GABAergic SH axon terminals. Finally, we demonstrate that hippocampal θ and γ rhythm power spectra are markedly diminished in 8-mo-old behaving mice expressing mutated hAPP. In addition to the well-known loss of cholinergic input to the hippocampus in AD, these data suggest that the altered patterns of synchronous activity seen in patients with AD could be caused by the loss of GABAergic SH axons, which modulate hippocampal network activities.—Rubio, S. E., Vega-Flores, G., Martínez, A., Bosch, C., Pérez-Mediavilla, A., del Río, J., Gruart, A., Delgado-García, J. M., Soriano, E., Pascual, M. Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased

hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 26, 000–000 (2012). www.fasebj.org

Key Words: θ rhythm • J20 mice • medial septum

THE MOST TYPICAL NEUROPATHOLOGICAL hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are amyloid- β (A β) deposits and Tau tangles. However, one of the earliest manifestations of this disease is the progressive deterioration of the cholinergic component of the basal forebrain system, including the medial septum/diagonal band of Broca (MS/DB) and the nucleus basalis magnocellularis (NBM), and thus of the cholinergic input to the cerebral cortex, including the hippocampal complex (1–3). This phenomenon has been described during normal aging in experimental animals, and several abnormalities in the cholinergic system have also been reported in aged human brains (4–6). Moreover, it is believed that reduced function of the cholinergic septohippocampal pathway (SHP) may underlie early impairment of hippocampus-based episodic memory. Indeed, pharmacological intervention of the cholinergic neurotransmitter system (*e.g.*, cholinesterase inhibitors) is used to treat early AD symptoms (7).

In addition to the cholinergic pathway, the SHP has a second important component, the GABAergic SHP. This inhibitory pathway terminates specifically on GABAergic hippocampal interneurons (8, 9), which, in turn, control the activity of pyramidal neurons. It has been proposed that activation of GABAergic SHP neurons leads to the selective inhibition of inhibitory interneurons, thereby allowing the synchronous activa-

Abbreviations: A β , amyloid- β ; AD, Alzheimer's disease; BDA, biotinylated dextran amine; CALR, calretinin; DB, diagonal band of Broca; FAD, familial Alzheimer's disease; GAD65/67, glutamic acid decarboxylase isoforms 65 and 67; hAPP, human amyloid precursor protein; MS, medial septum; NBM, nucleus basalis magnocellularis; PARV, parvalbumin; SH, septohippocampal; SHP, septohippocampal pathway; WT, wild type

¹ Correspondence: Developmental Neurobiology and Regeneration Laboratory, Institute for Research in Biomedicine, Baldiri i Reixac, 10, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: marta.pascual@irbbarcelona.org
doi: 10.1096/fj.12-208413

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

tion of large numbers of pyramidal neurons (10, 11). Thus, the GABAergic SHP may provide correct levels of excitation as well as regulate synchronous neuronal activities, including the θ and γ rhythms (12, 13). The θ rhythm is involved in visuospatial processing and the storage and retrieval of information in the hippocampus (14, 15).

Recent studies have reported altered rhythmic activity in human patients affected by AD and in animal models of this disease (16, 17). For instance, there is evidence of visuospatial deficits (18) and increased excitability (19, 20) in patients with AD. These processes are associated with θ oscillations, which are believed to depend strongly on the GABAergic SHP (12, 13). Thus, herein we examined whether this pathway presents alterations in AD mouse models that could underlie these aberrant network activities. First, we show that innervation of the GABAergic SHP decreases during normal aging. Second, our data indicate that the GABAergic SHP in mice of the J20 mouse line, an AD model expressing human amyloid precursor protein (hAPP) carrying Swedish and Indiana mutations (21, 22), presents an early decrease in innervation; this reduction is not caused by neuronal loss, but by reduced complexity of GABAergic SHP axons. In agreement with these data, we demonstrate that θ and γ rhythms are decreased in J20 transgenic mice at the age at which histological deficits are detected.

MATERIALS AND METHODS

Animals

For the histological procedures, we used wild-type (WT) male mice (C57BL/6J strain; 2–3, 8–9, and 18 mo old; $n=3-5$ /group) and hemizygous transgenic male mice expressing hAPP carrying the Swedish and Indiana familial Alzheimer disease (FAD) mutations (J20 line; 2 and 8–9 mo old; $n=5$ /group). For the electrophysiological studies, 2- and 8–9-mo-old transgenic ($n=6$) and nontransgenic ($n=9$) mice from the J20 strain were used. All animals were kept on a 12-h light-dark schedule with access to food and water *ad libitum*. All the experiments using animals were performed in accordance with the European Community Council Directive and the U.S. National Institute of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Experiments were also approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA), University of Barcelona (Barcelona, Spain), and the ethics committee of Pablo de Olavide University (Seville, Spain).

Detection of septohippocampal (SH) fibers

Animals were deeply anesthetized [mixture 10:1 Ketolar (Parke-Davis Veterinary, Pontypool, UK)/Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany), 0.003 ml/g] and stereotactically injected with an anterograde tracer [10% biotinylated dextran-amine (BDA), 10,000 MW; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA] in the MS/DB complex. Each animal received midline injections of the tracer into the MS/DB complex at one or two anteroposterior (AP) levels, and at two dorsoventral (DV) injection points by iontophoresis (7 μ A positive

direct current, 7 s on–off cycle). Stereotactic coordinates were (from Bregma): AP + 0.7 (in the case of single AP levels) or AP + 0.5 and + 0.9 (in the case of two AP levels), and DV –3.0 and –3.7. This protocol results in intense BDA labeling in the MS/DB complex area, which contains the highest proportion of GABAergic SH neurons (23). After 5 or 6 d, the animals were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer. The brains were frozen, and 30- μ m sections were cut. Coronal sections were stored in a cryoprotectant solution (30% glycerol, 30% ethylene glycol, and 40% 0.1 M phosphate buffer) at –20°C until use. After blocking, BDA was visualized by incubating the sections overnight at 4°C with the ABC complex (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:100. Peroxidase activity was developed with diaminobenzidine intensified with nickel ammonium sulfate and cobalt chloride (DAB/Ni-Co), and H₂O₂. Thereafter, sections were mounted onto gelatinized slides, Nissl stained, and coverslipped with Eukitt. We considered only the BDA-injected mice that displayed a strong uptake of the tracer in the MS for this study.

Immunodetection of neuronal populations

Some hippocampal sections from each of the iontophoretically injected animals were processed for the double immunodetection of BDA and several interneuronal markers (23, 24). After blocking, free-floating sections of the tissue were incubated overnight at 4°C with the ABC complex (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories) diluted 1:100 simultaneously with well-characterized rabbit polyclonal antibodies (Swant Antibodies, Marly, Switzerland) against parvalbumin (PARV; 1:3000) or calretinin (CALR; 1:1000), or glutamic acid decarboxylase isoforms 65 and 67 (GAD65/67; 1:1000; Chemicon International, Temecula, CA, USA). BDA was revealed using DAB/Ni-Co, yielding a black end product in SH fibers. Primary antibodies were then visualized by sequential incubation with biotinylated secondary antibodies and the ABC complex (2 h each; Vector Laboratories). The peroxidase reaction was developed with DAB to produce a brown end product. The sections were mounted onto gelatinized slides, dehydrated, and coverslipped with Eukitt.

For double immunofluorescent detection of BDA and PARV, after blocking, the sections were incubated overnight with anti-PARV antibody. Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was incubated for 2 h in the presence of streptavidin-fluorescein (1:200, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The sections were mounted onto slides and coverslipped with Mowiol 4-88 (Merck, Darmstadt, Germany). Images were acquired with a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and processed with ImageJ software (Rasband, W. S.; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Sections corresponding to the MS were used for fluorescent immunodetection of PARV. After blocking, tissue was incubated overnight with anti-PARV antibody and then incubated with Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen). The sections were mounted, coverslipped with Mowiol 4-88, and imaged as described above.

Electron microscopy

Adult (8-mo-old) J20 ($n=2$) and WT male mice ($n=3$) were perfused with 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer. Brains were fixed in the same solution overnight. Tissue slices were obtained and BDA detection was performed as described above, except that the entire procedure was performed at 4°C. Thereafter, slices

were transferred to 2% osmium tetroxide, stained with 2% uranyl acetate, dehydrated, and finally embedded in Araldite. Ultrathin sections from hippocampi were collected on Formvar-coated slot grids and stained with lead citrate. Stained boutons contacting cell bodies of hippocampal interneurons were identified and photographed.

Analysis of the histological sections

Microscopic observations were focused on sections corresponding to the MS and to dorsal (sections between 1.60 and 2.30 mm posterior to Bregma) and ventral (sections 2.90 and 3.40 mm posterior to Bregma) hippocampal levels, following the atlas reported by Paxinos and Franklin (25).

To estimate the density of GABAergic SH neurons, PARV-immunopositive cells in the MS/DB complex were hand counted under a fluorescent optical microscope (Nikon E600; Nikon Corp., Kawasaki, Japan) in serial sections of the brain from animals of the different groups (2-, 8-, and 18-mo-old WT mice, and 2- and 8-mo-old J20 mice, $n=4-8$ animals/genotype and age; 3-5 sections/animal) and the results were expressed as number of PARV-immunopositive cells in the MS/DB area.

To estimate the density of hippocampal interneurons and the percentage of these cells contacted by GABAergic SH fibers, the density of interneurons containing PARV or CALR, as well as the percentage of these interneurons receiving the BDA⁺ pericellular basket, was calculated in the entire hippocampal area of each section (3-5 animals/genotype and age, 4-8 sections/animal). The hippocampal area of each section considered above was quantified with CellF software (Olympus). The density of hippocampal interneurons was defined as the density of interneurons per square millimeter. Each harvested single section contained 52-321 PARV⁺ interneurons and 78-755 CALR-immunoreacted interneurons.

A similar procedure was performed for GAD65/67-immunopositive cells, except that, due to the very large number of GAD65/67⁺ cells, we selected several sample areas for each single section. The selected samples (125- μ m-wide stripes) contained all hippocampal layers (perpendicularly from the ventricle to the pial surface) and for each section included 1 stripe in the dentate gyrus, 2 in the CA3 area, and 3 in the CA1 region. For GAD65/67 quantification, 3-5 animals/genotype and age were used, and 4-8 sections/animal were analyzed. Data were represented as above (density of interneurons per square millimeter).

To assess the complexity of the GABAergic SH contacts, the numbers of synaptic boutons around the somata of hippocampal interneurons were counted for each interneuron subclass in the same sections and procedure as above.

Statistical analysis of histological data

For the statistical analysis, we estimated the densities of GABAergic SH (PARV-immunopositive) cells per section for each mouse. For each hippocampal interneuronal population studied (PARV⁺, CALR⁺, or GAD65/67-immunopositive neurons), the density of interneurons per square millimeter, percentage of contacted interneurons, and number of boutons per single basket were estimated for each hippocampal area.

Histological data were processed for statistical analysis with StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). Overall comparisons (1-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests) and *post hoc* 2-sample Student's *t* test (2-tailed) or Mann-Whitney *W* test (2-tailed) were used (when the samples fitted a normal distribution or not, respectively) to examine differences between the experimental groups. The significance was set at $P < 0.05$ for the 2-tailed tests.

Surgery for chronic recording experiments

The 2- and 8-mo-old WT and J20 mice were anesthetized with 0.8-3% halothane delivered from a calibrated Fluotec 5 vaporizer (Fluotec-Ohmeda, Tewksbury, MA, USA) at a flow rate of 1-4 L/min oxygen. Animals were implanted with a recording electrode aimed at the ipsilateral stratum radiatum underneath the CA1 area (1.2 mm lateral and 2.2 mm posterior to Bregma; depth from brain surface, 1.0-1.5 mm; ref. 25). These electrodes were made of 50- μ m Teflon-coated tungsten wire (Advent Research Materials Ltd., Eynsham, England). A bare silver wire (0.1 mm) was affixed to the skull as a ground. The wires were connected to a 6-pin socket, and the socket was fixed to the skull with the help of two small screws and dental cement (see ref. 26 for details).

Recording procedures

The electroencephalographic (EEG) field activity of the CA1 area was recorded with the help of Grass P511 differential amplifiers. EEG recordings were carried out with the awake animal placed either in a small (5 \times 5 \times 5 cm) box to prevent walking movements or in a large (20 \times 15 \times 15 cm) box in which the animal could move freely. Recordings were carried out for 20 min, from which up to 5 min of recording free of unwanted artifacts were selected for spectral analysis.

Data analysis of the electrophysiological experiments

Hippocampal activity was stored digitally on a computer through an analog/digital converter (CED 1401 Plus; CED, Cambridge, UK), at a sampling frequency of 11-22 kHz and an amplitude resolution of 12 bits. Commercial computer programs (Spike 2 and SIGAVG; CED) were modified to represent recordings.

The power spectrum of the hippocampal EEG activity during recording sessions was computed with the help of the Mat Lab 7.4.0 software (MathWorks, Natick, MA, USA), using the fast Fourier transform with a Hanning window, expressed as relative power and averaged across each session. This average was analyzed and compared using the wide-band model, considering the following bands: δ (<4 Hz), θ (4.1-8 Hz), α (8.1-12 Hz), β (12.1-26 Hz), and γ (26.1-100 Hz) (27).

Data were processed for statistical analysis using the Sigma Plot 11.0 for Windows package (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Two-way ANOVA and nonparametric statistical tests (Mann-Whitney rank sum test) allowed checking the statistical differences between groups.

RESULTS

GABAergic SH innervation is decreased during normal aging

To trace the GABAergic SHP, we performed iontophoretic injections of BDA in the MS, following a protocol that virtually fills the MS/DB complex with tracer (Fig. 1A, B; ref. 23). As shown previously (8, 24, 28), SH axons innervated all layers in the hippocampus and dentate gyrus, and two types of fibers were clearly distinguished: thin axons with numerous "en passant" boutons, corresponding to cholinergic fibers, and thick GABAergic axons that established complex basket-like nets with large boutons around the perisomatic region

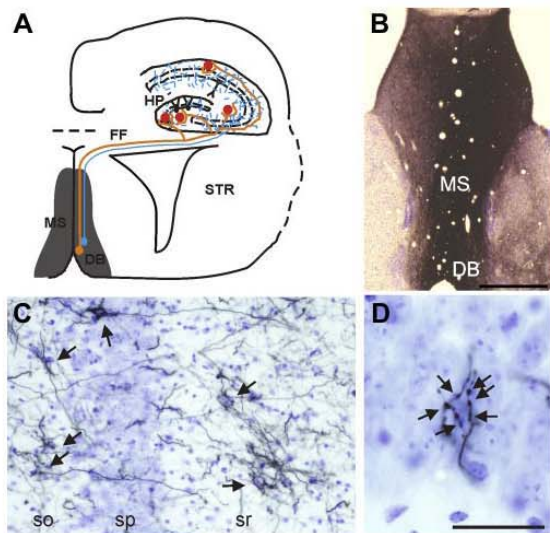


Figure 1. The GABAergic SHP connection originates in the MS and innervates hippocampal interneurons by forming complex baskets. Injection of biotinylated dextran-amine in the MS results in a strong labeling of SH axons in the hippocampus (HP). *A*) While cholinergic axons (blue) innervate all types of hippocampal neurons, GABAergic axons (orange) establish contact only with interneurons (red circles). FF, fimbria-fornix; STR, striatum. *B*) Photomicrograph of a Nissl-stained section shows the site of injection of BDA in the MS/DB complex. *C*) Some septal fibers forming baskets (arrows) are present in or close to the stratum pyramidale (sp) in the CA3 region of the hippocampus. so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. *D*) Septal synaptic contacts (arrows) are arranged forming a characteristic basket around the somatic region of a neuron in the pyramidal cell layer. Scale bars = 500 μ m (*B*); 100 μ m (*C*; bar in *B*); 20 μ m (*D*).

of hippocampal neurons scattered throughout all hippocampal layers (Fig. 1*C, D*). To characterize the SH fibers filled with BDA, we performed a double immunodetection of the tracer with either a GABAergic (GAD65/67) or a cholinergic (ChAT) marker in the hippocampi of 8-mo-old WT mice (see Supplemental Data). BDA filled thick fibers and large boutons, forming perineuronal baskets that did not colocalize with ChAT immunostaining. In contrast, large BDA-labeled boutons composing baskets were GAD65/67 positive (Supplemental Fig. S1). These results demonstrate the GABAergic nature of the axonal terminals examined in this study.

Recent studies have shown substantial fiber and synaptic loss of cholinergic SHP fibers during aging (5, 6, 29). To our knowledge, the GABAergic SHP component has been studied mostly in young adult rodents. To address whether the GABAergic SHP is altered during normal aging, we compared young adult (2-mo-old), adult (8-mo-old), and aged (18-mo-old) mice. The GABAergic SHP termination showed decreased complexity in aged mice, with fewer basket-like nets and reduced numbers of boutons (Fig. 2*A, B, E, G*). To confirm this finding, sections were immunolabeled

simultaneously for axons and for their GABAergic targets (GAD65/67 immunostaining), and the sections were quantitatively evaluated. No statistical differences were observed either in the percentage of GAD65/67⁺ neurons innervated by SHP fibers or in the complexity (number of boutons/basket) of the innervation between the 2- and 8-mo-old groups (Fig. 3). The percentage of GAD65/67⁺ hippocampal neurons contacted by GABAergic SHP boutons was significantly reduced (60%) in 18-mo-old hippocampi, compared to 2-mo-old mice ($W=12.0$; $P<0.028$, Mann-Whitney W test; Figs. 2*C, D, F, H* and 3*A*). However, although there was a clear downward trend, no statistical differences were detected in the complexity (number of boutons per target GAD65/67⁺ neuron) between aged mice (average 5.78 ± 0.87) and young adult (average 7.19 ± 0.38) or adult specimens (average 7.91 ± 0.66) (Fig. 3*B*).

To study whether this decrease affected the subsets of

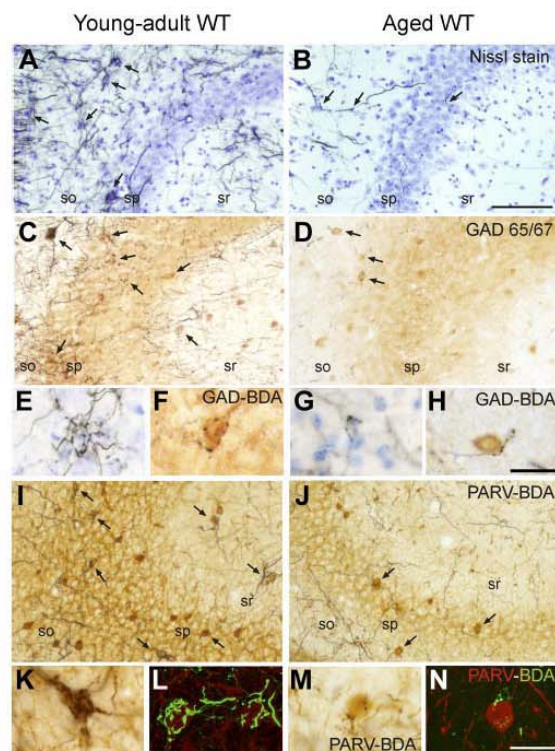


Figure 2. GABAergic SHP during normal aging. The detection of the septal fibers (BDA, black) is combined with Nissl staining, GAD65/67 or PARV immunostaining (brown) in the hippocampus. *A–D, I, J*) Septal innervation of the CA3 area in young adult (*A, C, I*) and aged mice (*B, D, J*). Some SH baskets are indicated by arrows (*A, B*). so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. *E–H, K–N*) Higher-magnification photomicrographs show single baskets in young adult (*E, F, K*) and aged mouse (*G, H, M*) tissue sections stained with Nissl, or GAD65/67 or PARV immunostaining. Confocal micrographs illustrate the complexity of the baskets (green) on PARV⁺ cells (red) from young adult (*L*) and aged (*N*) mice. Scale bars = 100 μ m (*A–D, I–J*); 25 μ m (*E–H*); 25 μ m (*K–N*).

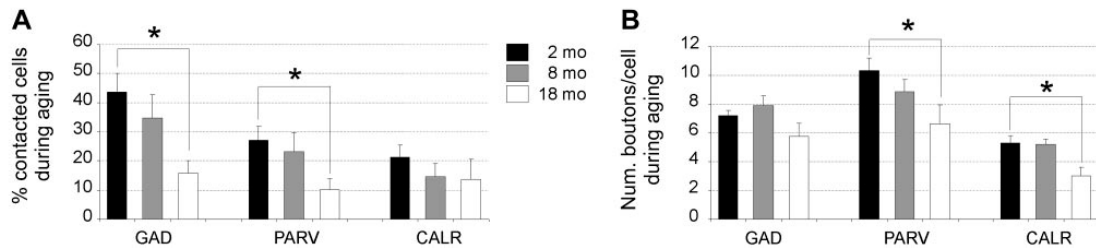


Figure 3. GABAergic SHP input on interneuron populations decreases during normal aging. Percentage of hippocampal interneurons contacted by septal GABAergic afferents (A) and the number of boutons per neuron (B) were quantified for GAD65/67 (GAD)⁺, PARV⁺, and CALR⁺ populations during normal aging. The percentage of contacted GAD65/67⁺ and PARV⁺ neurons and the number of boutons per PARV⁺ and CALR⁺ target neuron was diminished in aged compared to young adult mice. Data represent means \pm SE for each experimental group. * $P < 0.05$.

target hippocampal interneurons, we next used two additional markers, CALR and PARV antibodies, which label interneuron-selective 1 (IS-1) interneurons, and basket and axo-axonic interneurons, respectively (30, 31). In aged mice, the percentage of PARV⁺ cells contacted by GABAergic SHP baskets was significantly lower than in young adult (*i.e.*, 2-mo-old) mice ($t=2.64$; $P<0.022$, Student's *t* test; Figs. 2I, J and 3). Thus, in 2-mo- and 8-mo-old mice, GABAergic septal axons formed dense innervations with the perisomatic region of the PARV⁺ hippocampal interneurons (Fig. 2K, L). In contrast, the number of boutons per target PARV⁺ neuron was reduced in aged mice [average 6.63 ± 1.30 (18 mo) *vs.* 10.31 ± 0.86 (2 mo) and 8.86 ± 0.87 (8 mo); $t=2.44$; $P<0.031$, Student's *t* test; Figs. 2M, N and 3B]. A similar decrease was observed in the density of boutons innervating CALR⁺ interneurons in 18-mo-old mice (average 2.98 ± 0.61) compared to 2-mo-old mice (average 5.29 ± 0.53 ; $t=2.658$; $P<0.018$, Student's *t* test), whereas there was a nonsignificant decrease in the percentage of CALR⁺ neurons contacted (Fig. 3).

Taken together, these data show that GABAergic SH innervation is reduced during normal aging. Moreover, this age-dependent decrease is more dramatic for PARV⁺ basket and axo-axonic interneurons.

Transgenic mice expressing mutated hAPP show an accelerated decrease in the GABAergic SHP

To explore the organization of the GABAergic SHP in AD mouse models, we injected BDA into the MS/DB complex of WT adult (8-mo-old) mice and adult (8-mo-old) mice carrying mutations in the hAPP gene (J20 line; ref. 21). The GABAergic SHP was recognizable in these transgenic animals, in which septal axons formed complex baskets around the perisomatic region of several types of hippocampal interneurons (Fig. 4A, B). Double immunodetection of BDA and PARV showed that the complexity (number of boutons per target neuron) of the GABAergic SHP contacts on PARV⁺ interneurons was lower in 8-mo-old J20 animals (average 5.63 ± 0.61) than in WT age-matched controls (8.86 ± 0.87 , Fig. 4C–F). Furthermore, electron microscopy confirmed that these GABAergic SHP boutons

established multiple symmetric inhibitory synaptic contacts on the cell bodies of hippocampal interneurons in J20 mice. The morphology of these contacts was indistinguishable from that observed in WT age-matched controls (Fig. 4G–L).

To examine whether mice overexpressing mutated hAPP showed alterations in the GABAergic SHP during the development of the disease, 2- and 8-mo-old J20 mice were traced with BDA and subjected to a quantitative evaluation as above. Young adult J20 mice exhibited a pattern of GABAergic SHP innervation that was indistinguishable from that observed in WT mice (Fig. 5A, C, D), with similar percentages of interneurons contacted and similar numbers of boutons per single neuron; this held true for all the interneuronal markers used (GAD65/67, PARV and CALR; Figs. 3A, B and 5G, H). In contrast, a dramatic decrease in the density of the GABAergic SHP innervation was already observed in 8-mo-old J20 mice (Fig. 5B, E, F); thus, the percentage of contacted interneurons was significantly decreased ($t=2.39$; $P<0.03$, Student's *t* test for GAD65/67; $W=10.0$; $P<0.009$, Mann-Whitney *W* test for PARV and $W=5.0$; $P<0.006$, Mann-Whitney *W* test for CALR; Fig. 5G) and, for all types of interneurons analyzed, the number of boutons per target neuron was significantly diminished ($P<0.01$, Student's *t* test and Mann-Whitney *W* test; Fig. 5H). We thus conclude that the GABAergic SHP is reduced in 8-mo-old J20 mice expressing mutated hAPP.

No major loss of GABAergic neurons in the MS/DB and hippocampus during aging and in J20 mice

To explore whether this decrease is related to neuronal loss in the MS/DB complex, the GABAergic PARV-immunopositive SHP neurons were quantified in the septum (32). Although our results showed a downward trend in the number of PARV-immunoreactive cells in the MS of 18-mo-old WT mice, statistical analyses indicated that the density of GABAergic SHP neurons remained constant for all groups of WT and J20 mice ($K=5.59$; $P>0.23$, Kruskal-Wallis test; Fig. 6A–C).

Similarly, we analyzed the density of hippocampal interneurons, the specific targets of GABAergic SHP

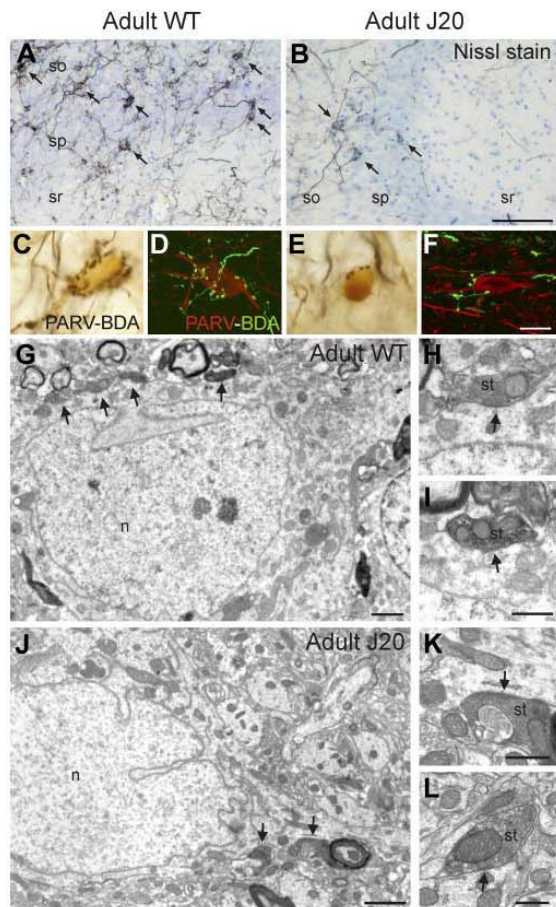


Figure 4. Accelerated decrease in the GABAergic SHP input in a mouse model of AD. *A, B*) Detection of septal fibers (black) in a Nissl-stained hippocampus of WT (*A*) and J20 (*B*) adult mice. Arrows indicate some SH baskets. so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. *C, E*) Complexity of the baskets was assessed by combining BDA detection (black) with PARV immunostaining (brown). *D, F*) Confocal photomicrographs of double immunofluorescent detection of the tracer (green) and PARV (red) showed a significant reduction in the number of boutons per target neuron in J20 mice (*F*) compared with WT mice (*D*). *G–L*) Electron micrographs illustrate ultrastructural features of GABAergic SH baskets in WT (*G–I*), which are preserved in J20 (*J–L*) adult mice. Arrows indicate some BDA-containing boutons. n, nucleus; st, synaptic terminal. *H, I, K, L*) Detail of the symmetrical synaptic contacts (arrows) on the soma of hippocampal interneurons. Scale bars = 100 μm (*A, B*); 10 μm (*C–F*); 1 μm (*G, J*); 500 nm (*H, I, K, L*).

fibers, in 2-, 8-, and 18-mo-old WT mice and in 2- and 8-mo-old J20 mice. The population of hippocampal interneurons immunoreactive for GAD65/67, PARV, and CALR was also constant at all ages in WT and J20 mice, except for a decrease in CALR⁺ neurons in aged WT animals ($K=10.99$; $P<0.03$, Kruskal-Wallis test); *post hoc* analyses showed this decrease was significant in 18-mo-old compared to 2- and 8-mo-old WT mice

($W=14.0$; $P<0.045$, Mann-Whitney W test and $t=2.53$; $P<0.023$, Student's t test; Fig. 6*D–L*). These data indicate that the reduction in innervation of the GABAergic SHP in 18-mo-old WT mice and in 8-mo-old J20 mice is not related to neuronal loss, but rather reflects decreased axonal and perisomatic basket complexity.

Behaving transgenic adult mice expressing mutated hAPP present lower hippocampal θ and γ rhythms

As the SHP is believed to have a significant effect on hippocampal network activity (12) and this is altered in 8-mo-old J20 mice, we next examined whether the accelerated loss of the GABAergic SHP in this model is accompanied with oscillatory network activities of hippocampal circuits recorded in behaving mice with chronically implanted electrodes (33). Field hippocampal activity was recorded with animals placed in small or large boxes to determine the contribution of overt motor activities to the power spectra of the bands (δ , θ , α , β , and γ). The θ and γ rhythms of adult WT mice were better defined to the naked eye than those of adult J20 mice in both experimental situations (Fig. 7*A–D*). Spectral analysis showed that the θ and γ bands had significantly ($P=0.02$, Mann-Whitney rank sum test) greater spectral power in WT than in J20 mice for the

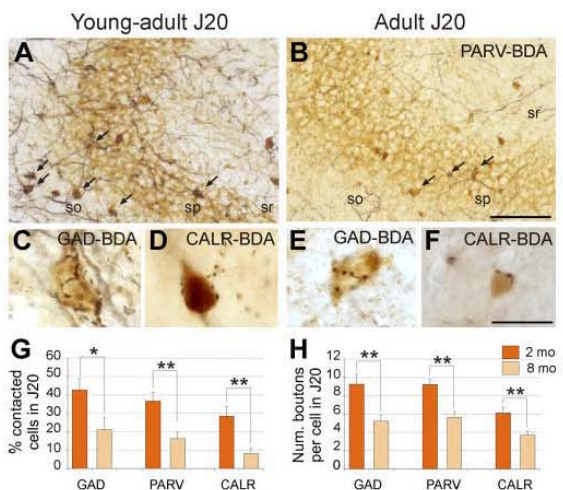


Figure 5. J20 transgenic mice show an accelerated decrease in the GABAergic SHP. Detection of the septal fibers (black) is combined with PARV, GAD65/67 (GAD) or CALR immunostaining (brown) in the hippocampus. *A, B*) Lower-magnification photomicrographs demonstrate the septal innervation of the CA3 area in young adult (*A*) and adult (*B*) J20 mice. Arrows indicate some SH baskets. so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. *C–F*) Higher-magnification photomicrographs show baskets on interneurons in young adult (*C, D*), and adult (*E, F*) J20 mice. *G, H*) Percentage of hippocampal interneurons contacted by GABAergic afferents (*G*) and the number of boutons per target of these baskets (*H*) were quantified in J20 mice at different ages. Scale bars = 100 μm (*A, B*); 10 μm (*C–F*). Data represent means \pm SE for each experimental group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

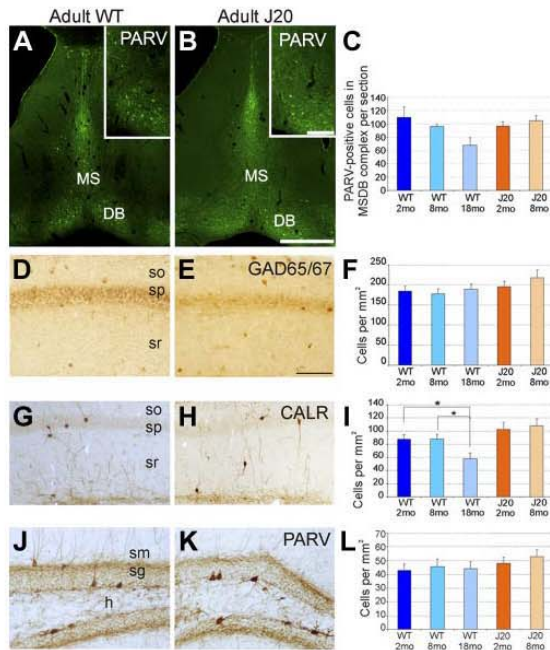


Figure 6. Density of GABAergic SHP neurons and hippocampal interneurons is mainly spared during aging and in AD. *A, B*) Density, distribution, and morphology of GABAergic SHP neurons were assessed by PARV immunofluorescent detection in septal sections from adult WT (*A*) and J20 (*B*) mice. *C*) Density of PARV⁺ cells per section was quantified in all groups. No change was detected in the density, distribution, or general morphology in either group. *D–L*) GAD65/67 (*D, E*), CALR (*G, H*), and PARV (*J, K*) immunohistochemical staining in hippocampal sections from adult WT (*D, G, J*) and J20 (*E, H, K*) mice. Number of GAD65/67⁺ (*F*), CALR⁺ (*I*), and PARV⁺ (*L*) cells per square millimeter was quantified in all groups. There were no differences between groups for any population except for CALR⁺ cells, which were significantly decreased in aged WT animals. so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum; h, hilus. Scale bars = 500 μ m (*A, B*); 100 μ m (*A, B* insets; *D, E, G, H, J, K*). Data represent means \pm SE for each experimental group. * $P < 0.05$.

8-mo-old group, with no significant differences in the other (δ , α , and β) bands (Fig. 7*E*) when the animals were located in the small box. The θ and γ bands also had significantly ($P=0.03$, Mann-Whitney rank sum test) greater spectral power in 8-mo-old WT than in 8-mo-old J20 mice, when the animals were located in a larger box (Fig. 7*E*). The same experimental procedure was carried out for 2-mo-old WT and J20 mice (Fig. 7*F*). No differences were detected in the power spectra of any of the bands between WT and J20 mice in the 2-mo-old group, either in the small or the large box ($P \geq 0.095$, Mann-Whitney rank sum test). These findings suggest that the decrease in the GABAergic SHP observed in 8-mo-old J20 mice correlates with decreased θ and γ rhythm oscillations, and that these differences were not related to the presence or absence of overt motor activities.

DISCUSSION

The present study shows a decrease in the GABAergic SHP during normal aging. Furthermore, this reduction is mimicked and accelerated in transgenic mice carrying mutations in the hAPP gene. Moreover, we demonstrate that these AD model mice display decreased hippocampal θ and γ power spectra.

Loss of the GABAergic SHP in normal aging

There is consistent evidence that aged humans and animals have spatial memory deficits (34–36). Previous studies demonstrate that activity driven by septal neurons is crucial for hippocampus-based spatial memory (37). On the one hand, cholinergic septal neurons and fibers decay during aging (29, 38–40), and compounds enhancing cholinergic neurotransmission improve these cognitive deficits (7, 41). All these data strongly indicate that cholinergic septal neurons are essential to control these behavioral defects. On the other hand, in human aging and AD, a decrease in the expression of proteins implicated in GABAergic neurotransmission has been described (42–44). Here we show that the GABAergic SHP, which is believed to regulate essentially synchronous patterns of activity by selective innervation on GABAergic hippocampal interneurons, is dramatically reduced in aged compared to young adult mouse hippocampi.

Our results also show that the densities of GABAergic SHP neurons in the MS/DB and the population of interneurons in the hippocampus remained largely constant during aging, only the densities of CALR⁺ hippocampal interneurons were diminished in aged mice, as described previously (45, 46). Thus, our data indicate that the reduction in GABAergic SHP innervation is due to synaptic and axonal loss rather than to the degeneration of septal GABAergic projection neurons or the loss of hippocampal interneurons.

Our data also indicate a loss in the number of boutons per target neuron on CALR⁺ interneurons in aged mice. CALR-immunoreactive interneurons contact (and therefore inhibit) GABAergic hippocampal interneurons innervating dendritic segments of pyramidal cells (dendritic inhibitory cells; ref. 47); thus, the reduction in the density of CALR⁺ interneurons, in addition to the decrease in GABAergic SHP inhibition on remaining CALR⁺ cells, may result in diminished modulatory inhibition of pyramidal cells in dendritic segments. Our data also reveal that the reduced SHP innervation occurs on PARV⁺ GABAergic interneurons in the hippocampus, including axo-axonic and basket interneurons. Each of these interneurons has large local axons that are believed to synchronize the firing of hundreds of hippocampal pyramidal neurons (30, 31, 48). Thus, the decrease in the GABAergic SHP observed in aged hippocampi may result in disinhibition of axo-axonic/basket interneurons and therefore in the desynchronization of pyramidal cell network activity.

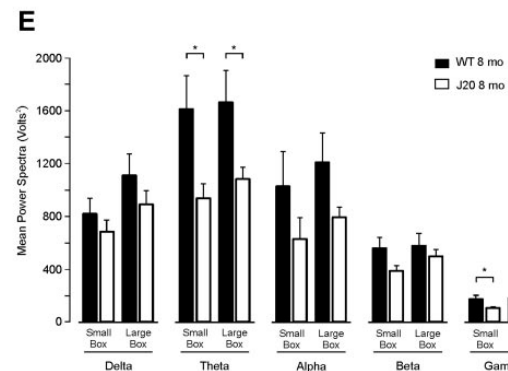
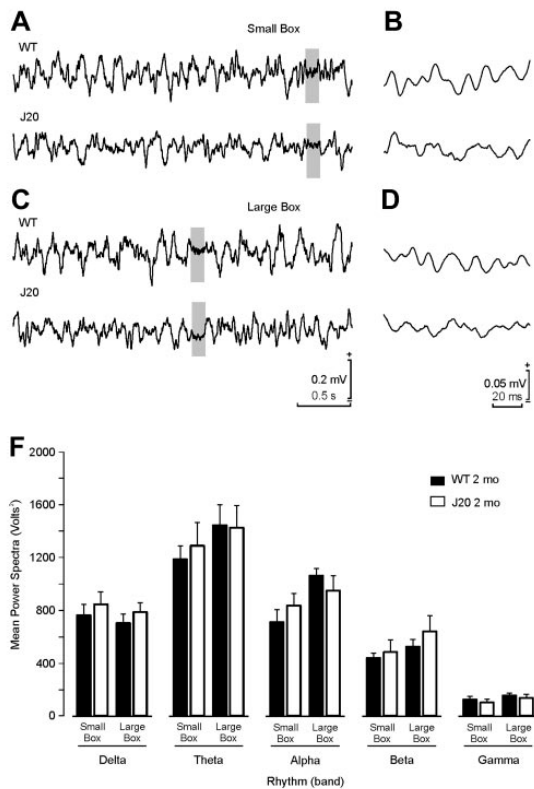


Figure 7. Spectral power distribution of EEG collected from hippocampal pyramidal CA1 areas. *A–D*) Examples of raw field activity recorded in pyramidal CA1 areas from 8-mo-old WT and J20 animals, when located in either a small box (*A, B*) or a large box (*C, D*). Note the different time scales for traces illustrated in panels *A* and *C* vs. those in panels *B* and *D*. Shaded areas in panels *A* and *C* are illustrated in *B* and *D* at a smaller time scale. *E*) Spectral powers were computed from similar records collected from 8-mo-old WT ($n=6$) and J20 ($n=6$) mice. Bar graphs (solid bars, WT; open bars, J20) indicating the mean \pm SE power spectra are displayed for each frequency band. * $P = 0.02$ for data collected in small boxes, $P = 0.03$ for data collected in large boxes; Mann-Whitney rank test. *F*) Note that there were no significant differences for any frequency band when power spectra were analyzed in 2-mo-old WT vs. J20 ($P > 0.095$).

As discussed above, the net effect of the GABAergic SHP is major disinhibition, thereby allowing the activation of pyramidal neurons. Similarly, the cholinergic SHP pathway has an excitatory effect on pyramidal neurons. We propose that both the septal cholinergic and GABAergic systems act coordinately and synergically through distinct circuits to regulate hippocampal synchronous network activity in adult life. Moreover, our data reveal that, in addition to the cholinergic dysfunction, there is a dramatic age-related decay of the GABAergic SHP.

Accelerated loss of the GABAergic SHP and decreased hippocampal rhythms in J20 AD mice

The present study demonstrates a premature, accelerated decline of the GABAergic SHP in 8-mo-old J20 mice. This decline was more dramatic than that observed in aged (18-mo-old) WT mice and, again, implies axonal and synaptic loss without apparent neuronal cell death of septal projection neurons. In addition, our data show that the densities of hippocampal interneurons were unaltered in the hippocampi of 2- and 8-mo-old J20 animals, compared with their littermate controls.

There are contradictory data about the loss of hippocampal interneurons in AD mouse models. As a general rule, interneuronal loss has been found to be mild or absent in transgenic lines expressing only

hAPP-mutated forms (49–51), whereas it is often reported in double-transgenic models expressing both mutated APP and presenilin1/2 or Tau (49,50,52–55). However, our findings support previous studies reporting no neuronal loss in 8-mo-old J20 mice (22).

A β species cause synaptic loss and dysfunction in both cholinergic and glutamatergic synapses by distinct mechanisms, including interaction with glutamatergic and cholinergic receptors (56). We therefore propose that similar synaptic dysfunctions account for the loss of the GABAergic SHP synapses described in the present study. As discussed above, the net effect of a decreased GABAergic SHP would be a reduced inhibition of hippocampal interneurons, which in turn may curtail the synchronous activity of pyramidal neurons (12, 48). In this regard, it is important to emphasize that the most severely affected interneurons; *i.e.*, axo-axonic and basket PARV⁺ cells, are believed to control the firing of large numbers of pyramidal neurons, thus leading to the generation of oscillatory activities in the range of θ and γ frequencies (31, 57, 58). In conjunction with intra- and other extrahippocampal generators known to determine hippocampal θ activity (12), it has been proposed that the GABAergic SHP controls oscillatory activity, particularly through the recruitment of hippocampal interneurons. We found reduced θ and γ power spectra in 8-mo-old J20 mice in the presence or absence of overt motor activities, as described previ-

ously in response to hippocampal A β injection (17). In contrast, 2-mo-old J20 mice, which displayed no alterations of the GABAergic SHP at the histological level, did not show altered rhythmic activity in the hippocampus compared to the WT age-matched mice. This result clearly supports a correlation between an altered GABAergic SHP and a dysfunctional hippocampal rhythmic activity in the range of θ and γ bands in a manner that is not related to the performance of overt motor activities.

In summary, our results demonstrate a previously overlooked alteration of the GABAergic SHP during aging and AD. The integration of histological results with electrophysiological data, showing functional changes in the oscillatory network activities of the hippocampal circuits in J20 mice, indicate that the altered patterns of synchronous activity seen in AD patients and mouse models could be caused, in part, by the loss of GABAergic SH axons, which modulate hippocampal rhythmic activities. Thus, these results, together with the limited success of restorative cholinergic treatments in AD, identify a new target for therapeutic intervention in this disease. **[F]**

The authors thank Natalia Ruiz and Dr. Raudel Sánchez-Campusano for excellent technical support, Tanya Yates for editorial assistance, and the personnel of Advanced Digital Microscopy and Biostatistics and Bioinformatics Facilities at the Institute for Research in Biomedicine for support. This work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain (SAF2008-02342 to A.P.M., BFU2008-03390 to A.G., and BFU2008-00899 to J.M.D.-G); the Unión Temporal de Empresas (UTE) project Foundation for Applied Medical Research (FIMA), Spain (to A.P.M.); the Caixa Catalunya-Obra Social Foundation and the Ministry of Science and Innovation (BFU2008-3980 to E.S.); and Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministry of Science and Innovation (PI08/1891 to M.P.).

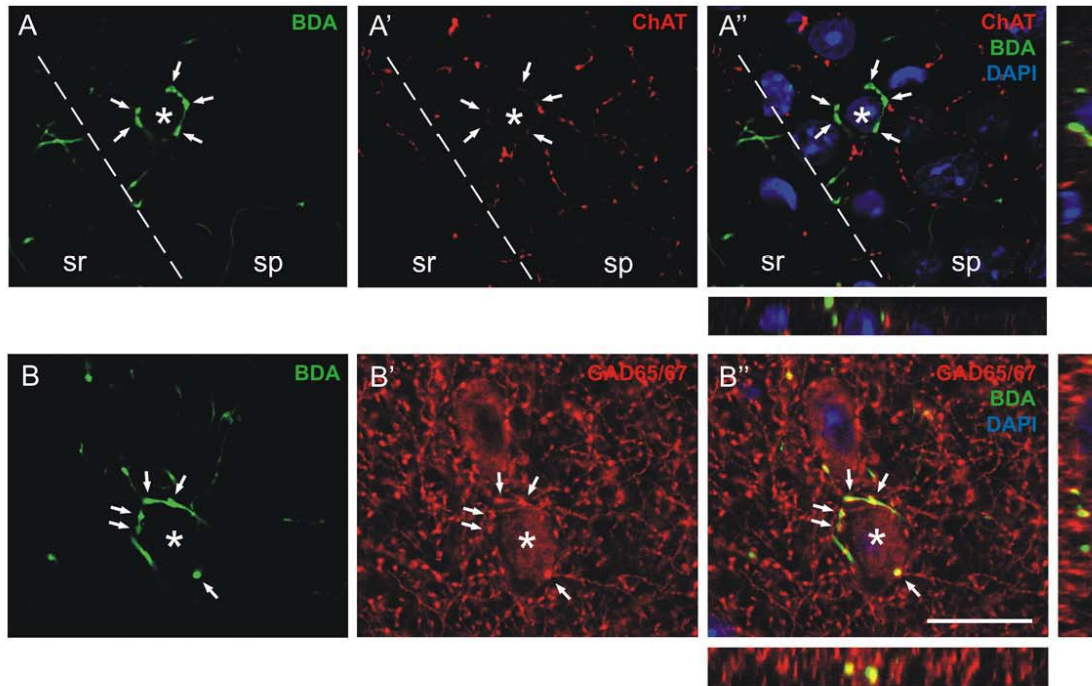
REFERENCES

- Mufson, E. J., Ginsberg, S. D., Ikonovic, M. D., and DeKosky, S. T. (2003) Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J. Chem. Neuroanat.* **26**, 233–242
- Bartus, R. T. (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**, 495–529
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., and Delon, M. R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237–1239
- Muir, J. L. (1997) Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **56**, 687–696
- Schliebs, R., and Arendt, T. (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* **221**, 555–563
- Ypsilanti, A. R., Cirao da Cruz, M. T., Burgess, A., and Aubert, I. (2008) The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. *Neurobiol. Aging* **29**, 1666–1679
- Winkler, J., Thal, L. J., Gage, F. H., and Fisher, L. J. (1998) Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J. Mol. Med.* **76**, 555–567
- Freund, T. F., and Antal, M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **336**, 170–173
- Gulyas, A. I., Gorcs, T. J., and Freund, T. F. (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* **37**, 31–44
- Toth, K., Freund, T. F., and Miles, R. (1997) Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J. Physiol.* **500**(Pt. 2), 463–474
- Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 479–487
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilagy, N., Freund, T. F., and Varga, V. (2009) GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J. Neurosci.* **29**, 8094–8102
- Buzsaki, G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325–340
- Hasselmo, M. E., and Eichenbaum, H. (2005) Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Netw.* **18**, 1172–1190
- Vertes, R. P. (2005) Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus* **15**, 923–935
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K. O., Yu, C. Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J. L., and Mucke, L. (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* **55**, 697–711
- Villette, V., Poindessous-Jazat, F., Simon, A., Lena, C., Roullot, E., Bellesort, B., Epelbaum, J., Dutar, P., and Stephan, A. (2010) Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J. Neurosci.* **30**, 10991–11003
- Iachini, I., Iavarone, A., Senese, V. P., Ruotolo, F., and Ruggiero, C. (2009) Visuospatial memory in healthy elderly, AD and MCI: a review. *Curr. Aging Sci.* **2**, 43–59
- Amatniek, J. C., Hauser, W. A., DelCastillo-Castaneda, C., Jacobs, D. M., Marder, K., Bell, K., Albert, M., Brandt, J., and Stern, Y. (2006) Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* **47**, 867–872
- Rabinowicz, A. L., Starkstein, S. E., Leiguarda, R. C., and Coleman, A. E. (2000) Transient epileptic amnesia in dementia: a treatable unrecognized cause of episodic amnesic wandering. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **14**, 231–233
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, C., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20**, 4050–4058
- Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, C. Q., Raber, J., Masliah, E., and Mucke, L. (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9572–9577
- Pascual, M., Perez-Sust, P., and Soriano, E. (2004) The GABAergic septohippocampal pathway in control and reeler mice: target specificity and termination onto Reelin-expressing interneurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**, 679–691
- Rocamora, N., Pascual, M., Acsady, L., de Lecea, L., Freund, T. F., and Soriano, E. (1996) Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J. Neurosci.* **16**, 3991–4004
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA, USA/London
- Cruart, A., Munoz, M. D., and Delgado-Garcia, J. M. (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J. Neurosci.* **26**, 1077–1087
- Munera, A., Cruart, A., Munoz, M. D., and Delgado-Garcia, J. M. (2000) Scopolamine impairs information processing in the hippocampus and performance of a learned eyeblink response in alert cats. *Neurosci. Lett.* **292**, 33–36
- Pascual, M., Pozas, E., and Soriano, E. (2005) Role of class 3 semaphorins in the development and maturation of the septohippocampal pathway. *Hippocampus* **15**, 184–202
- Fischer, W., Gage, F. H., and Bjorklund, A. (1989) Degenerative changes in forebrain cholinergic nuclei correlate with cognitive impairments in aged rats. *Eur. J. Neurosci.* **1**, 34–45

30. Matyas, F., Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (2004) Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus* **14**, 460–481
31. Freund, T. F., and Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347–470
32. Freund, T. F. (1989) GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res.* **478**, 375–381
33. Gaztelu, J. M., and Buno, W., Jr. (1982) Septo-hippocampal relationships during EEG theta rhythm. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **54**, 375–387
34. Gage, F. H., Dunnett, S. B., and Björklund, A. (1984) Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging* **5**, 43–48
35. Wilkniss, S. M., Jones, M. G., Korol, D. L., Gold, P. E., and Manning, C. A. (1997) Age-related differences in an ecologically based study of route learning. *Psychol. Aging* **12**, 372–375
36. Newman, M. C., and Kaszniak, A. W. (2000) Spatial memory and aging: performance on a human analog of the Morris water maze. *Aging Neuropsychol. Cogn.* **7**, 86–93
37. Lecourtier, L., de Vasconcelos, A. P., Leroux, E., Cosquer, B., Geiger, K., Lithfous, S., and Cassel, J.-C. (2010) Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequential implication of GABAergic and cholinergic neurons. *Hippocampus* **21**, 1277–1289
38. Stroessner-Johnson, H. M., Rapp, P. R., and Amaral, D. G. (1992) Cholinergic cell loss and hypertrophy in the medial septal nucleus of the behaviorally characterized aged rhesus monkey. *J. Neurosci.* **12**, 1936–1944
39. Gallagher, M., and Colombo, P. J. (1995) Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 161–168
40. Geula, C. N. N., Nicholas, A., Wu, C. K. (2008) Early cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J. Neurobiol. Exp. Neurol.* **67**, 309–318
41. Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S. p., and Quirion, R. m. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**, 209–245
42. Loerch, P. M., Lu, T., Dakin, K. A., Vann, J. M., Isaacs, A., Geula, C., Wang, J., Pan, Y., Gabuzda, D. H., Li, C., Prolla, T. A., and Yankner, B. A. (2008) Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. *PLoS ONE* **3**, e3329
43. Rissman, R. A., De Blas, A. L., and Armstrong, D. M. (2007) GABAA receptors in aging and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **103**, 1285–1292
44. Rissman, R. A., and Mobley, W. C. (2011) Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **117**, 613–622
45. Shetty, A. K., and Turner, D. A. (1998) Hippocampal interneurons expressing glutamic acid decarboxylase and calcium-binding proteins decrease with aging in Fischer 344 rats. *J. Comp. Neurol.* **394**, 252–269
46. Vela, J., Gutierrez, A., Vitorica, J., and Ruano, D. (2003) Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J. Neurochem.* **85**, 368–377
47. Gulyas, A. I., Hajos, N., and Freund, T. F. (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**, 3397–3411
48. Buzsaki, G., Anastassiou, C. A., and Koch, C. (2012) The origin of extracellular fields and currents - EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev.* **13**, 407–420
49. Wirths, O., and Bayer, T. A. (2010) Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2010**, 723782
50. Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. T. (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* **115**, 5–38
51. Irizarry, M. C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K. J., Schenk, D., Games, D., and Hyman, B. T. (1997) A-beta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci.* **17**, 7053–7059
52. Takahashi, H., Brasnjevic, I., Rutten, B., Van Der Kolk, N., Perl, D., Bouras, C., Steinbusch, H., Schmitz, C., Hof, P., and Dickstein, D. (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* **214**, 145–160
53. Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Romero-Acebal, M., Ruano, D., Vizuet, M., Vitorica, J., and Gutierrez, A. (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J. Alzheimers Dis.* **21**, 119–132
54. Popovic, M., Caballero-Bleda, M., Kadish, I., and Van Groen, T. (2008) Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience* **155**, 182–191
55. Ribé, E. M., Pérez, M., Puig, B., Gich, I., Lim, F., Cuadrado, M., Sesma, T., Catena, S., Sánchez, B., Nieto, M., Gómez-Ramos, P., Morán, M. A., Cabodevilla, F., Samaranch, L., Ortiz, L., Pérez, A., Ferrer, I., Avila, J., and Gómez-Isla, T. (2005) Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **20**, 814–822
56. Palop, J. J., and Mucke, L. (2010) Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* **13**, 812–818
57. Pike, F. G., Goddard, R. S., Suckling, J. M., Ganter, P., Kasthuri, N., and Paulsen, O. (2000) Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurons in response to oscillatory input currents. *J. Physiol.* **529**, 205–213
58. Cardin, J. A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C. I. (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**, 668–667

Received for publication March 20, 2012.
Accepted for publication July 10, 2012.

Supplemental Figure 1



Suppl. Figure 1. BDA tracer labels specifically GABAergic septohippocampal synaptic contacts. Micrographs obtained by sequential acquisition of separate wavelength channels (BDA in green, DAPI in blue, and ChAT or GAD65/67 in red) from a single confocal slice in the hippocampi of BDA-injected adult mice (8-mo, wild-type). *A* to *A''*, The double immunodetection of BDA (*A*) and ChAT (*A'*) shows that the two markers do not colocalize (*A''*) in the axonal terminals (arrows) of a septohippocampal basket contacting the soma of a neuron (asterisk) located in the pyramidal layer of the CA1 region. *B* to *B''*, The combined immunodetection of the tracer BDA (*B*) and GAD65/67 (*B'*) shows that both markers colocalize (*B''*) in the synaptic boutons (arrows) of a septohippocampal basket that contacts the soma of a GAD-positive neuron (asterisk) in the stratum radiatum of CA1. In both merged images (*A''* and *B''*), orthogonal views of the adjacent z-planes are included to corroborate colocalization. Scale bar: (in *B''*) 20 μm applies to *A-B''*. Abbreviations: BDA, biotinylated dextran-amine; ChAT, choline acetyltransferase; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; GAD65/67, glutamic acid decarboxylase, isoforms 65 and 67; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum.

Apéndice de Resultados - I

**Propiedades sinápticas in vivo del hipocampo de un modelo de
Alzheimer y sus alteraciones ante
la autoestimulación de septum medial**

Germán Vega-Flores¹, Sara E. Rubio^{2,3,4}, Eduardo Soriano^{2,3,4}, Marta Pascual^{2,3,4},
Agnès Gruart¹, José M. Delgado-García¹

¹ División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide, E-41013 Sevilla, España.

² Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo y de la Regeneración Neuronal, Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB), Barcelona, España.

³ Departamento de Biología Celular, Universidad de Barcelona, E-08028 Barcelona, España.

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIII), España.

RESUMEN

Los pacientes de enfermedad de Alzheimer (EA) y algunos modelos animales de EA muestran alteraciones en la función de las redes corticales, aunque se desconocen en gran medida las causas de este fenómeno. La conexión GABAérgica septohipocámpica regula la actividad de hipocampo mediante el control de los circuitos inhibidores locales. Estudios previos han revelado que esta conexión está notablemente afectada en un modelo animal de EA (hAPP_{Sw, Ind}; cepa J20). Aquí caracterizamos las propiedades sinápticas del hipocampo de ratones J20 *in vivo* en animales no anestesiados, demostrando ciertas alteraciones en la facilitación por pares de pulsos de la sinapsis CA3-CA1, así como una mayor y más duradera potenciación a largo plazo (LTP) de esta sinapsis en los animales transgénicos.

Por otra parte, hemos analizado el papel de las proyecciones GABAérgicas septohipocámpicas en la autoestimulación mediada por septum medial (SM) —un fenómeno que actúa como refuerzo positivo en comportamientos de condicionamiento operante. Se ha inducido la autoestimulación en ratones control (WT) y transgénicos J20 mediante procedimientos de condicionamiento instrumental. En comparación con los animales control, los ratones transgénicos presentan un retraso en la adquisición del comportamiento de autoestimulación del SM, y menor ejecución de la tarea durante las fases de adquisición.

Cuando se induce LTP en la sinapsis CA3-CA1, la ejecución de la tarea disminuye únicamente en los animales transgénicos.

La estimulación eléctrica de la conexión septohipocámpica causa una respuesta glutamatérgica de la sinapsis CA3-CA1 aumentada en los animales transgénicos respecto a los animales control. Este fenómeno se puede relacionar con procesos emotivos relacionados con el refuerzo operante.

En conclusión, los resultados aquí mostrados apuntan a un papel importante de la vía GABAérgica septohipocámpica en el sistema de recompensa interna, que involucra ciertas funciones hipocámpicas y está, en conjunto, alterado en el modelo de EA J20.

Los resultados presentados en este manuscrito han sido enviados para su publicación a la revista *Cerebral Cortex*.

In vivo hippocampal synaptic properties of an Alzheimer's disease model and their alterations upon medial septum self-stimulation

Germán Vega-Flores¹, Sara E. Rubio^{2,3,4}, Eduardo Soriano^{2,3,4}, Marta Pascual^{2,3,4},
Agnès Gruart¹, José M. Delgado-García¹

¹ Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, E-41013 Seville, Spain.

² Developmental Neurobiology and Regeneration Laboratory, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain.

³ Department of Cell Biology, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIII), Spain.

ABSTRACT

Patients with Alzheimer's disease (AD) and AD mouse models display altered functioning of cortical networks. However, the mechanisms underlying these alterations are largely unknown. The γ -aminobutyric acid (GABA)ergic septo-hippocampal pathway (SHP) is believed to regulate hippocampal activity by controlling the activity of interneurons. Previous studies have shown that the GABAergic component of the septohippocampal pathway is markedly decreased in a mouse model of AD (hAPP_{Sw,Ind}; J20 mice). Here we characterize hippocampal synaptic properties in behaving J20 mice, demonstrating some alterations in paired-pulse facilitation and a larger and longer-lasting long-term potentiation (LTP) in the CA3-CA1 synapse of transgenic mice.

Furthermore, we studied the putative role of GABAergic septohippocampal projections in medial septum (MS) self-stimulation of behaving mice, a process which acts as a positive reinforcer of operant condition behaviors. Self-stimulation was evoked in behaving wild-type (WT) and J20 transgenic mice using instrumental conditioning procedures. J20 mice presented a delayed acquisition of MS self-stimulation protocols and lower performance rates when compared with acquisition rates presented by WT mice. Experimentally evoked LTP at the hippocampal CA3-CA1 synapse further decreases self-stimulation rates in J20, but not in WT mice. Interestingly enough, electrical stimulation of the SHP in hAPP transgenic mice results in a significant increase in the activity of the glutamatergic hippocampal CA3-CA1 synapse in J20 mice compared to WT mice, which can be related to internal emotional

processes related to operant rewarding phenomena. In conclusion, the results reported here point to a crucial role of the GABAergic septohippocampal pathway in the internal reward system, which involves certain hippocampal functions and are, as a whole, altered in a mouse model of AD.

INTRODUCTION

Many Alzheimer's disease (AD) mouse models have been developed that harbour genetic alterations and resemble some neuropathological hallmarks of the disease. The J20 mouse line, an AD model expressing human APP (hAPP) carrying the Swedish and Indiana mutations (Mucke et al., 2000; Palop et al., 2003), have being reported of having a severe deficit of GABAergic septohippocampal projections (Rubio et al., 2012). These animals show altered rhythmic activity and increased hyperexcitability (Palop et al., 2007). *In vitro* studies have shown some synaptic intrinsic properties of the hippocampus in this transgenic strain, but not an exhaustive study has been carried out in alert, behaving mice concerning the role of the septal inputs onto hippocampal synapses, taking into account the alterations already described in the septohippocampal pathway in this AD mouse model. We tested the hypothesis that the decrease in GABAergic septal projection onto hippocampal interneurons could modify the functional properties of hippocampal circuits, including changes in input/output curves, paired-pulse facilitation, and LTP. LTP was evoked by high-frequency stimulation (HFS) of Schaffer collaterals and recorded at the ipsilateral hippocampal CA1 area in the behaving animal.

Once the functional properties of the hippocampus in J20 mice had been revealed, and taking into account the septohippocampal deficits adscribed to this mouse model of AD, we next addressed the putative role of the medial septum (MS) input on the hippocampal function during a self-stimulation paradigm. In a seminal study, Olds and Milner (1954) reported that rats located in a Skinner box can learn to do a simple manipulation (i.e., to press a lever) in order to obtain a train electrical stimulation of selected brain sites. Presently, intracranial self-stimulation is a standardized operant conditioning paradigm by which animals are able to self-administer electrical stimulation through electrodes chronically implanted in the brain (Carlezon and Chartoff, 2007).

Here we decided to study the effects of MS self-stimulation on the synaptic strength of hippocampal CA3-CA1 synapses. It is known that rodents will work actively to obtain train electrical stimulations of this septal area (Ball and Gray, 1971; Cazala et al, 1988) which has a triple (cholinergic, GABAergic and glutamatergic) projection system to the hippocampus (Gulyás et al., 2003; Sotty et al., 2003; Habib and Dringenberg, 2009;). In addition, it has been recently reported that dorsal hippocampal CA3 connections with the ventral tegmental area (across the lateral septum) close a circuit putatively involved in the internal reward system (Luo et al., 2011).

The functional changes observed in the hippocampus of J20 mice could also have some putative consequences on MS self-stimulation. To this aim, and following procedures described elsewhere (Gruart et al., 2006), wild-type and J20 mice were prepared for the chronic recording of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse during the acquisition and performance of an operant self-stimulation task. Animals were rewarded with a train of stimuli presented to the MS.

Results indicate that the GABAergic septohippocampal projection plays an important role in the functional properties of hippocampal circuits, with a particular incidence on intrinsic neural mechanisms involved in the reinforcing value of internal (MS self-stimulation) rewards.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Histological and self-stimulation experiments (Figs. 1-7) were carried out in mature (6/8-month-old, 25-35 g) hemizygous transgenic male mice expressing human amyloid precursor protein carrying the Swedish and Indiana familial Alzheimer disease mutations (J20 line) and in their littermate controls (Mucke et al., 2000; Palop et al., 2003). These mice were provided by the University of Barcelona Animal House (Barcelona, Spain) or kindly provided by Dr. Joaquín del Río and Alberto Pérez-Mediavilla [Center for Applied Medical Research (CIMA) – University of Navarra]. Upon arrival to the Pablo de Olavide Animal House (Seville, Spain), animals were housed in shared cages (6 per cage), but they were switched to individual cages after surgery. Mice were kept on a 12 h light/dark cycle with constant ambient temperature (21.5 ± 1 °C) and humidity ($55 \pm 8\%$), with food and water available *ad libitum*.

All the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the European Union Council (2003/65/EU) and recent Spanish regulations (BOE 252/34367-91, 2005) for the use of laboratory animals in chronic studies, and approved by the local Ethics Committee of the Pablo de Olavide University. Unless otherwise indicated, a total of 10 successful animals were used per experimental group. We considered successful animals those that finished experimental protocols presenting fEPSPs that did not deteriorate over time.

Detection of septohippocampal fibers. For the detection of GABAergic septohippocampal projections (Fig. 1A,B), mice were deeply anesthetized with a mixture (10/1; 0.003 ml/g, i.p.) of ketamine (Ketolar, Parke-Davis, Madrid, Spain) and xylazine

(Rompun, Bayer, UK Ltd, Suffolk, UK), and stereotaxically injected with 10% biotinylated dextran-amine (BDA 10000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in the medial septum/diagonal band complex (MS/DB). Each animal received two iontophoretic (7 μ A positive direct current, 7 s on–off cycle) injections of the tracer into the MS/DB (0.0 mm lateral, 0.7 mm anterior, and 3.0 and 3.7 ventral to bregma; Paxinos and Franklin, 2001). This protocol results in intense BDA labeling in the MS/DB, which contains the highest proportion of GABAergic septohippocampal neurons (Pascual et al., 2004). Five or six days later, animals were deeply re-anesthetized with the above-described mixture of ketamine/xylazine (10/1; 0.003 ml/g, i.p.) and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer. Brains were removed and frozen and 30- μ m sections were obtained. Coronal sections were stored in a cryoprotectant solution (30% glycerin, 30% ethylenglycol, 40% 0.1 M phosphate buffer) at -20 °C until use. After blocking, BDA was visualized by incubating the sections overnight at 4°C with the ABC complex (Vectastain ABC Kit; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) diluted 1/100. Peroxidase activity was developed with diaminobenzidine intensified with nickel ammonium sulphate and cobalt chloride (DAB/Ni-Co), and H₂O₂ yielding a black end-product in septohippocampal fibers. Thereafter, sections were mounted onto gelatinized slides, Nissl-stained and coverslipped with Eukitt.

Double immunodetection of BDA tracer and parvalbumin. Hippocampal sections from iontophoretically injected animals were processed for the double detection of BDA and parvalbumin (PARV; Fig. 1C-G). After blocking, free-floating sections were incubated overnight at 4°C with the ABC complex simultaneously with rabbit polyclonal antibody against parvalbumin (1/3000, Swant Antibodies, Fribourg, Switzerland). Next, BDA was revealed using DAB/Ni-Co producing a black end-product. Primary antibody was then visualized by sequential incubation with biotinylated secondary antibodies and the ABC complex (2 h each, Vector Labs). The peroxidase reaction was developed with DAB to produce a brown end-product. The sections were mounted onto gelatinized slides, dehydrated and coverslipped with Eukitt. These double immunolabeled sections were used to perform subsequent quantifications.

For double immunofluorescent detection of BDA and parvalbumin, after blocking, the sections were first incubated overnight with anti-parvalbumin antibody. For primary antibody detection, goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was incubated simultaneously with streptavidin-fluorescein (1/200, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), which allows for the detection of BDA tracer. The sections were then mounted onto slides with Mowiol 4-88 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) and viewed

under a Leica SPE confocal microscope (Leica Inc., Heidelberg, Germany). Images were then processed with ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), and brightness and contrast were adjusted using Adobe Photoshop™ (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

To assess the complexity of the baskets, the number of boutons per basket was hand-counted in the same regions. The sections used for quantifications were from equivalent hippocampal levels (sections between 1.60 mm and 2.30 mm posterior to bregma) following the atlas reported by Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Histological data were processed for statistical analysis with Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, EEUU). Two-tailed Student's *t*-test was used to examine differences between the experimental groups. The significance was set at $p < 0.05$.

Animal preparation for self-stimulation and electrophysiological recordings. Animals were anesthetized with 0.8-1.5% isoflurane delivered by a mouse anesthesia mask (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The anesthetic gas was supplied from a calibrated Fluotec 5 (Fluotec-Ohmeda, Tewksbury, MA, USA) vaporizer, at a flow rate of 1–2 L/min oxygen (AstraZeneca, Madrid, Spain). Animals were implanted with bipolar stimulating electrodes on the right MS (0.1 mm lateral and 0.6 mm anterior to bregma, and 3.8 mm from the brain surface; Paxinos and Franklin, 2001) and in the ipsilateral Schaffer collateral/commissural pathway of the dorsal hippocampus (2 mm lateral and 1.5 mm posterior to bregma, and 1-1.5 mm from the brain surface; Paxinos and Franklin, 2001). A recording electrode was aimed to the CA1 stratum radiatum (1.2 mm lateral and 2.2 mm posterior to bregma, and 1-1.5 mm from the brain surface; Paxinos and Franklin, 2001). Electrodes were made from 50 μm , Teflon-coated, tungsten wire (Advent Research, Eynsham, UK). A bare silver wire was affixed to the bone as ground. All the implanted wires were soldered to one six-pin socket (RS Amidata, Madrid, Spain) and fixed to the skull with dental cement (Fig. 2A-D; see Gruart et al., 2006 for details).

Electrocortical field recordings, input/output curves and paired-pulse facilitation. Recording sessions started one week after surgery. In order to determine the functional capabilities of hippocampal circuits in the two groups of mouse, we recorded EEG activity at the CA1 area, and performed input/output and paired-pulse stimulation tests at the CA3-CA1 synapse. For this purpose, the animal was placed in a small (5 cm \times 5 cm \times 10 cm) plastic chamber located inside a larger Faraday box (30 cm \times 30 cm \times 20 cm). EEG and fEPSP recordings were made with Grass P511 differential amplifiers through a high-impedance probe ($2 \times 10^{12} \Omega$, 10 pF).

For input/output curves (Fig. 4), animals were stimulated at the CA3 area with paired pulses (40 ms of interstimulus interval) of increasing intensity (0.05–1.0 mA). The effects of paired pulses of different interstimulus intervals (10, 20, 40, 100, 200, and 500 ms), with intensities corresponding to 30–40% of the amount necessary to evoke a saturating response, were also checked (Fig. 5). These stimuli were repeated ≥ 5 times with time intervals of 10 seconds to avoid as much as possible interferences with slow short-term potentiation (augmentation) or depression processes (Zucker and Regehr, 2002).

Self-stimulation procedures. Training took place in a Skinner box module measuring 12.5×13.5×18.5 cm (MED Associates, St. Albans, VT, USA) equipped with a lever. The shaping (Sh, Fig. 2E) protocol was carried out as follows (see Fig. 2E): i) The animal was placed for 5 min in a small box (5 cm × 5 cm × 10 cm) located besides the Skinner box. In this situation, the animal was stimulated at the CA3-CA1 synapse at a rate of 6 stimuli/min (BL, Fig. 2E); ii) afterwards, the animal was placed for 20 min in the Skinner box where it was shaped to press the lever to receive a train of pulses (bipolar, 100 μ s pulses presented at 100 Hz for 200 ms, with intensity ≤ 2 mA) in the MS using a fixed interval (FI5). This train was followed, 40 ms after its end, by a single pulse presented at the CA3-CA1 synapse (SB, Fig. 2E); and iii) finally, the animal was returned to the small box, for a recovery period (5 min), in which it was stimulated at the CA3-CA1 synapse at the initial rate of 6 stimuli/min (R, Fig. 2E). The shaping protocol was applied for a maximum of 10 sessions until the animal reached criterion. The criterion was that the animal performed by itself a minimum of 20 lever presses during a 10-minute period (Fig. 6A). Animals that did not reach the selected criterion during the 10 shaping sessions were discarded from the study.

Shaping sessions were followed by 7 self-stimulation sessions (6B-D). Self-stimulation sessions were organized as described above for the shaping sessions, but in this case train stimulation of the MS was only carried out when the animal pressed the lever by itself. In all the cases, self-stimulation reinforcements could be received at a maximum rate of one every 5 seconds, *i.e.*, with the same fixed interval (FI5) schedule.

Long-term potentiation. For LTP induction in behaving mice we followed procedures described previously (Gruart et al., 2006). Baseline values for fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse were collected 15 min prior to LTP induction using single 100 μ s, square, biphasic pulses. Pulse intensity was set at 30–40% of the amount necessary to evoke a maximum fEPSP response (0.2–0.4 mA) in the input/output curve collected from the stimulated animal. For LTP induction, animals were presented with a HFS session consisting of five 200 Hz-, 100 ms trains of pulses at a rate of 1 per second repeated six times, at

intervals of 1 min, *i.e.*, a total of 600 pulses were presented during the HFS session. To avoid evoking large population spikes and/or the appearance of cortical seizures, the stimulus intensity during HFS was set at the same as that used for generating baseline recordings. After the HFS session, the same single stimuli were presented every 20 s for 30 min and for the following 30 min. On days 2 and 3, a baseline record lasting for 15 min was carried out, and then the same HFS session was repeated, followed by a 30 min recording session (Fig. 8).

Histological procedures for electrode location. Mice were perfused transcardially under deep pentobarbital anesthesia, with saline and then with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4). Brains were cryoprotected with 30% sucrose in PB and coronal sections (50 μ m) were obtained with a sliding freezing microtome (Leica SM2000R, Nussloch, Germany) and stored at -20°C in 30% glycerol, 30% ethylene glycol in PB until used. Selected sections including the implanted sites (MS and hippocampus) were mounted on gelatinized glass slides and stained using the Nissl technique with 0.1% toluidine blue to determine the location of stimulating and recording electrodes (Fig. 2A-C).

Data collection and analysis. EEG and fEPSP, and 5-volt rectangular pulses corresponding to lever presses and brain stimulations were stored digitally on a computer through an analog/digital converter (CED 1401 mk II, Cambridge, England). Filmed operant conditioning sessions were also stored with the help of the CED 1401 mk II. Self-stimulation data were analyzed off-line for quantification of each animal's performance in the Skinner box and fEPSP with the Spike 2 (CED) program. The amplitude of evoked fEPSPs was computed as the first derivative (volts/s) of fEPSP recordings (volts). Five successive fEPSPs were averaged, and the mean value of the amplitude during the rise-time period (*i.e.*, the period between the initial 10% and the final 10% of the fEPSP) was determined. Computed results were processed for statistical analysis using the Sigma Plot 11.0 package (SigmaPlot, San Jose, CA, USA). Data are always represented as the mean \pm SEM. Acquired data were analyzed using the Student's t test or one-way or two-way ANOVA, with days as repeated measure and with a contrast analysis for a further study of significant differences.

RESULTS

The density of GABAergic septohippocampal contacts is decreased in J20 mice

Following (Rubio et al., 2012), in a first series of experiments we checked whether J20 mice presented a lower density of GABAergic septohippocampal contacts so they could be used as

suitable model to determine the role of the GABAergic septohippocampal pathway on the effects of MS self-stimulation. Thus, we performed iontophoretic injections of the anterograde tracer biotinylated dextran-amine (BDA) in the MS/DB of J20 mice (Mucke et al., 2000), as well as in WT mice. This protocol results in intense BDA labeling in the MS/DB (Fig. 1A). As shown previously in WT mice (Freund and Antal, 1988; Gulyas et al., 1990; Pascual et al., 2004), septohippocampal axons innervated all layers of the hippocampus and dentate gyrus (Fig. 1B). Two types of fibers were easily recognizable: thin axons with “en passant” synaptic boutons, corresponding to cholinergic fibers, and abundant thick GABAergic axons forming complex baskets with large synaptic boutons around the perisomatic region of hippocampal interneurons (Fig. 1B, arrows). The GABAergic septohippocampal fibers were also recognizable in J20 transgenic mice, in which septal axons formed baskets on the perisomatic region of hippocampal interneurons. To determine the density of GABAergic septohippocampal contacts in WT and J20 mice, we performed double immunodetection of BDA tracer and parvalbumin, which specifically label basket and axo-axonic interneurons largely contacted by GABAergic septohippocampal axons (Freund and Buzsaki, 1996; Matyas et al., 2004). In agreement with our previous results (Rubio et al., 2012), the present data showed that the complexity of the GABAergic septohippocampal contacts on parvalbumin-positive interneurons was diminished in J20 mice compared to WT mice (Fig. 1C-E). By confocal microscopy, we confirmed a dramatic decrease in the complexity of the GABAergic septohippocampal contacts on parvalbumin-immunolabeled neurons in J20 mice (Fig. 1D, F). Quantitatively, the number of boutons per basket on parvalbumin-positive cells was significantly reduced (38%) in transgenic mice compared with age-matched controls ($P = 0.024$, Student’s t-test; Fig. 1G). As a whole, the collected data further confirm that the density and complexity of the GABAergic septal innervation of basket and axo-axonic hippocampal interneurons is significantly reduced in J20 mice.

Differences in the functional properties of hippocampal circuits between WT and J20 mice

In the next experimental step, we tested the functional properties of hippocampal circuits in behaving WT and J20 mice (see Fig. 2 for details on the experimental procedure).

Both WT and J20 mice presented similar [$F_{(19,133)} = 0.430$, $P = 0.982$] increases in the amplitude of fEPSP evoked at the CA1 area following the presentation of paired pulses (40 ms of interstimulus interval) of increasing intensity at the ipsilateral Schaffer collaterals (Fig. 3B, E). The amplitude of fEPSPs evoked at the CA1 area by the first pulse increased steadily

with current strength in both groups of mouse and was significantly ($P \leq 0.05$) larger than baseline values for intensities ≥ 0.35 mA (Fig. 3B, E). Interestingly enough, and as already described in behaving WT mice (Madroñal et al., 2009) paired-pulse facilitation evoked in the two groups of mice at low intensities was reversed into a paired-pulse depression at higher intensities, with no significant difference between groups (Fig. 3C-F).

The characteristic synaptic facilitation (or depression) evoked by the presentation of a pair of pulses is a typical presynaptic short-term plastic property of the hippocampal CA3-CA1 synapse. This phenomenon has been related to the process of neurotransmitter release (Zucker and Regehr, 2002; Madroñal et al., 2009). As illustrated in Fig. 4, WT mice presented a significant [$F_{(5,35)} = 3.883$, $P = 0.007$] increase of the response to the second pulse at short (10-20 ms) and intermediate (40-100 ms) time intervals. In contrast, J20 animals showed a significant facilitation to the second pulse at intermediate intervals (40-100 ms). Although J20 presented a smaller facilitation at short intervals (10-20 ms) and a larger facilitation at very long intervals (> 100 ms) than wild-type animals, no significant differences between the two experimental groups were observed [$F_{(5,35)} = 2.327$, $P = 0.063$; Fig. 4B]. In summary, short-term facilitation processes are delayed to longer intervals in J20 mice as compared with their littermate controls, but without a significant difference between collected values.

J20 mice present poorer self-stimulation performance and lower activity-dependent hippocampal synaptic depotentiations than WT mice.

As detailed in the Methods section and following a selection of individual stimulus intensities, animals were firstly shaped to associate lever presses with train stimulation of the MS (20 pulses at 100 Hz). A maximum of 10 20-minute sessions (one per day) were allowed to reach criterion. For criterion, the animal is required to press the lever by itself a minimum of 20 times during a 10-minute period, with pauses between self-stimulus > 60 s. WT mice reached the selected criterion significantly before ($P = 0.028$, Mann-Whitney rank-sum test) than J20 animals (Fig. 5A). In addition, WT mice reached significantly [$F_{(9,72)} = 2.637$, $P = 0.011$] larger self-stimulation scores than J20 animals during most (5 out of 7) self-stimulation sessions (see asterisks in Fig. 5B).

Manual train stimulation (20 pulses at 100 Hz) of the MS evoked in WT mice a positive-negative (0.24 ± 0.05 mV, peak-to-peak) extracellular field potential at the hippocampal CA1 area with a latency of 20 ± 5 ms and lasting for 100 ± 12 ms (Fig. 6A1).

The negative component was smaller and the positive component was significantly larger (0.41 ± 0.09 mV; $P = 0.02$; Student's *t* test; Fig. 6A) in J20 mice than in the WT group.

In a next step, we studied the effects of train stimulation (manual or by self-stimulation) of the MS on fEPSPs evoked at the hippocampal CA1 area by single pulses presented to the ipsilateral Schaffer collaterals. In Figs. 5D and 6A, B are illustrated several profiles of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse in the absence, or collected immediately (40 ms) after, a self-stimulation of the MS. As previously described, the first positive component of fEPSPs evoked at CA3-CA1 synapse corresponds to the activation of glutamate receptors (Collingridge et al., 1983a, b; Bliss and Collingridge, 1993). Those fEPSPs have already been recorded in alert behaving mice (Gruart et al., 2006).

fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse presented a decreased amplitude when recorded after self-stimulation in WT mice (Fig. 5C, D and 6A-C). Indeed, the amplitude of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse following MS self-stimulation decreased across the successive self-stimulation sessions (black squares, Fig. 5C). This decrease disappeared during the recovery period (black triangles, Fig. 5C), *i.e.*, in the 5 min after the end of the self-stimulation session. In contrast, self-stimulation of the MS in J20 mice did not cause a similar decrease in the amplitude of fEPSPs evoked at the CA3-CA1. In fact, these fEPSPs presented an increase in amplitude when compared with control (baseline) values (white squares in Fig. 5C). This increase in the amplitude of fEPSPs, evoked at the CA3-CA1 synapse in J20 mice during self-stimulation sessions, returned to baseline values during the recovery period (white triangles in Fig. 5C and Fig. 6D). As a consequence of the different effects on synaptic strength evoked by MS self-stimulation in WT and J20 mice, fEPSPs evoked in WT mice during the successive self-stimulation sessions were significantly [$F_{(10,70)} = 0.605$, $P = 0.003$] smaller in amplitude than those evoked in J20 mice (asterisks in Fig. 5C and Fig. 6D).

The late negative components present in the evoked extracellular synaptic field potentials (Figs. 5D and 6A, B) correspond to the activation of GABA_A and GABA_B receptors (Schwartzkroin, 1986). We also checked the effects of MS self-stimulation on these late components of field potentials evoked at the CA3-CA1 synapse in two different moments: firstly, at the beginning of the experiment, prior to any MS stimulation test (GABA_A, $P \geq 0.181$; GABA_B, $P \geq 0.285$, data not shown); and, secondly, during MS self-stimulation. As shown in Figs. 5D and 6D, no significant differences ($P \geq 0.306$) could be observed between the two groups of mouse for GABA_A and GABA_B components of the evoked field potential following MS self-stimulation.

LTP evoked at the hippocampal CA3-CA1 synapse in J20 mice presented larger values and produced a larger depressing effect on medial septum self-stimulation than in WT animals

We expected that the decrease in GABAergic septohippocampal projections observed in J20 mice could modify the excitability of hippocampal circuits. To test this possibility, we decided to evoke LTP at the hippocampal CA3-CA1 synapse and to check its effects on MS self-stimulation in both J20 and WT mice.

To obtain baseline values, animals were stimulated at the CA3-CA1 synapse every 20 s for 15 min (Fig. 7A). After obtaining stable baseline records, each animal was presented an HFS protocol that was followed by 30 min of post-HFS recordings at the same stimulation rate than for baseline records. The same recording session was repeated 24 h later for 15 min to observe the remaining LTP. After this control, a 2nd HFS session was carried out and a 30 min session of additional recordings was repeated as well. Finally, 48 h after the 1st HFS, we carried out another control recording for 15 min that was followed by a 3rd HFS session. As before, the 3rd HFS session was followed by a post-HFS 30-minute recording session. With this experimental protocol, both WT and J20 mice presented a significant LTP for the three recording days ($P \leq 0.05$). Interestingly, the LTP response presented by J20 mice was significantly [$F_{(26,104)}=1.765$, $P = 0.023$] larger and longer-lasting than that presented by WT animals (Fig. 7A).

In order to check the effects of LTP on MS self-stimulation we determined an efficiency coefficient as follows: [(actual number of self-stimulation reinforcements / maximum number of reinforcements obtained during baseline recordings) \times 100]. As illustrated in Fig. 7B, following the experimental induction of LTP, J20 mice were more affected in their performance of MS self-stimulation than WT animals. Indeed, the scores reached by J20 mice for the efficiency coefficient were significantly ($P = 0.025$) decreased with respect to their control values following each of the three HFS sessions. In contrast, values collected from WT mice indicated that self-stimulation performance was not affected ($P = 0.134$) by the LTP evoked at the hippocampal CA3-CA1 synapse. In addition, self-stimulation was not modified ($P = 0.194$) in those J20 mice that did not received a HFS session. In conclusion, the larger LTP evoked in J20 mice has a more deleterious effect on MS self-stimulation than the smaller LTP evoked in WT animals.

DISCUSSION

Functional properties of hippocampal circuits in behaving J20 mice

Interestingly, a number of studies have shown that J20 AD mice display increased network activity including epileptiform discharges (Del Vecchio et al., 2004; Palop et al., 2007; Harris et al., 2010), which is attributed to alterations of cholinergic and glutamatergic neurotransmissions, including aberrant circuitry and synaptic dysfunctions.

Hippocampal synaptic properties in J20 mice have been thus far studied *in vitro* only (Palop et al., 2007). The novel experiments carried out here in alert, behaving mice show no alteration in the synaptic strength of the CA3-CA1 synapse in J20 mice. The presynaptic short-term plasticity of this synapse was assessed by presenting a pair of pulses at different intervals and results show that, even though no significant differences were found between groups, the CA3-CA1 synapse of the transgenic mice was easily facilitated at higher intervals than at shorter intervals, suggesting some subtle changes in intrinsic synaptic properties attributed to neurotransmitter release. Beta-amyloid presence could have a role in these changes, as it has been previously described that A β species can disturb vesicle release in hippocampal neurons (Nimmrich et al., 2008).

In addition to the severe cognitive deficits observed in these mutant mice (Palop et al., 2003; Harris et al., 2010), here we show that behaving J20 mice evoke early LTP responses in the CA3-CA1 synapse as efficiently as aged-matched controls, which is consistent with previous data (Palop et al., 2007). Nevertheless, we further show that late LTP responses (24-48h) were substantially increased and lasted longer in J20 mice than in their littermate controls. Interestingly, glutamatergic CA3-CA1 responses were also facilitated in J20 mice after train stimulation of the medial septum. Furthermore, as the expected functional consequence of the GABAergic SHP loss would be disinhibition of hippocampal interneurons and thus, inhibition of principal pyramidal neurons, the observed increased excitability of hippocampal neurons is unlikely to be directly related to the loss of the GABAergic SHP. Accordingly, these data suggest that compensatory synaptic mechanisms in the hippocampus that attempt to re-establish the activity balance altered by the diminution of cholinergic and GABAergic SHP innervation are responsible for the hyper-excitability observed in J20 mice (Palop et al., 2007). Taken together, these data support the view that hippocampal neurons in J20 mice present an increased excitability *in vivo*.

A neural mechanism for internal reward involving the GABAergic septohippocampal pathway.

We have shown here that train electrical stimulation of the MS can be rewarding for alert behaving WT mice and that it can serve as an operant reinforcer — namely, the experimental animal will generate specific behaviors (lever presses) to obtain this internal reward (Olds and Milner, 1954; Mora and Cobo, 1990; Wise, 1996). Indeed, the MS has been recognized for years as an important neural center involved in self-stimulation reward (Ball and Gray, 1971; Buño and Velluti, 1977; Grauer and Thomas, 1982; Cazala et al., 1988). Importantly enough, the present results suggest that this internal reward system produces a significant decrease in the amplitude of hippocampal fEPSPs evoked at the very moment of reinforcement. The involvement of the hippocampus in this process is probably related to the cognitive aspects, like attention and learning, of motivational processes. In this regard, it has been recently reported the presence of a hippocampal-septal-ventral tegmental area circuit involved in the relationships between reward-motivated behaviors and the learned value of contextual stimuli (Luo et al., 2011). The present results suggest that there are also septo-hippocampal feedback projections relating internal motivational states with their cognitive counterparts.

In addition, the depressing effect on hippocampal fEPSPs was more significant when the animal did stimulate during an already acquired MS self-stimulation protocol than during manual train stimulation (shaping) or during the first MS self-stimulation sessions - *i.e.*, during the acquisition process. MS self-stimulation appears to be highly dependent on the proper functioning of the GABAergic septohippocampal pathway, since J20 mice, which present a decrease in the density of the GABAergic terminals on hippocampal basket and axo-axonic interneurons, show a delayed acquisition and a poorer rate of MS self-stimulation than their littermate controls. Although other processes and circuits affected in the J20 mice could account for some of the results of these experiments, the deficit of the GABAergic septohippocampal innervation in J20 mice may be well involved in the significant functional alterations affecting the potential role of MS self-stimulation as an internal rewarding agent. These results point to a particular role of MS-hippocampal circuits in the integration between internal motivational states, typical of the mesolimbic dopaminergic system (Wise, 1996, 2002), and cognitive, learning and memory processes characteristically ascribed to hippocampal circuits (Bliss and Collingridge, 1993; Gruart et al., 2006). Early studies did propose that septal nuclei could play a definitive role in the integration between internal drives and learning and memory processes (Cazala et al., 1988) and that septal networks represent a nodal point for processing of information from brainstem and hypothalamic

centers and archicortical and neocortical structures (Colom, 2006). In addition, it has been already reported that MS self-stimulation is phase-locked to hippocampal theta rhythms, a fact that further support the functional integration between motivational and cognitive activities taking place in septohippocampal circuits (Buño and Velluti, 1977). Moreover, activation of the MS enhances the synchronized firing of hippocampal pyramidal cells and contributes to the fine tuning of hippocampal rhythmic activities (Ovsepian, 2006). All this data, together with the results shown in this study, point to a crucial role of the GABAergic pathway in the modulation of certain hippocampal processes.

Functional consequences of an increased LTP in the septohippocampal-mediated reward system in J20 mice

The electrophysiological experiments shown here in behaving mice suggest, on the one hand, a dissociation between the larger LTP responses seen in J20 mice and their reported deficits in learning and memory tasks (Palop et al., 2003; Harris et al., 2010). A similar dissociation phenomenon has been reported in other animal models also using recordings on behaving mice (Madroñal et al., 2007; Sahun et al., 2007; Madroñal et al., 2009). These results suggest that in behaving mice although LTP and learning possibly share some common mechanisms, they may differ in particular aspects.

On the other hand, the increased excitability and longer-lasting effects of HFS of the CA3-CA1 synapse reported here in J20 transgenic mice have some important consequences on the reinforcing value of MS self-stimulation of J20 mice.

It has already been reported that non-saturating LTP evoked on hippocampal synapses (CA3-CA1) has no effect on the normal acquisition and/or performance of appetitive (lever press) and consummatory (food intake) behaviors evoked during operant conditioning tasks (Jurado-Parras et al., 2012). Here, non-saturating LTP evoked at the hippocampal CA3-CA1 synapse did not have any noticeable effect on MS self-stimulation rates in WT mice. Nevertheless, when the evoked LTP reached high and long-lasting levels as that reported here taking place in J20 mice, then the MS self-stimulation scores were significantly decreased. A putative reason is that the large facilitation of fEPSPs evoked during LTP in J20 mice cancel out the internal rewarding effects of MS self-stimulation, because as reported here, internal rewards are dependent on a disfacilitation of hippocampal fEPSP responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2008-00899 and BFU2008-03390) and the Junta de Andalucía (Spain, BIO-122, CVI-02487 and P07-CVI-02686), to JMDG and AG, and by grants BFU2008-3980 to ES and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI11/00704) to MP. The research leading to these results also received funding from the European Community's seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 201714 (DEVANX). The authors thank Mr. J.A. Santos for help in the experimental set-up, Ms. Natalia Ruiz for histological support and Mr. R. Churchill for his help in manuscript editing.

REFERENCES

- Ball GG, Gray JA (1971) Septal self-stimulation and hippocampal activity. *Physiol Behav* 6:547-549.
- Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Buño Jr W, Velluti JC (1977) Relationships of hippocampal theta cycles with bar pressing during self-stimulation. *Physiol Behav* 19:615-621.
- Carlezon WA, Chartoff EH (2007) Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc* 2:2987-2995.
- Cazala P, Galey D, Durkin T (1988) Electrical self-stimulation in the medial and lateral septum as compared to the lateral hypothalamus: Differential intervention of reward and learning processes? *Physiol Behav* 44:53-59.
- Colom LV, (2006) Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochemistry* 96:609-623.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983a) The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 334:19-31.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983b) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 334:33-46.
- Del Vecchio, R. A., L. H. Gold, S. J. Novick, G. Wong and L. A. Hyde (2004). "Increased seizure threshold and severity in young transgenic CRND8 mice." *Neuroscience Letters* 367(2): 164-167.
- Freund TF, Antal M (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336:170-173.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Grauer E, Thomas E (1982) Conditioned suppression of medial forebrain bundle and septal intracranial self-stimulation in the rat: evidence for a fear-relief mechanism of the septum. *J Comp Physiol Psychol* 96:61-70.
- Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26:1077-1087.
- Gulyas AI, Gorcs TJ, Freund TF (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 37:31-44.
- Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17:1861-1872.
- Habib D, Dringenberg HC (2009) Alternating low frequency stimulation of medial septal and commissural fibers induces NMDA-dependent, long-lasting potentiation of hippocampal synapses in urethane-anesthetized rats. *Hippocampus* 19:299-307.
- Harris, J. A., N. Devidze, B. Halabisky, I. Lo, M. T. Thwin, G. Q. Yu, D. E. Bredesen, E. Masliah and L. Mucke (2010). Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 30(1): 372-81.

- Jurado-Parras MT, Gruart A, Delgado-García JM (2012) Observational learning in mice can be prevented by medial prefrontal cortex stimulation and enhanced by nucleus accumbens stimulation. *Learn Mem*, 2012 Feb 21;19(3):99-106.
- Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G (2011) Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 333:353-357.
- Madroñal, N., J. M. Delgado-Garcia and A. Gruart (2007). Differential effects of long-term potentiation evoked at the CA3 CA1 synapse before, during, and after the acquisition of classical eyeblink conditioning in behaving mice. *J Neurosci* 27(45): 12139-46.
- Madroñal N, Gruart A, Delgado-García JM (2009) Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Front Behav Neurosci* 3:7. doi: 10.3389/neuro.08.007.2009.
- Matyas F, Freund TF, Gulyas AI (2004) Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus* 14:460-481.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. (2000) High-level neuronal expression of $\alpha\beta_{1-42}$ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Nimmrich, V., C. Grimm, A. Draguhn, S. Barghorn, A. Lehmann, H. Schoemaker, H. Hillen, G. Gross, U. Ebert and C. Bruehl (2008). Amyloid β Oligomers ($A\beta_{1-42}$ Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. *J Neurosci* 28: 788-797.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Ovsepian SV (2006) Enhancement of the synchronized firing of CA1 pyramidal cells by medial septum preconditioning: Time-dependent involvement of muscarinic cholinergic receptors and GABAB receptors. *Neurosci Lett* 393:1-6.
- Palop JJ, Jones B, Kekonius L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9572-9577.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55: 697-711.
- Pascual M, Perez-Sust P, Soriano E (2004) The GABAergic septohippocampal pathway in control and reeler mice: target specificity and termination onto Reelin-expressing interneurons. *Mol Cell Neurosci* 25:679-691.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, Calif. London: Academic.
- Rubio, S. E., G. Vega-Flores, A. Martínez, C. Bosch, A. Pérez-Mediavilla, J. del Río, A. Gruart, J. M. Delgado-García, E. Soriano and M. Pascual (2012). Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, published online July 26, 2012.
- Sahun, I., J. M. Delgado-García, A. Amador-Arjona, A. Giralt, J. Alberch, M. Dierssen and A. Gruart (2007). Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J Neurosci* 27(9): 2253-60.
- Schwartzkroin PA (1986) Regulation of excitability in hippocampal neurons. In: *The Hippocampus* (Isacson RL, Pribram KH, eds), pp 113-136. New York, NY: Plenum Press.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: Novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol (Lond)* 551:927-943.
- Wise RA (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Ann Rev* 19:319-340.
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36:229-240.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Ann Rev Physiol* 64:355-405.

Figure 1. *Histological analysis of the GABAergic septohippocampal connection in WT and J20 mice.*

A, A photomicrograph of a Nissl-stained section showing the site of injection of biotinylated dextran-amine tracer (BDA, black staining) in the medial septum (MS)-diagonal band (DB) complex. **B**, BDA injection in the MS/DB produced an intense labeling of septohippocampal fibers in the hippocampus. The photomicrograph shows septal fibers throughout all hippocampal layers forming basket-shaped contacts (arrows) around somata of neurons located mainly in, or close to, the stratum pyramidale (sp) in the hippocampal CA3 area of a WT animal. **C, E**, The complexity of the GABAergic septohippocampal baskets was assessed by combining BDA detection (black) with parvalbumin (PARV) immunostaining (brown). Complex baskets with numerous synaptic boutons (arrows) were abundant in the hippocampus of WT mice (**C**). In contrast, GABAergic septal baskets were formed by few boutons (arrows) in J20 transgenic mice (**E**). **D, F**, Confocal photomicrographs of double immunofluorescent detection of the BDA tracer (green) and PARV (red) showing an important reduction in the complexity of GABAergic septohippocampal contacts in J20 mice (**F**) compared to WT age-matched controls (**D**). **G**, A quantitative analysis showed a significant reduction (*, $P < 0.05$, Student's t-test) in the complexity of these baskets in J20 mice compared to WT mice, expressed by the number of boutons on PARV-positive neurons. Scale bars: (in **B**) 100 μm applies to **B** and 1000 μm applies to **A**; (in **F**) 20 μm applies to **C-F**.

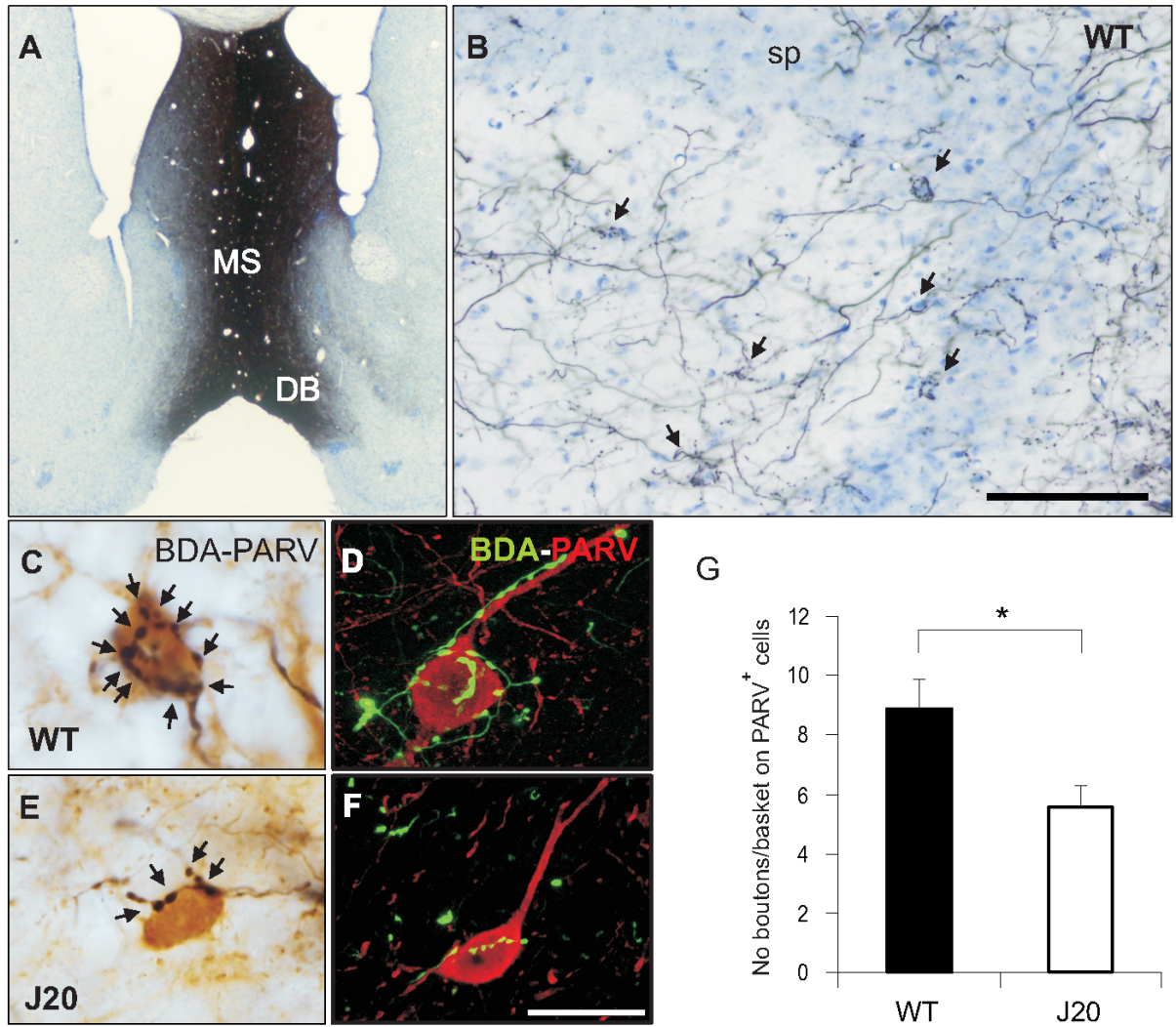
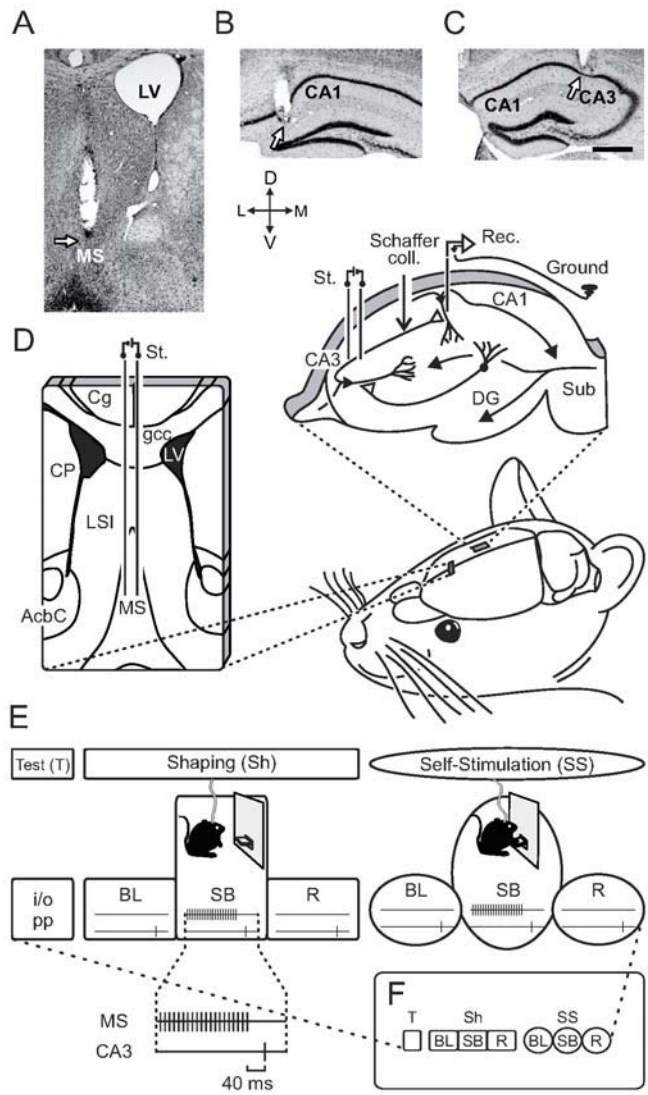


Figure 2. Experimental design.

A-C, Photomicrographs illustrating the location (arrows) of stimulating (**A**, **C**) and recording (**B**) sites. Calibration bar is 0.5 mm. **D**, Bipolar stimulating (St.) electrodes were chronically implanted in the medial septum (MS, left diagram). As shown at the top-right diagram, animals were also implanted with stimulating and recording (Rec.) electrodes aimed to activate CA3-CA1 synapses of the right hippocampus. Abbreviations: AcbC, core of accumbens nucleus; Cg, cingulate cortex; CP, caudate-putamen; DG, dentate gyrus; gcc, genu of the corpus callosum; LSI, lateral septal nucleus, intermediate part; LV, lateral ventricle; Sub, subiculum; D, L, M, V, dorsal, lateral, medial, ventral. **E**, In a first experimental step (Test, T), we recorded the EEG activity of the hippocampal CA1 area, and input/output (i/o) curves and paired-pulse (pp) facilitation at the CA3-CA1 synapse in all of the animals. Animal's shaping session (Shaping, Sh) consisted of: i) a baseline (BL) period 5 min long for recordings of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse with the animal located in a small box; ii) up to 10 shaping sessions (20 min each) in a Skinner box (SB), during which animals were presented with a train of stimuli to the medial septum followed 40 ms later by a single pulse applied to Schaffer collaterals every time they were located nearby the lever; and iii) a recovery (R) recording period 5 min long in the small box. Finally, the animals were allowed to self-stimulate session (Self-stimulation, SS) when pressing the lever. For this, we used the same protocol than for animals' shaping, with a total of 7 self-stimulation sessions. Only one session (Sh or SS) by day was made. **F**, A diagram summarizing all the experimental protocols.



**Figure 3. Input/output curves of the pyramidal CA3-CA1 synapse
in WT and J20 mice.**

A, Representative averaged ($n = 5$) records of fEPSPs recorded in the CA1 area of a WT animal following paired (1st St. and 2nd St., at 40 ms inter-stimulus interval) stimulation of the ipsilateral Schaffer collaterals at two different (1: 0.35 mA; and 2: 0.9 mA) intensities. *B*, Relationships between the intensity (in mA) of pairs of stimuli presented to Schaffer collaterals and amplitudes of fEPSPs evoked at the CA1 layer, corresponding to the 1st (white triangles) and the 2nd (black triangles) pulses. These data (illustrated as mean \pm SEM) were collected and averaged from 8 animals. 1 and 2 indicate intensity values for the representative records illustrated in *A*. The arrow indicates the intensity at which the paired-pulse facilitation was reversed into paired-pulse depression. *C*, Evolution of the paired-pulse ratio [(2nd/1st) \times 100; black diamonds] with increasing stimulus intensity for the data illustrated in *B*. *D-F*, Same than in A-C, but for data collected from J20 mice. No significant differences were observed between data collected from the two types of mouse ($P = 0.982$, two-way ANOVA).

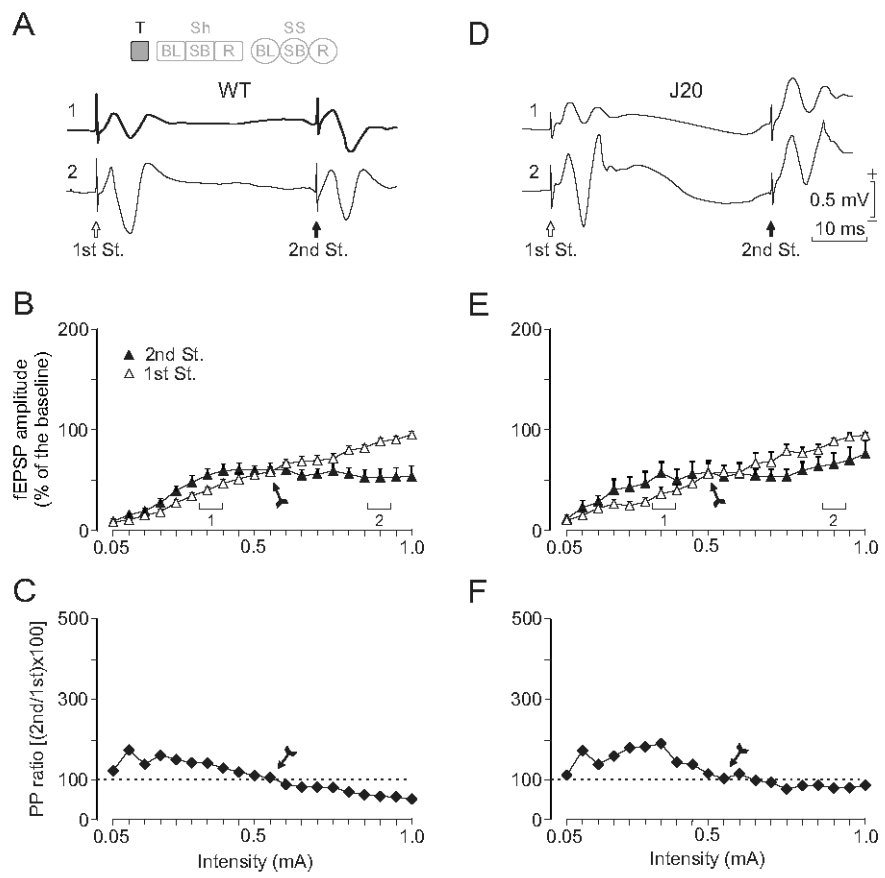


Figure 4. Effects of paired-pulse stimulation of the hippocampal CA3-CA1 synapse in WT and J20 mice.

A, Representative averaged ($n = 5$) records of fEPSPs evoked by paired-pulse stimulation at three different (10, 40, 100 ms) time intervals, and using intensities (mA) $< 40\%$ of the asymptotic value for WT (left set of records) and J20 (right set of records) mice. **B**, Paired-pulse facilitation of fEPSPs recorded in the CA1 area following stimulation of the ipsilateral Schaffer collaterals ($n = 8$ animals). Paired-pulse facilitation was evoked by stimulating Schaffer collaterals at intensities $< 40\%$ of the asymptotic values. Field EPSPs paired traces were collected at inter-pulse intervals of 10, 20, 40, 100, 200, and 500 ms. Data shown are mean \pm SEM amplitudes of the second field EPSP expressed as a percentage of the first $[(2\text{nd}/1\text{st}) \times 100]$ for the six inter-stimulus intervals used in this study. Note that J20 mice presented paired-pulse facilitation at larger intervals (40-100 ms, white bar) than in WT mice (10-100 ms, black bar). (*, $P = 0.007$, one-way ANOVA). No significant differences were observed between groups ($P = 0.063$, two-way ANOVA).

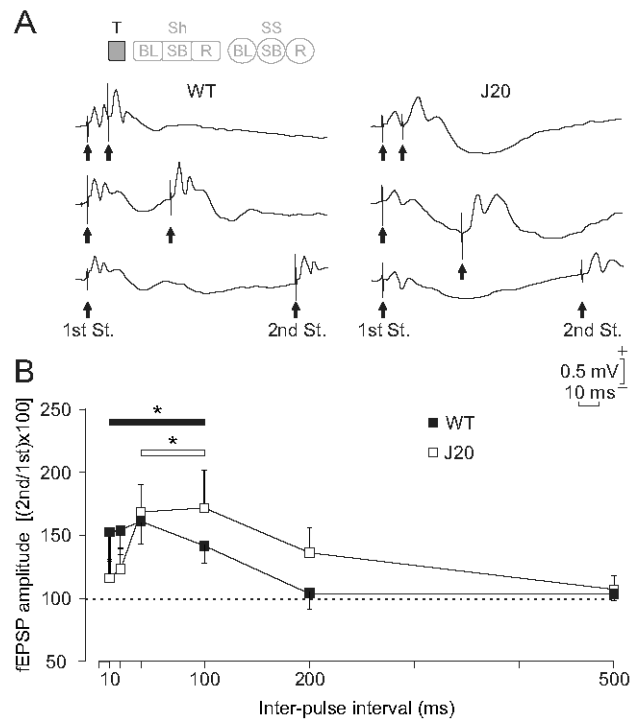


Figure 5. Acquisition of the self-stimulation protocol and changes evoked at the CA3-CA1 synapse in shaping (Sh) vs. selfstimulation (SS) sessions.

A, The graph at the left illustrates the cumulative days needed to reach the criterion of self-stimulation (i.e., the animal must press the lever by itself a minimum of 20 times during a 10-minute period) in each group of mice. Note that the WT group reached the criterion faster than J20 animals. The graph at the right illustrates the mean time (days) required by each group to reach the criterion (*, $P = 0.028$, Mann-Whitney rank sum test). **B**, Performance during the self-stimulation protocol. WT mice (black squares) reached asymptotic values which were faster and larger (*, $P < 0.011$, two-way ANOVA) than the J20 group (white squares). **C**, Amplitude of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse 40 ms after each self-stimulation (black squares, WT; white squares, J20) and during recovery (black triangles, WT; white triangles, J20) across the successive sessions. Control values were collected from the last two shaping sessions (*, $P < 0.001$, two-way ANOVA). **D**, Comparative effects on the different components (glutamatergic —GLU— and GABAergic —GABA_A and GABA_B; see inset) of the field potential evoked in the pyramidal CA1 area by the electrical stimulation of Schaffer collaterals during shaping or Selfstimulation sessions. Either manual stimulation (in Sh) or self-stimulation (in SS) of of the medial septum produces a significant decrease in the amplitude of the evoked fEPSP (GLU component) in WT, but not in J20 mice (***, $P < 0.001$, two-way ANOVA). The two late fEPSPs (GABA_A and GABA_B) were not significantly modified.

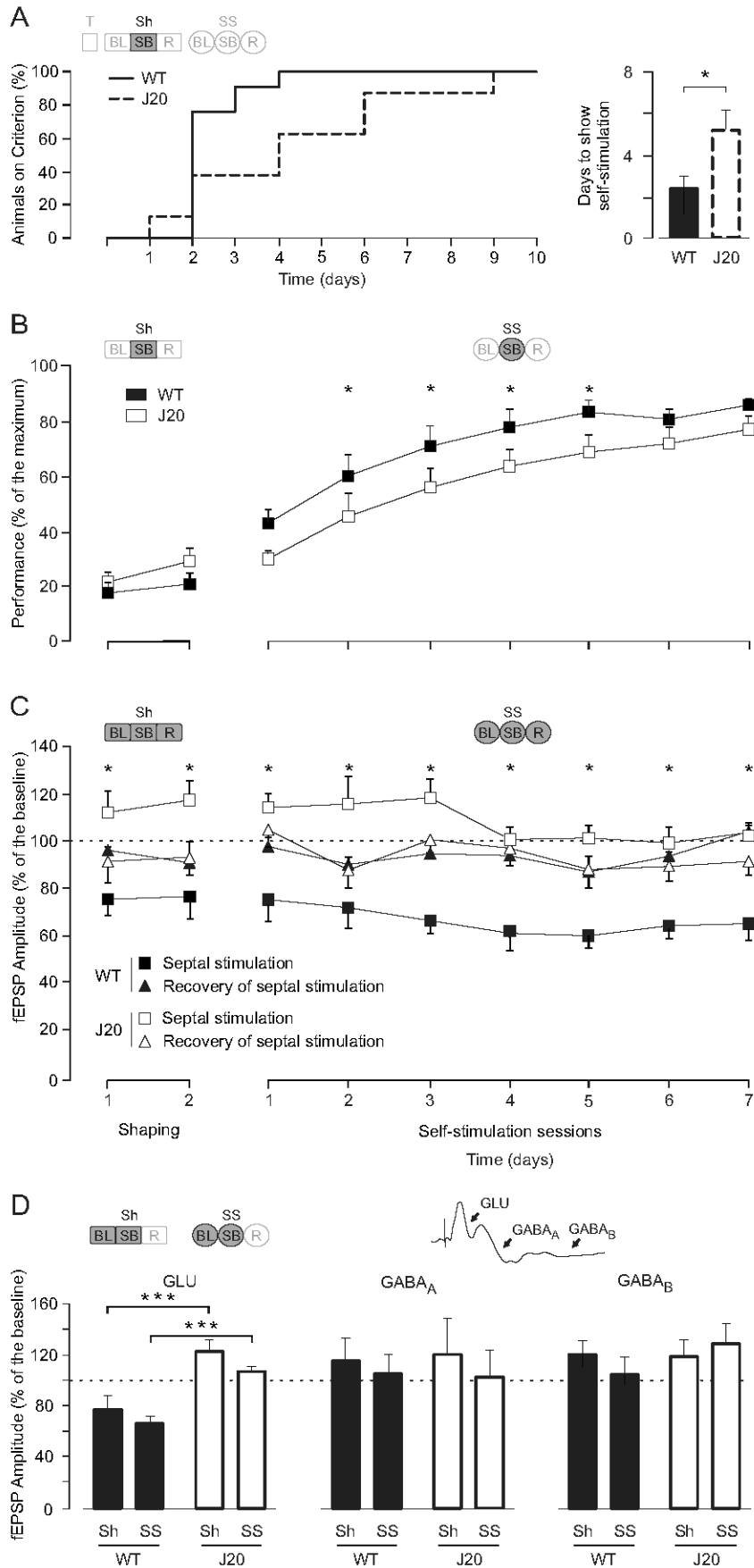


Figure 6. Responses evoked at the CA1 area during the selfstimulation sessions.

A, Illustrative recordings (averaged 10 times) obtained from the stratum radiatum of the CA1 area during the self-stimulation train in the medial septum, followed 40 ms later by a single pulse (St.) presented to Schaffer collaterals. Calibrations as indicated. **B**, Representative recordings (averaged 5 times) of field potentials evoked at the CA1 area by Schaffer collateral stimulation during baseline recordings (BL), immediately following a self-stimulation (SB), and during the recovery period (R) collected from a representative WT animal. **C**, As in B, but collected from a representative J20 mouse. **D**, **E** and **F**, A quantitative analysis of data shown in **B** and **C**. **D**, Note that medial septum self-stimulation produced a significant decrease (***, $P < 0.001$) in the amplitude of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse in WT mice, but an increase (*, $P < 0.05$) in J20 mice in comparison with their respective baselines (two-way ANOVA). **E**, **F**, No significant changes were observed in the GABAergic components of the field potential evoked in CA1 by CA3 stimulation following self-stimulation or during the recovery period ($P = 0.608$ for **E** and $P = 0.306$ for **F**, two-way ANOVA).

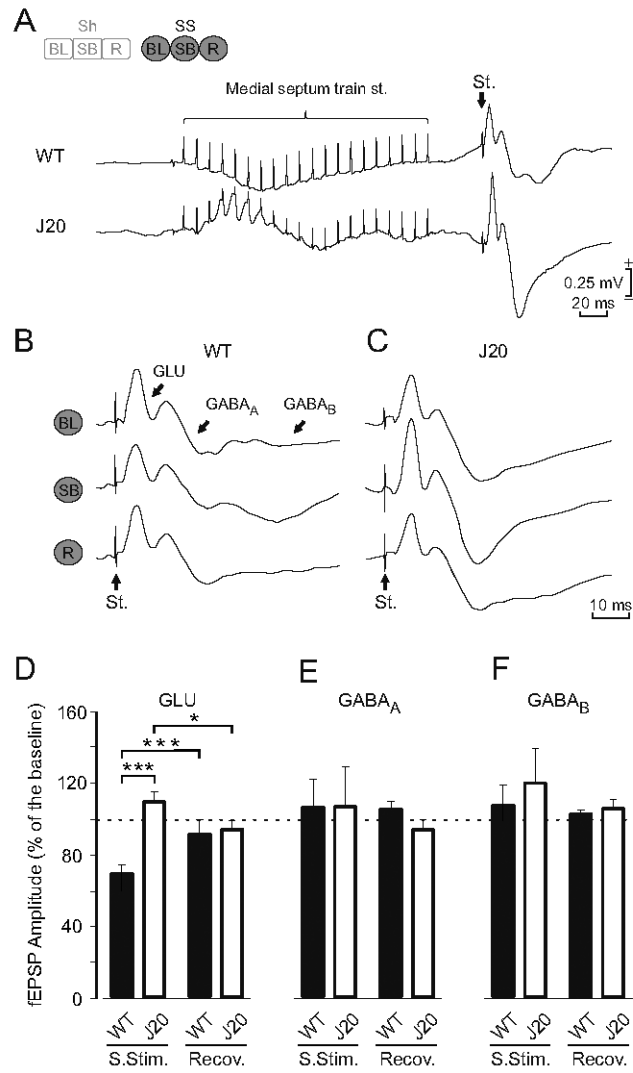
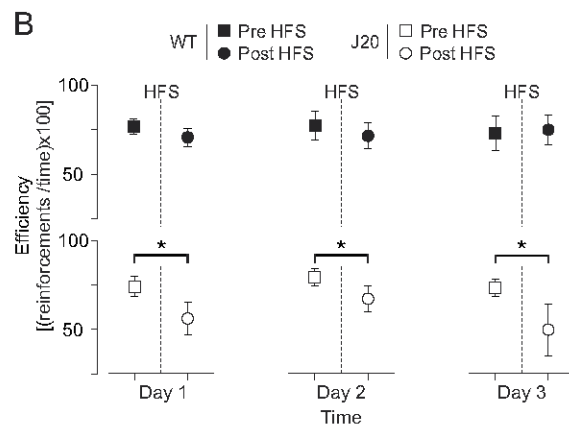
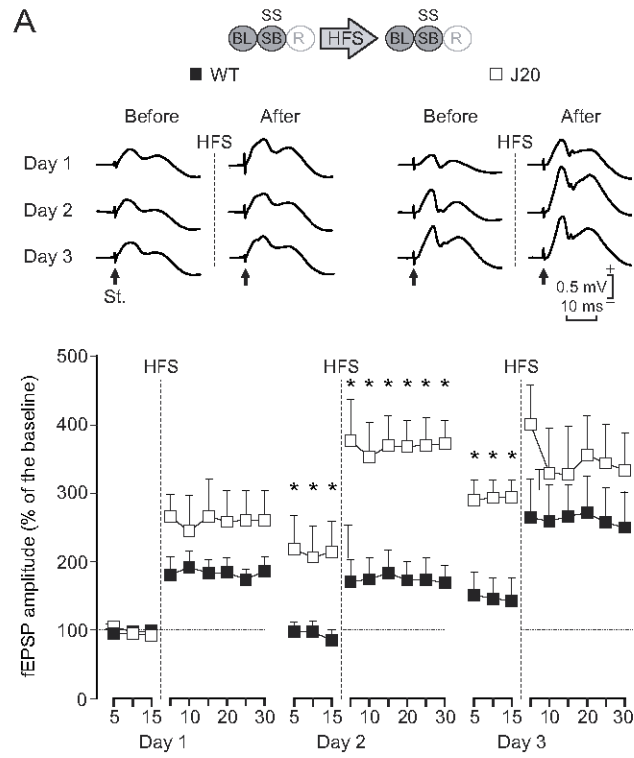


Figure 7. Different effects of LTP evoked at the CA3-CA1 synapse on medial septum self-stimulation carried out by WT and J20 mice.

A, Representative examples of fEPSPs collected from WT and J20 animals before (baseline) and after (days 1-3) three successive high-frequency stimulation (HFS) sessions of Schaffer collaterals. The bottom graphs show the time course of LTP evoked in the CA1 area (fEPSP mean \pm SEM) following the three HFS sessions for WT and J20 mice. The HFS was presented for three days after 15 min of baseline recordings, at the time marked by the dashed line. The fEPSPs are given as a percentage of the baseline (100%) amplitude. Although the two groups presented a significant increase (two-way ANOVA) in fEPSP amplitude following HFS when compared with baseline records, values collected from the J20 group were significantly (* $P = 0.023$, two-way ANOVA) larger than those collected from WT mice at the indicated times. **B**, The graphs illustrate the effects of LTP on self-stimulation for both WT (black squares and circles) and J20 (white squares and circles) mice. This effect was determined with the help of the efficiency coefficient: (number of reinforcements / recording time) \times 100. Note that LTP significantly (*, $P = 0.026$, two-way ANOVA) reduced self-stimulation of J20, but not of WT mice.



RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. Desarrollo Postnatal de la Conexión Septohipocámpica

1.1 MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ESPECIFICIDAD DE CONTACTO DE LA CONEXIÓN SEPTOHIPOCÁMPICA

Los axones GABAérgicos septohipocámpicos muestran una de las más exquisitas especificidades de contacto de todo el sistema nervioso: únicamente contactan con el compartimiento somatodendrítico de interneuronas GABAérgicas de hipocampo. Esta característica morfológica es trascendental para la función de la conexión, de manera que el proceso de selección de diana de estos axones ha de estar altamente regulado para garantizar la correcta conexión de los diferentes componentes. No obstante, actualmente, los factores involucrados en estos procesos no se conocen en profundidad.

En trabajos previos del grupo (Rocamora et al., 1996; Pascual et al., 2004) se describieron varias moléculas expresadas de manera más o menos específica por las neuronas diana del componente GABAérgico septohipocámpico como NGF, Reelina o Semaforina 3C (Sema 3C). En concreto, Sema 3C se expresa específicamente en interneuronas de hipocampo, y sus receptores en MS/DBB, durante las primeras semanas de vida postnatal, coincidiendo con el establecimiento de los contactos GABAérgicos septohipocámpicos.

Así, analizar el papel de Sema 3C en la especificidad de contacto de los axones GABAérgicos septohipocámpicos ha sido uno de los objetivos de la presente tesis. Debido a que los animales deficientes en esta proteína mueren pocas horas después del nacimiento a causa de alteraciones cardíacas (Feiner et al., 2001), no se pueden realizar estudios *in vivo* de pérdida de función de Sema 3C. Por ello, para este análisis se desarrolló un modelo *in vitro* de cultivo organotípico que contiene hipocampo, corteza entorrinal y septum medial proveniente de embriones en estadios muy avanzados (E18) o postnatales tempranos (P0-1). La caracterización de los cultivos mostró que este modelo *in vitro* se reconstruye la conexión septohipocámpica manteniendo el alto grado de especificidad de la conexión GABAérgica septohipocámpica (véase el siguiente apartado). Los cultivos realizados utilizando hipocampo proveniente de animales Sema 3C *-/-* demuestran que no es necesaria la presencia de Sema 3C en hipocampo para que tenga lugar el establecimiento de contactos sinápticos y el reconocimiento específico de diana de las fibras GABAérgicas septohipocámpicas en el sistema *in vitro*.

Las células septohipocámpicas expresan *Sema 3C*, y además, *NRP-1* y *NRP-2* se expresan en hipocampo durante la ventana temporal en que se da la sinaptogénesis septohipocámpica. Para descartar cualquier efecto que *Sema 3C* pudiera estar ejerciendo desde las propias células septales, empleamos otra metodología: aplicar ectodominios bloqueantes de los receptores (*NRP-1* y *NRP-2*) en el cultivo (Pascual et al., 2004). Con esta aproximación, demostramos que la expresión de *Sema 3C* por parte del septum no está implicada en la selección de diana de los axones GABAérgicos septohipocámpicos, además de corroborar los datos derivados del tejido *Sema 3C* -/-.

La correcta actividad del hipocampo y de las interneuronas de esta región depende de la integridad de los circuitos hipocámpicos, entre ellos la vía perforante procedente de la corteza entorrinal. Para determinar si los aferentes entorrinales son importantes para el desarrollo y especificidad de la conexión GABAérgica septohipocámpica, establecimos cultivos organotípicos septohipocámpicos sin corteza entorrinal, demostrando que las aferencias desde esta área no son necesarias para la correcta selección de diana de los axones GABAérgicos septales. Aunque se ha descrito que los niveles de actividad pueden afectar a procesos de sinaptogénesis, no ocurre así en el sistema estudiado aquí ya que el porcentaje de interneuronas contactadas por axones GABAérgicos septohipocámpicos no se ve afectado en cultivos sin corteza entorrinal. Por el contrario, es más probable que la actividad de las neuronas diana esté afectando a los procesos de estabilización de los contactos ya creados, eliminando aquellos que no muestren niveles correctos de actividad o no sean funcionales.

En conjunto, nuestros resultados indican que el proceso de selección de diana de los axones GABAérgicos septohipocámpicos seguramente dependa de factores diferentes a *Sema 3C* y las aferencias desde corteza entorrinal. Aún así, no se puede descartar la existencia de mecanismos redundantes que pudieran compensar, por ejemplo, la falta de *Sema 3C* y garantizar la correcta conexión entre los elementos del sistema.

Teniendo en cuenta la localización de las interneuronas de hipocampo, presentes en todas las capas de hipocampo y frecuentemente entremezcladas con otros tipos celulares, los mecanismos para asegurar el contacto por parte de los axones GABAérgicos septales deberían actuar a muy corta distancia o incluso por contacto. Es probable que los procesos y/o moléculas que gobiernen ambos tipos de especificidad de contacto (celular y subcelular) coincidan en una ventana temporal estrecha, si no es que actúan simultáneamente o se trate del mismo mecanismo. Actualmente se conocen varias moléculas implicadas en el reconocimiento de diana por contacto, por ejemplo moléculas de adhesión celular (CAMs, de

las siglas en inglés para *Cell-Adhesion Molecules*) como las Neurexinas y Neuroliginas; Semaforinas transmembrana y proteínas Netrina-G, etc (Margeta and Shen, 2010; Williams et al., 2010). Sería interesante comprobar el estado de este tipo de moléculas en la vía GABAérgica septohipocámpica para encontrar posibles mecanismos y elementos reguladores de la especificidad de contacto. El modelo *in vitro* desarrollado en esta tesis es una herramienta excelente para testar la implicación de estos factores en la selección de diana de los axones en cuestión.

1. 2. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA ESPECIFICIDAD DEL CONTACTO DE LA CONEXIÓN GABAÉRGICA SEPTOHIPOCÁMPICA

En el cultivo organotípico desarrollado en esta tesis se recrea la conexión septohipocámpica *in vitro* a partir de rebanadas de cerebro de ratón en estadios embrionarios tardíos o postnatales tempranos. Los contactos GABAérgicos septohipocámpicos se forman siguiendo un patrón temporal semejante a la situación *in vivo* y alcanzan una complejidad similar en los estadios maduros.

Uno de los aspectos más relevantes del modelo es que se mantiene la especificidad de contacto de los axones GABAérgicos septales sobre interneuronas de hipocampo. En estudios previos en que se desarrollaron modelos *in vitro* de la conexión no se consiguió mantener la especificidad de contacto de estos axones (Heimrich et al., 1996). Las diferencias con este estudio pueden deberse a la especie utilizada (ratón en vez de rata) y la edad de obtención del tejido, más temprana en nuestro caso. Otra diferencia es que, en el cultivo presentado en esta tesis, incluimos una rebanada de septum entero, no sólo un hemiseptum como hacían Heimrich et al. De esta manera se conservan parte de los circuitos locales y aferencias desde el septum lateral. En nuestro modelo, además, hemos llevado a cabo una optimización de las condiciones de cultivo (manipulación del tejido, medio de cultivo, suplementos...) que contribuyen a mantener una situación más fisiológica de la conexión en el sistema *in vitro*.

La especificidad del contacto del componente GABAérgico septohipocámpico mantenida en el cultivo organotípico hace de él una herramienta clave en el estudio de la conexión, puesto que refleja uno de los aspectos cruciales del sistema no sólo a nivel morfológico sino también funcional, como se expone a continuación.

Por una parte, la especificidad de contacto a nivel de dominio subcelular es clave para una inhibición eficaz de la célula diana. Las sinapsis de tipo cesto, típicas de los axones GABAérgicos septohipocámpicos, constan de numerosos botones sinápticos localizados en el soma y dendritas proximales de la neurona inervada. La presencia de numerosos botones sinápticos en el mismo compartimento, y el hecho de que liberen neurotransmisor en una ventana temporal estrecha (ya que muchos de ellos provienen de una misma célula septal activa) causa una intensa hiperpolarización de estas neuronas, debido a procesos de sumación espacial y temporal de los potenciales postsinápticos generados. Esta hiperpolarización ocurre en compartimentos cercanos al segmento inicial del axón, donde tiene lugar la integración sináptica y la decisión de disparo del potencial de acción. Por todo esto, las sinapsis de tipo cesto causan una inhibición especialmente potente en las células diana, que asegura su silenciamiento y anula cualquier efecto de otras sinapsis excitadoras, provenientes por ejemplo de las neuronas colinérgicas septohipocámpicas.

Por otra parte, el significado funcional de tan exquisita especificidad de contacto a nivel celular es obvio: es crucial asegurar que las neuronas GABAérgicas septales contactan exclusivamente con interneuronas de hipocampo, y no con células principales, para que tenga lugar el circuito desinhibidor descrito en el sistema (Freund and Antal, 1988; Toth et al., 1997).

Un fallo en la guía y sinaptogénesis de los axones GABAérgicos septohipocámpicos, tanto a nivel celular como del compartimento contactado, impediría el correcto control de amplias poblaciones de neuronas hipocámpicas, causando, entre otros, alteraciones en los patrones rítmicos theta y gamma de hipocampo implicados en procesos de memoria y aprendizaje tan necesarios para la supervivencia del individuo. Por tanto, es lógico que durante el desarrollo existan mecanismos robustos que garanticen la conectividad e integridad del sistema para que funcione adecuadamente. Se necesitan más experimentos para conocer estos mecanismos y las moléculas que intervienen en ellos. Analizar la manera en que estos axones se desarrollan y contactan con sus dianas puede contribuir a ello, como se expone en el siguiente apartado.

1.3 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y SINAPTOGÉNESIS DE LOS AXONES SEPTOHIPOCÁMPICOS *IN VITRO*

Un punto importante que puede aportar información sobre el proceso de selección de diana de estos axones es el estudio de la dinámica de crecimiento axonal y sinaptogénesis. Es importante caracterizar este proceso para comprender de qué manera ocurre la guía y sinaptogénesis axonal: ¿es un proceso azaroso basado en la estabilización selectiva de los contactos establecidos correctamente y la eliminación de los erróneos? ¿Cómo un mismo axón inerva diferentes interneuronas, y qué mecanismo determina que siga creciendo en busca de más células diana o se estabilice y pare? ¿De qué manera un único axón aporta numerosos botones sinápticos a una misma célula diana? ¿Cómo se distribuyen espacialmente los botones sinápticos provenientes de diferentes axones septales sobre una misma interneurona de hipocampo?

Para responder a estas preguntas hemos puesto a punto un protocolo para realizar filmaciones de larga duración en los cultivos organotípicos vivos, durante las diferentes etapas del crecimiento axonal hacia sus células diana. Para ello, generamos cultivos organotípicos septohipocámpicos estándar en los cuales colocamos, en la zona media del septum una porción de septum proveniente de ratones que expresan el gen de la proteína verde fluorescente (*eGFP*) bajo el promotor del gen β -*ACTINA* (cepa ACTB-eGFP). De esta manera, el crecimiento y sinaptogénesis de los axones fluorescentes septales se puede monitorizar en un sistema de filmación mediante microscopía confocal o de *Spinning Disk* en incubador. Esta metodología aporta información relevante sobre el comportamiento de los axones de crecimiento en un entorno más fisiológico que el estudiado normalmente en cultivos primarios de células disociadas. Sin embargo, a día de hoy existen pocos estudios sobre el desarrollo axonal en tejido *ex vivo* o rebanadas de tejido cultivadas *in vitro*.

Usando esta metodología hemos observado que a las 24h *in vitro* los axones septales ya han empezado a inervar el hipocampo. Durante los primeros 3 días de cultivo, numerosos axones septales penetran en el hipocampo y exhiben conos de crecimiento muy dinámicos, algunos de los cuales establecen contactos de tipo cesto con células hipocámpicas. Nuestros resultados muestran ciertas características de estos axones, que se exponen a continuación:

- Los axones invaden el hipocampo en diferentes profundidades del tejido, y los conos de crecimiento muestran un comportamiento exploratorio en las **tres dimensiones** (ejes *x*, *y*, *z* del espacio). Este hecho demuestra un comportamiento no descrito en los cultivos disociados

de neuronas, por motivos puramente metodológicos —en ese sistema *in vitro* el cono de crecimiento sólo puede moverse en dos dimensiones si no se aplica una matriz tridimensional.

El cultivo organotípico que hemos desarrollado aquí demuestra un comportamiento más similar a la situación *in vivo*, y en él se podría comprobar si realmente existe una compartimentación del cono de crecimiento en cara inferior y cara superior. Este fenómeno de compartimentación se ha descrito en cultivos disociados de neuronas que crecen sobre un sustrato en dos dimensiones, e involucra algunas moléculas implicadas en el crecimiento axonal y determinados procesos de exocitosis y endocitosis (Itofusa and Kamiguchi, 2011; O. Ros, comunicación personal).

- Los conos de crecimiento muestran un **comportamiento pulsátil**: constantemente sufren procesos de extensión, colapso y recrecimiento. Este comportamiento ya ha sido descrito anteriormente en axones corticocorticales filmados en rebanadas de cerebro de ratón *in vitro* (Halloran and Kalil, 1994) y motoneuronas del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en condiciones *in vivo* (Knobel et al., 1999).

- La **velocidad de avance de los conos de crecimiento** es notablemente constante a lo largo del tiempo para un mismo axón, excepto en períodos de pausa que seguramente implican reconocimiento de diana o procesos de colapso y redireccionamiento ante células no diana o células de señalización intermedia (*guidepost cells*). Sin embargo, diferentes axones muestran velocidades de crecimiento variadas, aunque dentro del rango fisiológico descrito: la media de crecimiento de los axones septohipocámpicos en nuestro cultivo organotípico es de $36,8 \pm 3,3 \mu\text{m/hora}$, un valor similar a los datos publicados de axones corticales en el área diana ($42,4 \pm 4 \mu\text{m/hora}$, Halloran and Kalil, 1994).

- Numerosos axones crecen sobre axones pioneros, en solitario o en forma de haz con otros axones en desarrollo, de los cuales pueden separarse posteriormente (figura 18 y material suplementario en el CD adjunto). Estos **procesos de fasciculación y defasciculación** son comunes en la guía axonal de otros elementos del sistema nervioso, y representan una método eficiente para guiar axones de neuronas que han de inervar dianas similares.

- Frecuentemente, **los axones se ramifican** en más de un nivel (figura 18), y los conos de crecimiento de cada ramificación parecen guiarse de manera independiente. Aunque algunas ramificaciones pueden colapsar, retraerse y finalmente desaparecer, otras permanecen y contactan con una o más células diana. Este proceso da lugar a la gran divergencia existente en el sistema septohipocámpico, que funcionalmente se traduce en el control de amplias poblaciones de interneuronas hipocámpicas por parte de pocas células septales.

- Los axones que contactan con células diana pueden dejar **uno o varios botones sinápticos** sobre el soma de éstas (figura 18), y detenerse o seguir avanzando a través del tejido. Algunos axones que crecen en solitario o por encima de otros axones pioneros pueden establecer contactos sinápticos con células ya contactadas por el axón sobre el cual avanzan, aumentando la complejidad de las sinapsis en cesto de los contactos septohipocámpicos. Este fenómeno podría darse en los sucesivos días de desarrollo postnatal de la conexión, cuando los axones pioneros ya han establecido algunos contactos con interneuronas de hipocampo.

- En ocasiones se observan **varicosidades axonales** que se desplazan a lo largo del axón. Este fenómeno se ha descrito previamente en axones de otras especies (Malkinson and Spira, 2010) y reflejaría la movilización y aporte de nueva membrana hacia la parte más distal del axón para su correcto crecimiento.

En conjunto, los resultados de estos primeros experimentos demuestran que el modelo de cultivo organotípico septohipocámpico generado durante esta tesis, en combinación con el protocolo de filmación en vivo descrito aquí, puede ser una herramienta óptima para estudiar en detalle los procesos de guía y crecimiento axonal, sinaptogénesis, regeneración de axones ante lesiones, etc. Todo ello en condiciones más fisiológicas que otros modelos *in vitro* (cultivos de neuronas disociadas o de explantes de tejido), y aportando información sobre la dinámica temporal de estos procesos. Una de las ventajas de los cultivos organotípicos, compatible con el protocolo de filmación, es que estos sistemas *in vitro* admiten numerosas manipulaciones como estudios de lesión o tratamientos con drogas, anticuerpos bloqueantes, toxinas o péptido amiloide, entre otros.

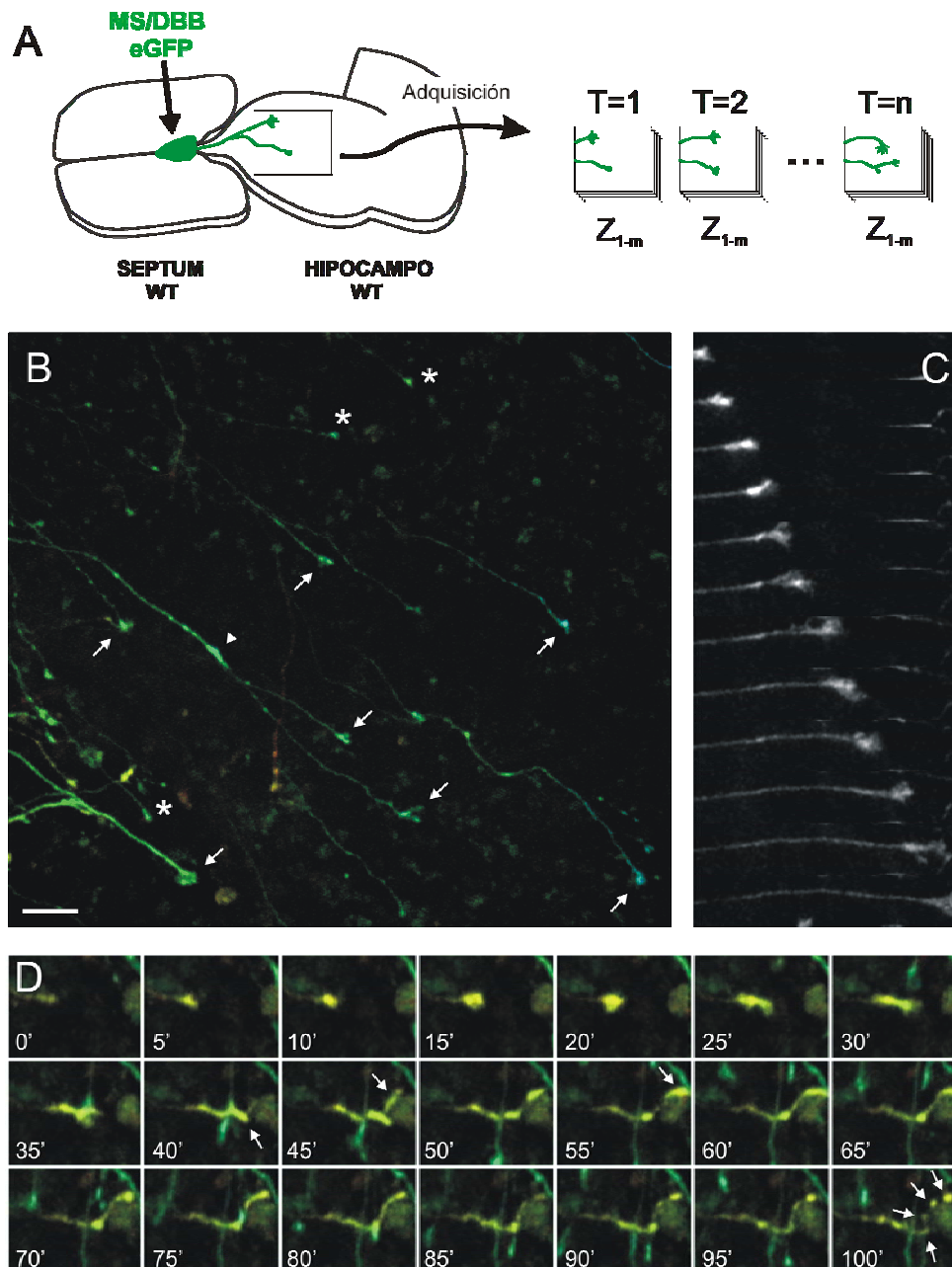


Figura 18. Monitorización de la dinámica axonal en cultivos organotípicos septohipocámpicos.

(A) Diseño experimental: se coloca una porción de MS/DBB eGFP⁺ en el septum medial de un cultivo organotípico septohipocámpico estándar, y se adquieren imágenes del hipocampo a varias profundidades del tejido (Z_{1-m}) a lo largo de diferentes tiempos (T). (B) A las 30 horas *in vitro*, el cultivo muestra numerosos axones septales fluorescentes que han invadido el hipocampo. Se observan conos de crecimiento extendidos (flechas), colapsados (asteriscos) y varicosidades axonales (punta de flecha). (C) Montaje de micrografías de un mismo campo del hipocampo de un cultivo de 48h *in vitro*, tomadas cada 10 minutos. Se observa un cono de crecimiento avanzando a velocidad constante. (D) Evento de sinaptogénesis filmado en un cultivo de 35h *in vitro*. Un cono de crecimiento (en amarillo) contacta en el minuto 40 con el soma de la célula situada a la derecha; en los 60 minutos siguientes se establecen numerosos botones sinápticos (flechas) entorno al soma de la célula diana, adoptando la morfología en cesto característica de los axones GABAérgicos septohipocámpicos. En (B) y (D), las imágenes son proyecciones de los planos de diferentes profundidades, codificadas en color (transición rojo-amarillo-verde-azul, del plano más superficial al más profundo respectivamente). Escala: 50 μm en (B), equivale a 25 μm en (C) y 30 μm en (D).

Capítulo 2. Conexión GABAérgica Septohipocámpica en Envejecimiento y Enfermedad de Alzheimer

Los resultados expuestos en la presente tesis son los primeros en que la conexión GABAérgica septohipocámpica se estudia en envejecimiento y EA mediante técnicas de trazado de la conexión, combinadas con la detección de marcadores específicos de las neuronas de proyección y sus células diana. Además, se aportan datos inéditos sobre el estado funcional del hipocampo *in vivo* en el modelo de EA J20 (*hAPP*_{Swe, Ind}), para correlacionar así los datos histológicos con la fisiología de hipocampo. Los resultados muestran una alteración del componente GABAérgico de la conexión septohipocámpica durante el envejecimiento: aunque no se pierden células de proyección ni células diana, los ratones C57BL6/J de 18 meses presentan menos terminales GABAérgicos septales en el hipocampo en comparación a los animales de 2 meses. Los contactos remanentes, además, son menos complejos (tienen menor número de botones sinápticos por célula diana) tanto sobre interneuronas inmunopositivas para Parvalbúmina como para Calretinina. Estos mismos déficits se observan en animales transgénicos de la cepa J20, modelos de EA, en estadios más tempranos (8 meses de edad) y en todas las poblaciones de interneuronas estudiadas. Además, en los ratones transgénicos modelo de EA se observa una reducción en los patrones de actividad rítmica del hipocampo en frecuencias theta y gamma, en los cuales el sistema septohipocámpico tiene un papel crucial.

2. 1. ESTADO DE LA CONEXIÓN SEPTOHIPOCÁMPICA EN ENVEJECIMIENTO Y EA

Componente colinérgico de la conexión

Aunque en nuestro estudio hemos preferido abordar el análisis del componente GABAérgico septohipocámpico, mucho menos estudiado que el colinérgico, es importante hacer un inciso sobre el estado del componente colinérgico de la conexión en envejecimiento y EA. La visión aceptada actualmente es que en los primeros estadios de EA no hay muerte neuronal sino que ocurriría una desregulación funcional, en concreto del estado neurotrófico de las células colinérgicas. La disminución de receptores de NGF (trkA, p75) en estas neuronas sugiere una falta de respuesta a NGF, que podría provocar los desequilibrios en

niveles de acetilcolina o enzimas colinesterasas observados en pacientes de EA (Schliebs and Arendt, 2011).

La pérdida o retracción de terminales sinápticos colinérgicos, sin que la célula de proyección muera, es también un proceso de plasticidad que podría explicar la disminución de innervación sin muerte neuronal aparente en determinadas etapas del declive colinérgico. En el modelo de EA utilizado en esta tesis, la cepa transgénica J20, no hemos detectado disminución de la innervación colinérgica en neocórtex e hipocampo a las edades estudiadas (2 y 8 meses de edad; figura 19). Esta observación concuerda con datos publicados por otros grupos sobre la cepa J20: los animales transgénicos muestran menos terminales colinérgicos en neocórtex e hipocampo únicamente a partir de los 12 - 18 meses de edad, pero no antes (Aucoin et al., 2005). Por tanto, es destacable el hecho de que la alteración GABAérgica septal descrita en los resultados de esta tesis es más temprana que la del componente colinérgico, al menos en cuanto al estado de los terminales sinápticos en hipocampo.

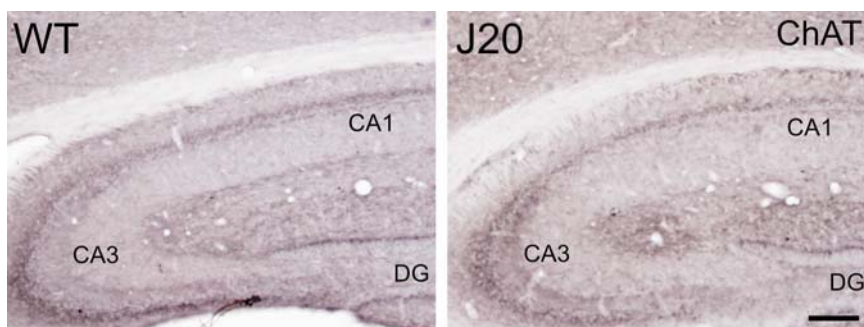


Figura 19. Innervación colinérgica del hipocampo en la cepa J20. La inmunodetección del enzima colinacetiltransferasa (ChAT, en negro) demuestra la densidad de fibras colinérgicas en el hipocampo de un ratón transgénico de la cepa J20 a los 8 meses de edad (J20), similar a la de un control (WT). Escala: 125 μ m.

Componente GABAérgico de la conexión en envejecimiento

El componente GABAérgico de la conexión septohipocámpica, tal y como se demuestra en esta tesis, está afectado durante el envejecimiento fisiológico en ratones. Los animales WT de 18 meses de edad presentan, en comparación con los animales jóvenes, una reducción del 60% en el número de contactos GABAérgicos septales sobre interneuronas de hipocampo. La complejidad (número de botones por célula diana) de estos contactos de tipo cesto también está disminuida para todos los tipos de interneuronas consideradas en este estudio, pero la alteración se restringe a los terminales sinápticos, puesto que no hay disminución en el número de neuronas GABAérgicas septohipocámpicas. Por el contrario,

varios estudios previos han descrito una disminución de esta población neuronal durante el envejecimiento (Krzywkowski et al., 1995; Madhusudan et al., 2009; Stanley and Fadel, 2011). Esta discrepancia con la bibliografía existente puede ser debida al uso de especies diferentes, a las edades consideradas o a la diferente metodología en las cuantificaciones.

Por otra parte, en cuanto al número de interneuronas de hipocampo, nuestros resultados no muestran apenas cambios durante el envejecimiento. Stanley y Shetty (2004) muestran que este parámetro no disminuye en ratas envejecidas, aunque se pierde inmunorreactividad para GAD67, hecho que los autores atribuyen a un fallo funcional o una pérdida del fenotipo GABAérgico en animales envejecidos (Stanley and Shetty, 2004). Nuestros análisis, detectando ambas isoformas del enzima GAD (GAD65 y 67), no muestran cambios en el número total de interneuronas. Tampoco vemos disminución en la subpoblación de interneuronas positivas para Parvalbúmina, coincidiendo con estudios previos (Potier et al., 1994; Vela et al., 2003; Madhusudan et al., 2009; Stanley et al., 2011). Cabe destacar que, a diferencia de algunos de los estudios publicados, nuestros datos se refieren al área hipocámpica total, para relacionar este dato con la presencia de terminales septales, presentes en todo el hipocampo. Por tanto, es posible que alteraciones más sutiles, a nivel de áreas específicas (CA, giro dentado), puedan quedar enmascaradas al agrupar todos los datos. Sería interesante, por otra parte, comprobar en ratones envejecidos el estado de otras subpoblaciones de interneuronas que disminuyen durante el envejecimiento [p.ej. Calbindina, (Potier et al., 1994) o Reelina (Madhusudan et al., 2009)] para comprobar el estado de la conexión septohipocámpica sobre éstas.

De todas maneras, es necesario remarcar que la inmunodetección de determinadas neuronas con marcadores específicos demuestra que no hay pérdida neuronal, pero no garantiza el correcto funcionamiento de estas células. Por tanto, no permite descartar posibles alteraciones en la función neuronal, para lo cual se deben utilizar técnicas funcionales u otros marcadores que reflejen su nivel de actividad o función sináptica.

Componente GABAérgico de la conexión en modelos de EA

Como hemos comentado anteriormente, en la investigación del prosencéfalo basal en enfermedad de Alzheimer se ha dado preferencia tradicionalmente al estudio del componente colinérgico de la conexión septohipocámpica, por lo que existen pocos datos respecto al componente GABAérgico. Ante esta situación, nuestros estudios cobran especial importancia ya que aportan nuevos datos sobre un aspecto apenas explorado previamente en la patología de Alzheimer, y cuya implicación funcional es evidente teniendo en cuenta algunos de los

déficits cognitivos en pacientes de EA y modelos animales (por ejemplo, alteraciones en aprendizaje y memoria visuoespaciales). Sin embargo, esta misma circunstancia hace más difícil contextualizar e interpretar los datos en el marco de la bibliografía existente.

La mayor cantidad de información sobre el sistema GABAérgico septohipocámpico en modelos de EA que se puede extraer de los datos publicados hasta ahora se refiere únicamente al estado de las células diana de la conexión: las interneuronas de hipocampo. Aunque existen datos contradictorios, en general no hay pérdida de interneuronas en modelos transgénicos de *hAPP* simples. En cambio, es frecuente en modelos que combinan la expresión de *hAPP* con formas mutadas de *PSEN1/2* o *Tau* (Wirhth and Bayer, 2010). Nuestros resultados coinciden con datos provenientes de otros investigadores en la cepa transgénica J20, en que no se observa pérdida de interneuronas de hipocampo (Palop et al., 2003).

En cuanto al estado de las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas y la función de esta conexión en modelos de AD diferentes a la cepa J20, existen muy pocos datos publicados a día de hoy:

-En un estudio de Villette y colaboradores, publicado en 2010, se intenta mimetizar la acumulación de placas amiloides en el hipocampo de ratas adultas mediante inyecciones de péptido β -amiloide en el hipocampo (Villette et al., 2010). El análisis en las siguientes 3 semanas muestra una reducción en la potencia del ritmo theta, de manera similar a nuestros resultados, junto con una disminución en la cantidad de potenciales de acción generados por las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas. Esto sugiere que la amiloidosis en hipocampo causa una inhibición de la conexión ya durante las primeras semanas de la patología.

En nuestro estudio, en que se analiza los efectos de amiloidosis a más largo plazo (la cepa J20 muestra placas amiloides en hipocampo a partir de los 5 meses), los animales transgénicos de 8 meses muestran también disminución en el ritmo theta y presentan menos terminales GABAérgicos septohipocámpicos, quizá a consecuencia de esos oligómeros de β -amiloide directamente o a procesos de plasticidad posteriores a la disfunción sináptica. El número de neuronas del MS/DBB inmunopositivas para Parvalbúmina no varía en los transgénicos J20 de 8 meses, mientras que las ratas a las que se les ha inducido la amiloidosis muestran, sorprendentemente, un aumento en la inmunorreactividad de Parvalbúmina en el MS/DBB. Esta discrepancia se ha de tener en cuenta en el diferente marco temporal de ambos estudios en cuanto al avance de la patología, siendo quizá el aumento de Parvalbúmina en el estudio de Villette et al, 2010 resultado de mecanismos compensatorios tempranos ante la

amiloidosis —mecanismos que se habrían extinguido más adelante, en el momento en que están recogidos nuestros datos.

Por otra parte, es importante reconocer que este modelo de amiloidosis en rata y la cepa J20 utilizada en nuestro estudio difieren en varios aspectos. En primer lugar, las especies son distintas. Asimismo, el diferente origen del péptido amiloide (exógeno en el caso de las inyecciones o endógeno en el caso de la cepa J20), la dosis aplicada y sobretodo el tiempo que el péptido ha estado presente en el tejido en cada uno de los estudios seguramente conllevan diferencias en cuanto a la toxicidad de las especies amiloides y su agregación, la respuesta glial asociada, los procesos de plasticidad y reorganización que pueden darse en cada situación, etc.

-Este mismo año se ha publicado un estudio sobre el estado de la conexión septohipocámpica en EA, realizado en este caso en la cepa transgénica de ratón TauPS2APP (Loreth et al., 2012). Esta cepa expresa formas mutadas de *Tau*, *PSEN2* y *APP*, y presenta acumulación de péptido β -amiloide, placas seniles y ovillos neurofibrilares en el hipocampo. Los ratones transgénicos de 12 y 18 meses de edad no presentan cambios en el componente colinérgico septohipocámpico, pero sí se observa menor número de células inmunorreactivas para Parvalbúmina (*i.e.*, neuronas GABAérgicas septohipocámpicas) en el septum medial. Además, a los 18 meses hay pérdida de interneuronas positivas para Calretinina y Neuropeptido Y en todas las regiones de hipocampo, y positivas para Parvalbúmina en el giro dentado e hilus. Estos datos concuerdan en parte con nuestros resultados, aunque el número total de interneuronas hipocámpicas ($GAD67^+$) en el transgénico TauPS2APP también se ve disminuido a los 18 meses de edad. Hay que tener en cuenta que ambas cepas de transgénicos expresan diferentes genes asociados a EA familiar, por tanto es arriesgado hacer comparaciones directas y estrictas entre ambos modelos. Es probable que TauPS2APP, al desarrollar también taupatía, muestre un efecto sinérgico en los mecanismos patogénicos debido a las diferentes mutaciones expresadas, y tenga un fenotipo más agresivo y afecte por tanto a más poblaciones neuronales, como ya se ha descrito en otras cepas de transgénicos dobles modelos de EA (Wirhth and Bayer, 2010). Éste puede ser también el motivo por el que existan menos neuronas GABAérgicas septohipocámpicas en el modelo TauPS2APP, aunque también hay que considerar que la edad más temprana a la que esta alteración se observa en TauPS2APP (12 meses) es mayor que la edad a la que se ha estudiado en la cepa J20 en esta tesis (8 meses). Por tanto, no se puede descartar una posible afectación del componente GABAérgico septohipocámpico a nivel de soma en ratones J20 a edades más avanzadas, de

igual manera que sería interesante saber si en la cepa TauPS2APP existe disfunción GABAérgica septohipocámpica a nivel de sinapsis antes de que ocurra la pérdida de somas en MS/DBB.

2. 2. MECANISMOS PATOGENICOS SOBRE EL COMPONENTE GABAÉRGICO

Los animales transgénicos de la cepa J20 sufren una disminución de la innervación GABAérgica septohipocámpica, tanto en la cantidad de contactos que establecen sobre interneuronas de hipocampo como en la complejidad de éstos. El análisis histológico del MS/DBB y el hipocampo de estos animales demuestra que no hay pérdida de las neuronas de proyección en septum ni de las neuronas diana en hipocampo, respectivamente. Por tanto, las alteraciones morfológicas observadas en estos animales se restringen exclusivamente a los terminales axónicos.

Los estudios preliminares que hemos realizado no muestran colocación de marcadores de placas amiloides con los terminales septohipocámpicos en animales J20 de 8 meses (datos no mostrados). Por lo tanto, si existe algún efecto deletéreo del β -amiloide sobre los terminales axonales septohipocámpicos, éste debe ser mediado por formas solubles del péptido (presentes a altas concentraciones en el hipocampo de transgénicos J20; Mucke et al, 2000) o bien por formas intermedias de agregación previas a la formación de placas, hipótesis que concuerda con la visión actual (Masters CL, 2012). De hecho, se ha demostrado que la sinaptotoxicidad del β -amiloide ocurre en diversos modelos transgénicos de EA, incluida la cepa J20, sin que haya deposición de placas (Mucke et al., 2000).

Numerosos estudios han comprobado la inmunorreactividad de la proteína presináptica Sinaptofisina para testar la cantidad de terminales sinápticos en el tejido de pacientes o modelos animales de EA. Lamentablemente, esta metodología no permite discriminar los tipos de sinapsis en cuanto al neurotransmisor utilizado, ya que Sinaptofisina es un marcador presente en todos los tipos neuronales. Las sinapsis en las que más se ha estudiado funcionalmente la neurotoxicidad del péptido β -amiloide son las sinapsis excitadoras, especialmente las glutamatérgicas de hipocampo, debido a la extensa metodología desarrollada para analizar su función. Diferentes estudios demuestran que la cantidad de β -amiloide y los niveles de actividad neuronal están íntimamente relacionados, de manera que concentraciones muy altas del péptido dificultan la transmisión sináptica

glutamatérgica, llegando a causar la pérdida de los terminales sinápticos (Hsia et al., 1999; Palop and Mucke, 2010). Los mecanismos por lo cuales se altera la transmisión sináptica incluyen la internalización de receptores de glutamato de tipo NMDA y AMPA en la sinapsis y la activación de ciertos receptores (NMDA, mGluR, α 7-nAChR) en el espacio perisináptico (Snyder et al., 2005; Shankar et al., 2007). También se ven afectadas determinadas vías de señalización asociadas al citoesqueleto de actina (calcineurina-cofilina) o GSK-3 β en el compartimento postsináptico, que comprometerían su integridad causando finalmente su colapso (Kamenetz et al., 2003; Shankar et al., 2007). Por otra parte, el péptido β -amiloide es capaz de afectar las propiedades de membrana y por tanto la transmisión sináptica mediante la formación de poros en la membrana neuronal (Zhu et al., 2000).

Los resultados de nuestros estudios muestran una reducción en torno al 50% en el número y complejidad de los contactos GABAérgicos septohipocámpicos en los transgénicos J20 a los 8 meses de edad. Esto sugiere un papel tóxico de β -amiloide directamente sobre las sinapsis GABAérgicas septohipocámpicas. Aunque es un campo menos estudiado, la bibliografía muestra alteraciones de la transmisión GABAérgica en varios modelos de EA, supuestamente mediados por péptido β -amiloide. Se ha demostrado que la falta o sobreexpresión de APP altera los niveles y actividad de ciertos canales de calcio presentes en neuronas GABAérgicas (Yang et al., 2009). En ratones de la cepa J20, además, hay alteraciones del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.1 en interneuronas Parvalbúmina⁺ (Verret et al., 2012). En cuanto a los receptores GABAérgicos, aunque la mayor parte de bibliografía muestra que los receptores GABA_A no están afectados en EA, hay pruebas de que algunas de sus subunidades o la capacidad de unión de éstos estarían disminuídas en EA (Rissman and Mobley, 2011).

Dada la poca información existente al respecto, es obvio que hacen falta más experimentos para analizar el papel sinaptotóxico de APP y β -amiloide sobre las sinapsis GABAérgicas. A este respecto, los cultivos organotípicos desarrollados en la presente tesis ofrecen una oportunidad excelente para testar el efecto del β -amiloide sobre las sinapsis GABAérgicas de la conexión. El abordaje *in vitro* permite una mejor manipulación del sistema, de tal manera que se pueden aplicar especies de β -amiloide en diferentes estados de agregación, a diferentes tiempos, y analizar entonces el componente GABAérgico septal, marcadores funcionales de estas sinapsis, estado de los receptores GABAérgicos en hipocampo e incluso el papel de β -amiloide sobre la sinaptogénesis y estabilidad de las

sinapsis septohipocámpicas. El protocolo de filmación de cultivos organotípicos que estamos desarrollando puede resultar también muy útil para este tipo de estudio.

2.3. IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA ALTERACIÓN GABAÉRGICA SEPTOHIPOCÁMPICA EN EA

Hemos demostrado aquí que los animales de la cepa J20 presentan una disminución en los patrones de actividad rítmica en hipocampo a los 8 meses, edad en que el número y complejidad de las sinapsis en cesto GABAérgicas septohipocámpicas están reducidos. En concreto, la actividad en frecuencia theta (4.1 a 8 Hz) y gamma (26.1 a 100 Hz) de los animales J20 de 8 meses disminuye en torno a un 40% respecto a los de 2 meses, independientemente del grado de actividad locomotora del individuo. Tales patrones de actividad están relacionados con procesos cognitivos que se ven afectados durante el envejecimiento y EA.

Por una parte, en cuanto al proceso de envejecimiento, estudios en animales de experimentación y humanos en edades avanzadas muestran alteraciones en patrones de sueño [p.ej. sueño REM (Miles and Dement, 1980; Bliwise, 1993)] y fallos en procesos cognitivos (Lamour et al., 1989) dependientes de ritmo theta hipocámpico. A este respecto, sería interesante ampliar el estudio de los ritmos de actividad hipocámpica mostrados en los resultados de esta tesis con datos de animales envejecidos, para comprobar cómo se encuentran los patrones theta y gamma durante el envejecimiento fisiológico y, si existe alguna alteración, caracterizar su evolución temporal.

Por otra parte, en la enfermedad de Alzheimer existen indicios de alteraciones funcionales en la conexión septohipocámpica, presentes tanto en animales de experimentación como en pacientes de EA. Los ratones transgénicos de la cepa J20 muestran peor desempeño en tareas visuoespaciales como el laberinto acuático de Morris (*Morris watermaze*) y el test de reconocimiento de objetos (*novel object recognition*), de las cuales es responsable el sistema septohipocámpico (Roberson et al., 2007; Sanchez-Mejia et al., 2008). Estos déficits en la memoria y el aprendizaje visuoespacial correlacionan con síntomas descritos en humanos: los pacientes de EA demuestran una peor integración de la información espacial para calcular su posición y frecuentemente se desorientan en entornos familiares en los que previamente no tenían problemas (Iachini et al., 2009).

Otra correlación entre el modelo J20 y los pacientes de EA se refiere a la susceptibilidad de ambos a actividad de tipo epiléptico. Los animales transgénicos J20 muestran ciertos patrones epileptiformes en los registros electroencefalográficos de neocórtex e hipocampo, aunque en la mayoría de casos no van acompañados de crisis tónico-clónicas. Además, estos animales son más sensibles al antagonista GABAérgico pentilenotetrazol (PTZ; Palop et al., 2007). De manera análoga, los pacientes de EA tienen mayor riesgo de padecer ataques epilépticos que personas sanas de su misma edad, especialmente en la forma familiar de la enfermedad (Amatniek et al., 2006). Aunque estas alteraciones no son uno de los síntomas más característicos en pacientes de EA, se ha sugerido que puedan ser más frecuentes de lo que se cree ya que se trata, en la mayoría de casos, de actividad epileptiforme sin síntomas aparentes y posiblemente no reportada a nivel clínico. Esta actividad epileptiforme es resultado de un desequilibrio en los niveles de excitación e inhibición en los circuitos o redes neuronales. La conexión GABAérgica septohipocámpica, al controlar los circuitos inhibidores de hipocampo, tiene un papel crucial en el mantenimiento de los niveles adecuados de excitación. Por tanto, el déficit de terminales GABAérgicos septohipocámpicos descrito en esta tesis puede contribuir a explicar el fenotipo epileptiforme en la cepa J20. Los resultados electrofisiológicos obtenidos en el hipocampo de transgénicos J20 concuerdan con el aumento de actividad epileptiforme hipocámpica, ya que se ha demostrado que la actividad theta es un estado funcional que evita la aparición de focos de actividad epiléptica en el hipocampo (Miller et al., 1994), y en este mismo modelo de EA se ha descrito mayor frecuencia de espigas poblacionales (*i.e.*, actividad epileptiforme) durante episodios de baja intensidad de ritmo gamma (Verret et al., 2012). Precisamente, un elemento que puede explicar la susceptibilidad de los transgénicos J20 a actividad epileptiforme es la falta de terminales septales GABAérgicos sobre la subpoblación de interneuronas Parvalbúmina-positivas en hipocampo, con la consecuente afectación funcional de éstas. Esta subpoblación de interneuronas está involucrada en procesos epileptogénicos en neocórtex e hipocampo (DeFelipe, 1999), y se ha descrito que los animales deficientes en *Parvalbúmina* muestran alteraciones de los circuitos neuronales que los hacen más propensos a ataques epilépticos inducidos por PTZ (Schwaller et al., 2004).

Otro punto importante a destacar es la disminución de la actividad gamma hipocámpica que hemos encontrado en los transgénicos J20, probablemente debida a la falta de aferencias desde el MS/DBB que demostramos en el presente trabajo o a un fallo en la función de las células Parvalbúmina como generadores intrahipocámpicos de ritmo gamma (Mann and Paulsen, 2005). El acoplamiento theta-gamma en hipocampo es un fenómeno

dependiente de la población de interneuronas positivas para Parvalbúmina (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009), y en especial de la inhibición sináptica rápida (de tipo *fast-spiking*) sobre estas células (Wulff et al., 2009). Esta inhibición rápida es debida a mecanismos intra- o extrahipocámpicos, en este último caso dependiente de la innervación GABAérgica septal sobre las interneuronas Parvalbúmina⁺. Los resultados de esta tesis apuntan a posibles alteraciones en el acoplamiento theta-gamma en EA, tal y como sugieren nuestros datos en ratones de la cepa J20, que muestran a los 8 meses una falta de inhibición rápida proveniente del MS/DBB y alteraciones en el ritmo gamma. Por ello sería interesante no sólo analizar el estado funcional de la población Parvalbúmina⁺ de hipocampo, sino ampliar los estudios electrofisiológicos descritos en transgénicos J20 para comprobar el acoplamiento theta-gamma en hipocampo —un fenómeno relacionado con la codificación y recuperación de recuerdos, la representación de secuencias espaciales y la memoria de trabajo (Colgin and Moser, 2010), procesos típicamente afectados en envejecimiento y EA

2.4. LA CONEXIÓN SEPTOHIPOCÁMPICA COMO SISTEMA: ALTERACIONES A NIVEL DE CIRCUITOS Y REDES NEURONALES.

Hay que tener en cuenta que el sistema septohipocámpico no es un elemento aislado, sino que su correcto funcionamiento depende de la interacción de varios componentes.

En primer lugar, y desde un punto de vista de sistemas, la conexión septohipocámpica consta de varios sistemas de neurotransmisores que actúan de manera coordinada. Cualquier fallo que afecte a uno de ellos puede tener consecuencias en el conjunto de la vía. Además, al comportarse como un sistema dinámico, intenta compensar las perturbaciones a las que se ve sometido. Esto puede causar otras alteraciones secundarias, y en esta situación sería difícil reconocer qué fallos son causa o consecuencia, y de qué alteraciones. Por tanto, se requiere un análisis en diferentes estadios de la patología de cada uno de los elementos que juegan un papel (directa o indirectamente) en el sistema, de manera que se pueda reconocer qué mecanismos son patogénicos y cuáles son cambios compensatorios. Esta caracterización es clave desde un punto de vista terapéutico para diseñar tratamientos más eficientes.

Actualmente se tiene información de algunos de los elementos del sistema septohipocámpico, sobretodo del estado del componente colinérgico, en algunas situaciones patológicas (EA, lesiones, tratamientos farmacológicos) o fisiológicas (envejecimiento), pero es necesario un estudio exhaustivo de otros elementos del sistema y las relaciones entre unos

y otros. Los nuevos datos obtenidos del estudio del componente GABAérgico suponen un gran avance para entender el sistema en conjunto, especialmente tras demostrarse el papel crucial del sistema GABAérgico septohipocámpico en determinadas funciones hipocámpicas, asociadas a procesos cognitivos complejos, que se encuentran alteradas en envejecimiento o EA. Además, la limitada eficacia de los fármacos colinomiméticos disponibles actualmente sobre el avance de la enfermedad y el deterioro cognitivo de los pacientes de EA pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas. La demostrada afectación del componente GABAérgico septohipocámpico en EA abre la posibilidad de nuevos abordajes terapéuticos para esta patología.

Aferencias de las neuronas septohipocámpicas: estado en envejecimiento y EA

Considerando la complejidad del sistema, es importante tener en cuenta que las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas reciben aferencias tanto locales como provenientes de otras regiones: hipocampo, hipotálamo y núcleo medial del rafe, entre otros. Cualquier alteración en estos sistemas aferentes que tenga lugar durante el envejecimiento y EA debe ser considerada para interpretar el estado del sistema.

Por un lado, las alteraciones del sistema colinérgico septohipocámpico, sean a nivel funcional en las primeras etapas de la enfermedad o bien de tipo neurodegenerativo en etapas más avanzadas, pueden afectar a la función de las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas, ya que ambos elementos están anatómicamente conectados mediante circuitos locales. En el funcionamiento normal, las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas septales emiten axones colaterales que activan a las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas. Estos contactos son importantes para mantener el tono de activación necesario para la inducción septal del ritmo theta en hipocampo, por tanto un déficit en estos elementos pone en compromiso la generación de estos patrones de actividad en hipocampo.

Por otro lado, se han descrito alteraciones en algunas aferencias desde otras regiones durante el envejecimiento y la EA. Por ejemplo, las aferencias hipocretinérgicas activadoras provenientes de hipotálamo están disminuidas durante el envejecimiento, situación que puede contribuir a los déficits de alerta y vigilia presentes durante el envejecimiento fisiológico (Stanley and Fadel, 2011). En pacientes de EA, además, existe una disminución de las neuronas serotoninérgicas del núcleo medial del rafe que normalmente activan a las neuronas GABAérgicas septohipocámpicas (Chen et al., 2000). En el modelo murino de EA de amiloidosis inducida en hipocampo, del cual se ha hablado anteriormente (Villette et al., 2011), se ha detectado una disminución de las interneuronas hipocampo-septales

inmunopositivas para Calbindina y Somatostatina. Esto impediría el correcto diálogo entre hipocampo y septum, que es necesario para mantener los niveles de activación hipocámpica dentro de un rango fisiológico así como para colaborar al mantenimiento del ritmo theta hipocámpico de origen septal.

Desde un punto de vista más general, hay que tener en cuenta que no sólo el fallo en las neuronas hipocamposeptales, sino la alteración en la función hipocámpica general durante EA (seguramente causada por diversos mecanismos patogénicos) afectará a la función de la conexión septohipocámpica, ya que los diferentes sistemas se encuentran interconectados. A este respecto, es importante remarcar que, aunque en los resultados de esta tesis no se observa pérdida neuronal o alteraciones morfológicas evidentes de las dianas de la conexión GABAérgica septohipocámpica durante el envejecimiento y la EA, las interneuronas de hipocampo pueden estar afectadas a un nivel no detectable mediante las técnicas utilizadas en nuestro estudio. Por una parte, se desconoce si hay cambios en el compartimento postsináptico de la conexión septohipocámpica (cambios en los receptores GABAérgicos de las interneuronas hipocámpicas, por ejemplo). Por otra parte, las sinapsis de las interneuronas hipocámpicas sobre las células principales de hipocampo pueden estar afectadas tanto a nivel morfológico (p.ej. degeneración, remodelación de los terminales sinápticos o procesos de recrecimiento axonal o *sprouting*) como funcional (cambio en las propiedades sinápticas, alteración de los receptores postsinápticos, etc). Se necesitan más experimentos para comprobar el estado de estos elementos hipocámpicos, y poder interpretar mejor los resultados obtenidos en nuestros estudios. Como se ha mencionado al principio de este apartado, la complejidad de las alteraciones presentes en EA y otras enfermedades neurodegenerativas hace más difícil su estudio, pero es importante caracterizarlas para entender el funcionamiento de los diferentes elementos del sistema, los mecanismos patogénicos y las posibles aproximaciones terapéuticas a aplicar.

2.5 OTRAS CONSIDERACIONES

La EA como un proceso de envejecimiento acelerado

Los resultados expuestos en esta tesis muestran un fenotipo de envejecimiento acelerado en los animales transgénicos de la cepa J20 a 8 meses de edad en cuanto al estado de la conexión GABAérgica septohipocámpica. Actualmente, existe cierta controversia sobre

si la enfermedad de Alzheimer es un proceso de envejecimiento acelerado o, por el contrario, se trata de una enfermedad neurodegenerativa con mecanismos patogénicos propios. El mayor factor de riesgo para desarrollar EA es una edad avanzada, pero algunos autores argumentan que hacen falta otras lesiones o insultos para desarrollarla (Herrup, 2010).

En el caso de la cepa J20, la sobreexpresión del gen *hAPP* mutado causaría niveles altos de péptido β -amiloide u otros eventos asociados que acabarían causando la pérdida de terminales GABAérgicos septohipocámpicos a 8 meses de edad. En cambio, en los animales *wild-type* (WT) esta alteración sucede mucho más tarde, quizá porque requiera acumulación de APP o β -amiloide durante mucho más tiempo (la forma murina de APP no es capaz de agregar en forma de placas, así que las especies amiloides en WT serían más solubles que las presentes en modelos de EA que expresan APP humana) o bien porque sea el resultado de otros mecanismos patogénicos que finalmente convergen en el mismo fenotipo sobre los terminales GABAérgicos.

Uso de modelos animales para el estudio de la EA

Un aspecto imprescindible a discutir sobre este trabajo es el uso de animales de experimentación en el estudio de procesos y enfermedades que afectan a humanos. A fecha de hoy no existe ningún modelo animal que presente todas las alteraciones observadas en EA; posiblemente el modelo que más se aproxima es el de primates no humanos envejecidos (Price et al., 1991), pero debido al elevado coste y tiempo necesarios para trabajar con ellos, la mayor parte de investigación realizada se centra en especies murinas. Lamentablemente, la enfermedad de Alzheimer es una patología que ratas y ratones no sufren de manera natural (Woodruff-Pak, 2008). Por ello es necesario aplicar sustancias exógenas (p.ej., especies de β -amiloide) o alterar la expresión génica en estas especies para obtener modelos que muestren algunos aspectos de la enfermedad. Un aspecto clave para ello es la necesidad de conocer los mecanismos genéticos, moleculares, celulares y neurológicos de la enfermedad en pacientes. Aunque es cierto que estos conocimientos ayudan a diseñar modelos animales que recreen mejor la enfermedad, en muchas ocasiones es gracias a estos modelos animales, que presentan algunas de las características por separado, por los que se consiguen entender mecanismos aislados de la patología. Esta aproximación es especialmente útil para investigar las fases preclínicas de la patología, en que la falta de síntomas hace difícil su detección y estudio en pacientes humanos (Zahs and Ashe, 2010).

La aplicación de especies de péptido amiloide mejor caracterizadas y estandarizadas entre diferentes estudios, así como el desarrollo de animales transgénicos múltiples, están

permitiendo modelar mejor la enfermedad y obtener nueva información sobre los mecanismos patogénicos. De todas maneras, hay que tener precaución a la hora de extrapolar resultados de animales de experimentación a humanos, ya que por muy bien modelizada que esté la enfermedad, sigue habiendo diferencias entre especies en cuanto a determinados procesos fisiológicos, especialmente en niveles de funcionamiento superiores. Hace falta mucha más información, por ejemplo, sobre la electrofisiología de hipocampo en humanos. Por cuestiones metodológicas, la mayor parte de información existente en humanos se refiere a patrones de actividad cortical, y muy pocos estudios han investigado la electrofisiología del hipocampo humano *in vivo* y sus correlatos cognitivos o comportamentales (Cantero et al., 2003).

Otro aspecto fundamental es la existencia de formas esporádicas de la enfermedad de Alzheimer, no asociadas a mutaciones genéticas, que constituyen la mayoría de casos. Es lógico plantearse si los modelos transgénicos pueden aportar información sobre las causas patogénicas de estas variantes, y en todo caso, aunque la investigación con pacientes humanos es necesaria, la combinación de diferentes modelos animales puede igualmente aportar información muy útil sobre procesos patológicos presentes en la enfermedad, independientemente de si el origen es genético o esporádico.

Capítulo 3. Función Hipocámpica en el Modelo J20. Alteraciones ante Procesos de Autoestimulación Septal

Los datos obtenidos en el capítulo Resultados-II, en que estudiamos el estado de la conexión GABAérgica septohipocámpica en envejecimiento y EA, muestran una reducción del ritmo theta y gamma en el hipocampo de ratones transgénicos J20 (modelo de EA) a los 8 meses de edad. Estos resultados nos llevaron a plantear un estudio más amplio de la función sináptica del hipocampo de ratones J20 *in vivo* a los 8 meses, edad en que observamos importantes déficits de la conexión GABAérgica septohipocámpica. En paralelo, y teniendo en cuenta los estudios pioneros de Olds y Milner sobre autoestimulación septal, nos planteamos analizar el papel de la conexión GABAérgica septohipocámpica en este paradigma de refuerzo operante, y el efecto que esto provoca en hipocampo.

Los resultados derivados de este estudio demuestran que la sinapsis CA3-CA1 funciona normalmente en los animales transgénicos J20, aunque con alteraciones sutiles en la facilitación sináptica a corto plazo. Los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) de esta sinapsis están aumentados en el modelo de EA.

En un paradigma de condicionamiento operante de autoestimulación, en que los animales pueden autoadministrarse estímulos eléctricos reforzantes en el septum medial, los animales J20 presentan peor aprendizaje y ejecución de la tarea. Hemos demostrado que, en animales WT, este refuerzo operante se correlaciona con una disminución de la respuesta obtenida en la sinapsis CA3-CA1. Los transgénicos J20 no presentan tal disminución, especialmente durante los primeros días del test, y por tanto muestran peor aprendizaje y ejecución del paradigma de refuerzo operante, como se observa en nuestros resultados.

En estos mismos animales, además, la inducción de LTP afecta negativamente la ejecución de la tarea reforzante ya adquirida, seguramente porque la excesiva respuesta de la sinapsis una vez potenciada cancela esa disminución de la respuesta en CA3-CA1 que es necesaria para que tenga lugar el refuerzo operante.

3. 1. FUNCIÓN SINÁPTICA EN EL MODELO DE EA J20. **IMPLICACIONES FUNCIONALES**

Propiedades de la sinapsis colateral de Schaffer en ratones J20

Los terminales septales GABAérgicos acaban en todas las zonas de hipocampo, aunque de manera particularmente densa en las regiones del hilus y la CA3. La sinapsis CA3-CA1, o colateral de Schaffer, es especialmente interesante para estudiar el efecto que las aferencias septales pueden tener sobre la función de hipocampo, al ser una parte del circuito hipocámpico más densamente inervada por el septum medial. Además, se conocen con detalle las características electrofisiológicas de esta sinapsis, incluso en condiciones *in vivo* (Gruart et al., 2006; Madroñal et al., 2009).

A día de hoy, se han descrito numerosas características del hipocampo de ratones de la cepa J20 tanto a nivel molecular, celular, como de circuitos. En el aspecto funcional, las sinapsis y circuitos hipocámpicos en esta cepa han sido estudiados casi exclusivamente en condiciones *in vitro*, mediante experimentos en rebanadas de tejido (Palop et al., 2007). Nuestros datos son los primeros en que la sinapsis CA3-CA1 de hipocampo de animales J20 se estudia *in vivo*, aportando datos inéditos en condiciones fisiológicas.

En estas condiciones, los transgénicos J20 apenas muestran alteraciones en las propiedades sinápticas de las colaterales de Schaffer. Los experimentos de input/output muestran que la respuesta registrada en el área CA1 se comporta de manera similar en J20 y WT ante la presentación de estímulos aferentes de diferentes intensidades. Por tanto, la fuerza de la transmisión en esta sinapsis no se ve afectada en transgénicos. Resultados previos *in vitro*, en cambio, demuestran una disminución de la fuerza de la sinapsis CA3-CA1 en J20 (Palop et al., 2007); esta contradicción podría surgir de la diferente metodología empleada, ya que en las rebanadas de tejido se elimina una buena parte de los circuitos extrínsecos y locales, o del uso de animales de edades diferentes.

Los experimentos de pares de pulsos aportan información sobre fenómenos de plasticidad sináptica a corto plazo atribuidos a procesos de liberación de neurotransmisor por parte del componente presináptico (Zucker and Regehr, 2002). En la sinapsis CA3-CA1 de animales WT, tal y como se había descrito previamente (Madroñal et al., 2009), la presentación de dos pulsos (estímulos) separados por intervalos de entre 10 y 100 ms causa un aumento en la respuesta obtenida en el segundo pulso. Este proceso de facilitación desaparece cuando los pares de pulsos se presentan a intervalos mayores de 100 ms. En cambio, en los animales J20, la facilitación ocurre únicamente en pares de pulsos separados por intervalos

más largos (40 a 100 ms). Esto sugiere deficiencias en la liberación facilitada de neurotransmisor a tiempos cortos. Se ha descrito que cierta especie de oligómero (globulómero $A\beta_{1-42}$) afecta a la corriente de calcio P/Q presináptica y por tanto a la liberación de neurotransmisor (Nimmrich et al., 2008), por tanto la presencia de oligómeros de β -amiloide en el hipocampo de J20 podría explicar el fenómeno observado en los transgénicos. Sin embargo, a tiempos mayores, los animales J20 presentan una facilitación similar, incluso tiende a ser superior, que en los WT. De manera similar, en estudios electrofisiológicos de corteza que comparan registros *in vivo* e *in vitro* en diferentes condiciones se ha descrito facilitación a tiempos mayores cuanto mayor es la actividad basal del tejido, situación que concuerda con la hiperexcitabilidad y mayor actividad espontánea observada en el hipocampo de los animales transgénicos J20 (Palop et al., 2007; Verret et al., 2012).

Potenciación a largo plazo en la sinapsis colateral de Schaffer en ratones J20

Los resultados de los experimentos de LTP demuestran que el protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS, de las siglas en inglés para *High-Frequency Stimulation*) utilizado en la presente tesis es capaz de inducir correctamente LTP en animales J20. Este protocolo provoca una respuesta potenciada de la sinapsis CA3-CA1 tanto en WT como en transgénicos J20. Ahora bien, la duración de esta potenciación es mucho mayor en los transgénicos, ya que sigue activa 24 horas después de ser inducida, mientras en los WT ha desaparecido por completo. Una segunda estimulación de alta frecuencia vuelve a evocar LTP en ambos genotipos. Mientras que la LTP provocada en WT es similar a la del día anterior, la respuesta registrada en los transgénicos es mucho mayor, probablemente porque la sinapsis ya se encontraba potenciada antes de inducir una nueva LTP. El tercer día, tanto WT como J20 presentan una respuesta basal potenciada respecto al día anterior. En este caso, la aplicación del protocolo HFS causa LTP en los dos genotipos, aunque sin diferencias entre ambos ya que los WT muestran una potenciación de magnitud similar a la presentada por los animales J20.

Estos resultados sugieren un mantenimiento más eficaz de la LTP en los animales transgénicos, en que la LTP de fase temprana (e-LTP, siglas en inglés de *early-LTP*) se convierte a LTP de fase tardía (l-LTP, de *late-LTP*) sin necesidad de aplicar más estímulos externos a la sinapsis. Esto podría ser debido a que los transgénicos J20 tienen un umbral más bajo para la inducción de LTP, quizá debido al estado de hiperexcitabilidad en hipocampo sugerido también por otros resultados de esta tesis y por estudios previos en esta cepa (Palop et al., 2007).

Nuestros datos previos muestran graves alteraciones de la conexión GABAérgica septohipocámpica en animales J20 (véase el apartado *Resultados II*). Una menor función de la vía GABAérgica septal debería causar menos inhibición de las interneuronas hipocámpicas. Éstas células, más activas entonces, serían capaces de silenciar más eficazmente a las neuronas piramidales, con lo que se esperaría menor respuesta de la sinapsis CA3-CA1 en los transgénicos J20. Sorprendentemente, estos animales muestran mayor LTP. Una situación que se pone de manifiesto en estos experimentos *in vivo* es que la intrincada red de circuitos hipocámpicos no puede ser interpretada como un conjunto de elementos lineales del cual se obtiene una única respuesta predecible. Al contrario, el hipocampo contiene numerosos circuitos que conforman redes neuronales con múltiples contactos complejos entre sus elementos, de manera que, en un momento determinado, el patrón y niveles de actividad de una célula concreta dependerá del estado de muchos otros elementos del sistema, y esta célula, a su vez, determinará el estado de tantas otras que están bajo su control. El hecho de estudiar la función sináptica de hipocampo *in vivo* es un magnífico avance, sobre todo porque se mantiene el sistema completo en una situación fisiológica (no sólo los circuitos de hipocampo en concreto, sino el resto de sistema nervioso, hormonal y el comportamiento del individuo ante un entorno determinado). Sin embargo, esta extraordinaria complejidad, precisamente, hace que la interpretación de los fenómenos observados en este tipo de estudios suponga un auténtico reto para el experimentador.

A este respecto, y centrándonos en nuestros resultados, cobra protagonismo la hipótesis de la existencia de mecanismos compensatorios responsables de las respuestas observadas en transgénicos J20:

-Reajustes funcionales: si las aferencias GABAérgicas septales están disminuidas en estos animales, las interneuronas de hipocampo pueden inhibir más eficazmente a las neuronas piramidales, como se comentaba más arriba. Cabría esperar de las piramidales, entonces, menos actividad. Esto conllevaría una menor activación de vuelta hacia interneuronas locales, mediado por los axones colaterales de la propia célula piramidal (este proceso forma parte del sistema de inhibición retroactiva o *feedback inhibition*). De esta manera, disminuiría la activación de las interneuronas para intentar compensar la falta de inhibición septal, aunque no es fácil predecir si este mecanismo es capaz de retornar el sistema a su estado basal. Además, no se puede descartar una alteración funcional de las

propias interneuronas de hipocampo, siendo entonces responsables de inhibir menos a las células piramidales y provocando las respuestas observadas en nuestros experimentos.

-Cambios morfológicos: Cuando los niveles de actividad de células hipocámpicas están alterados durante mucho tiempo, pueden ocurrir procesos que reajusten la conectividad entre ellas, incluyendo la remodelación de sinapsis ya existentes e incluso la formación de nuevas conexiones mediante el crecimiento de fibras colaterales (procesos de *sprouting*). Esta reorganización de los circuitos, que ya se ha demostrado en el hipocampo de ratones J20 (Palop et al., 2007), causaría una desinhibición y excitabilidad excesiva de las neuronas piramidales, de manera que estímulos repetitivos como el protocolo de HFS causarían una potenciación de estas neuronas más eficaz y duradera que en el caso de los WT, como sugieren nuestros experimentos de LTP.

Por último, hay que destacar que, cuando las redes neuronales se sincronizan para oscilar en diferentes frecuencias, los esquemas de inhibición y desinhibición que normalmente rigen entre varios elementos del sistema desaparecen o cambian su comportamiento. Tanto células principales como determinados tipos de interneuronas disparan al unísono durante ciertas fases de los patrones oscilatorios en hipocampo, seguramente porque otros mecanismos en un orden de jerarquía superior controlan a ambos por igual. Por tanto, es arriesgado hacer predicciones siguiendo una lógica lineal de inhibición-desinhibición en sistemas oscilatorios.

LTP y déficits cognitivos en ratones J20

Un punto clave a discutir en este trabajo es la aparente contradicción entre los déficits cognitivos asociados a la cepa J20, modelo de EA, y el aumento en los niveles y duración de la LTP de la sinapsis CA3-CA1 observado en nuestros resultados. Estudios previos *in vitro* muestran que la e-LTP de esta sinapsis no está afectada en transgénicos J20 de 4-7 meses (Palop et al., 2007), aunque estos animales demuestren déficits cognitivos en el laberinto acuático de Morris o el test de reconocimiento de objetos a edades similares (Sanchez-Mejia et al., 2008). Nuestros resultados no sólo confirman esos resultados electrofisiológicos, sino que extienden el estudio a fases más tardías de la potenciación, en que hemos comprobado alteraciones en la LTP, en este caso al alza, en los transgénicos J20. Esta situación, en que una mayor LTP va asociada a déficits cognitivos o un peor aprendizaje, se ha demostrado

previamente en estudios de condicionamiento clásico (Madroñal et al., 2007; Sahun et al., 2007). Aunque supone una idea transgresora en el marco de la bibliografía actual, es posible que algunos procesos de potenciación sináptica a largo plazo en determinados circuitos causen el "borrado" de información preexistente o impidan la correcta codificación de información necesaria para la formación o mantenimiento de memorias (véase más adelante, *Efecto de la LTP sobre la autoestimulación septal*).

3. 2. EL SEPTUM MEDIAL COMO PARTE DEL SISTEMA DE REFUERZO INTERNO

Desde hace muchos años se sabe que el MS es un centro neural involucrado en procesos de refuerzo responsables de comportamientos de autoestimulación en animales de experimentación (Ball and Gray, 1971; Cazala et al., 1988). Los experimentos presentados en esta tesis confirman esos resultados, de manera que usando un paradigma de condicionamiento operante, los ratones aprenden a presionar una palanca (comportamiento voluntario) para obtener una activación eléctrica del MS (refuerzo). Durante las primeras sesiones, denominadas "de moldeamiento" o "*shaping*", los animales aprenden la asociación entre comportamiento y refuerzo mediante la aplicación de estímulos manuales por parte del experimentador cuando el ratón muestra interés por la palanca y la explora activamente. Cuando el animal es capaz de pulsar la palanca por sí mismo y administrarse el estímulo, se considera un comportamiento de autoestimulación, y el refuerzo suele ser tan fuerte que el animal deja cualquier otro comportamiento para dedicarse a él durante toda la sesión experimental (ver material suplementario en el CD adjunto).

Los animales J20, modelo de EA, aprenden la tarea de manera más lenta y presionan la palanca menos veces que los WT. De estos datos se deduce que obtienen menos refuerzo positivo de la autoestimulación septal, quizá debido a los déficits en la conexión GABAérgica septohipocámpica descritos en este modelo. Existe un paralelismo entre la falta de refuerzo observada en los animales J20 y los pacientes de EA: la apatía es uno de los síntomas neuropsiquiátricos presentes ya en las primeras fases de EA y que se mantiene de manera más persistente a medida que avanza la enfermedad, si bien es cierto que está poco reconocida en la sintomatología típica de EA (Landes et al., 2001). Aunque en la bibliografía actual no existe una definición consensuada del concepto "apatía", una de las que más se ajustan es la disminución de la motivación debido a alteraciones en el sistema de recompensa (Marin,

1990). Hay que tener en cuenta que el sistema de refuerzo involucra numerosas áreas del cerebro, es extraordinariamente complejo y difiere en algunos aspectos entre roedores y humanos, pero aún así los datos presentados en este trabajo sugieren una posible implicación de la conexión GABAérgica septohipocámpica en los síntomas de apatía y falta de motivación presentes en pacientes de EA. Para comprobar esta hipótesis son necesarios estudios en pacientes que muestren apatía, buscando alteraciones en la conexión septohipocámpica, así como en modelos animales que permitan realizar estudios funcionales complementarios para testar la implicación de la conexión en estos procesos.

Los resultados electrofisiológicos del estudio que presentamos aquí, por otra parte, aportan información sobre algunos aspectos neurofisiológicos del sistema de refuerzo mediado por septum medial. La estimulación eléctrica del septum medial provoca una respuesta directa en la región CA1 en forma de potencial de campo. La amplitud de esta respuesta es mayor en los animales transgénicos J20, hecho que reafirma la argumentación de una función sináptica facilitada en el hipocampo de estos animales. Este mismo proceso puede explicar que, cuando se comprueba la sinapsis colateral de Schaffer justo después del tren septal, ésta muestra una respuesta de mayor amplitud (facilitada) en los transgénicos. En cambio, la respuesta de esta sinapsis en los animales WT es menor que en condiciones basales: la estimulación de septum medial causa una "desfacilitación" de la sinapsis CA3-CA1. Creemos que esta inhibición forma parte del proceso de refuerzo, ya que la excesiva respuesta que se observa tras la estimulación septal en el hipocampo de ratones transgénicos J20 impide esa desfacilitación: esto dificultaría la obtención del refuerzo, por lo que tardan más en aprender y se autoestimulan menos que los WT.

La implicación de hipocampo en estos procesos de refuerzo operante podría estar reflejando procesos cognitivos fundamentales para obtener recompensas positivas: es necesario codificar y aprender el contexto, así como las conductas que llevan a la obtención de tal refuerzo.

Un punto importante a destacar es que la mayor o menor respuesta, en J20 y WT respectivamente, del potencial de campo obtenido tras estimular las colaterales de Schaffer, se debe exclusivamente a cambios en la amplitud del componente glutamatérgico de la respuesta. Los análisis realizados no muestran cambios en la amplitud del componente GABA (tanto evocado por receptores GABA_A como GABA_B). Aún así, no se puede descartar que haya alteraciones en la función GABAérgica de hipocampo en la cepa J20, especialmente

teniendo en cuenta que todos los datos de autoestimulación están normalizados respecto de la condición basal *para cada uno de los animales*. Cualquier alteración basal del componente GABAérgico que pudiera existir en el hipocampo de ratones J20, especialmente las debidas a reorganizaciones morfológicas de las sinapsis, puede no verse afectada de manera específica ante una estimulación previa en septum medial.

3.3. EFECTO DE LA LTP SOBRE LA AUTOESTIMULACIÓN SEPTAL

Tras comprobar el efecto de la autoestimulación septal sobre la función de hipocampo, quisimos realizar una aproximación inversa al problema estudiando el efecto de determinados procesos hipocámpicos, como la LTP, sobre el paradigma de autoestimulación septal. La LTP de la sinapsis CA3-CA1 afecta a la tarea de condicionamiento operante únicamente en los animales transgénicos J20. En concreto, nuestros datos revelan que los animales transgénicos muestran menor eficiencia de autoestimulación justo después de la inducción de la LTP para los tres días consecutivos en que se aplica el protocolo de HFS. Esto concuerda con nuestra argumentación de que hace falta una disminución en la respuesta de la sinapsis colateral de Schaffer para que tenga lugar el refuerzo de autoestimulación septal, ya que la gran potenciación de la sinapsis en J20 anula el refuerzo. Este efecto no se observa en WT, seguramente porque la respuesta de LTP es menor que en los J20 o porque en estos animales ya se ha consolidado la memoria necesaria para llevar a cabo la tarea reforzante (el comportamiento de refuerzo es más estable en los animales WT, que presentan también mayor ejecución).

3.4. CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos mediante el protocolo de condicionamiento operante expuesto en este trabajo muestran una correlación entre la disminución de la conexión GABAérgica septohipocámpica presente en los transgénicos J20 y los procesos de refuerzo dependientes de autoestimulación septal. Aunque la aproximación *in vivo* de estos experimentos representa una oportunidad extraordinaria para extraer información en condiciones más fisiológicas de los procesos que ocurren naturalmente en el sistema nervioso, hay que tener en cuenta las limitaciones metodológicas asociadas a estos experimentos.

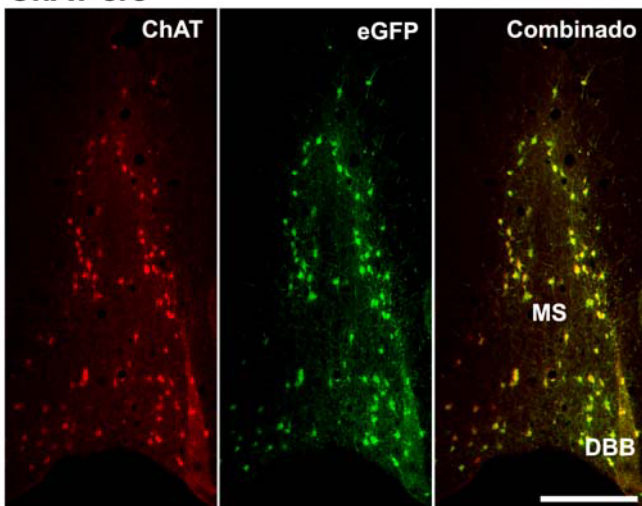
En primer lugar, la estimulación eléctrica aplicada está dirigida a la zona medial del septum, pero no se puede descartar la activación de fibras provenientes de otras regiones que pasen por esta zona (*fibers of passage*) ni la activación antidrómica* de las fibras hipocamposeptales, que provienen de interneuronas localizadas mayoritariamente en las zonas CA3 y CA1 de hipocampo. Además, la estimulación eléctrica no es específica del tipo celular, y por tanto puede estar afectando también al componente colinérgico de la vía, y al recientemente descrito componente glutamatérgico, cuyo efecto no ha sido todavía estudiado. Igualmente, se pueden activar los circuitos locales del MS/DBB, que afectan a la función de las neuronas de proyección. Por tanto, sería interesante llevar a cabo experimentos en que se pueda manipular de manera específica el componente GABAérgico de la conexión para descartar los posibles efectos inespecíficos de la estimulación septal.

Actualmente, la ingeniería molecular ha permitido desarrollar herramientas para manipular más finamente la actividad neuronal. Un ejemplo de ello es la optogenética, que permite utilizar luz para manipular selectivamente la función de neuronas, mediante la introducción de canales iónicos fotosensibles en poblaciones neuronales específicas combinado con la aplicación de pulsos de luz (Carter and de Lecea, 2011; Yizhar et al., 2011). La implementación de técnicas de optogenética en los estudios de autoestimulación utilizados en la presente tesis permitiría la activación o silenciamiento selectivo del componente GABAérgico septohipocámpico. Para ello, se deberían introducir canalrodopsinas activadoras (en este caso, variantes capaces de generar frecuencias de disparo altas típicas de células Parvalbúmina⁺, como el canal ChETA) en la población Parvalbúmina⁺ del MS/DBB, utilizando cepas de ratones transgénicos como GAD67-*cre* o Parvalbúmina-*cre*, combinadas con vectores de expresión de canalrodopsina dependiente del sistema *cre-loxP*. Para el silenciamiento, los mismos animales transgénicos serían inyectados con vectores de expresión de halorrodopsinas inhibitoras dependiente de Cre. Para manipular el componente colinérgico de la conexión, por otra parte, se podrían utilizar otras cepas transgénicas como ChAT-*cre*. Entonces, la aplicación de luz de diferentes longitudes de onda mediante fibras ópticas implantadas crónicamente permitiría la activación o silenciamiento de cada componente de la vía, a la vez que se registra la actividad eléctrica en hipocampo y se comprueba el estado de la sinapsis CA3-CA1 *in vivo*.

* El término *antidrómico* se aplica al impulso nervioso que viaja desde el axón hacia el soma neuronal, es decir, en sentido contrario al normal u *ortodrómico*. La activación antidrómica de una neurona se puede provocar mediante estimulación eléctrica de su axón.

Durante una estancia breve realizada en la última etapa de esta tesis hemos emprendido el abordaje de optogenética en colaboración con el grupo del Dr. Luis de Lecea, en el departamento de Psicología y Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Stanford, California. Hemos puesto a punto las coordenadas y volumen de inyección de los vectores de expresión de opsinas en el MS/DBB. Asimismo, hemos diseñado las fibras ópticas necesarias para la manipulación *in vivo* mediante láser, y hemos caracterizado la expresión de la recombinasa *cre* en las cepas transgénicas GAD67-*cre* y ChAT-*cre*; hemos descartado el uso de los animales GAD67-*cre* porque no presentan la recombinasa en la población de neuronas septohipocámpicas GABAérgicas (figura 20).

ChAT-*cre*



GAD67-*cre*

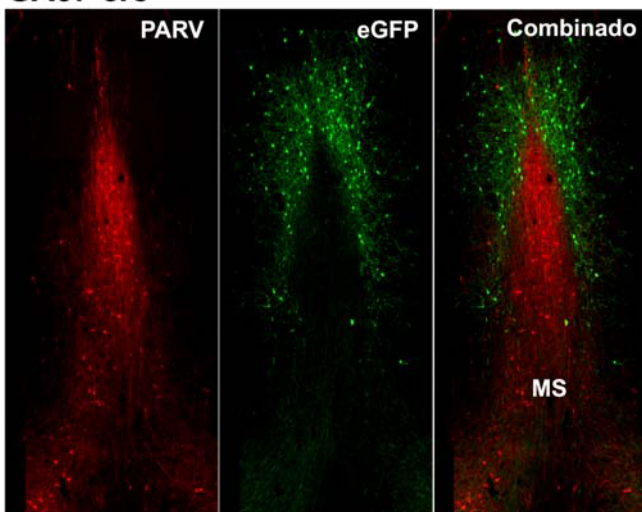


Figura 20. Expresión de la recombinasa Cre en el MS/DBB de varias líneas transgénicas de ratón.

Se analizó la presencia de la recombinasa Cre en el MS/DBB de ratones transgénicos que expresan *cre* bajo el promotor colinérgico ChAT (cepa ChAT-*cre*) o el promotor GABAérgico GAD67 (cepa GAD67-*cre*). Para ello, se infectó el MS/DBB de estos ratones con vectores que permiten la expresión del gen reportero *eGFP* sólo en las células que contengan Cre (vector AAV-EF1a-DIO-eGFP). La detección combinada del reportero (*eGFP*) con un marcador de neuronas colinérgicas (ChAT) muestra una colocalización absoluta del reportero (y por tanto, expresión de *cre*) en la población colinérgica del MS/DBB de ratones de la cepa ChAT-*cre* (panel superior). En cambio, no hay expresión de *cre* en las células GABAérgicas septohipocámpicas (inmunodetección de PARV) de ratones GAD67-*cre* (panel inferior). Escala: 250 μ m.

El abordaje de optogenética permitiría comprobar los efectos específicos del componente GABAérgico septohipocámpico sobre la sinapsis CA3-CA1 y sobre los procesos de refuerzo dependientes de septum medial. Mediante esta técnica se puede descartar la participación de otros elementos del sistema, no controlables por completo mediante los protocolos de estimulación eléctrica. Desde un punto de vista más amplio, la manipulación optogenética puede arrojar luz sobre la función (o disfunción) de la conexión GABAérgica septohipocámpica en muchos otros procesos, como por ejemplo la generación y mantenimiento de patrones rítmicos theta y gamma en hipocampo.

CONCLUSIONES

1. El cultivo organotípico septohipocámpico desarrollado en esta tesis recrea el desarrollo postnatal temprano de la conexión septohipocámpica manteniendo la especificidad de contacto del componente GABAérgico de la vía.
2. Ni la presencia de Semaforina 3C ni las aferencias entorrinohipocámpicas son imprescindibles para que tenga lugar la correcta selección de diana de los axones GABAérgicos septohipocámpicos *in vitro*.
3. Tanto el número como la complejidad de los contactos GABAérgicos septohipocámpicos sobre interneuronas IS-1 (Calretinina⁺) y axo-axónicas y de tipo cesto (Parvalbúmina⁺) de hipocampo disminuyen durante el envejecimiento no patológico (ratones de 18 meses).
4. Los ratones de la línea transgénica J20, modelo de la patología de Alzheimer, muestran una disminución en la innervación GABAérgica septohipocámpica más acusada, y de manera más prematura (8 meses), a lo observado durante el envejecimiento fisiológico.
5. Paralelamente a la grave pérdida de innervación GABAérgica septohipocámpica, los animales J20 muestran una disminución en la potencia de los ritmos theta y gamma hipocámpicos.
6. Las alteraciones de la vía GABAérgica septohipocámpica en envejecimiento y J20 se restringen a los terminales sinápticos, ya que no se observa muerte de las neuronas de proyección ni de sus células diana en el hipocampo.
7. La sinapsis CA3-CA1 de hipocampo en ratones J20 de 8 meses *in vivo* presenta alteraciones sutiles en la plasticidad sináptica a corto plazo y una LTP excesiva en comparación con animales control.

8. En un paradigma de condicionamiento operante por autoestimulación septal, la disminución del potencial de campo evocado en la sinapsis CA3-CA1 se correlaciona con el efecto reforzante de la tarea.

9. Sin embargo, los transgénicos J20 muestran alteraciones en el sistema de refuerzo mediado por septum medial en condiciones normales y, especialmente, tras la inducción de LTP en la sinapsis CA3-CA1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y. and K. Toyosawa (1999). "Age-related changes in rat hippocampal theta rhythms: a difference between type 1 and type 2 theta." *J Vet Med Sci.* 61(5): 543-8.
- Alonso, A. and C. Kohler (1982). "Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain." *Neurosci Lett.* 31(3): 209-14.
- Alreja, M. (1996). "Excitatory actions of serotonin on GABAergic neurons of the medial septum and diagonal band of Broca." *Synapse* 22(1): 15-27.
- Alreja, M., M. Wu, W. Liu, J. B. Atkins, C. Leranath and M. Shanabrough (2000). "Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory." *J Neurosci* 20(21): 8103-10.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 64: 146-148.
- Amaral, D. G. and J. Kurz (1985). "An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat." *J Comp Neurol* 240(1): 37-59.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (2004). "Hippocampal formation". in *The rat nervous system.* G. Paxinos. Amsterdam ; Boston, Elsevier Academic Press: xvii, 1309 p.
- Amatniek, J. C., W. A. Hauser, C. DelCastillo-Castaneda, D. M. Jacobs, K. Marder, K. Bell, M. Albert, J. Brandt and Y. Stern (2006). "Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease." *Epilepsia* 47(5): 867-72.
- Apartis, E., F. Poindessous-Jazat, J. Epelbaum and M. H. Bassant (2000). "Age-related changes in rhythmically bursting activity in the medial septum of rats." *Brain Res* 876(1-2): 37-47.
- Aucoin, J. S., P. Jiang, N. Aznavour, X. K. Tong, M. Buttini, L. Descarries and E. Hamel (2005). "Selective cholinergic denervation, independent from oxidative stress, in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuroscience* 132(1): 73-86.
- Baimbridge, K. G. and J. J. Miller (1982). "Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat." *Brain Research* 245(2): 223-229.
- Ball, G. G. and J. A. Gray (1971). "Septal self-stimulation and hippocampal activity." *Physiology & Behavior* 6(5): 547-549.
- Barnes, C. A. (1988). "Selectivity of neurological and mnemonic deficits in aged rats." in *Neural plasticity: A lifespan approach. Neurology and neurobiology.* T. L. Petit and G. O. Ivy. New York, NY, US. Vol. 36: pp. 235-264.
- Bartus, R. T. (2000). "On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis." *Experimental Neurology* 163(2): 495-529.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, B. Beer and A. S. Lippa (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. 217: 408-414.
- Belarbi, K., K. Schindowski, S. Burnouf, R. Caillierez, M. E. Grosjean, D. Demeyer, M. Hamdane, N. Sergeant, D. Blum and L. Buee (2009). "Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res.* 6(2): 152-7.
- Bliwise, D. L. (1993). "Sleep in normal aging and dementia." *Sleep.* 16(1): 40-81.
- Braak, H. and E. Braak (1994). "Pathology of Alzheimer's disease". in *Neurodegenerative diseases.* D. B. Calne. Philadelphia, W. B. Saunders: 585-613.
- Buhl, D. L., K. D. Harris, S. G. Hormuzdi, H. Monyer and G. Buzsáki (2003). "Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse in vivo." *J Neurosci* 23(3): 1013-1018.

- Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." *Nat Rev Neurosci* 7(1): 30-40.
- Buzsáki, G. (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." *Neuron* 33(3): 325-40.
- Buzsáki, G. (2005). "Theta rhythm of navigation: Link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory." *Hippocampus* 15(7): 827-840.
- Buzsáki, G. (2006). "Rhythms of the Brain", Oxford University Press, USA.
- Cantero, J. L., M. Atienza, R. Stickgold, M. J. Kahana, J. R. Madsen and B. Kocsis (2003). "Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex." *J Neurosci* 23(34): 10897-903.
- Cardin, J. A., M. Carlen, K. Meletis, U. Knoblich, F. Zhang, K. Deisseroth, L. H. Tsai and C. I. Moore (2009). "Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses." *Nature* 459(7247): 663-7.
- Carter, M. E. and L. de Lecea (2011). "Optogenetic investigation of neural circuits in vivo." *Trends in molecular medicine* 17(4): 197-206.
- Cazala, P., D. Galey and T. Durkin (1988). "Electrical self-stimulation in the medial and lateral septum as compared to the lateral hypothalamus: Differential intervention of reward and learning processes?" *Physiology & Behavior* 44(1): 53-59.
- Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci*. 5(9): 677-85.
- Colgin, L. L. and E. I. Moser (2010). "Gamma oscillations in the hippocampus." *Physiology (Bethesda)* 25(5): 319-329.
- Colom, L. V., M. T. Castaneda, T. Reyna, S. Hernandez and E. Garrido-Sanabria (2005). "Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus." *Synapse* 58(3): 151-64.
- Colom, L. V., M. T. Castañeda, C. Bañuelos, G. Puras, A. García-Hernández, S. Hernandez, S. Mounsey, J. Benavidez and C. Lehker (2008). "Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function." *Neurobiology of Aging* 31(1): 46-57.
- Chen, C. P. L. H., S. L. Eastwood, T. Hope, B. McDonald, P. T. Francis and M. M. Esiri (2000). "Immunocytochemical study of the dorsal and median raphe nuclei in patients with Alzheimer's disease prospectively assessed for behavioural changes." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26(4): 347-355.
- Chrobak, J. J. and G. Buzsáki (1998). "Gamma Oscillations in the Entorhinal Cortex of the Freely Behaving Rat." *Journal of Neuroscience* 18(1): 388-398.
- Davies, P. (1999). "Challenging the cholinergic hypothesis in Alzheimer disease." *JAMA*. 281(15): 1433-4.
- Davies, P. and A. J. Maloney (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." *Lancet* 2(8000): 1403.
- DeFelipe, J. (1999). "Chandelier cells and epilepsy." *Brain* 122(10): 1807-1822.
- DeKosky, S. T., M. D. Ikonovic, S. D. Styren, L. Beckett, S. Wisniewski, D. A. Bennett, E. J. Cochran, J. H. Kordower and E. J. Mufson (2002). "Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment." *Ann Neurol*. 51(2): 145-55.
- Duyckaerts, C., M.-C. Potier and B. t. Delatour (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." *Acta Neuropathologica* 115(1): 5-38.
- Feiner, L., A. L. Webber, C. B. Brown, M. M. Lu, L. Jia, P. Feinstein, P. Mombaerts, J. A. Epstein and J. A. Raper (2001). "Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption." *Development* 128(16): 3061-70.

- Flood, J. F. and J. E. Morley (1997). "Learning and memory in the SAMP8 mouse." *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 22(1): 1-20.
- Freund, T. F. (1989). "GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin." *Brain Res* 478(2): 375-381.
- Freund, T. F. and M. Antal (1988). "GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus." *Nature* 336(6195): 170-3.
- Freund, T. F. and G. Buzsáki (1996). "Interneurons of the hippocampus." *Hippocampus* 6(4): 347-470.
- Frotscher, M. and C. Léránth (1985). "Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study." *J Comp Neurol*. 239(2): 237-46.
- Frotscher, M. and C. Léránth (1986). "The cholinergic innervation of the rat fascia dentata: Identification of target structures on granule cells by combining choline acetyltransferase immunocytochemistry and Golgi impregnation." *J Comp Neurol* 243(1): 58-70.
- Gaykema, R. P. and L. Zaborszky (1996). "Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons." *The Journal of Comparative Neurology* 374(4): 555-577.
- Gaykema, R. P. A., P. G. M. Luiten, C. Nyakas and J. Traber (1990). "Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex." *The Journal of Comparative Neurology* 293(1): 103-124.
- Giacchino, J., J. R. Criado, D. Games and S. Henriksen (2000). "In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Brain Research* 876(1-2): 185-190.
- Green, J. D. and A. A. Arduini (1954). "Hippocampal electrical activity in arousal." *Journal of Neurophysiology* 17(6): 533-557.
- Greferath, U., A. Bennie, A. Kourakis and G. L. Barrett (2000). "Impaired spatial learning in aged rats is associated with loss of p75-positive neurons in the basal forebrain." *Neuroscience* 100(2): 363-373.
- Gruart, A., M. D. Munoz and J. M. Delgado-Garcia (2006). "Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice." *J Neurosci* 26(4): 1077-87.
- Grueninger, F., B. Bohrmann, C. Czech, T. M. Ballard, J. R. Frey, C. Weidensteiner, M. von Kienlin and L. Ozmen (2009). "Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Aβ in TauPS2APP triple transgenic mice." *Neurobiology of Disease* 37(2): 294-306.
- Gulyás, A. I., N. Hajos and T. F. Freund (1996). "Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus." *J Neurosci* 16(10): 3397-411.
- Gulyás, A. I., N. Hájos, I. Katona and T. F. Freund (2003). "Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum." *Eur J Neurosci*. 17(9): 1861-72.
- Gulyás, A. I., L. Seress, K. Toth, L. Acsády, M. Antal and T. F. Freund (1991). "Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey." *Neuroscience* 41(2-3): 381-90.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran and S. Sisodia (2012). "Trafficking and Proteolytic Processing of APP." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(5).
- Hajszan, T., M. Alreja and C. Léránth (2004). "Intrinsic vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive input to septohippocampal parvalbumin-containing neurons: novel glutamatergic local circuit cells." *Hippocampus* 14(4): 499-509.

- Halloran, M. C. and K. Kalil (1994). "Dynamic behaviors of growth cones extending in the corpus callosum of living cortical brain slices observed with video microscopy." *Journal of Neuroscience* 14(4): 2161-2177.
- Han, S.-H., B. A. McCool, D. Murchison, S.-S. Nahm, A. R. Parrish and W. H. Griffith (2002). "Single-cell RT-PCR detects shifts in mRNA expression profiles of basal forebrain neurons during aging." *Molecular Brain Research* 98(1-2): 67-80.
- Hangya, B., Z. Borhegyi, N. Szilagy, T. F. Freund and V. Varga (2009). "GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity." *J Neurosci* 29(25): 8094-102.
- Hardy, J. and D. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science*. 297(5580): 353-6.
- Heimrich, B., E. C. Papp, T. F. Freund and M. Frotscher (1996). "Regeneration of the GABAergic septohippocampal projection in vitro." *Neuroscience* 72(2): 409-17.
- Herrup, K. (2010). "Reimagining Alzheimer's disease: an age-based hypothesis." *J Neurosci* 30(50): 16755-16762.
- Hertzog, C., R. A. Dixon, D. F. Hultsch and S. W. MacDonald (2003). "Latent change models of adult cognition: are changes in processing speed and working memory associated with changes in episodic memory?" *Psychol Aging*. 18(4): 755-69.
- Hsia, A. Y., E. Masliah, L. McConlogue, G.-Q. Yu, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, R. C. Malenka, R. A. Nicoll and L. Mucke (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3228-3233.
- Iachini, I., A. Iavarone, V. P. Senese, F. Ruotolo and G. Ruggiero (2009). "Visuospatial memory in healthy elderly, AD and MCI: a review." *Curr Aging Sci* 2(1): 43-59.
- Itofusa, R. and H. Kamiguchi (2011). "Polarizing membrane dynamics and adhesion for growth cone navigation." *Molecular and Cellular Neuroscience* 48(4): 332-338.
- Kamenetz, F., T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia and R. Malinow (2003). "APP Processing and Synaptic Function." *Neuron* 37(6): 925-937.
- Kensinger, E. A. (2009). "Cognition in aging and age related disease." in *Handbook of the neuroscience of aging*. P. R. Hof and C. V. Mobbs. London, Elsevier Press.: 249-256.
- Keuker, J. I. H., P. G. M. Luiten and E. Fuchs (2003). "Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys." *Neurobiology of aging* 24(1): 157-165.
- Knobel, K. M., E. M. Jorgensen and M. J. Bastiani (1999). "Growth cones stall and collapse during axon outgrowth in *Caenorhabditis elegans*." *Development* 126(20): 4489-4498.
- Krzywkowski, P., F. De Bilbao, M. C. Senut and Y. Lamour (1995). "Age-related changes in parvalbumin- and GABA-immunoreactive cells in the rat septum." *Neurobiol Aging* 16(1): 29-40.
- Lamour, Y., M. H. Bassant, A. Robert and M. Joly (1989). "Septo-hippocampal neurons in the aged rat: relation between their electrophysiological and pharmacological properties and behavioral performances." *Neurobiol Aging*. 10(2): 181-6.
- Landes, A. M., S. D. Sperry, M. E. Strauss and D. S. Geldmacher (2001). "Apathy in Alzheimer's Disease." *Journal of the American Geriatrics Society* 49(12): 1700-1707.
- Larson, J., G. Lynch, D. Games and P. Seubert (1999). "Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice." *Brain Research* 840(1-2): 23-35.
- Leissring, M. A., W. Farris, A. Y. Chang, D. M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M. P. Frosch and D. J. Selkoe (2003). "Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death." *Neuron* 40(6): 1087-1093.

- Leranth, C., D. Carpi, G. Buzsaki and J. Kiss (1999). "The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm." *Neuroscience* 88(3): 701-718.
- Leranth, C., T. Deller and G. Buzsaki (1992). "Intraseptal connections redefined: lack of a lateral septum to medial septum path." *Brain Res* 583(1-2): 1-11.
- Leranth, C. and M. Frotscher (1989). "Organization of the septal region in the rat brain: cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers." *J Comp Neurol*. 289(2): 304-14.
- Leranth, C. and R. P. Vertes (1999). "Median raphe serotonergic innervation of medial septum/diagonal band of Broca (MSDB) parvalbumin-containing neurons: Possible involvement of the MSDB in the desynchronization of the hippocampal EEG." *The Journal of Comparative Neurology* 410(4): 586-598.
- Loerch, P. M., T. Lu, K. A. Dakin, J. M. Vann, A. Isaacs, C. Geula, J. Wang, Y. Pan, D. H. Gabuzda, C. Li, T. A. Prolla and B. A. Yankner (2008). "Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation." *PLoS One*. 3(10): e3329.
- Loreth, D., L. Ozmen, F. G. Revel, F. d. r. Knoflach, P. Wetzel, M. Frotscher, F. Metzger and O. Kretz (2012). "Selective degeneration of septal and hippocampal GABAergic neurons in a mouse model of amyloidosis and tauopathy." *Neurobiology of Disease* 47(1): 1-12.
- M'Harzi, M. and P. Monmaur (1985). "Selective lesions of the fimbria and the fornix in the rat: differential effects on CA1 and dentate theta." *Exp Neurol* 89(2): 361-71.
- Madhusudan, A., C. Sidler and I. Knuesel (2009). "Accumulation of reelin-positive plaques is accompanied by a decline in basal forebrain projection neurons during normal aging." *European Journal of Neuroscience* 30(6): 1064-1076.
- Madroñal, N., J. M. Delgado-García and A. Gruart (2007). "Differential effects of long-term potentiation evoked at the CA3 CA1 synapse before, during, and after the acquisition of classical eyeblink conditioning in behaving mice." *J Neurosci* 27(45): 12139-46.
- Madroñal, N., A. Gruart and J. M. Delgado-García (2009). "Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice." *Front Behav Neurosci* 3: 7.
- Malkinson, G. and M. E. Spira (2010). "Clustering of excess growth resources within leading growth cones underlies the recurrent "deposition" of varicosities along developing neurites." *Experimental neurology* 225(1): 140-153.
- Mandelkow, E.-M. and E. Mandelkow (2012). "Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7).
- Mann, E. O. and O. Paulsen (2005). "Mechanisms underlying gamma (γ 40 Hz) network oscillations in the hippocampus--a mini-review." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 87(1): 67-76.
- Manseau, F., M. Danik and S. Williams (2005). A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. 566: 865-884.
- Manseau, F., R. Goutagny, M. Danik and S. Williams (2008). "The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro." *J Neurosci* 28(15): 4096-107.
- Margeta, M. A. and K. Shen (2010). "Molecular mechanisms of synaptic specificity." *Molecular and Cellular Neuroscience* 43(3): 261-267.
- Marin, R. S. (1990). "Differential diagnosis and classification of apathy." *Am J Psychiatry* 147(1): 22-30.
- Masters CL, S. D. (2012). "Biochemistry of Amyloid beta-Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(6): a006262.

- Masters, C. L. and D. J. Selkoe (2012). "Biochemistry of Amyloid beta-Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(6): a006262.
- Mátyás, F., T. F. Freund and A. I. Gulyás (2004). "Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology." *Hippocampus* 14(4): 460-81.
- Medina, L. and A. Abellán (2012). "Subpallial Structures". in *The Mouse Nervous System*. C. Watson, G. Paxinos and L. Puelles. San Diego, Academic Press: 173-220.
- Meibach, R. C. and A. Siegel (1977). "Efferent connections of the septal area in the rat: An analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods." *Brain Research* 119(1): 1-20.
- Mesulam, M. (2004). "The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show?" *Learn Mem* 11(1): 43-9.
- Miles, L. E. and W. C. Dement (1980). "Sleep and aging." *Sleep* 3(2): 1-220.
- Miller, J. W., G. M. Turner and B. C. Gray (1994). "Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity." *Epilepsy Res.* 18(3): 195-204.
- Mosko, S., G. Lynch and C. W. Cotman (1973). "The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat." *J Comp Neurol.* 152(2): 163-74.
- Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood and L. McConlogue (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci* 20(11): 4050-8.
- Mufson, E. J., S. D. Ginsberg, M. D. Ikonomic and S. T. DeKosky (2003). "Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction." *J Chem Neuroanat* 26(4): 233-42.
- Newman, M. C. and A. W. Kaszniak (2000). *Spatial Memory and Aging: Performance on a Human Analog of the Morris Water Maze*, Psychology Press. 7: 86 - 93.
- Nimmrich, V., C. Grimm, A. Draguhn, S. Barghorn, A. Lehmann, H. Schoemaker, H. Hillen, G. Gross, U. Ebert and C. Bruehl (2008). "Amyloid β Oligomers (A β 1-42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents." *Journal of Neuroscience* 28(4): 788-797.
- O'Keefe, J. (2007). "Hippocampal neurophysiology in the behaving animal". in *The Hippocampus Book*. P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss and J. O'Keefe. New York, Oxford University Press: 487-517.
- Olds, J. and P. Milner (1954). "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain." *J Comp Physiol Psychol.* 47(6): 419-27.
- Palop, J. J., J. Chin, E. D. Roberson, J. Wang, M. T. Thwin, N. Bien-Ly, J. Yoo, K. O. Ho, G. Q. Yu, A. Kreitzer, S. Finkbeiner, J. L. Noebels and L. Mucke (2007). "Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." *Neuron* 55(5): 697-711.
- Palop, J. J., B. Jones, L. Kekonius, J. Chin, G. Q. Yu, J. Raber, E. Masliah and L. Mucke (2003). "Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16): 9572-7.
- Palop, J. J. and L. Mucke (2010). "Amyloid-[beta]-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." *Nat Neurosci* 13(7): 812-818.
- Pascual, M., P. Perez-Sust and E. Soriano (2004). "The GABAergic septohippocampal pathway in control and reeler mice: target specificity and termination onto Reelin-expressing interneurons." *Mol Cell Neurosci* 25(4): 679-91.

- Pascual, M., E. Pozas, M. J. Barallobre, M. Tessier-Lavigne and E. Soriano (2004). "Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections." *Mol Cell Neurosci* 26(1): 24-33.
- Pascual, M., E. Pozas and E. Soriano (2005). "Role of class 3 semaphorins in the development and maturation of the septohippocampal pathway." *Hippocampus* 15(2): 184-202.
- Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2001). "The mouse brain in stereotaxic coordinates". San Diego, Calif. London, Academic.
- Penner, M. R., C. A. Barnes, P. K. a. J. L. M. Raymond, A. R. P. K. Jr and Joe L. Martinez, Jr. (2007). "Chapter 15 - Memory changes with age: Neurobiological correlates". in *Neurobiology of Learning and Memory (Second Edition)*. Burlington, Academic Press: 483-518.
- Petersen Rc, S. G. E. W. S. C. I. R. J. T. E. G. K. E. (1999). "Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome." *Archives of Neurology* 56(3): 303-308.
- Potier, B., P. Krzywkowski, Y. Lamour and P. Dutar (1994). "Loss of calbindin-immunoreactivity in CA1 hippocampal stratum radiatum and stratum lacunosum-moleculare interneurons in the aged rat." *Brain Research* 661(1&2): 181-188.
- Price, D. L., L. J. Martin, S. S. Sisodia, M. V. Wagster, E. H. Koo, L. C. Walker, V. E. Koliatsos and L. C. Cork (1991). "Aged Non-Human Primates: An Animal Model of Age-Associated Neurodegenerative Disease." *Brain Pathology* 1(4): 287-296.
- Price, J. L., P. B. Davis, J. C. Morris and D. L. White (1991). "The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease." *Neurobiology of Aging* 12(4): 295-312.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar and J. Herms (2006). "Synapse formation and function is modulated by the Amyloid precursor protein." *Journal of Neuroscience* 26(27): 7212-7221.
- Prince M., J. J. (2009). Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report 2009, Alzheimer's Disease International.
- Rapp, P. R. and M. Gallagher (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. 93: 9926-9930.
- Risold, P. Y. and P. George (2004). "Chapter 20 - The Septal Region". in *The Rat Nervous System (Third Edition)*. Burlington, Academic Press: 605-632.
- Risold, P. Y. and L. W. Swanson (1997). "Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus." *Brain Res Brain Res Rev* 24(2-3): 91-113.
- Rissman, R. A., A. L. De Blas and D. M. Armstrong (2007). "GABAA receptors in aging and Alzheimer's disease." *Journal of Neurochemistry* 103(4): 1285-1292.
- Rissman, R. A. and W. C. Mobley (2011). "Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease." *Journal of Neurochemistry* 117(4): 613-622.
- Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu and L. Mucke (2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science* 316(5825): 750-4.
- Rocamora, N., M. Pascual, L. Acsády, L. de Lecea, T. F. Freund and E. Soriano (1996). "Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway." *J Neurosci* 16(12): 3991-4004.
- Rocamora, N., M. Pascual, L. Acsády, L. de Lecea, T. F. Freund and E. Soriano (1996). Expression of NGF and NT3 mRNAs in Hippocampal Interneurons Innervated by the GABAergic Septohippocampal Pathway. 16: 3991-4004.
- Sahun, I., J. M. Delgado-García, A. Amador-Arjona, A. Giralt, J. Alberch, M. Dierssen and A. Gruart (2007). "Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice." *J Neurosci* 27(9): 2253-60.

- Sanchez-Mejia, R. O., J. W. Newman, S. Toh, G.-Q. Yu, Y. Zhou, B. Halabisky, M. Cisse, K. Scearce-Levie, I. H. Cheng, L. Gan, J. J. Palop, J. V. Bonventre and L. Mucke (2008). "Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nat Neurosci* 11(11): 1311-1318.
- Scheff SW, S. D., Price DA. (1996). "Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease." *Dementia*. 7(4): 226-32.
- Schindowski, K., A. Bretteville, K. Leroy, S. Bégard, J.-P. Brion, M. Hamdane and L. Buée (2006). "Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated Tau transgenic mouse without any motor deficits." *The American Journal of Pathology* 169(2): 599-616.
- Schliebs, R. and T. Arendt (2006). "The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease." *Journal of Neural Transmission* 113(11): 1625-1644.
- Schliebs, R. and T. Arendt (2011). "The cholinergic system in aging and neuronal degeneration." *Behav Brain Res* 221(2): 555-563.
- Schwaller, B., I. V. Tetko, P. Tandon, D. C. Silveira, M. Vreugdenhil, T. Henzi, M. C. Potier, M. R. Celio and A. E. P. Villa (2004). "Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures." *Molecular and Cellular Neuroscience* 25(4): 650-663.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe and B. L. Sabatini (2007). "Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway." *The Journal of Neuroscience* 27(11): 2866-2875.
- Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe (2008). "Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." *Nat Med* 14(8): 837-842.
- Smith, D. E., P. R. Rapp, H. M. McKay, J. A. Roberts and M. H. Tuszynski (2004). "Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons." *J Neurosci* 24(18): 4373-4381.
- Snyder, E. M., Y. Nong, C. G. Almeida, S. Paul, T. Moran, E. Y. Choi, A. C. Nairn, M. W. Salter, P. J. Lombroso, G. K. Gouras and P. Greengard (2005). "Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β ." *Nat Neurosci* 8(8): 1051-1058.
- Sohal, V. S., F. Zhang, O. Yizhar and K. Deisseroth (2009). "Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance." *Nature* 459(7247): 698-702.
- Soriano, E., J. A. Del Río, A. Martínez and H. Supèr (1994). "Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone." *The Journal of Comparative Neurology* 342(4): 571-595.
- Sotty, F., M. Danik, F. Manseau, F. Laplante, R. Quirion and S. Williams (2003). "Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity." *J Physiol* 551(Pt 3): 927-43.
- Staiger, J. F. and F. Nürnberger (1991). "The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas." *Cell Tissue Res*. 264(3): 415-26.
- Stanley, D. P. and A. K. Shetty (2004). "Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration." *J Neurochem* 89(1): 204-216.

- Stanley, E. M. and J. R. Fadel (2011). "Aging-related alterations in orexin/hypocretin modulation of septo-hippocampal amino acid neurotransmission." *Neuroscience* 195(0): 70-79.
- Stanley, E. M., J. R. Fadel and D. D. Mott (2011). "Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats." *Neurobiol Aging* 33(2): 431.
- Supèr, H. and E. Soriano (1994). "The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI." *J Comp Neurol* 344(1): 101-20.
- Swanson, L. W. and W. M. Cowan (1979). "The connections of the septal region in the rat." *J Comp Neurol* 186(4): 621-55.
- Thal, D. R., K. Del Tredici and H. Braak (2004). "Neurodegeneration in Normal Brain Aging and Disease." *Sci Aging Knowledge Environ* 2004(23): 26.
- Thal, L. J. (1994). "Clinical trials in Alzheimer disease". in *Alzheimer disease*. R. D. K. Terry, Robert; Bick, Katherine L. New York, NY, US, Raven Press. xv.
- Toth, K., Z. Borhegyi and T. F. Freund (1993). "Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex." *J Neurosci* 13(9): 3712-24.
- Toth, K. and T. F. Freund (1992). "Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum." *Neuroscience* 49(4): 793-805.
- Toth, K., T. F. Freund and R. Miles (1997). "Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum." *J Physiol* 500 ((Pt 2)): 463-74.
- Vanderwolf, C. H. (1969). "Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26(4): 407-18.
- Vela, J., A. Gutiérrez, J. Vitorica and D. Ruano (2003). "Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing." *J Neurochem* 85(2): 368-377.
- Verret, L., Edward O. Mann, Giao B. Hang, Albert M. I. Barth, I. Cobos, K. Ho, N. Devidze, E. Masliah, Anatol C. Kreitzer, I. Mody, L. Mucke and Jorge J. Palop (2012). "Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model." *Cell* 149(3): 708-721.
- Villette, V., F. Poindessous-Jazat, B. Bellessort, E. Roullot, Y. Peterschmitt, J. Epelbaum, A. Stéphan and P. Dutar (2011). "A new neuronal target for beta-amyloid peptide in the rat hippocampus." *Neurobiology of aging* 33(6): 1126.e1-1126.e14.
- Villette, V., F. Poindessous-Jazat, A. Simon, C. Lena, E. Roullot, B. Bellessort, J. Epelbaum, P. Dutar and A. Stephan (2010). "Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat." *J Neurosci* 30(33): 10991-1003.
- West, M. J., P. D. Coleman, D. G. Flood and J. C. Troncoso (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." *The Lancet* 344(8925): 769-772.
- Williams, M. E., J. de Wit and A. Ghosh (2010). "Molecular Mechanisms of Synaptic Specificity in Developing Neural Circuits." *Neuron* 68(1): 9-18.
- Wirh's, O. and T. A. Bayer (2010). "Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease." *Intern J Alzheimer's Dis* (2010): 723-782.
- Woodruff-Pak, D. S. (2008). "Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications." *J Alzheimers Dis* 15(4): 507-21.
- Wu, M., Z. Zhang, C. Leranth, C. Xu, A. N. van den Pol and M. Alreja (2002). "Hypocretin increases impulse flow in the septohippocampal GABAergic pathway: implications

- for arousal via a mechanism of hippocampal disinhibition." *J Neurosci* 22(17): 7754-65.
- Wulff, P., A. A. Ponomarenko, M. Bartos, T. M. Korotkova, E. C. Fuchs, F. Bahner, M. Both, A. B. Tort, N. J. Kopell, W. Wisden and H. Monyer (2009). "Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3561-6.
- Yang, L., Z. Wang, B. Wang, N. J. Justice and H. Zheng (2009). "Amyloid Precursor Protein Regulates Cav1.2 L-type Calcium Channel Levels and Function to Influence GABAergic Short-Term Plasticity." *The Journal of Neuroscience* 29(50): 15660-15668.
- Yizhar, O., Lief E. Fenno, Thomas J. Davidson, M. Mogri and K. Deisseroth (2011). "Optogenetics in Neural Systems." *Neuron* 71(1): 9-34.
- Yoshida, K. and H. Oka (1995). "Topographical projections from the medial septum-diagonal band complex to the hippocampus: a retrograde tracing study with multiple fluorescent dyes in rats." *Neurosci Res* 21(3): 199-209.
- Zaborszky, L., van den Pol, A., and Gyengesi, E (2012). "The basal forebrain cholinergic projection system in mice". in *The Mouse Nervous System*. G. P. C. Watson, and L. Puelles. Amsterdam, Elsevier-Academic Press: 684–714.
- Zahs, K. R. and K. H. Ashe (2010). "'Too much good news' - are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease?" *Trends in Neurosciences* 33(8): 381-389.
- Zhu, Y. J., H. A. I. Lin and R. Lal (2000). "Fresh and nonfibrillar amyloid- β protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for A β P-channel-mediated cellular toxicity." *The FASEB Journal* 14(9): 1244-1254.
- Zucker, R. S. and W. G. Regehr (2002). "Short-term synaptic plasticity." *Annu Rev Physiol* 64: 355-405.

**INFORME SOBRE LAS PUBLICACIONES
DERIVADAS DE ESTA TESIS
DOCTORAL**

Barcelona, 20 de septiembre 2012.

La Dra. Marta Pascual Sánchez, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y el Dr. Eduardo Soriano García, Catedrático del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, como directores de la Tesis Doctoral de Sara Esmeralda Rubio Abejón.

Informan

que, fruto de la realización de su proyecto de Tesis Doctoral "*Análisis de los mecanismos y factores implicados en el desarrollo, especificidad y maduración de la conexión septohipocámpica. Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer*", la candidata a Doctora Sara Esmeralda Rubio Abejón ha participado activamente en la elaboración de dos artículos publicados en revistas internacionales:

1. *Semaphorin 3C is not required for the establishment and target specificity of the GABAergic septohippocampal pathway in vitro.*

Sara E Rubio, Albert Martínez, Sophie Chauvet, Fanny Mann, Eduardo Soriano, Marta Pascual.
European Journal of Neuroscience (2011); 34(12):1923-33. Factor de impacto **3.42**.

Este artículo constituye el primer capítulo de resultados publicados (Resultados - I) en la memoria de Tesis Doctoral.

2. *Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease.*

Sara E Rubio, Germán Vega-Flores, Albert Martínez, Carles Bosch, Alberto Pérez-Mediavilla, Joaquín Del Río, Agnès Gruart, José María Delgado-García, Eduardo Soriano, Marta Pascual.
FASEB Journal (2012); Nov. (versión electrónica publicada a fecha 26 de Julio de 2012). Factor de impacto **6.40**.

Este artículo constituye el segundo capítulo de resultados publicados (Resultados - II) en la memoria de Tesis Doctoral.

Así como en la elaboración de un artículo que actualmente está en segunda fase de revisión de la revista Cerebral Cortex (factor de impacto **6.54**):

3. The GABAergic septohippocampal pathway is directly involved in internal processes related to operant reward learning.

Germán Vega-Flores, Sara E. Rubio, M. Teresa Jurado-Parras, María Ángeles Gómez-Climent, Christiane S. Hampe, Mario Manto, Eduardo Soriano, Marta Pascual, Agnès Gruart, José M. Delgado-García

del cual se presenta una parte en la memoria de esta Tesis Doctoral, y al no estar todavía publicado se presenta como "Apéndice de Resultados - I".

Estos trabajos aportan información muy novedosa sobre la implicación de la conexión GABAérgica septohipocámpica en la enfermedad de Alzheimer, lo que queda patente en el alto índice de impacto de las revistas donde han sido publicados. Igualmente, nuestro artículo en *European Journal of Neuroscience* muestra la caracterización de un nuevo modelo de cultivo organotípico de permite el desarrollo y mantiene la alta especificidad de la conexión GABAérgica septohipocámpica, presentándose como una herramienta muy valiosa para futuras investigaciones sobre los mecanismos y factores responsables de la especificidad de la conexión, así como sobre la posible toxicidad de determinados compuestos sobre los contactos GABAérgicos septohipocámpicos.

Sara ha participado muy activamente en la realización de todas estas publicaciones, como indica el hecho de que sea primera autora de los dos trabajos publicados, y segunda autora en el trabajo que está en vías de publicación.

En los tres trabajos, Sara ha contribuido en la planificación de los experimentos, en la puesta a punto de nueva metodología, ha llevado a cabo gran parte del trabajo experimental, así como de las cuantificaciones, de la obtención de imágenes, del montaje de las figuras, y ha participado muy activamente en la escritura de los manuscritos. Todo ello justifica la posición de primera y segunda firmante de las publicaciones indicadas.

Y para que así conste para la presentación de la Tesis Doctoral de Sara Esmeralda Rubio Abejón, firmamos el presente informe.

Atentamente,

Marta Pascual, PhD
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Biología Celular
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona.

Eduardo Soriano, PhD
Catedrático Universidad
Departamento de Biología Celular
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona.

APÉNDICE 1:
CONTENIDO MULTIMEDIA INCLUIDO
EN EL MATERIAL SUPLEMENTARIO

Este ejemplar impreso se acompaña de un CD-ROM que contiene, además de la versión digital de esta memoria, material suplementario en forma de contenido multimedia:

- Material suplementario - 1: Monitorización de la dinámica axonal en cultivos organotípicos septohipocámpicos (archivo pps, incluye vídeos).
- Archivo "Selfstimulation Behavior.avi": filmación de un ratón control implantado con un electrodo de estimulación en septum medial (MS), durante una sesión de autoestimulación; forma parte de los experimentos descritos en el apartado *Apéndice de Resultados - I* de la presente tesis.
- Material suplementario - 2: Condicionamiento operante de autoestimulación en septum medial (archivo pps con información del vídeo "Selfstimulation Behavior.avi").

**APÉNDICE 2:
FINANCIACIÓN DISFRUTADA PARA LA
ELABORACIÓN DE ESTA TESIS
DOCTORAL**

El trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral ha sido financiado por numerosos organismos públicos y privados, sin los cuales no podría haberse llevado a cabo este proyecto. Algunos de ellos se exponen a continuación:

- Programa de becas de Colaboración para estudiantes en último año de carrera (Ministerio de Educación y Ciencia), convocatoria 2006/2007. Universitat de Barcelona.
- Programa de formación de personal investigador (FI; Generalitat de Catalunya), período 2008-2009. Universitat de Barcelona.
- Programa de formación del Profesorado Universitario (FPU; Ministerio de Educación y Ciencia), período 2010-2011. Universitat de Barcelona.
- Programa de ayudas para la finalización de la tesis doctoral (Universitat de Barcelona), 2012.
- Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-ISCIID), Spain
- Proyecto "Desarrollo y maduración de la conexión septohipocámpica, implicaciones en la enfermedad de Alzheimer" (PI08 / 1891; FIS - Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Sanidad y Consumo), trienio 2009-2011. IP: Marta Pascual Sánchez. Universidad de Barcelona / Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona.
- Proyecto "Alteraciones en la conexión GABAérgica septohipocámpica en la enfermedad de Alzheimer. Implicaciones terapéuticas" (PI11/000704; FIS - Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Sanidad y Consumo), trienio 2012-2014. IP: Marta Pascual Sánchez. Universidad de Barcelona / Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona.
- Proyecto " Identificación y caracterización de nuevos genes y vías de señalización implicados en el desarrollo cortical" [BFU2008-3980; Ministerio de Ciencia e Innovacion (MICINN)]. IP: Eduardo Soriano García.

