

---

**Trabajo de Tesis para obtener el título de  
Doctor en Medicina**

**“LOS GRUPOS NEURONALES SEPTALES  
COLINERGICOS, GABAERGICOS Y  
GLUTAMATERGICOS Y SU PROYECCION A  
HIPOCAMPO.”**

**Maria Teresa Castañeda Licón.**

**Director: José María Peinado Herreros**

**Co-Directores: Luis Vicente Colom Scalone**

**Emilio Rafael Garrido Sanabria**

**Universidad Autónoma de Tamaulipas. México.**

**Universidad de Granada. España.**



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Teresa Castañeda Licón  
D.L.: GR 2303-2009  
ISBN: 978-84-692-3103-6

---

José M. Peinado Herreros, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

AUTORIZA

la presentación de la tesis doctoral titulada “Los grupos neuronales septales colinérgicos, gabaérgicos y glutamatérgicos y su proyección a hipocampo”, para la obtención del grado de doctor, que ha sido realizada por Maria Teresa Castañeda Licón, Médico Cirujano Partero, por la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Mexico, y que ha sido realizada bajo mi dirección.

Fdo. José M. Peinado Herreros

Granada, Enero 2008

---

La presente Tesis Doctoral se fundamenta en los trabajos ya publicados que a continuación se relacionan:

1.- Las isoformas de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico se distribuyen en forma diferente en la región septal de la rata.

“Glutamic acid decarboxylase isoform are differentially distributed in the septal region of the rat”. Maria T. Castaneda, Emilio R. Garrido Sanabria, Sofia Hernandez, Adriana Ayala, Tania A. Reyna, Jan-Yen Wu, Luis V. Colom. *Neurosci Res.* 2005. 52:107-119.

2. Caracterización de las neuronas glutamatérgicas de septum medial y su proyección hacia hipocampo.

“Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus”. Colom L. V., Castañeda M.T., Reyna T. and Hernandez S. *Synapse.* 2005. 58: 151-164

Además se incluyen datos no publicados relativos al análisis estereológico de grupos neuronales septales.

El trabajo experimental se ha realizado en “Center for Biomedical Studies and Biology Department. University of Texas at Brownsville. Texas Southmost College, 80 Fort Brown, Brownsville, Texas 78520. USA, bajo la dirección de los profesores Luis Vicente Colom Scalone y Emilio Garrido Sanabria.

---

## Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis padres por inculcarme el amor al estudio, por haber hecho de mí lo que soy. Y sobre todo a mi padre, que perdí hace poco tiempo y que se que le hubiera gustado ver realizado mi sueño de terminar un doctorado; Querido Padre, fuiste un ejemplo, viviste y moriste como un luchador. A mi madre gracias por todo el amor que has derramado en mis hermanos y en mí.

A Hugo mi esposo con amor por compartir todos estos años, por ser mi amigo, mi fiel compañero, mi motivación, por toda tu ayuda, gracias por compartir mis angustias, mis dolores, y sobre todo mis alegrías. Gracias por motivarme siempre a vencer los problemas que se me presentan, a tu lado los problemas difíciles, resultan fáciles de resolver. Gracias por infundir siempre ese ánimo por la superación.

A mis hijos Hugo Esteban y José Mario, ustedes saben todo el cariño y profundo amor que les tengo, disculpen el tiempo que les he quitado por mi trabajo y estudio, ustedes son la principal fuente de motivación e inspiración para seguir adelante, su cariño me da la fuerza necesaria para estar de pie y con la cabeza en alto para enfrentar los problemas de la vida. Los adoro.

---

## **Agradecimientos**

Un agradecimiento especial a la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por haberme brindado la oportunidad de realizar este doctorado, y muy en especialmente a la Unidad Académica de Ciencias de la salud y Tecnología, antes Facultad de Medicina de Matamoros.

Agradezco también la oportunidad que me ha ofrecido la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, que ha facilitado los recursos para que se llevara a cabo tanto el propio programa de doctorado, como la realización y presentación de la Tesis Doctoral.

Esta tesis doctoral que llega a su conclusión final no hubiera sido posible sin la participación y cooperación de cada una de las personas que a continuación mencionaré, muchas de las cuales han sido un soporte en los momentos difíciles de su realización y que directa o indirectamente, junto a mi o en la distancia, han intervenido favorablemente para su culminación.

Primero antes que nada a Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en el camino a aquellas personas que han sido un gran apoyo en la realización del trabajo de investigación y en la presentación de la tesis doctoral.

---

Al Dr. Luis V. Colom, por haberme dado la posibilidad de realizar un sueño: hacer investigación en neurociencias. Nunca terminaré de agradecer todas sus enseñanzas, sus sabios consejos, su interés en que aprendiera lo que sé en esta labor, además de presentar ante mí el reto de trabajar en un área tan complicada e interesante como es la región septal e hipocámpica; doctor Colom es usted un ejemplo a seguir. El trabajo ejercido como maestro es admirable, la capacidad de transmitirnos sus conocimientos genera en mí una profunda admiración como jefe y sobre todo como amigo. Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de él, ni del laboratorio que dirige, donde fue realizado este trabajo de investigación.

A mi director de tesis Dr. José María Peinado por su dedicación, esfuerzo y tiempo extraído de sus obligaciones para elaborar esta tesis. Gracias por toda su paciencia y generosidad, por sus sabios consejos en la preparación de esta tesis, por brindarme su ayuda cuando la necesité, y apoyarme siempre para continuar este trabajo, pese a todos los obstáculos que se presentaron en el camino, sobre todo por su aliento e insistencia para que yo terminara el trabajo, creo que de no haber sido por él, este trabajo no hubiera podido llegar a su conclusión final. Bendita tecnología que permitió que a distancia pudiéramos tener esa comunicación tan directa, y usted seguir paso a paso la elaboración de mi tesis. Ha sido un honor para mí tenerlo como director de tesis, gracias por la confianza que deposito en mí. Siempre le estaré agradecida.

Al Dr. Emilio Garrido también co-director de mi tesis, por brindarme todo su apoyo en los problemas de investigación que surgieron sobre el trabajo de tesis, y por ese ánimo característico que le infunde a todas las cosas que realiza.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Adriana, Sofía, Miriam, Cristina, Susy, Antonio, Gustavo, gracias también por toda la ayuda brindada siempre en las buenas y en las malas. Gracias también por sus sugerencias y contribuciones. Con su colaboración y apoyo han hecho que los momentos difíciles de la investigación, se hagan más soportables, con todas las horas que hemos pasado juntos constituyen mi segunda familia.

---

Al departamento Biología de la Universidad de Texas en Brownsville, por estar siempre ahí cuando los necesité, especialmente al M.S. Alfredo Muñoz, Dr. Michael Lehcker, Dr. Daniele Provenzano, así como el personal administrativo.

A mis estudiantes de la facultad de Medicina de Matamoros, que durante todos estos veintitantos años que he sido docente en la cátedra de fisiología, me han motivado a seguirme preparando.

Con especial admiración a la Respetada Dra. Julieta V. García, Presidenta de la Universidad de Texas en Brownsville, al estimado Dr. Jose Martin Emeritus Provoste de la Universidad de Texas en Brownsville, Honorable Juez Hilda Tagle, presbítero Armand Mathew, Dr. Ernesto Chanes Chanes, Dr. José Pisanti, Dr. Manuel Montelongo (Q.E.P.D.).

Gracias a todos mis amigos, gracias por estar ahí y enriquecer mi vida.

A todas las personas que sin quererlo y tal vez sin imaginarlo, han contribuido con su ejemplo de trabajo a continuar en la realización de este proyecto.

---

“ Gracias a la vida que me ha dado tanto,  
me dió el corazón que agita su marco,  
cuándo miro el fruto del cerebro humano,  
cuándo miro el bueno tan lejos del malo”.....

(Violeta Parra)

---

“Yo solo sé que no sé nada y lo que sé, se me esta olvidando”

(Autor anónimo)

---

# INDICE

<b>INDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. PREFACIO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. INTRODUCCION.....</b>	<b>11</b>
2.1. El Hipocampo.	
a) Anatomía del hipocampo.....	12
b) Función del hipocampo.....	15
2.2. El septum.	
a) Anatomía del septum.....	18
b) Función del septum.....	22
2.3. Neuroquímica de la región septal.	
a) El sistema colinérgico de la región septal.....	24

---

b) El sistema GABAérgico de la región septal.....	26
c) El sistema glutamatérgico de la región septal.....	28
<b>3. HIPOTESIS O PLANTEAMIENTO.....</b>	<b>30</b>
<b>4 .MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 .EXPERIMENTO 1. Diferenciación de las isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección al hipocampo.	
4.2 .EXPERIMENTO 2. Caracterización de las neuronas glutamatérgicas de septum medial y su proyección hacia hipocampo.	
4.3. EXPERIMENTO 3. Cálculo, mediante estereología, del número de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata.	
Animales.....	36
Inmunohistoquímica.....	36
Análisis de las imágenes.....	39
1) Determinación del número de neuronas colinérgicas.	
2) Determinación del número de neuronas GABAérgicas.	
3) Determinación del número de neuronas glutamatérgicas.	
4) Determinación del número de neuronas totales.	
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>

---

5.1.EXPERIMENTO 1. Diferenciación de las isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección al hipocampo.	
5.1.1. Tinción de inmunoperoxidasa para GAD65.....	43
5.1.2. Tinción de inmunoperoxidasa para GAD67.....	46
5.1.3.Tinción con doble inmunofluorescencia y marcaje retrogrado para GAD65 y GAD67.....	50
5.2. EXPERIMENTO 2. Caracterización de las neuronas glutamatergicas de septum medial y su proyección hacia hipocampo.	
5.2.1.Tinción de inmunoperoxidasa para Glutamato.....	53
5.2.2 Tinción de inmunoperoxidasa para VGLUT2.....	54
5.2.3 Tinción con doble florescencia de VGLUT2 y Glutamato.....	55
5.2.4.Tinción de inmunoperoxidasa para ChAT y Glutamato.....	58
5.2.5.Tinción con triple fluorescencia para Glutamato, GAD 67 y ChAT.....	59
5.2.6.Tinción con triple fluorescencia con Fluorogold, ChAT, Glutamato y GAD67 .....	61
5.3.EXPERIMENTO 3. Cálculo, mediante estereología, del número de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata.	
5.3.1. Determinación del número de neuronas colinérgicas.....	66
5.3.2. Determinación del número de neuronas GABAérgicas.....	68
5.3.3. Determinación del número de neuronas glutamatérgicas.....	70
5.3.4. Determinación del número de neuronas totales.....	72
<b>6. DISCUSION.....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>

---

**8. REFERENCIAS.....82**

**9. ANEXOS.....91**

---

## **ABREVIATURAS**

---

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ABC	Avidin Biotin Peroxidasa
Acetil Co A	Acetil Coenzima A
Ach E	Acetilcolinesterasa
AMPA	$\alpha$ amino-3 hidroxil-5metil-4-isoxazol propionic acid.
ANOVA	Analisis de varianza
CA	Cuernos de Amon
ChAT	Colin acetil transferasa.
GABA	Acido Gama Aminobutirico.
GAD	Glutamato Descarboxilasa.
HDB	Banda Horizontal de Broca
LS	Septum Lateral
LTP	Potenciación a largo plazo.
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
MS	Septum Medial
Vdb	Rama vertical de la banda de Broca

---

NMDA	N-Metil D Aspartato
PBS	Solucion amortiguadora de fosfato salino
PPSI	Potencial Postsinaptico inhibidor
PPSE	Potencial Postsinaptico Excitador.
VDB	Rama vertical de la Banda de broca
Vglut 1	Transportador Vesicular de glutamato tipo 1
Vglut 2	Transportador vesicular de glutamato tipo 2

---

## **PREFACIO**

---

## 1.- PREFACIO

La región septal es una estructura del cerebro basal anterior que regula la excitabilidad de amplias zonas de neocorteza e hipocampo y participa en la modulación de algunos estados funcionales como es el ritmo theta hipocampal, el cual está implicado directamente en algunos procesos cognitivos cerebrales (Yoder RM, Pang KC,2005), como es el aprendizaje y la memoria (Winson, 1978;Jaffard y Meunier, 1993; Xu et al., 2004).

Esta región del cerebro posee dos poblaciones principales de neuronas: Colinérgicas y GABAérgicas. Ambas poblaciones proyectan al hipocampo (Jakab y Leranth, 1995; Alreja et al., 2000).

El estudio de las conexiones septo-hipocampales siempre ha sido de gran interés, conociéndose desde hace tiempo la presencia del neurotransmisor acetilcolina en los diferentes grupos celulares septales que proyectan a hipocampo (Chandler,1983;Butcher et al.,1989; Mesulam, 1990).Se sabe además que el 50-70% de estas neuronas llamadas colinérgicas se proyectan al hipocampo (Amaral,1985;Senut et al.,1989;Linke et al.,1994;Chrobak et al., 2000).

Hasta hace poco se consideraba que la proyección septohipocámpica no colinérgica del septum era exclusivamente GABAérgica y constituía el 30% de total (Kohler et al., 1984; Onteniente et al., 1987; Linke et al., 1994; Chrobak et al.,2000).

Durante los últimos años se ha sugerido la existencia de un tercer grupo neuronal septal que usa glutamato como neurotransmisor (Gonzalo-Ruiz y Morte, 2000; Manns et al., 2003; Kiss et al., 2002). Este grupo contiene neuronas que se proyectan al hipocampo. Algunos trabajos sugieren que la población de neuronas glutamatérgicas septales puede influenciar el ritmo theta hipocámpal, y a través de esta acción, participar en

---

diversas funciones hipocámpicas (Leung, 2004). Las neuronas septales glutamatérgicas podrían participar en forma importante en patologías, como la epilepsia y la enfermedad de Alzheimer (Bell y Coello, 2006; Garrido et al., 2006).

El descubrimiento de que las neuronas colinérgicas están afectadas por el envejecimiento y sufren una degeneración temprana en la enfermedad de Alzheimer (Whitehouse et al., 1982; Mufson et al., 1989; Arendt et al., 1995; Dringenberg, 2000) ha motivado un intenso estudio de sus características anatomofisiológicas, así como de su vulnerabilidad durante el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. En contraste con este grupo neuronal que presenta atrofia y deterioro en la enfermedad de Alzheimer el grupo de neuronas GABAérgicas septales no presenta cambios tempranos durante el envejecimiento (Krzywkowsky et al., 1995; Harkany et al., 1995; Colom et al., 2008). Además debemos considerar que la teoría colinérgica de la enfermedad de Alzheimer, debe ser sustituida por otra teoría donde se establezca la participación de otros neurotransmisores (Dringergerberg, 2000; Francis, 2005).

Los distintos grupos neuronales septales proyectan a grupos específicos de neuronas hipocámpicas. En este sentido, las neuronas colinérgicas septales inervan a las neuronas piramidales e interneuronas hipocámpicas (Frotscher y Leranth, 1985). A diferencia de las neuronas GABAérgicas septales (Kohler et al., 1984) que inervan exclusivamente a las interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Freund and Antal, 1988; Jakab y Leranth .1995; Gritti et al., 1997).

El presente trabajo se enfoca en realizar estudios de las poblaciones neuronales septales, en particular en la población glutamatérgica septal y su proyección septohipocámpica, lo cual representa, hasta hoy, un grupo neuronal septal apenas descrito y estudiado.

---

# **INTRODUCCION**

---

## **2. INTRODUCCION.**

### **2.1. El hipocampo.**

#### **a) Anatomía del hipocampo.**

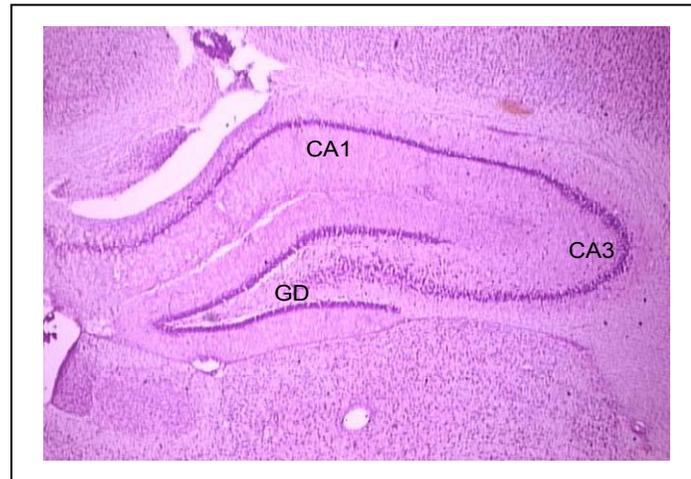
La formación hipocámpica es una parte filogenéticamente antigua de la corteza que durante el desarrollo es desplazada desde la superficie al interior del cerebro. En los mamíferos inferiores, como los roedores y felinos, se curva debajo de la neocorteza del lóbulo temporal (ejemplo: la corteza entorrinal) o debajo de la neocorteza de los lóbulos occipital, parietal y temporal (ejemplo: hipocampo propio, giro dentado –GD- y complejo subicular). En los primates toda la formación hipocámpica está restringida al lóbulo temporal (Squire et al., 2004)

La formación hipocámpica consta de cuatro partes principales: 1) el área entorrinal (entorhinalis), 2) el complejo subicular (subiculum, presubiculum, postsubiculum y parasubiculum), 3) el hipocampo propio o cuerno de Ammón (Cornu Ammonis, CA) y 4) el GD (gyrus dentatus).

El término hipocampo se usa para referirse al hipocampo propio (CA) y al GD, y fue creado debido a la semejanza que muestran dichas áreas con el caballito de mar (hippo-campus en griego) en cortes histológicos. El cuerno de Ammón ha sido dividido en cuatro subregiones por Lorente de Nó (1934): CA1, CA2, CA3 y CA4. CA1 es equivalente a la región superior y CA3 a la región inferior. CA2 es un área pequeña de transición entre CA1 y CA3. Es todavía motivo de debate si CA4 pertenece al hipocampo propio, como originalmente pensó Lorente de Nó, o al GD. Amaral (1978) reconoce CA4 y la parte más medial de CA3 como parte del del GD y no del cuerno de Ammón. Por lo tanto se denomina a CA4 como la región hilar del GD o simplemente hilus. (Figura 2.1)

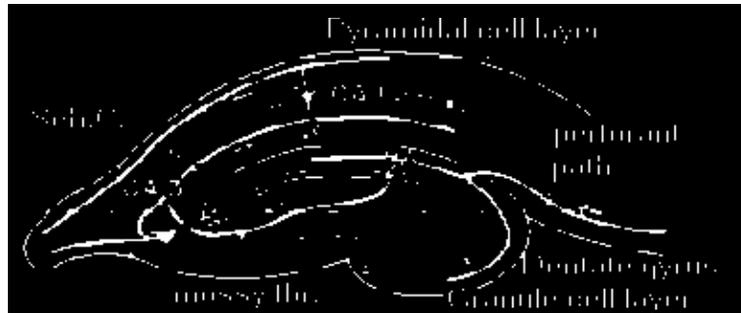
---

En contraste con la neocorteza el hipocampo es una estructura relativamente simple. Está compuesta de dos tipos celulares principales (las células piramidales granulosas) distribuidas en capas discretas, con aferencias y eferencias altamente organizadas en forma laminar (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Tinción de Nissl, de un corte histológico de cerebro de rata, representando el hipocampo y sus regiones principales: CA1, CA3 y Giro dentado DG.

La célula más abundante en CA1, CA2 y CA3 es la célula piramidal. Estas se ubican en paralelo y sus cuerpos celulares se disponen formando una capa definida: el estrato piramidal (stratum pyramidale). La célula principal en el giro dentado es la célula granulosa, la cual se ubica en un plano paralelo. La distribución de estas células del hipocampo forman vías entre sí, la cual, la principal vía de paso a través del hipocampo consiste en un circuito trisináptico.(Figura 2.2)



**Figura 2.2.**

Circuito trisináptico del hipocampo, compuesto de las células del giro dentado, CA3 y CA1 y sus interconexiones (Amaral y Witter, 1995).

Si bien este circuito trisináptico ha sido bien estudiado (Swanson, 1978; Witter, 1989), la función de los distintos tipos neuronales en el procesamiento de información hipocámpica no ha sido aun determinada.

La primera conexión sináptica esta formada entre la corteza entorrinal y Giro dentado (capa granulosa). De aquí se proyecta a las células piramidales de CA3 y son aferencias glutamatérgicas. A este primer circuito se le llama vía perforante (*Perforant pathway*).

La segunda conexión es entre giro dentado (Células granulosas) y CA3 (células piramidales a este sistema se le llama conexión musgosa (*Mossy fibers system*)).

La tercera conexión los axones de CA3 (Células piramidales) forman conexión con las dendritas de CA1. A esto se le llama sistema de colaterales de Schaffer (*Schaffer collaterals system*, Figura 2.2)

---

Aunque el circuito trisináptico es el principal circuito del hipocampo, existen otras conexiones, por ejemplo, entre corteza entorrinal y CA1 y subiculum, otras entre hipocampo y septum, vía septohipocampal (vía fimbria), conexiones entre locus coeruleus, núcleos de rafe, conexiones de los núcleos supramamilares, conexiones de área tegmental ventral y sustancia negra (Dutar,1995).

Estas grandes interconexiones del hipocampo, le permiten sincronizar la excitación e inhibición de las células piramidales.

Las dos principales aferencias al hipocampo provienen de la corteza entorrinal y de la parte medial del complejo septal (septum medial). Estas dos proyecciones difieren entre ellas en varios aspectos significativos. Las neuronas del sistema septohipocampal son grandes y están localizadas en el cerebro basal anterior, específicamente en la región medial septal y la banda diagonal de Broca (BDB). La mayoría de las neuronas septales se proyectan principalmente al hipocampo ipsilateral, aunque algunas se proyectan hacia el lado opuesto (Peterson, 1989; Dutar, 1995) y son fibras colinérgicas y GABAérgicas (Linke,1994). Las aferencias colinérgicas llevan impulsos modulatorios a las células piramidales y a las interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Weiner et al., 1985; Frotscher y Leranth, 1985). Las neuronas GABAérgicas se proyectan hacia las interneuronas GABAérgicas del hipocampo, y esto produce una desinhibición masiva de las células piramidales, (Freund y Antal ,1988; Gulyas, 2003).

Las conexiones provenientes de corteza entorrinal, se originan en la capa dos de esta estructura y proyectan hacia CA3 y CA1 y tienen una organización topográfica definida, además las fibras son pequeñas y son de carácter glutamatérgico (Colbert y Levy, 1992).

## **b) Función del hipocampo.**

Durante la primera mitad del siglo se pensó que la formación hipocámpica estaba relacionada primariamente con el olfato, razón por la que

---

se llamó Rinencéfalo o cerebro olfatorio. Pocas evidencias apoyaron este punto de vista ya que animales anósmicos podían tener un desarrollo del hipocampo normal. Papez (1937) propuso que la formación hipocámpica y sus conexiones con los cuerpos mamilares, núcleos talámicos y corteza cingular, constituían un circuito neural responsable de las experiencias emocionales y la respuesta a las mismas. (Teoría de Papez). Después se interpretó que el papel modulador en la experiencia emocional estaba más relacionado con el complejo amigdaloides que con la formación hipocámpica.

Hoy se acepta ampliamente que la función del hipocampo está relacionada con la memoria (Scoville y Milner, 1957; Zola-Morgan and Squire, 1991,1992; Bizon et al., 2003; Winters, 2004). Además se ha demostrado la relación entre neurodegeneración de poblaciones hipocámpicas y enfermedad de Alzheimer, así como algunos tipos de amnesia (Takeda et al., 2007). Por otra parte se ha demostrado el papel del hipocampo en la memoria en base a la potenciación a largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica en la mayoría de los componentes del circuito hipocámpico (Izquierdo y Medina, 1995; Adams, 2004).

Son clásicos los experimentos en que la eliminación de ambos hipocampos, para inhibir crisis epilépticas, originó una pérdida de la memoria a corto plazo (Scoville y Milner 1957). Estas observaciones, y otros estudios en animales Wu, 2000; Parent y Baxter, 2004), confirmaron el papel del hipocampo en la memoria.

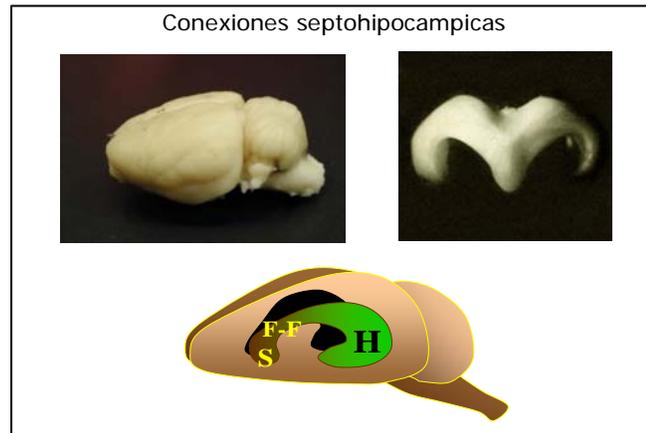
Hoy sabemos que el hipocampo, especialmente las áreas CA1 y CA3, participa en la denominada "memoria espacial". O Keefe (1971) y Muller (1996) demostraron la existencia de células piramidales hipocámpicas denominadas "*Place cells*", las cuales se cree que dan información del lugar específico donde se encuentra el animal. Experimentos posteriores han determinado que estas células se activan cuando la cabeza del animal está orientada en determinada posición (Frielingsdorf et al., 2006). Otras

---

investigaciones han demostrado que el hipocampo también participa en otros tipos de memoria (Dussek, et al 1997; Elvander, 2004).

El sistema hipocámpico participa también en la generación del ritmo theta hipocampal que es de 4-12 ciclos por segundo (Hz). Este se divide en dos tipos de ritmo theta: ritmo theta I, frecuencia de 7-12 Hz, que se presenta cuando el animal se mueve y que es resistente a atropina; ritmo theta II, que se presenta cuando el animal está inmóvil, con una frecuencia de 4-6 Hz y que es sensible a atropina. Este ritmo se presenta también en el animal anestesiado. (Kramis, 1975; Xu, et al., 2004).

En este sentido el septum se ha considerado el marcapasos hipocampal, ya que la lesión completa septohipocampal, elimina el ritmo theta hipocampal, (Leung et al., 1994) (Figura 2.3). La inervación colinérgica del Septum medial es generadora de esta activación neuronal (Colom et al., 1991). Este ritmo theta reenvía información a la corteza de manera que podría actuar como un organizador selectivo de la información que llega a corteza, aumentando la señal de entrada, esto además permite la atención selectiva, que es un requisito para la memoria sobre todo de las informaciones que llegan de forma simultánea (Vinogradova, 1995). Por otra parte existen experimentos en donde la ablación total con inmunotoxinas como la IgG *saporin*, selectiva de neuronas colinérgicas septales, no produce un déficit total de memoria espacial, ni elimina completamente el ritmo theta hipocampal (Lee et al., 1994; Baxter et al., 1996). En base a esto se ha sugerido que las neuronas GABAérgicas septales también pueden actuar como marcapasos generador del ritmo theta (Ufjalussy, 2006).

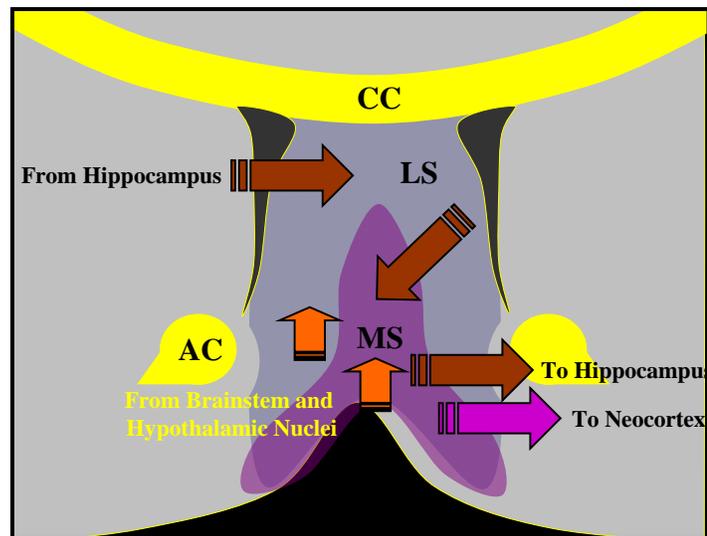


**Figura 2.3.** Esquema de la conexión septohipocámpica a través de la fimbria fornix. Cerebro de Rata.

## 2.2. EL SEPTUM

### a) Anatomía del Septum

El cuerpo principal de la región septal yace entre los cuernos anteriores de los ventrículos laterales, aunque se prolonga ventralmente para formar una considerable parte de la región preóptica del hipotálamo. Como la región septal y el hipocampo comparten importantes conexiones bilaterales, estas estructuras frecuentemente se describen juntas formando parte de un único sistema funcional.(Figura 2.3.)



**Figura 2.4.** Esquema representativo del septum, sus divisiones y sus conexiones septohipocámpicas.

El área septal puede ser dividida en 4 partes o divisiones, en base a su citoarquitectura y conexiones (Swanson et al., 1979). La división lateral consiste del núcleo septal lateral (LS). La división medial (MS) consta dorsalmente del núcleo septal medial y ventralmente del núcleo de la banda diagonal de Broca (BDB). La división posterior consta de los núcleos septo-fimbrial y triangular. Por último la división ventral está compuesta de los núcleos de la cama de la estría terminal y del núcleo de la cama de la comisura anterior. (Figura 2.4)

Esquemáticamente, las divisiones lateral, medial y posterior del área septal están asociadas con la formación hipocámpica, mientras que la división ventral se relaciona primariamente con la amígdala.

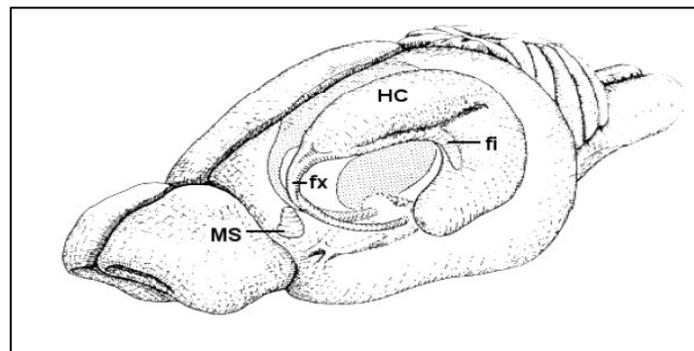
Raisman (1966), describió que el septum medial (pero no el lateral) se proyecta sobre el hipocampo propio y el GD. Estudios de Lewis y Shute (1967) y usando el método histoquímico para determinar acetil colinesterasa, demostraron que la formación hipocámpica recibe inervación colinérgica del área SM-BDB a través del fórnix, de la fimbria y del alveus (Goodson et al.,

---

2004). Otros estudios (Rye et al., 1984; Levey et al., 1984) corroboraron que la vía septo-hipocámpica utiliza acetilcolina como neurotransmisor, siendo el componente colinérgico aproximadamente el 50% de las proyecciones. Las fibras colinérgicas establecen contacto con células piramidales, granulosas e interneuronas. Otros autores han demostrado que el principal componente del remanente 50% de la vía septo-hipocámpica es GABAérgico. (Alonso y Kohler, 1982; Panula et al., 1984). Freund y Antal (1988) demostraron que los axones de células GABAérgicas del complejo SM-BDB establecen contacto con interneuronas hipocámpicas GABAérgicas.

La región CA1-CA3 del hipocampo propio proyecta al septum lateral (SL), el cual se conecta extensamente con el área del SM-BDB. Las células de esta última región mandan axones principalmente al GD pero también al hipocampo propio, cerrando así el circuito septo-hipocámpico.

Tombol y Petsche (1969) describieron, con tinción de Golgi, en la región septal dos tipos celulares diferentes: 1) células medianas y grandes con axones que presumiblemente se proyectan al hipocampo y 2) pequeñas células que se parecen a las neuronas tipo II de Golgi.



**Figura 2.5.-** Cerebro de Rata y conexiones septohipocámpicas a través de fimbria fornix (Amaral and Witter 1978).

---

En conclusión las interconexiones del septum e hipocampo son recíprocas. Las conexiones ascendentes del septum hacia el hipocampo provienen del MS y la parte ventral de la banda diagonal de Broca (vDB). Principalmente de dos tipos de conexión: Colinérgica y GABAérgica. Más del 90% de la innervación colinérgica que llega al hipocampo viene del septum medial. Esta influencia colinérgica es la principal aferencia moduladora de las células principales GABAérgicas del hipocampo (Wainer et al., 1990 ; Frotscher y Leranth, 1985). Las proyecciones GABAérgicas vienen del septum medial e inervan las interneuronas GABAérgicas del propio hipocampo, esto ocasiona una desinhibición de las células piramidales del hipocampo (Freund y Antal, 1988). Ambas poblaciones colinérgicas y GABAérgicas proporcionan una modulación sincronizada de todo el hipocampo (Chrobak, 2000).

En los últimos años se ha descrito una tercera población neuronal que usa glutamato como neurotransmisor. Este es el grupo glutamatérgico septal, que proviene del septum medial, y proyecta hacia hipocampo, específicamente hacia interneuronas (datos no publicados de nuestro propio laboratorio). El hipocampo proyecta principalmente hacia septum lateral (LS) y las células piramidales de CA1 hacia el septum lateral; las células piramidales de CA3 proyectan, hacia las partes caudales del septum lateral (Szeide mann et al., 1995). Aunque la principal conexión del hipocampo al septum es hacia septum lateral, hay también conexiones de interneuronas GABAérgicas hipocámpicas hacia septum medial. Estas interneuronas terminan en neuronas colinérgicas y GABAérgicas del septum medial (Jakab y Leranth, 1995).

Además de las proyecciones aferentes hipocámpicas, el septum medial y la banda diagonal de Broca (MS-DBB) recibe también proyecciones de numerosos núcleos del diencefalo (núcleos supramamilares, núcleos del

---

hipotálamo lateral, habénula medial núcleos talámicos periventriculares), del tallo encefálico (núcleo del rafe, locus coeruleus, área gris periacueductal, núcleos parabraquiales) y otras regiones del cerebro como el área tegmental o la amígdala (Vertes 1988; 2000, Woolf y Butcher,1986).

En relación a los neurotransmisores septales, el septum medial recibe aferentes colinérgicos del tegmento pontomesencefálico (Woolf y Butcher, 1986); aferentes aminérgicos del tronco encefálico, núcleos del rafe y locus coeruleus, (Kim et al., 1987); aferentes dopaminérgicos del área ventrotegmental (Lamour y Epelbaum, 1988) y aferentes GABAérgicas del hipocampo y de núcleos del septum lateral (Onteniente 1987).

## **b) Función del Septum**

El septum medial se ha considerado el marcapaso del ritmo theta hipocámpico por la mayoría de los autores. Esta consideración se basa en que: 1) lesiones del núcleo MS suprimen el ritmo theta hipocámpico (Gołebiewski et al,1999) 2) MS tiene una población de neuronas rítmicas que descargan a la frecuencia theta Gogolak (Petsche, Stumpf , 1968), 3) la ritmicidad de estas células se mantiene después de la desconexión con el hipocampo (Vinogradova et al.,1980) y 4) la rebanada-*slice* de septum contiene una población de células que continúan descargando rítmicamente a pesar de estar completamente aisladas de otras estructuras (Vinogradova et al., 1980).

Dutar et al., (1995) demostraron que casi la mitad de las neuronas septales que proyectan al hipocampo, disparan en salvas rítmicas y son excitadas por la acetilcolina. Esta actividad rítmica es lenta en contraposición con la alta frecuencia de las neuronas no colinérgicas. Es importante recordar, que más de la mitad de las neuronas del SM que

---

proyectan al hipocampo son colinérgicas y que probablemente muchas de las colaterales de estas neuronas, que inervan al SL, sean colinérgicas. Phelan et al., (1987) estudiaron la acción de la acetilcolina en rebanadas del septum dorsolateral, y demostraron que, actuando sobre receptores muscarínicos M1, ocasiona desinhibición a través de un descenso en la liberación de GABA. Estos datos apoyan la idea de que el área dorsolateral del septum participa en mecanismos integradores y no es una simple estación de relevo sináptico.

El septum medial también se ha considerado como marcapaso del ritmo theta, al comprobarse que, lesiones del área septal eliminan completamente el ritmo theta hipocampal en animales (Leung et al., 1994). Por otra parte estudios farmacológicos han demostrado que la innervación colinérgica del septum medial es la aferencia más importante que regula el ritmo theta hipocampal (Teitelbaum et al., 1975 y Colom et al., 1991). Aun no se conoce la participación directa de este ritmo theta en la función del hipocampo y el sistema septohipocámpico, pero se sugiere que durante las oscilaciones theta constituye un sistema de entrada rápida que reúne la información de la corteza entorrinal, y en este momento también el hipocampo procesa la información de regreso a áreas corticales cerebrales corticales, siendo así una forma de filtrar la información de las señales de salida hipocámpicas. (Vinogradova 1995).

Recientemente se han clasificado las neuronas septales en base a las diferencias de disparo, (Sotty, et al 2003), estableciéndose cuatro tipos neuronales:

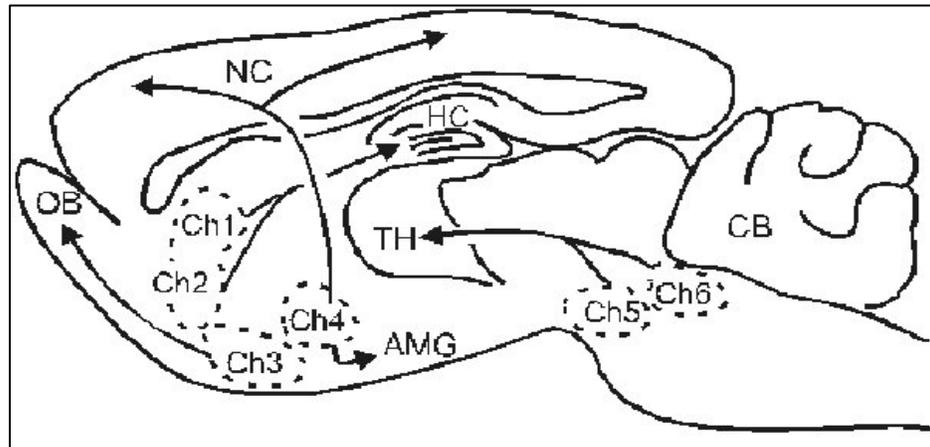
- El primer grupo es de baja frecuencia de disparo, corriente de hiperpolarización (I<sub>h</sub>) y tienen mRNA de Colinacetiltransferasa (Neuronas Colinérgicas).
- El segundo grupo es de alta frecuencia de disparo, tienen corriente de hiperpolarización (I<sub>h</sub>), y mRNA de GAD67 (Neuronas GABAérgicas),

- 
- El tercer grupo tiene alta frecuencia de disparo, y disparos en salva, tienen Ih y mRNA de GAD67 (Otro tipo de neuronas GABAérgicas).
  - El cuarto grupo es de Baja frecuencia de disparo, algunas tienen Ih y tienen mRNA de Vglut 1 y Vglut2 (Neuronas glutamatérgicas).

## **2.3. NEUROQUÍMICA DE LA REGIÓN SEPTAL**

### **a) El sistema colinérgico de la región septal.**

De acuerdo a la clasificación de Mesulam et al., (1983), las neuronas colinérgicas se clasifican en seis grupos. Esta clasificación está basada en la variación topográfica y sus áreas de proyección. El primer grupo (Ch1), está compuesto por células colinérgicas del septum medial (MS), y estas se distinguen de las células de la banda diagonal de Broca en su rama vertical (vDB) (Ch2), que constituirían el segundo grupo. Estos dos grupos proyectan predominantemente al hipocampo. El tercer grupo lo constituyen las células de la rama horizontal de la banda de Broca (hDB) que se proyectan al bulbo olfatorio (Ch3). Neocorteza y amígdala se inervan por otro grupo celular, (Ch4). Este último grupo constituye una gran parte de células localizadas en los núcleos basales de Meynert (NB), núcleo magnocelular y algunas partes de hDB. El tálamo es inervado por los 2 grupos restantes (Ch5 y Ch6), que están localizados en los núcleos pedunculopontinos y laterodorsales tegmentales. A pesar de que estos grupos desde Ch1-Ch6, son considerados como colinérgicos, también pueden tener otros tipos de celulares. Así, por ejemplo, solo el 10-20% de las células de Ch3 son colinérgicas, mientras que en otras áreas como Ch4, las células colinérgicas constituyen entre el 80 y 90%.



**Figura 2.6.-** Núcleos colinérgicos del cerebro de rata .(Ch1-6). AMG = amígdala; CB = cerebelo; HC = hipocampo; NC = Neocórtex; OB = Bulbo Olfatorio; TH = Tálamo. Tomado de Mesulam et al. (1983).

La disminución de neuronas colinérgicas, junto a la afectación de otros neurotransmisores, se ha implicado en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (Francis et al.1999). De hecho el tratamiento más eficaz, de momento, se realiza con inhibidores de la colinesterasa, los cuales son eficaces solo frenando la progresión de la enfermedad (Hansen et al., 2008). Estudios mas recientes, han implicado el efecto citotóxico del glutamato con la etiología de la enfermedad de Alzheimer (Francis ,2005).



**Figura 2.7.-** Distribución de neuronas colinérgicas de la región septal. Tinción de Inmunoperoxidasa, con marcador anti- ChAT.

---

**a) El sistema Gabaérgico de la región septal.**

El ácido Gammaminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más abundante del sistema nervioso central. Las neuronas GABAérgicas tienen una morfología similar a las neuronas colinérgicas pero con una distribución diferenciada, estando localizadas en la parte medial y lateral del septum. Estas neuronas constituyen la población más importante no colinérgica de la proyección septohipocámpica (Kohler et al., 1984).

La gran mayoría de las neuronas GABAérgicas expresan dos isoformas de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), la enzima que sintetiza el GABA (Soghomonian y Martin, 1998; Esclapez et al., 1994). La denominada GAD65 (65 KDa) parece localizarse preferentemente en las terminales nerviosas y está relacionada con la síntesis del pool de GABA almacenado en vesículas sinápticas, mientras que GAD67 (67KDa) está más localizada en el citoplasma del soma neuronal, habiéndose relacionado con funciones metabólicas no relacionadas con la liberación del neurotransmisor (Soghomonian y Martin, 1998).

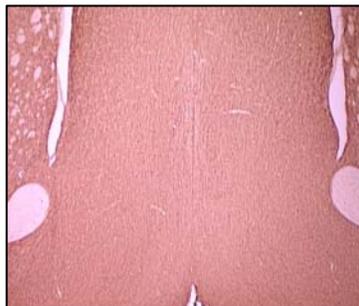
La distribución regional de las dos formas de mRNA de GAD, es diferente, siendo GAD65 más abundante en sistema visual, colículos superiores y algunos núcleos hipotalámicos, mientras que GAD67 es más abundante en neocórtex, septum medial y septum lateral, globo pálido y corteza cerebelosa. Por otra parte, GAD65 está más ligado a neuronas que presentan actividad fásica, mientras que GAD67 está presente en neuronas con actividad tónica (Feldblum et al., 1993).

Las células GABAérgicas septales constituyen una población heterogénea que incluye interneuronas, células de proyección y otras subpoblaciones neuronales. A pesar de que se ha descrito la presencia de neuronas GAD positivas en el septum (Kohler et al., 1984), hasta el

---

momento no se ha estudiado la distribución regional de estas dos isoenzimas. Se ha sugerido que la predominancia de una u otra isoforma GAD podría estar relacionada con diferentes patrones de actividad electrofisiológica. Así GAD67 se localizaría preferentemente en interneuronas y neuronas que disparan con un patrón tónico, mientras que las GAD65, lo harían en neuronas con disparo fásico (Feldblum et al., 1993; Esclapez et al., 1994). Si las propiedades de disparo dependen de la distribución la inmunotinción del GAD puede constituir un marcador selectivo de neuronas GABAérgicas septales, de su función y de sus posibles cambios plásticos.

En el presente estudio hemos analizado la distribución de las isoformas de la enzima GAD (GAD65 y GAD67) así como si estas enzimas se expresan predominantemente en alguno de los diferentes subgrupos de neuronas septales. Aunque las neuronas GABAérgicas no parecen afectarse por la edad, su relación con las neuronas colinérgicas, podría participar en la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer. (Alreja et al., 2000).



**Figura 2.8.-** Fotomicrofotografía de la región septal, mostrando la distribución de neuronas GABAérgicas. Técnica de inmunohistoquímica.

---

**c) El sistema glutamatérgico de la región septal**

EL L-glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el Sistema Nervioso Central. La transmisión glutamatérgica ha sido descrita en diversas regiones del sistema nervioso, que incluyen: conexiones córtico-corticales ipsilaterales y contralaterales, proyecciones corticales hacia la amígdala, tubérculo olfatorio, el putamen, núcleo caudado, tálamo, colículos superior e inferior, área tegmental, sustancia negra, núcleo rojo y médula espinal, además de la corteza entorrinal. El ácido glutámico participa a nivel hipocámpal en conexiones que incluyen al septum, subiculum, cuerpo mamilar e hipotálamo así como también en la corteza visual, retina y cerebelo (Michaelis 1990).



**Figura 2.9.-** Fotomicrofotografía que muestra la distribución de neuronas glutamatérgicas septales. Técnica de inmunohistoquímica.

---

Además de la implicación de glutámico en numerosas funciones centrales, este aminoácido tiene importantes efectos neurotóxicos. En consecuencia, su concentración en el espacio extracelular no debe sobrepasar ciertos límites, por lo que la homeostasis de los sistemas glutamatérgicos (metabolismo, mecanismos de liberación, receptores y transportadores) está muy finamente regulada (Siegel.1994). Las neuronas glutamatérgicas en el septum medial, tienen una enorme importancia funcional. Forman parte de una gran red neuronal que puede ser activada por acetilcolina, y a la vez, potenciar la funcionalidad de los grupos neuronales colinérgicos y GABAérgicos septales, así como la actividad hipocámpica en general (Manseau, et al.2005).

---

## **HIPOTESIS Y PLANTEAMIENTO**

---

### 3. HIPOTESIS Y PLANTEAMIENTO

El hipocampo es una estructura del cerebro que ha sido relacionada con los procesos de memoria y aprendizaje, por lo que juega un importante papel en la disfunción de estos mismos procesos cognitivos, en particular en el desarrollo de la demencia asociada a la edad. Por tanto el conocimiento de los circuitos neurales hipocámpicos puede permitirnos la comprensión de los mecanismos subyacentes a tales procesos, así como desarrollar estrategias terapéuticas adecuadas.

La mayoría de las aferencias al hipocampo constituyen un sistema neuronal denominado vía septohipocámpica, formada por la convergencia de un grupo de neuronas que se originan en el septum medial y la banda diagonal de Broca (SM-BDB), denominada en su totalidad como septum medial, las cuales inervan casi todas las áreas del hipocampo. Estos grupos neuronales pueden recibir diferentes aferencias locales y extrínsecas, con propiedades moleculares, anatómicas y funcionales diferentes, que pueden modificar por tanto el funcionamiento del hipocampo.

Se ha asumido tradicionalmente, que el complejo SM-BDB, constituido por neuronas predominantemente colinérgicas, aunque en menor grado también GABAérgicas, juegan un papel importante en la generación del ritmo theta hipocámpal. Las interconexiones colinérgicas y no colinérgicas de esta región siguen siendo motivo de investigación. A pesar de que existen evidencias de terminales colinérgicas que contactan con neuronas GABAérgicas, o viceversa, no conocemos a fondo la naturaleza de estas conexiones.

Por otra parte, aunque se han descrito dos isoformas del enzima responsable de la síntesis de GABA, que sabemos que es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en sistema nervioso en general,

---

su distribución en el septum no es conocida. Se ha sugerido que la predominancia de una u otra isoforma GAD podría estar relacionada con diferentes patrones de actividad electrofisiológica. Así GAD67 se localizaría preferentemente en interneuronas y neuronas que disparan con un patrón tónico, mientras que la GAD65, lo harían en neuronas con disparo fásico. Además GAD67 es la responsable de la producción basal de GABA, mientras que GAD65 es activada, aparentemente, en respuesta a la demanda del neurotransmisor.

Es posible que la regulación de la actividad GABAérgica, y en consecuencia la expresión del enzima GAD, este relacionada con un determinado patrón de conectividad y actividad sináptica. En el presente estudio se analiza la posible distribución diferencial de las isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección a hipocampo.

Además, la generación del ritmo theta hipocámpico, requiere de de inputs excitatorios desde la región septal. Es posible que junto a la población colinérgica, participen otros neurotransmisores de carácter excitador como el glutamato. De hecho, parece ser necesario que las neuronas hipocámpicas sean excitadas por neuronas colinérgicas del complejo SM-DBB, o por aferentes glutamatérgicos, para generar la inhibición rítmica de las interneuronas hipocámpicas, generada por las neuronas septohipocámpicas GABAérgicas. Este grupo neuronal que utiliza Glutamato como neurotransmisor apenas ha sido descrito y demostrado. Por tanto nos hemos planteado la caracterización de las neuronas glutamatérgicas septales y sus proyecciones septohipocámpicas.

Finalmente, en base a la implicación en los circuitos hipocámpicos de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas, parecería necesario calcular, mediante estereología, la densidad de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata. De hecho,

---

aunque se ha tratado de identificar otros grupos neuronales septales y calcular, en el cerebro basal anterior, el número de estas neuronas, aun no se ha logrado. Por tanto es importante conocer el numero de neuronas septales, así como de los transmisores más estudiados hasta hoy, y poder entender la compleja red interneuronal septal. Esto permitiría demostrar la presencia de otros grupos neuronales existentes a nivel septal así como sus implicaciones fisiológicas.

---

## **MATERIAL Y METODOS**

---

#### **4. MATERIAL Y METODOS**

##### **EXPERIMENTO 1. Diferenciación de las isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección al hipocampo.**

Ver detalladamente en la publicación “Glutamic acid decarboxylase isoforms are differentially distributed in the septal region of the rat”. Maria T. Castaneda, Emilio R. Garrido Sanabria, Sofia Hernandez, Adriana Ayala, Tania A. Reyna, Jan-Yen Wu, Luis V. Colom. **Neurosci Res.** 2005. 52:107-119.

##### **EXPERIMENTO 2. Caracterización de las neuronas glutamatérgicas del septum medial y su proyección hacia el hipocampo.**

Ver detalladamente en la publicación “Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus”. Colom L. V., Castañeda M.T., Reyna T. and Hernandez S. **Synapse** 2005. 58: 151-164

##### **EXPERIMENTO 3. Cálculo, mediante estereología, del número de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata.**

---

## **Animales**

Se emplearon un total de 12 ratas macho (Sprague-Dawley) adultas (200-300gr), a razón de 3 animales por cada uno de los siguientes experimentos:

- 1) Determinación del número de neuronas colinérgicas.
- 2) Determinación del número de neuronas GABAérgicas.
- 3) Determinación del número de neuronas glutamatérgica
- 4) Determinación del número de neuronas totales.

Toda la experimentación animal fue realizada de acuerdo con las con las pautas y requerimientos de la universidad, así como las indicaciones la guía "Care and Use of Laboratory Animals" (IACUC) del "National Institute of Health Guide for the care and Use of laboratory Animals". Se intentó minimizar el número de animales y su sufrimiento. Las ratas fueron anestesiadas con una combinación de Ketamina (42.8mg/ml), Xilazin (8.6mg/ml) y acepromazina (1.4mg/ml), a una dosis de (0.7ml/kg.i.m.) y perfundidas transcárdialmente con 0.1M de Buffer Fosfato Salino (PBS), seguido de una solución fijadora conteniendo Paraformaldehído 4 %, en 0.1 M de PBS, con un pH de 7.4. Después de la fijación y extracción, los cerebros fueron postfijados en el mismo fijador toda la noche a 4°C. Después, los cerebros fueron crioprottegidos con 30% de sucrosa en PBS, para a continuación congelarse y cortarse con un criostato (Car Zeiss) microm HM 505E, MICROM, en secciones de 60  $\mu$ m, que se almacenaron en 0.1M PBS.

## **Inmunohistoquímica**

Por el método de libre flotación, los cortes de de 60  $\mu$ m de grosor, conteniendo la región septal, se incubaron durante 10 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, para inhibir la actividad de peroxidasa endógena. El marcaje inespecífico se

---

evitó colocando los cortes en Albúmina Bovina Sérica (BSA) al 10% durante una hora a temperatura ambiente.

Las secciones fueron incubadas durante 48 horas en cada uno de los siguientes anticuerpos, de acuerdo con los experimentos descritos anteriormente.

a) Determinación del número de neuronas colinérgicas. Suero anti-ChAT hecho en cabra, a una dilución de 1:200, durante 48 horas, posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra, hecho en caballo, durante una hora, a una concentración de 1:200. Finalmente las secciones fueron incubadas en el sustrato de avidina-biotina (ABC) (Vector Labs) durante 1 hora para la determinación del número de neuronas colinérgicas.

b) Determinación del número de neuronas GABAérgicas. Suero anti- GAD67 hecho en conejo a una dilución de 1:1000 (Chemicon ,Temecula) en PBS conteniendo 2% de BSA,durante 48 horas,posteriormente las secciones fueron enjuagadas, con PBS.Después fueron incubadas en el anticuerpo biotinilado anti-ratón preparado en cabra a una dilución de 1:200 (Vector. USA) durante una hora en la misma solución, que el anticuerpo primario.Finalmente las secciones fueron incubadas en el sustrato de avidina-biotina (ABC) (Vector Labs) durante 1 hora. Para la técnica inmunohistoquímica del GAD todos los enjuagues fueron hechos con Tween 20 (Sigma, St Louis) a una concentración de 0.05% en PBS .1M.

c) Determinación del número de neuronas glutamatergicas. Las secciones fueron incubadas durante 48 horas en un anticuerpo de ratón monoclonal anti-glutamato a concentración de 1:2000 (Immunostar), seguido después de un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado a una concentración de 1:200 (Chemicon) durante una hora, para después ser colocadas, en el sustrato de avidina (ABC) (Vector) durante una hora.

---

d) Determinación del número de neuronas. Para la determinación del número de neuronas totales, las secciones fueron incubadas con el suero anti-NeuN hecho en ratón, a una dilución de 1:1000, durante 48 horas, posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón, hecho en cabra, por una hora, e incubadas en ABC, durante una hora.

En cada experimento algunas secciones fueron incubadas sin el anticuerpo primario para determinar la especificidad del anticuerpo y estas fueron utilizadas como controles.

Las secciones fueron reveladas utilizando diferentes cromógenos DAB y Nova Red (Vector Labs.). Posteriormente las secciones fueron enjuagadas y montadas en portaobjetos gelatinizados, deshidratadas en grados crecientes de alcohol, aclaradas con xileno y cubiertas con Permount (Líquido de montaje) y cubreobjetos para su posterior análisis.

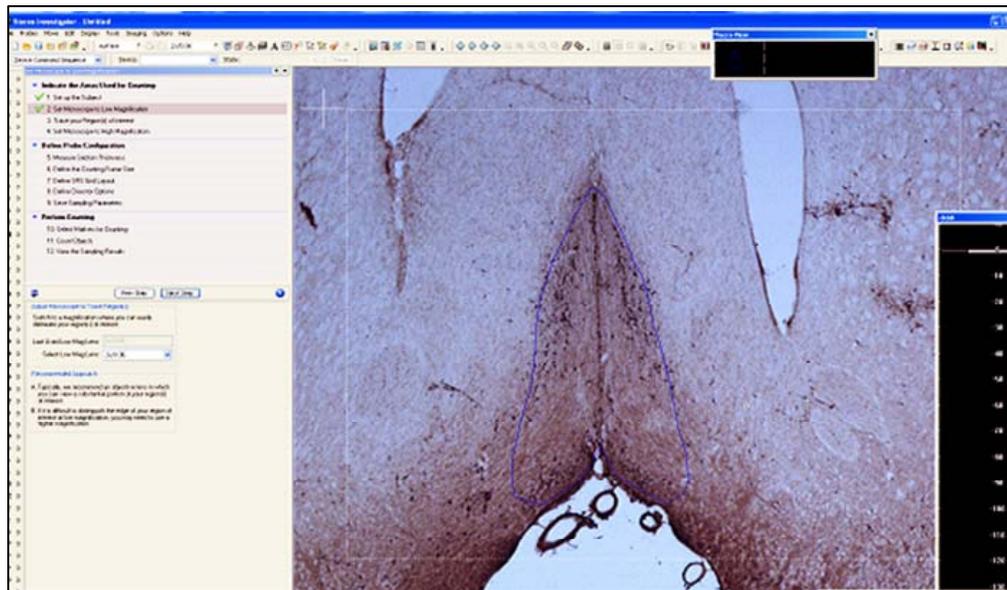
Después de haberse terminado la técnica inmunohistoquímica, las secciones fueron analizadas con ayuda de un microscopio de luz (Axiovert 200, Zeiss), equipado con una videocámara (Optronics), y con una plataforma motorizada (Prior). Se utilizó una lente de inmersión (100X) tanto para medir el grosor de los cortes después del proceso histológico y también para contar las neuronas septales (Ver Figura 4.1)



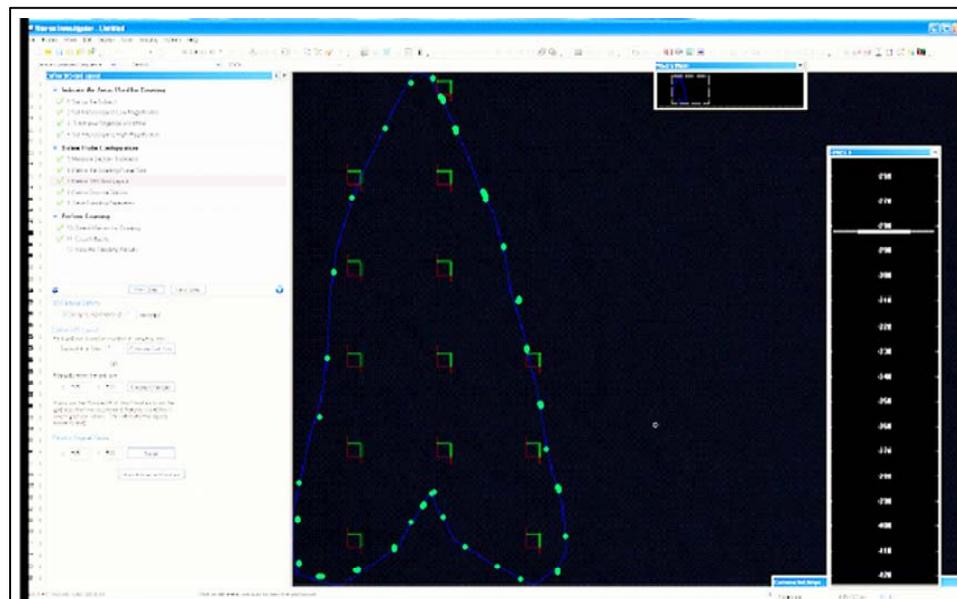
**Figura 4.1.-** Equipo para realizar la estereología, con el programa “Stereoinvestigador”, y el microscopio Axiovert Zeiss.

### **Análisis de las imágenes.**

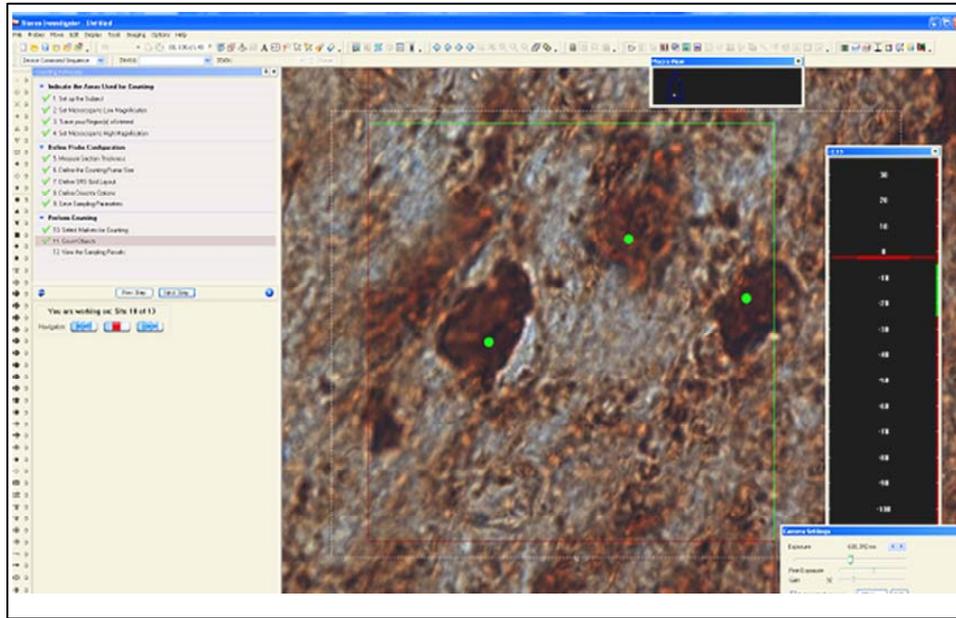
El contorno del septum medial se determinó usando la correspondiente sección en el Atlas de Paxinos and Watson del cerebro de rata. Las secciones consideradas dentro del septum medial fueron clasificadas como anterior (anterior a  $\beta$  0.07mm), central ( $\beta$  0.07 mm) y posterior (posterior a  $\beta$  0.2 mm) de acuerdo al mismo atlas. Se empleó el fraccionador óptico (Gundersen et al., 1987; West et al., 1991), analizando en cada tercera sección zonas de  $60 \times 60 \mu\text{m}$  contando los marcos y celdas de  $221.36 \times 228.04 \mu\text{m}$  que fueron sobrepuestas en las imágenes de video del campo microscópico usando el programa “*stereo investigator*” (MicroBright field, Willistone, VT, USA). Las porciones superiores e inferiores de tejido, de  $3\mu\text{m}$ , dio como resultado una altura del disector de  $12 \mu\text{m}$ . La muestra estereológica fue diseñada para que al menos 200 neuronas se contaran en cada animal.



**Figura 4.2.** Microfotografía de una rebanada histologica que incluye septum medial. En esta se aprecia uno de los primeros pasos del analisis estereológico. Se aprecia con una linea azul la delimitación del contorno del septum medial.



**Figura 4.3.-** Análisis estereológico donde se aprecia el fraccionador óptico, con la celdillas, en los pequeños recuadros, determinando los sitios de contar las neuronas.



**Figura 4.4.-** Análisis estereológico con el objetivo a 100x, donde se aprecia el marco de referencia donde se cuentan, las neuronas ( Marcadas con los puntos), lo incluido cerca a la línea verde, son las neuronas .

---

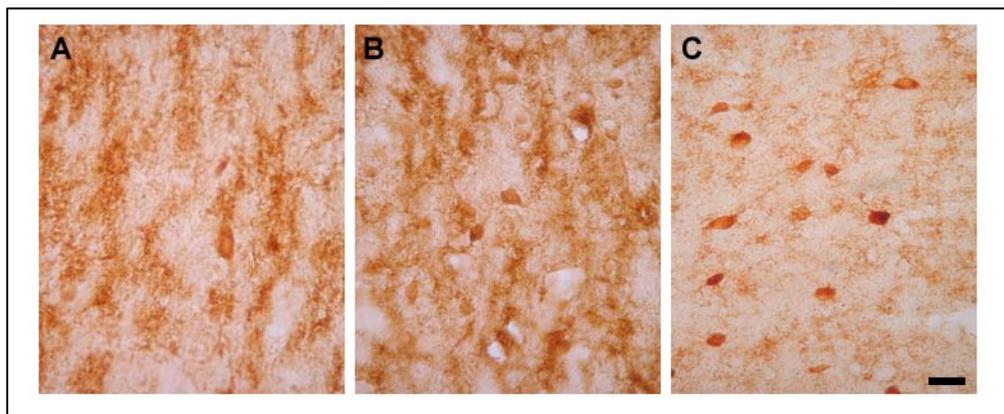
## **RESULTADOS**

---

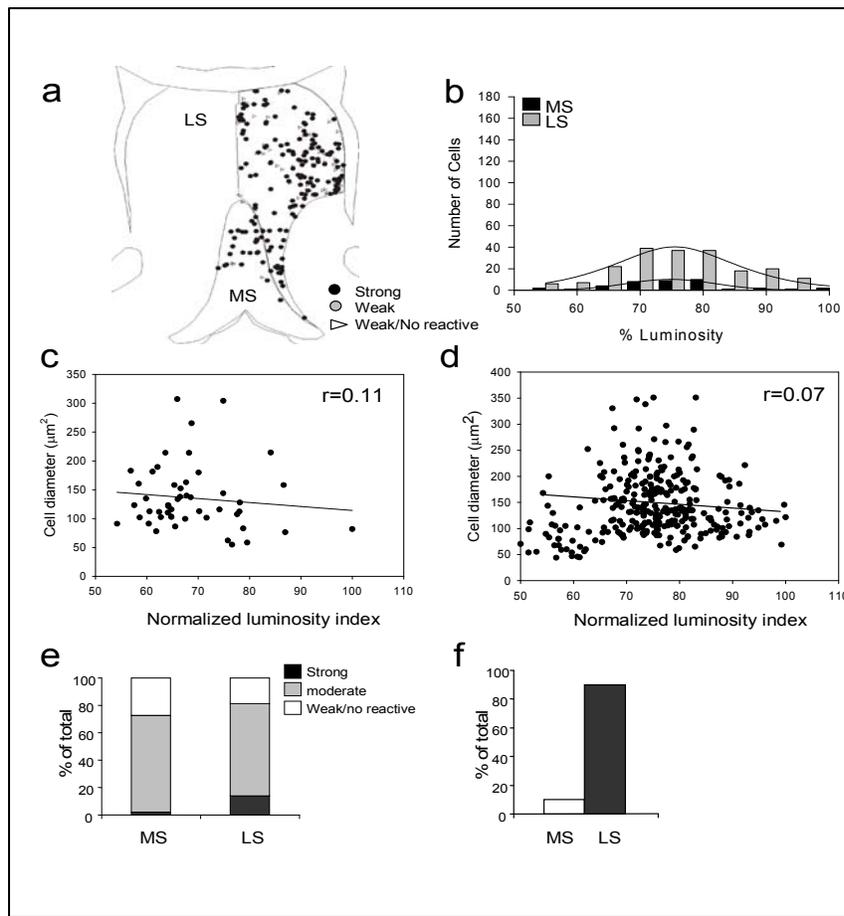
## 5.1. EXPERIMENTO 1. Diferenciación de las isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección al hipocampo.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este experimento. Ver detalladamente en la publicación “Glutamic acid decarboxylase isoform are differentially distributed in the septal region of the rat”. Maria T. Castaneda, Emilio R. Garrido Sanabria, Sofia Hernandez, Adriana Ayala, Tania A. Reyna, Jan-Yen Wu, Luis V. Colom. *Neurosci Res.* 2005. 52:107-119.

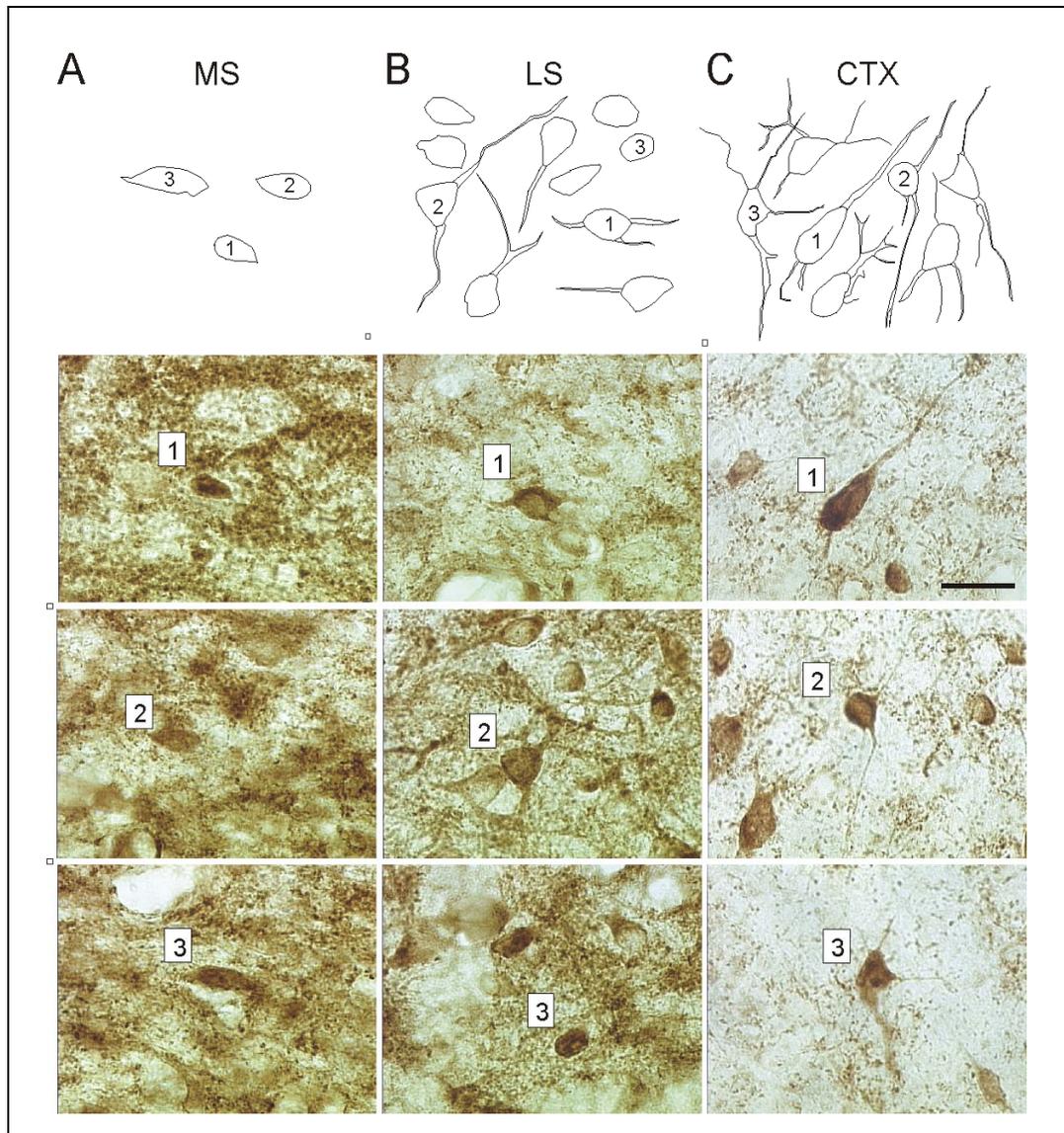
### 5.1.1. Tinción de inmunoperoxidasa para GAD65



**Figura 5.1.1.-** Microfotografías de tinción de inmunoperoxidasa para GAD65 en septum medial (A), septum lateral (B) y corteza cerebral (C). (A) El pericarium de las neuronas GAD65 positivo en el septum medial se muestra disperso, orientados en paralelo a la línea media. En esta área es también evidente el marcaje denso de conglomerados (bandas) de fibras. (B) En el septum lateral, las neuronas GAD65 exhiben diferentes morfologías e inmunodensidades, y aparecen orientadas en diferentes direcciones. La inmunoreactividad GAD65 marca fuertemente fibras y terminales como se manifiesta por el intenso marcaje del fondo. (C) Las neuronas GAD 65 positivas en la corteza muestran una intensa inmunoreactividad y formas morfológicamente diversas. Escala de la barra = 50µm.



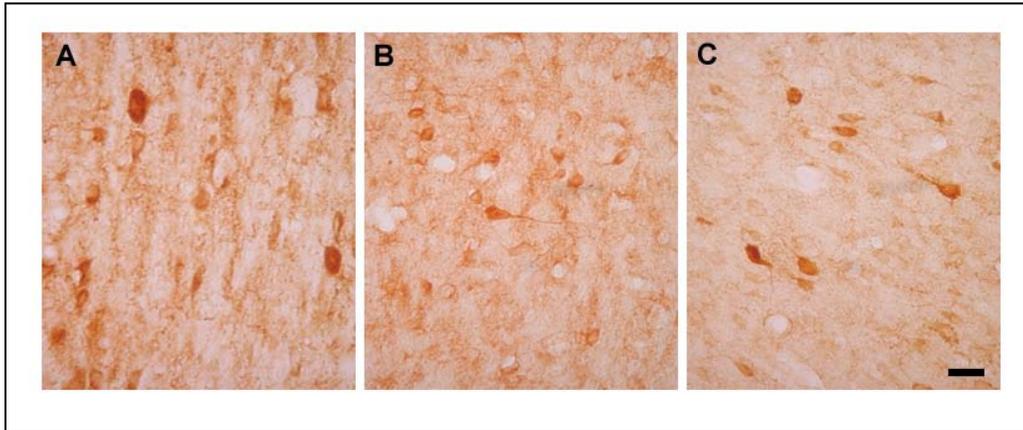
**Figura 5.1.2.-** (a) Experimento representativo mostrando la distribución de neuronas GAD65 positivas en el septum medial (MS) y septum lateral (LS) en una sección coronal. Cada símbolo indica un cuerpo celular inmunoreactivo con diferentes niveles de inmunoreactividad tal como se describe en la figura. (b) Histograma que representa el índice de porcentaje de luminosidad de neuronas GAD 65 positivas en el septum medial versus septum lateral. (c y d) Representación de los parámetros determinados en este experimento (índice de luminosidad normalizada vs diámetro celular) para el septum medial (c) y septum lateral (d). Las líneas representan la regresión línea. (e) Análisis de grupo de neuronas agrupadas de acuerdo al índice de luminosidad. Se observa que la gran mayoría de neuronas expresa moderada inmunoreactividad. (f) Datos normalizados representando el porcentaje de células en septum medial vs septum lateral.



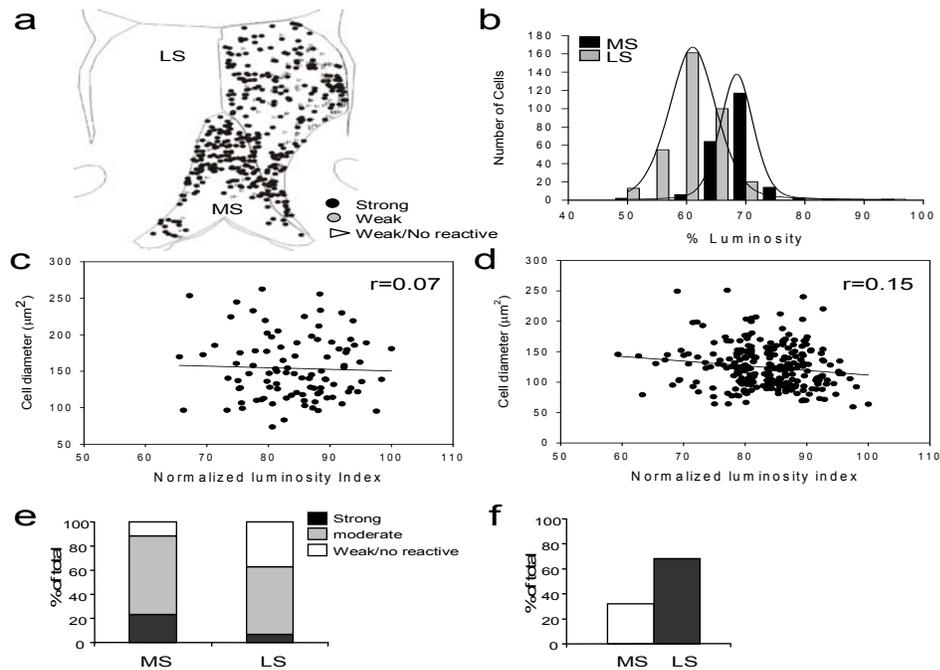
**Figura 5.1.3.-** Reconstrucción digital e imágenes fotomicroscópicas de neuronas GAD65 positivas en (A) septum medial (MS), (B) septum lateral (LS) y (C) Corteza (CTX). Se observa que la inmunoreactividad de GAD65 esta restringida predominantemente al área somática en el septum medial, mientras que la inmunoreactividad para septum lateral y corteza esta también presente en dendritas primarias y secundarias. Los números indican, las neuronas reconstruidas. Escala de la barra = 50 $\mu$ m.

---

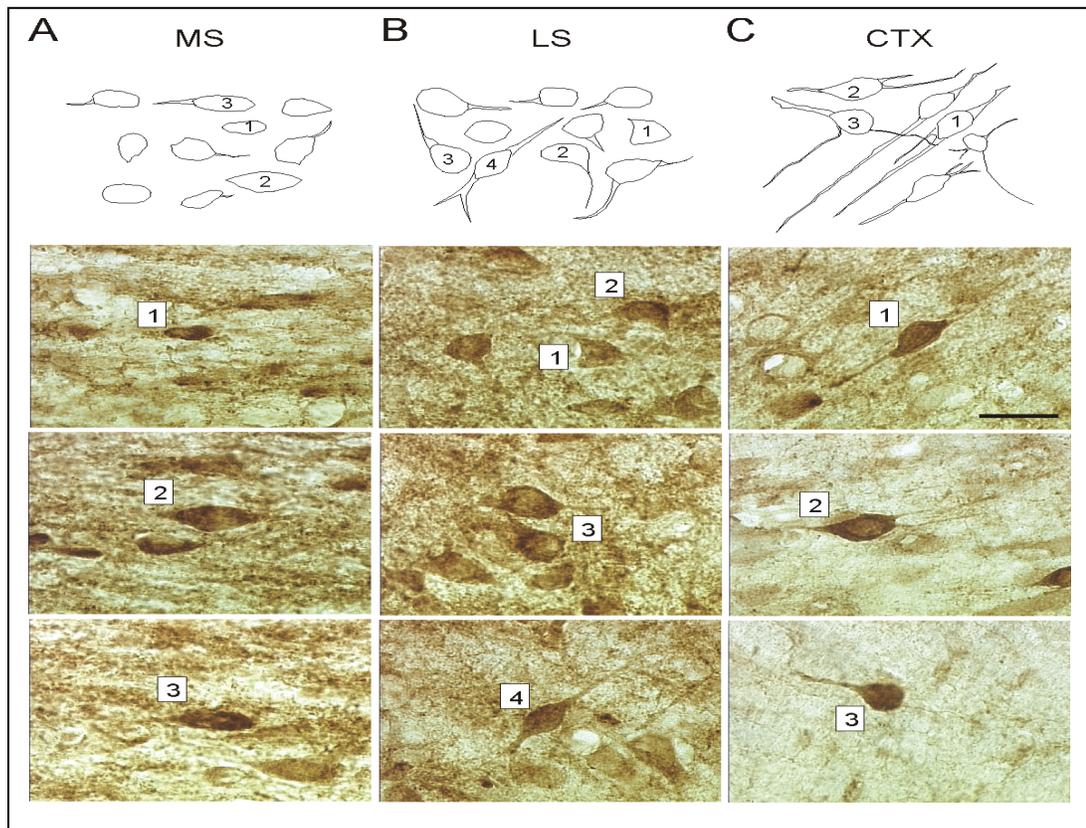
### 5.1.2. Tinción de inmunoperoxidasa para GAD67



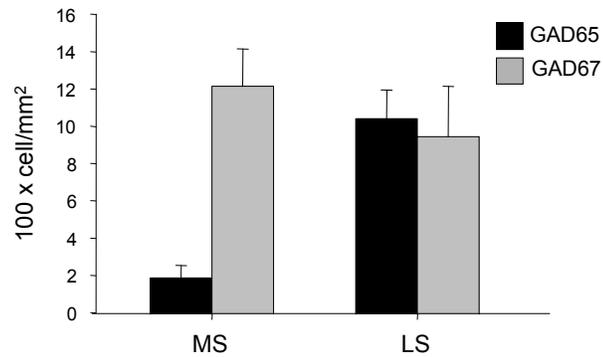
**Figura 5.1.4.-** Microfotografías de la tinción de inmunoperoxidasa para GAD67 en el septum medial (A), septum lateral (B) y corteza (C). (A) Tinción de neuronas inmunopositivas para GAD67, en el septum medial (B) En el septum lateral, las neuronas GAD67 presentan morfologías más complejas. (C) Neuronas GAD67 positivas en corteza, en las que se expresa intensa inmunoreactividad en el soma y dendritas proximales. Escala de la barra = 50 $\mu$ m.



**Figura 5.1.5.-** (a) Distribución de cuerpos celulares inmunopositivos para GAD67 en septum medial (MS) y septum lateral (LS), de un experimento representativo. Las neuronas fueron clasificadas de acuerdo a los niveles de inmunoreactividad. (b) Histograma representando la distribución de los niveles de inmunoreactividad determinado por el índice de luminosidad. (c y d) Grafica de distribución por puntos, representando el índice de luminosidad vs el área celular, en el que se aprecia que no hay correlación entre estas, tanto en el septum medial (c) como en septum lateral (d). (e) Porcentaje de neuronas agrupadas de acuerdo a inmunoreactividad (como lo describe la leyenda) en ambas areas septales. (f). Porcentaje del total de neuronas inmunoreactivas en septum medial (MS) y septum lateral (LS)



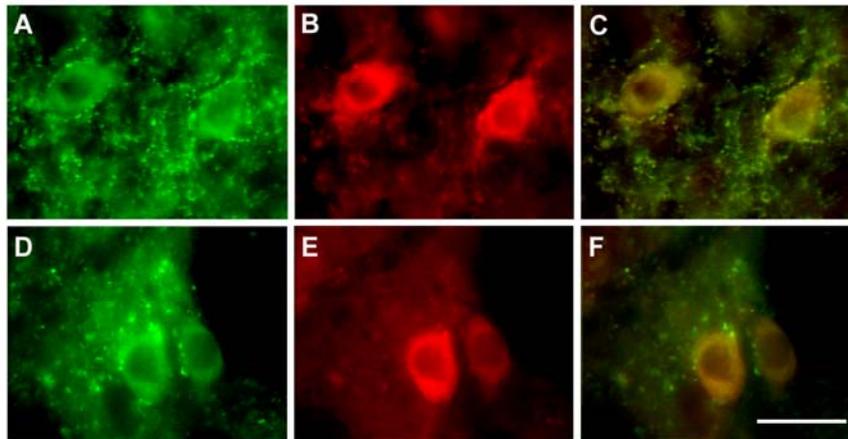
**Figura 5.1.6.-** Reconstrucción e imágenes microscópicas de neuronas marcadas con GAD67 en **(A)** septum medial (MS), **(B)** septum lateral (LS) y **(C)** corteza (CTX). Observe la complejidad del marcaje de GAD67, principalmente restringido a somas neuronales en el septum medial, pero presente en ramas dendríticas de septum lateral y corteza cerebral. Los números indican las neuronas reconstruidas. Barra igual a 50µm.



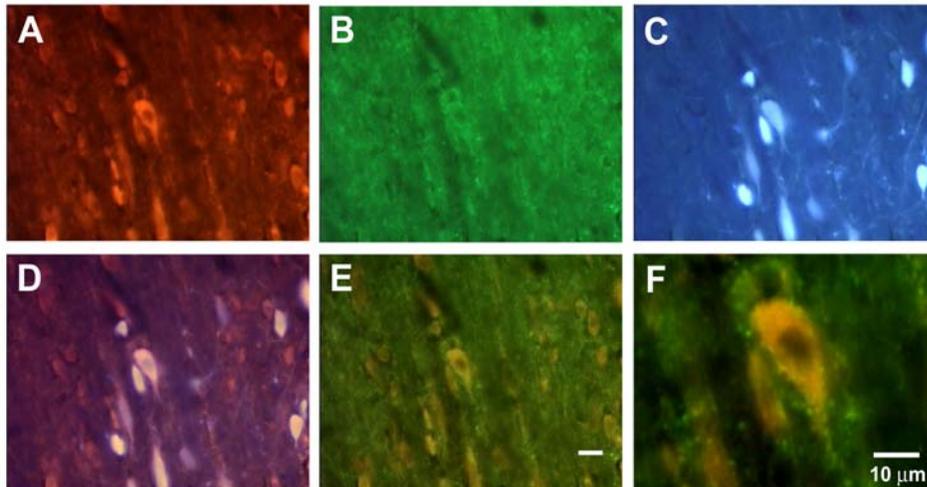
**Figura 5.1.7-** Densidad de neuronas inmunopositivas para GAD65 y GAD67, en el septum medial y septum lateral. La densidad de las neuronas marcadas con GAD65, fue significativamente más baja en el septum medial (T de student,  $p < 0.01$ ). No se observaron cambios significativos en la densidad de las neuronas GAD67 positivas.

---

### 5.1.3.- Tinción con doble inmunofluorescencia y marcaje retrogrado para GAD65 y GAD67



**Figura 5.1.8.-** Doble inmunofluorescencia para GAD65 y GAD67 en la región septal. (A) Neuronas inmunoreactivas para anticuerpos anti- GAD65 en el septum medial. (B) Las mismas neuronas marcadas con el antisuero anti-GAD67 y anticuerpo secundario rojo fluorescente (Alexa 568). (C) Imágenes superpuestas mostrando terminales GAD65 positivas rodeando a neuronas marcadas. (D) Inmunofluorescencia para GAD65 en el septum lateral. (E) Las mismas neuronas se marcan por el anticuerpo anti-GAD67. (F) La sobreposición de ambas imágenes revela la presencia de botones sinápticos GAD65 alrededor de las neuronas. (Barra =20 $\mu$ m).



**Figura 5.1.9.-** Marcaje retrógrado de neuronas septo-hipocampales y doble inmunofluorescencia para GAD65 y GAD67 en el septum medial. **(A)** Inmunofluorescencia para GAD67, en la que se observan numerosas neuronas reactivas (Alexa 568). **(B)** Inmunofluorescencia para GAD65 en la que se observa un escaso inmunomarcaje en el soma de las neuronas del septum medial (Alexa 488). **(C)** Algunas neuronas Fluorogold positivas. **(D)** Algunas neuronas Fluorogold positivas fueron también inmunomarcadas para GAD67. **(E)** Superposición de inmunomarcaje con GAD65 y GAD67, en el que se aprecia la predominancia de GAD67. **(F)** A mayor aumento, puede observarse un amplio marcaje difuso “punteado” rodeando neuronas GAD67 inmunopositivas (aunque negativas para GAD65) en esta área. (Barra=10 µm).

---

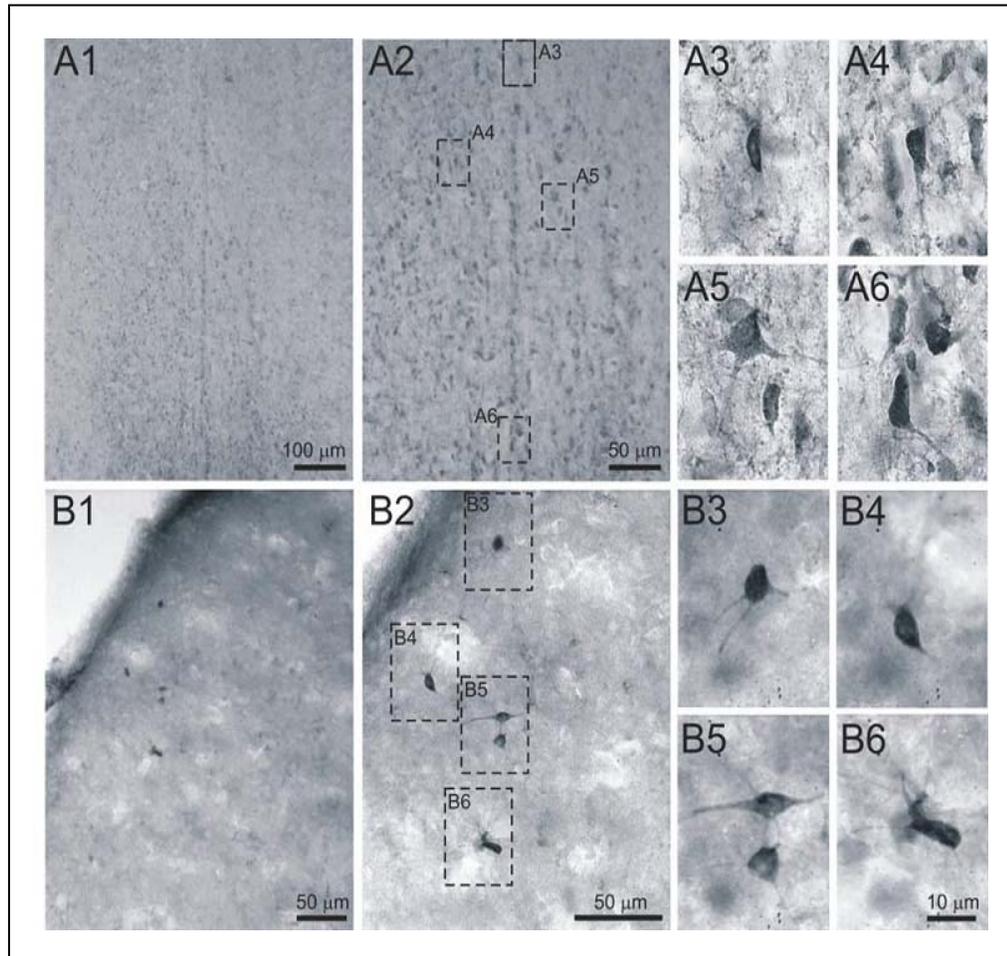
## 5.2 EXPERIMENTO 2. Caracterización de las neuronas glutamatergicas de septum medial y su proyección hacia hipocampo.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este experimento. Ver detalladamente en la publicación : “Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus”. Colom L. V., Castañeda M.T., Reyna T. and Hernandez S. Synapse. 2005. 58: 151-164



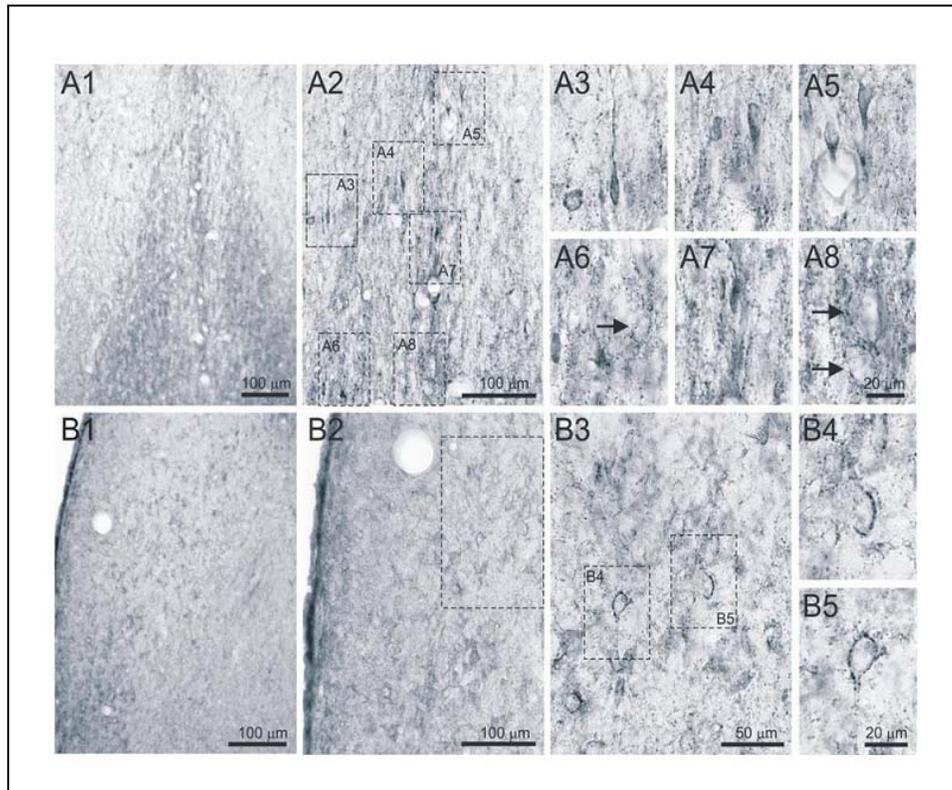
**Figura 5.2.1** Ejemplo representativo de la inyección intrahipocámpica de Fluorogold, para identificar las neuronas septohipocámpicas. Inyección en CA1, tinción de Nissl.

### 5.2.1.- Tinción de inmunoperoxidasa para Glutamato.



**Figura 5.2.2.** Microfotografías que muestran las áreas que inmunoreactivas con el anticuerpo antiglutamato en A) el Septum Medial y B) Septum lateral. A1, magnificación de las áreas de septum medial, mostrando la distribución de las neuronas glutamato inmunoreactivas. A2, nótese las neuronas glutamato positivas en toda la extensión del septum medial. A3-A6, amplificación de las áreas marcadas en A2. Obsérvense diferentes subtipos morfológicos de las neuronas glutamato inmunoreactivas. B1 Inmunohistoquímica del septum lateral, mostrando escasas neuronas glutamato positivas. B2 amplificación de B1, donde se observa la morfología de estas neuronas, B3-B6 amplificación de estas neuronas.

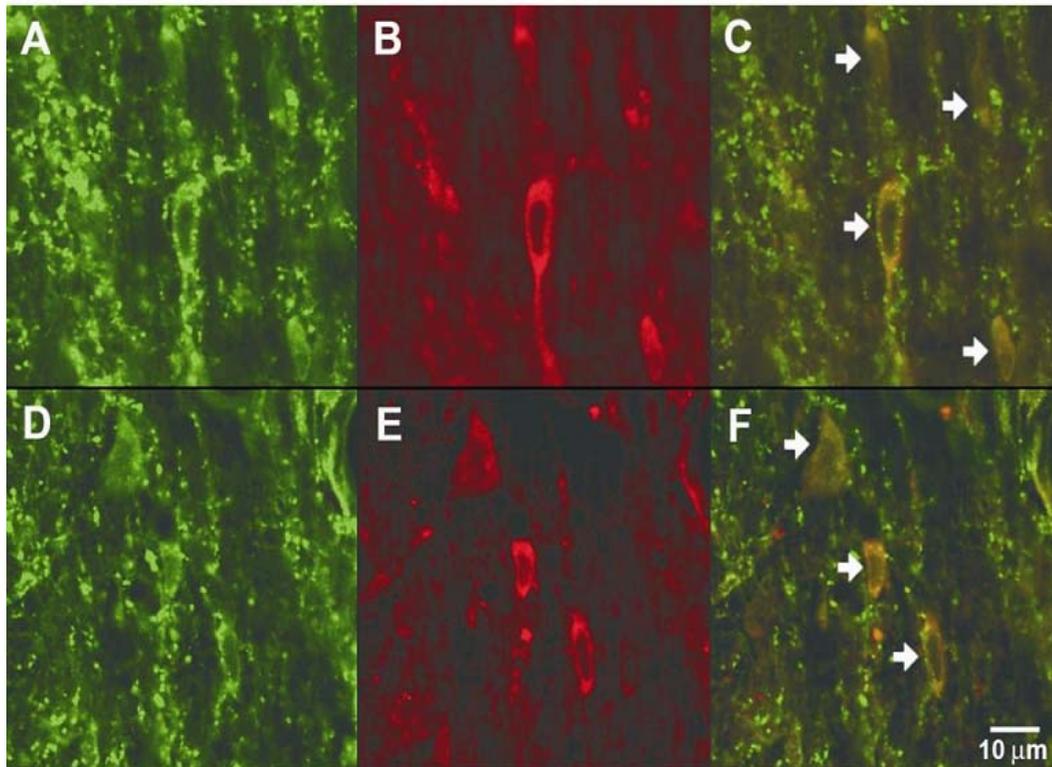
### 5.2.2 Tinción de inmunoperoxidasa para VGLUT2



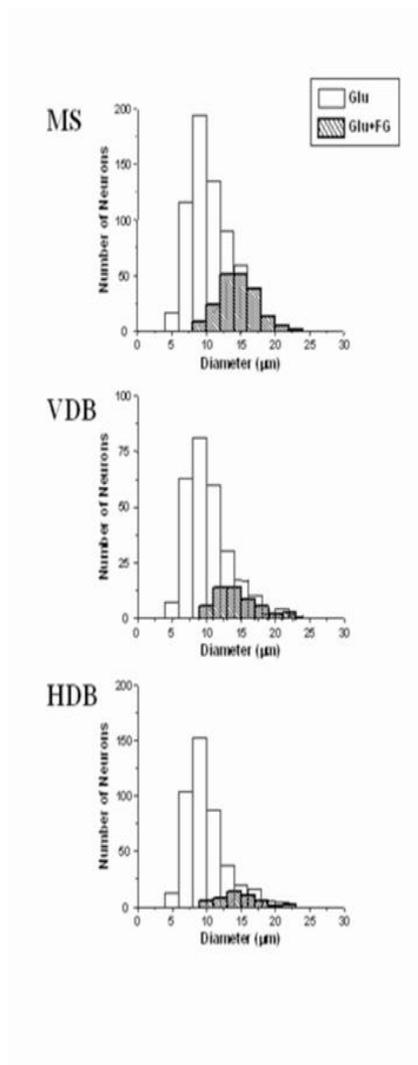
**Figura 5.2.3** Microfotografía que muestra la inmunorreactividad de las neuronas VGLUT2 en el septum medial (A), y septum lateral (B). A1, Con amplificación moderada del septum medial, puede apreciarse un intenso de marcaje de fondo de VGLUT2. A2, mayor amplificación de A1, enmarcándose áreas con neuronas VGLUT2 positivas. En la mayoría de las neuronas VGLUT2 positivas puede apreciarse como poseen un soma fusiforme, la tinción es débil y están orientadas en el eje axial de la línea media, tal como se observa en el recuadro A3-A8. Algunos somas inmunonegativos, “*imágenes fantasma*”, están rodeados de terminales VGLUT2 positivos de aspecto “*punteado*” (posibles neuronas glutamatérgicas). B1, Microfotografía del septum lateral mostrando inmunotinción de VGLUT2. B2, amplificación de B1 mostrando algunos somas inmunonegativos y amplia inmunorreactividad VGLUT2, de aspecto “*punteado*”. B3, algunas células no VGLUT2 inmunoreactivas están rodeadas de inmunorreactividad VGLUT2 positiva de aspecto “*punteado*”. En B4 y B5 se muestra una amplificación.

---

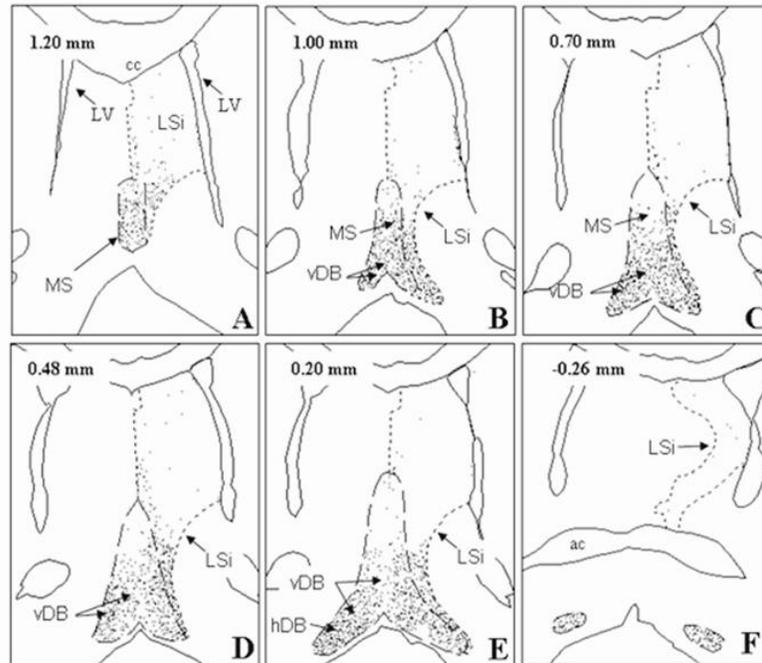
### 5.2.3 Tinción con doble fluorescencia de antiglutamato y VGLUT2



**Figura 5.2.4.** Dos ejemplos representativos que ilustran neuronas de septum medial inmunoreactivas a anticuerpos anti-VGLUT2 y anti-glutamato. A y D muestran neuronas en septum medial marcadas con anticuerpo anti-VGLUT2. B y E muestran las mismas neuronas de septum medial marcadas en el anticuerpo anti-glutamato. C resulta de una superposición de A y B, y F sobreponiendo D y E. Se observa una gran inmunoreactividad a VGLUT2, de carácter “punteado” en A y D, lo cual hace difícil visualizar la inmunoreactividad de los cuerpos celulares. Se observa también el doble marcaje de estas neuronas. Cuatro y tres neuronas doblemente marcadas están señaladas por las flechas en C y F, respectivamente.



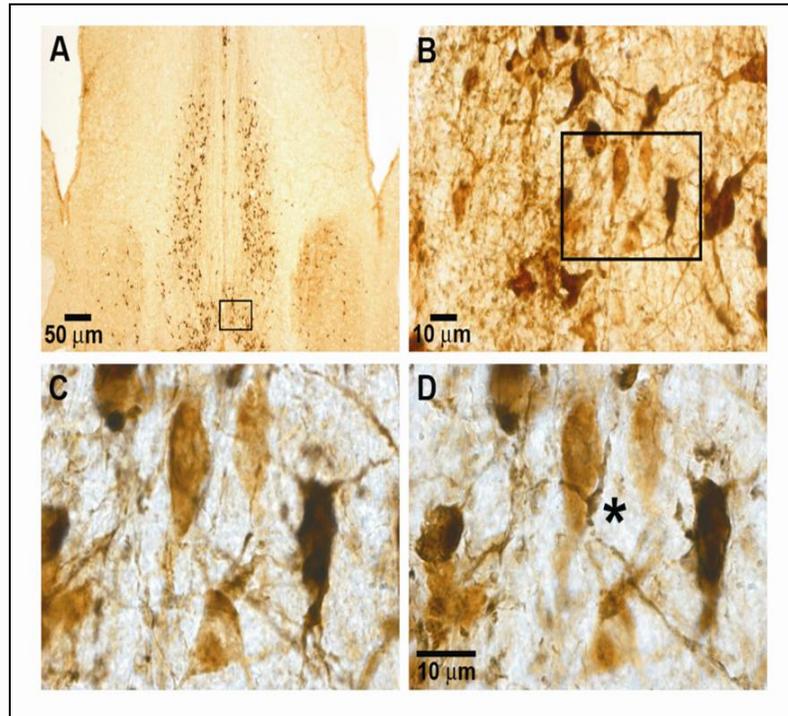
**Figura 5.2.5.** Representación del diámetro de las neuronas glutamato inmunoreactivas (Glu) y neuronas glutamato inmunoreactivas mas marcadas con FG (Glu+FG) en el septum medial (MS), rama vertical de la banda diagonal de Broca (vDB) y rama horizontal de la banda diagonal de Broca (hDB) del cerebro de rata, tras inyecciones intrahipocámpicas de FG. Cada región del septum medial incluye un grupo de neuronas glutamato inmunoreactivas con un diámetro promedio de  $10\mu\text{m}$  ( $10.79\pm 3.24$  MS,  $10.21\pm 3.15$  vDB,  $10\pm 3.27$  hDB), y un subgrupo de neuronas glutamatérgicas, mas grande, con un diámetro medio de aproximadamente  $15\mu\text{m}$  ( $14.55\pm 2.65$  MS,  $14.55\pm 3.16$  vDB,  $14.67\pm 3$  hDB) que se proyectan a hipocampo. No se observaron células glutamato inmunoreactivas magnocelulares ( $\geq 30\mu\text{m}$ ).



**Figura 5.2.6.** Ilustración esquemática (ejemplo representativo) de la distribución de neuronas glutamato-inmunoreactivas en la región del septum medial de la rata (septum medial/rama vertical y horizontal de la banda de Broca) y septum lateral. Los números del diagrama representan la sección coronal aproximada del atlas de la rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1982). MS Septum medial; LSi, Septum lateral; vDH rama vertical de la banda diagonal de Broca; hDB rama horizontal de la banda diagonal de Broca; V ventrículos laterales; ac comisura anterior; y CC cuerpo calloso.

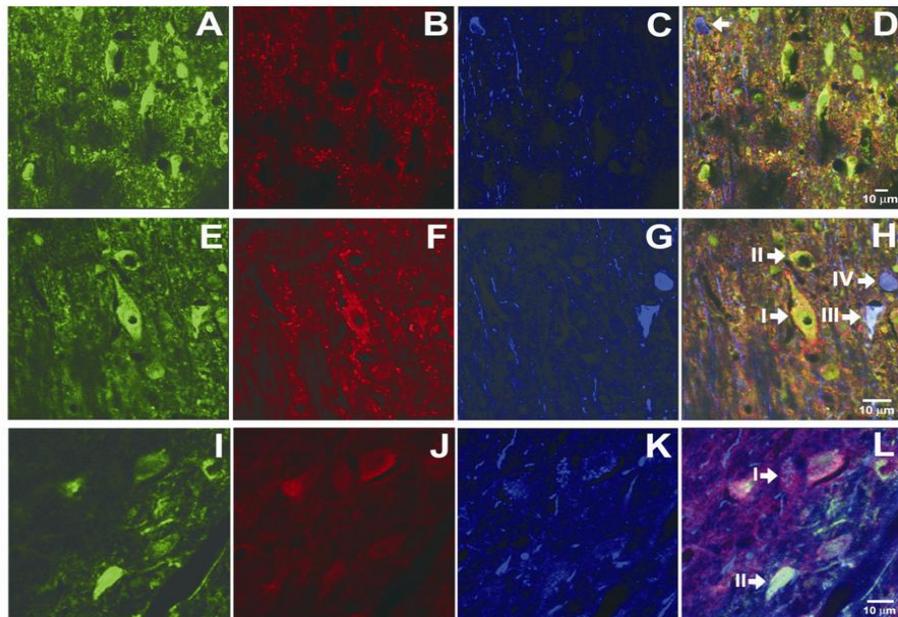
---

#### 5.2.4.- Tinción de inmunoperoxidasa para ChAT y Glutamato.



**Figura 5.2.7.** Microfotografía de la región septal marcada con anticuerpos anti-ChAT y anti-glutamato, las neuronas ChAT positivas se pueden ver en azul oscuro/negro (SG) y las neuronas glutamato positivas se observan en color marrón claro (DAB). En **A** se muestra una vista panorámica del septum. **B** muestra una amplificación de la zona marcada en **A**. Nótese la presencia tanto de neuronas Chat positivas como de neuronas glutamato positivas. **C** y **D** muestran una magnificación de la zona marcada en **B**. Nótese en **D** la presencia de terminales ChAT positivas alrededor del soma de una neurona fusiforme glutamato positiva (\*).

### 5.2.5.-Tinción con triple fluorescencia para glutamato, GAD67 y ChAT.



**Figura 5.2.8** Imágenes confocales de tres grupos de neuronas de septum medial sometidas a triple in-muno-marcaje. Las imágenes AEI, BFJ y CGK muestran inmunoreactividad para glutamato, GAD 67 y ChAT, respectivamente. Las imágenes, D, H y L se originan por superposición de ABC, EFG e IJK, respectivamente.

En la parte superior, **A** muestra muchos cuerpos neuronales y presuntas terminales que reaccionaron fuertemente al anticuerpo glutamato. En contraste, **B** muestra posibles terminales que reaccionaron fuertemente al anticuerpo GAD67 y cuerpos celulares que muestran débil o ninguna inmunoreacción a GAD67. **C** presenta en el extremo superior izquierdo un pequeño soma neuronal que inmunoreaccionó con ChAT, mientras que en el resto de la imagen aparecen numerosas posibles terminales que inmunoreaccionaron a ChAT. Esta neurona ChAT positiva está marcada con una flecha en **D**. La imagen **D** también confirma que la mayoría de la neuronas que reaccionaron fuertemente a glutamato no inmunoreaccionan a otros marcadores de neurotransmisores. En **D** también se demuestra la presencia de una profusa e intensa inmunoreactividad a glutamato, GAD67 y ChAT rodeando a dichas neuronas.

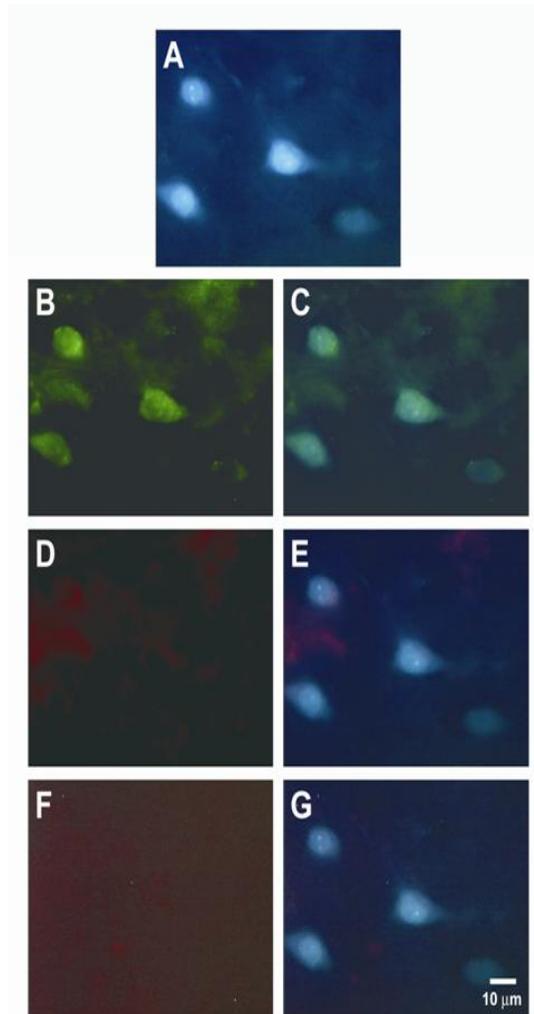
---

En las imágenes centrales se observan, en **H**, tres neuronas que reaccionaron a glutamato. Una de estas tres neuronas inmunoreaccionó a GAD67 (neurona central grande marcada como I en **H**), una segunda neurona inmunoreaccionó a glutamato, mostrando una débil o nula inmunoreactividad para otros marcadores (pequeña neurona marcada como II en **H**), y una tercera neurona marcada con ChAT (marcada como III en **H**). Se observa también la presencia de una pequeña neurona que reaccionó exclusivamente a ChAT (marcada como IV en **H**). Se observa también la presencia de inmunorreactividad GAD67 *“punteada”* alrededor de una gran neurona central que inmunorreaccionó tanto con glutamato como con GAD67. Y la neurona más pequeña situada en la parte superior y central de la figura que reaccionó predominantemente con glutamato.

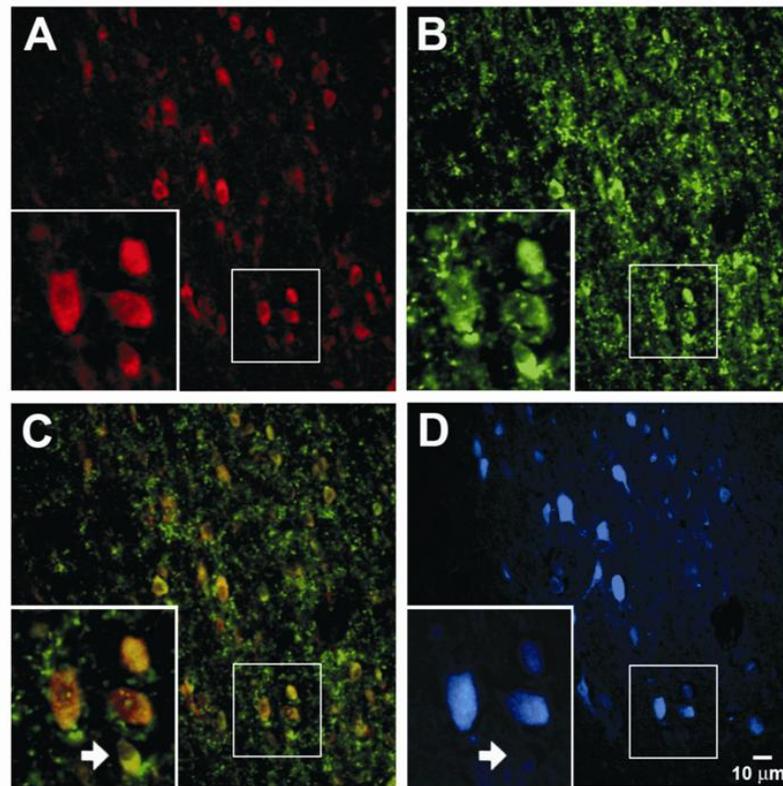
Imágenes inferiores. En **I** se observa la presencia de un cuerpo neuronal que reaccionó fuertemente a glutamato. Se muestran tres neuronas en la parte superior de **J** que reaccionaron a GAD67 (la neurona media de este grupo se marca como I en **L**). Por el contrario, en **K** se observa solo una abundante y difusa inmunoreactividad a ChAT. Finalmente en **L**, se comprueba la presencia de esta inmunoreactividad difusa para ChAT alrededor de neuronas marcadas con GAD67, y también rodeando a una neurona inmunoreactiva a glutamato.

---

### 5.2.6.- Tinción con triple fluorescencia con Fluorogold, ChAT, Glutamato y GAD67



**Figura 5.2.9.** Triple inmunomarcaje en una sección del septum del cerebro de una rata inyectada con fluorogold en hipocampo. La figura **A** muestra somas celulares marcados con fluorogold. Las figuras **B**, **D** y **F** muestran respectivamente inmunoreactividad para glutamato, GAD67 y ChAT. Se observa la presencia de tres neuronas que reaccionaron con el anti-glutamato (**B**) y que no reaccionaron con el anti-GAD67 (**D**) o con el anti-ChAT (**F**). En las imágenes **C**, **E** y **G** se muestran las superposiciones de la inmunorreactividad a Glutamato, GAD67 y ChAT (imágenes **B**, **D** y **F**) con la imagen **A** marcada con Fluorogold. Obsérvese que las tres neuronas marcadas con Fluorogold, reaccionaron fuertemente con el anti-glutamato (**C**) pero no con el anti-GAD67 (**E**) o con el anti-ChAT (**G**).



**Figura 5.2.10.** Microfotografías de neuronas glutamatérgicas septohipocámpales, que expresan glutamato y VGLUT2 en el área de la banda diagonal de Broca. **A:** Inmunofluorescencia en la que se aprecia la inmunoreactividad a glutamato en varios cuerpos neuronales de la banda diagonal de Broca. **B:** Inmunofluorescencia en la que se aprecia la inmunoreactividad a VGLUT2 en varios cuerpos neuronales de la banda diagonal de Broca así como inmunorreactividad a VGLUT2 difusa (posibles terminales nerviosas). **C:** Imágenes superpuestas mostrando la colocalización de ambos anticuerpos en las mismas neuronas. **D:** Neuronas marcadas retrógradamente por inyección de Fluorogold en el hipocampo. Nótese en el recuadro cuatro somas de neuronas que inmunoreaccionaron con anticuerpos antiglutamato y anti-VGLUT2. Tres de estas cuatro también fueron Fluorogold positivas. Se distingue con una flecha una pequeña neurona Fluorogold negativa.

CEREBRO	N	Células	CE
1	235	16,886.55	0.07
2	280	16,784.25	0.06
3	231	15,332.98	0.06
Media±SD	2486±27.2	16,334.5±868	0.06±0.005

**TABLA I.-** Estimación del número de neuronas de la región septal media inmunoreactivas a glutamato, utilizando la sonda del fraccionador óptico estereológico. *N= número de campos; CE=coeficiente de Error; SD= desviación estándar.*

	Glu				ChAT	GAD67	ChAT + GAD67
	Glu	ChAT	GAD67	ChAT + GAD67			
Recuento de neuronas	141	10	25	8	352	208	5
Sub-total	141	43					
	76.6%	23.4%			-	-	-
Sub-total	184				352	208	5
	24.5%				47%	27.8%	0.7%
Total de neuronas inmunomarcadas	749						

**TABLA II.** Recuento celular y distribución de marcadores para los neurotransmisores glutamato (Glu), ChAT y GAD67 en neuronas del área septal medial.

**Glu**

	Neg.	Glu	ChAT	GAD67	GAD67 +ChAT	ChAT	GAD67	ChAT + GAD67
Recuento de neuronas FG (+)	78	27	10	8	4	68	29	7
Sub-total	-	27 55%	22 45%			-		
Sub-total	78 (34%)	49 (21%)				104(45%)		
Total FG (+) neuronas	231							

**TABLA III.-** Recuento celular y distribución de marcadores para los neurotransmisores glutamato (Glu), ChAT y GAD67 en neuronas positivas a Flurogold (FG +) del área septal medial. Los animales (n=3) se inyectaron en hipocampo con FG en el área CA1.

Lugar de inyección	Región Septal	FG	Glu	FG+Glu	(FG+Glu) FG(%)
CA1 (n=3)	MS	157	178	56 (62.2) <sup>b</sup>	35.6
	vDB	109	116	23 (25.5)	21.1
	hDB	127	157	11 (12.2)	8.6
<b>Sub-Total</b>		<b>393</b>	<b>451</b>	<b>90</b>	<b>22.9</b>
CA3 (n=3)	MS	177	155	50 (56.1) <sup>b</sup>	28.2
	vDB	57	64	17 (19.1)	29.8
	hDB	135	122	22 (24.7)	16.3
<b>Sub-Total</b>		<b>369</b>	<b>341</b>	<b>89</b>	<b>24.1</b>
DG (n=3)	MS	48	63	16 (48.4) <sup>b</sup>	33.3
	vDB	31	55	8 (24.2)	25.8
	hDB	62	113	9 (27.3)	14.5
<b>Sub-total</b>		<b>141</b>	<b>231</b>	<b>33</b>	<b>23.4</b>
<b>TOTAL</b>		<b>903</b>	<b>1023</b>	<b>212</b>	<b>23.48</b>

**TABLA IV.-** Distribución de neuronas marcadas con Fluorogold (FG), neuronas inmunoreactivas a glutamato (Glu), y neuronas FG + Glu en la región septal media del cerebro de rata, tras la inyección de FG en las zonas de hipocampo CA1, CA3 y giro dentado (DG).

---

**5.3.- EXPERIMENTO 3. Cálculo, mediante estereología, del número de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata.**

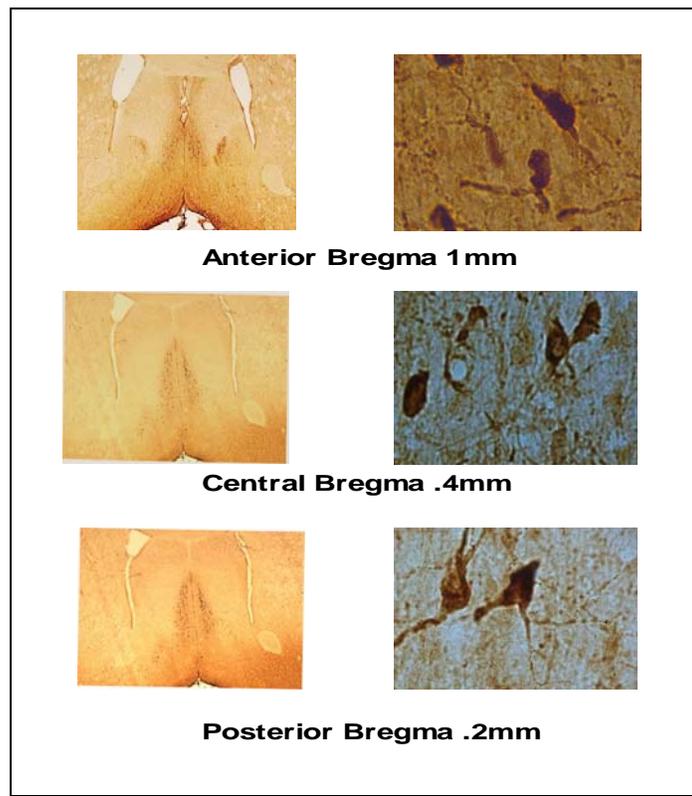
**1) Determinación del número de neuronas colinérgicas.**

El recuento de las poblaciones neuronales de tipo colinérgico de la región septal presentó los valores que se muestran en la tabla 5.3.1:

Cerebro No.1	9.574,62 neuronas	CE = 0.076075
Cerebro No.2	15.346,45 neuronas	CE = 0.085043
Cerebro No.3	12458,56 neuronas	CE = 0.0655248
PROMEDIO	12.459,8767 neuronas	

**Tabla 5.3.1.-** Población estimada de neuronas colinérgicas en septum medial. CE = Coeficiente de error.

Las neuronas colinérgicas de la región septal muestra un tamaño del soma para las denominadas neuronas colinérgicas “grandes” en torno a las 20  $\mu\text{m}$ , con una forma predominantemente redondeada, mientras que el grupo de neuronas colinérgicas de tamaño “medio”, presenta un tamaño entre 15-18  $\mu\text{m}$  y un aspecto predominantemente ovoide.



**Figura 5.3.1** Tinción de inmunoperoxidasa para ChAT, utilizada para la determinación de neuronas colinérgicas. Se aprecian las diferentes regiones consideradas del septum medial. En la parte izquierda de la figura, las microfotografías se obtuvieron con un objetivo 2x. Apreciándose la distribución de las neuronas colinérgicas. En la parte derecha el objetivo fue 100X, apreciándose la morfología de las neuronas en las diferentes regiones del septum medial.

---

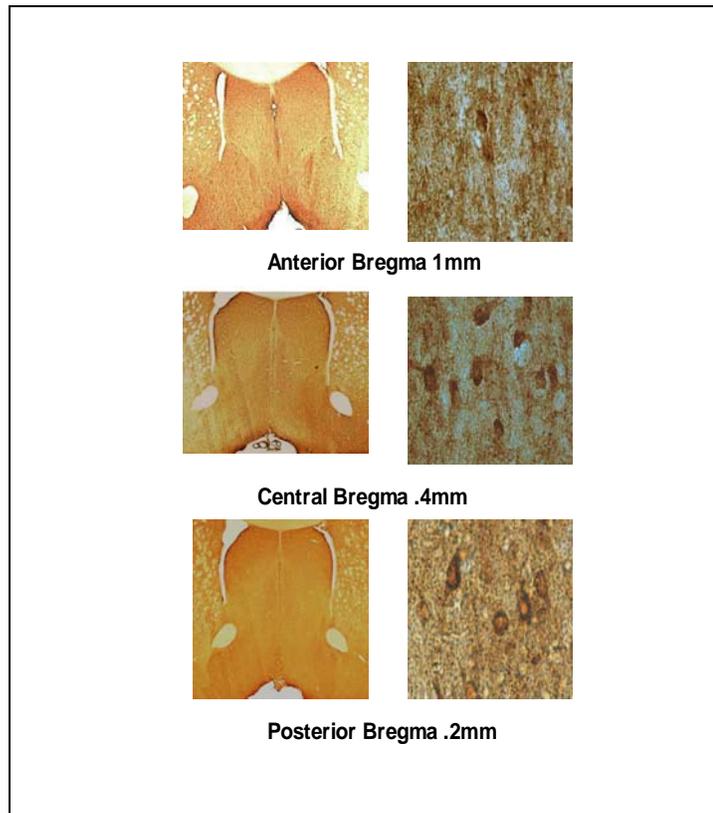
**2) Determinación del número de neuronas GABAérgicas.**

El recuento de las poblaciones neuronales de tipo GABAérgico de la región septal presentó los valores que se muestran en la tabla 5.3.2:

Cerebro No. 1	32.294,75 neuronas	CE = 0.082894
Cerebro No. 2	25.456,42 neuronas	CE = 0.064523
Cerebro No. 3	28.265,45 neuronas	CE = 0.074586
PROMEDIO	28672,2067 neuronas	

**Tabla 5.3.2.-** Población estimada de neuronas GABAérgicas en el septum medial. CE = Coeficiente de error.

El análisis de la morfología de las neuronas anti- GAD67 positivas de la región septal mostró que el tamaño promedio del soma neuronal de las neuronas GAD67 positivas varía entre 11 y 13  $\mu\text{m}$ . Su aspecto morfológico se presenta con forma ovoide y poligonal.



**Figura 5.3.2** Tinción de inmunoperoxidasa para GAD67, utilizada para la determinación de neuronas GABAérgicas. Se aprecian, las diferentes regiones consideradas del septum medial. En la parte izquierda de la figura, las microfotografías se obtuvieron con un objetivo 2x apreciándose la distribución de las neuronas GABAérgicas. En la parte derecha el objetivo fue 100X, apreciándose la morfología de las neuronas, en las diferentes regiones del septum medial.

---

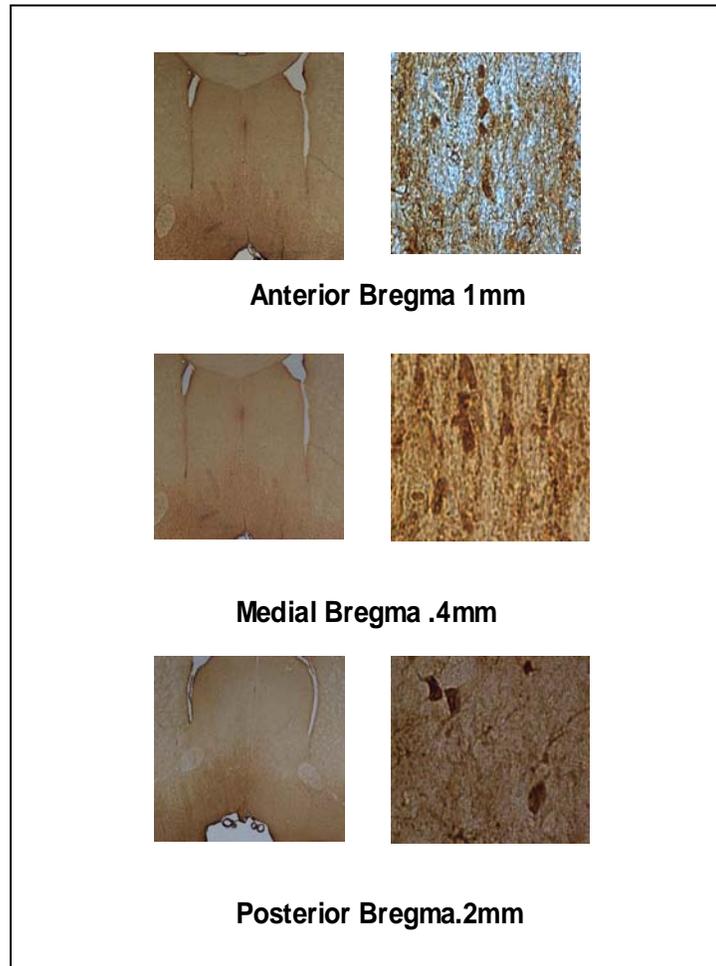
### 3) Determinación del número de neuronas glutamatérgicas.

El recuento de las poblaciones neuronales de tipo glutamatérgico de la región septal presentó los valores que se muestran en la tabla 5.3.3.:

Cerebro No. 1	16.886,55 neuronas	CE = 0.07
Cerebro No. 2	16.784,25 neuronas	CE = 0.06
Cerebro No. 3	15.332,98 neuronas	CE = 0.06
PROMEDIO	16.334,59 neuronas	

**Tabla 5.3.3.-** Población estimada de neuronas en glutamatérgicas en el septum medial. CE = Coeficiente de error.

El análisis de la morfología de las neuronas anti-glutamato positivas de la región septal mostró que el tamaño medio de 5-21  $\mu\text{m}$  del soma neuronal, con un diámetro promedio de 10.5  $\mu\text{m}$ . Los cuerpos celulares mostraron diversas formas, oval, fusiforme, redondo poligonal y piramidal.



**Figura 5.3.3** Tinción de inmunoperoxidasa para glutamato, utilizada para la determinación de neuronas glutamatérgicas. Se aprecian, las diferentes regiones consideradas del septum medial. En la parte izquierda de la figura, las microfotografías se obtuvieron con un objetivo 2x apreciándose la distribución de las neuronas glutamatérgicas. En la parte derecha el objetivo fue 100X, apreciándose la morfología de las neuronas, en las diferentes regiones del septum medial.

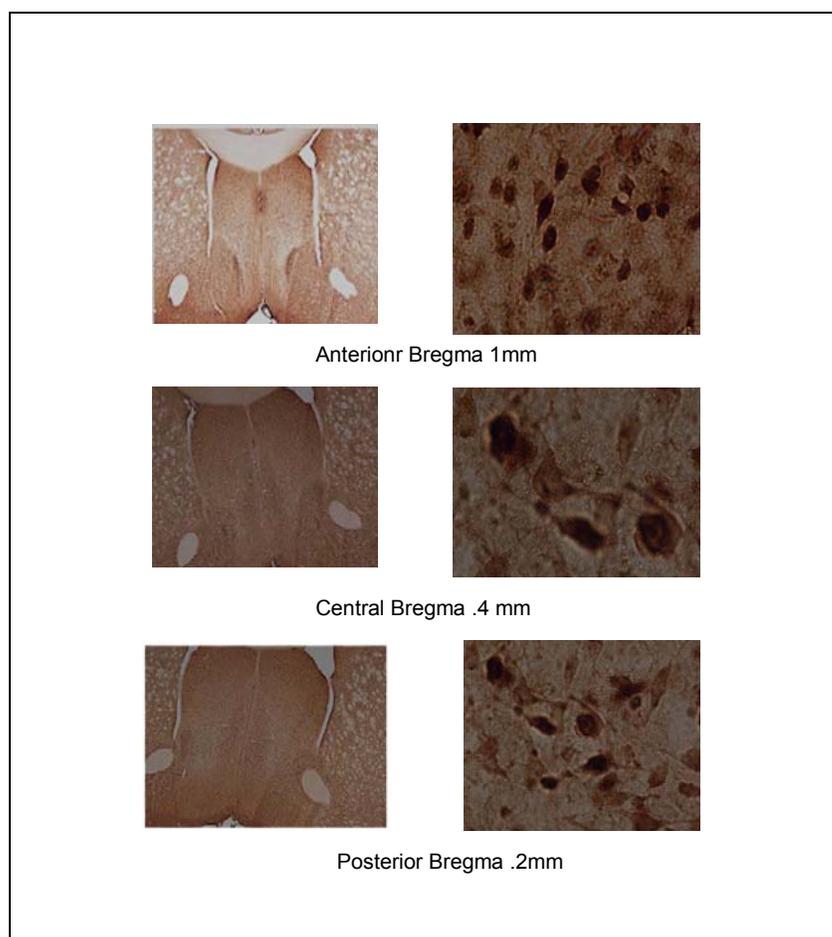
---

#### 4) Determinación del número de neuronas totales

El recuento de las poblaciones neuronales totales, NeuN positivas, de la región septal presentó los valores que se muestran en la tabla 5.3.4.:

Cerebro No. 1	126,856.69 neuronas	CE 0.063758
Cerebro No. 2	102,418.15 neuronas	CE 0.072636
Cerebro No. 3	145,557.72 neuronas	CE 0.066093
PROMEDIO	124.944,18 neuronas	

**Tabla 5.3.4.-** Población estimada de neuronas totales en base a la utilización del marcador neuronal específico NeuN, en el septum medial.  
CE = Coeficiente de error.



**Fig. 5.3.4** Tinción de inmunoperoxidasa para NeuN, utilizada para la determinación de neuronas totales. Se aprecia, las diferentes regiones consideradas del septum medial. En la parte izquierda de la figura, las microfotografías se obtuvieron con un objetivo 2x, apreciándose la distribución heterogénea de las neuronas en general inmunomarcadas con el marcador inespecífico NeuN. En la parte derecha objetivo utilizado fue 100X, donde se aprecia la diferente morfología no uniforme de las neuronas, en las diferentes regiones del septum medial.

---

## **DISCUSIÓN**

---

**6.1.- EXPERIMENTO 1. Diferenciación de las isoformas de la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD), 67, y 65 en la región septal de la rata y su proyección a hipocampo.**

Ver detalladamente en la publicación “*Glutamic acid decarboxylase isoform are differentially distributed in the septal region of the rat*”. Maria T. Castaneda, Emilio R. Garrido Sanabria, Sofia Hernandez, Adriana Ayala, Tania A. Reyna, Jan-Yen Wu, Luis V. Colom. **Neurosci Res.** 2005. 52:107-119.

**6.2.-Caracterizar las neuronas glutamatergicas septales y su proyecciones septohipocampicas.**

Ver detalladamente en la publicación “*Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus*”. Colom L. V., Castañeda M.T.,Reyna T. and Hernandez S. **Synapse**,2005. 58: 151-164.”

**6.3.- EXPERIMENTO 3. Cálculo, mediante estereología, del número de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de la región septal de la rata.**

En este apartado se ha calculado, mediante análisis estereológico, la población estimada de los grupos neuronales septales, a nuestro juicio mas relevantes, tales como neuronas colinérgicas, GABAérgicas que han sido descritos hasta hoy y además tenemos el valor estimado de neuronas glutamatérgicas, un tercer grupo neuronal apenas descrito hasta la fecha.

---

No existen evidencias de análisis estereológico del cálculo de neuronas septales totales, aunque hay investigaciones donde se demuestra que el número total de neuronas colinérgicas septales del ratón es de 9000 (Peterson et al., 1999). Otros autores describen el número de neuronas GABAérgicas y afirman que éstas son el doble de numerosas que las neuronas colinérgicas (Brashear et al., 1986), y que un número menor de estas neuronas GABAérgicas, se encuentra en el septum lateral. (Kimura et al. 1980., Kiss et al., 1997).

En cuanto a la distribución las neuronas GABAérgicas estas se localizan en la proximidad de las neuronas colinérgicas, y su somas presentan diferentes formas, siendo unas multipolares grandes y otras medianas fusiformes; son de tamaño menor que las neuronas colinérgicas (alrededor de 15  $\mu\text{m}$  (Köhler C, Chan-Palay V.,1984). Las células más grandes las encontramos en MS-DBB, sobre todo en los cortes más posteriores del septum (Panula et al., 1984).

En relación a las neuronas colinérgicas estas no están tan ampliamente distribuidas, y se encuentran confinadas al complejo MS-DBB. La mayoría son grandes y miden entre 13 y 18  $\mu\text{m}$  de diámetro (Kimura et al., 1980). Aunque nosotros encontramos algunas mayores de 20  $\mu\text{m}$ .

No tenemos datos específicos de otras poblaciones septales que sabemos existen, ya que el número de neuronas septales totales obtenido por el marcador neuronal neuN (promedio 124.944) es mucho más alto que la suma de los tres grupos neuronales septales analizados independientemente (57.466). Por lo tanto con este estudio se pretende analizar, de forma estimativa, el número de neuronas septales en cuanto a los grupos neuronales más estudiados hasta hoy (colinérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos), situándolos en el contexto general (neuronas totales) del septum.

---

Muy probablemente estos grupos neuronales, poseen mecanismos para sintetizar neurotransmisores de tipo neuropeptídico tales como somatostatina (Shiosaka et al., 1992) sustancia P (Ljungdahl et al., 1978; Sakanaka et al., 1982), y otros neurotransmisores moduladores, por lo que cabe deducir que existe un número significativo de neuronas que usa otros sistemas neurotransmisores, aún no analizados.

Investigaciones previas (Gritti et al., 2006) han realizado análisis estereológicos de las neuronas de cerebro basal anterior, describiendo que el número total de neuronas era de 355.000. De estas, se ha descrito que el 5% de eran inmunoreactivas para ChAT (22.000), un 35% para GAD (119.000), y el 90% era inmunoreactiva para Glutamato (316.000). Sin embargo hay que mencionar que la determinación de la inmunoreactividad para el glutamato se realizó con un anticuerpo para determinar la enzima sintetizadora glutaminasa activada por fosfato (PAG). Con este procedimiento resulta difícil realizar un análisis cuantitativo acertado, ya que algunas neuronas GABAérgicas son capaces de tener el mecanismo enzimático necesario para sintetizar glutamato (Akiyama et al., 1990)

El trabajo realizado por nuestro equipo utilizó el anticuerpo monoclonal antiglutamato cuya inmunoreactividad se ha descrito como específica en otras áreas cerebrales, en neuronas que tienen neuronas glutamatérgicas (Madl et al., 1986).

Existe una gran interrelación entre las neuronas colinérgicas y GABAérgicas en la región septal, ya que presentan interconexiones sinápticas entre ellas y los dos grupos neuronales forman parte del sistema hipocampo-septal (Leranth, 1989). De hecho las fibras hipocampo-septales terminan en neuronas GABAérgicas del septum, predominantemente septum lateral, y es este quien recibe la mayor aferencia del hipocampo y de ahí proyecta hacia el complejo SM/DBB (Septum Medial) (Risold y

---

Swanson, 1997), este a su vez envía proyecciones de regreso hacia la la formación hipocámpicas, vía la fimbria fornix.

Nosotros decidimos utilizar como marcador GABAérgicos, el anticuerpo anti-GAD 67, ya que a pesar de que la proteína fijadora de calcio Parvalbumina, se ha considerado tradicionalmente como marcador de neuronas GABAérgicas (Wu et al., 2003), se optó no usarla para marcar dichas neuronas, ya que experimentos realizados en nuestro laboratorio (datos no publicados), demuestran que el anticuerpo anti-Parvalbumina puede marcar también otros grupos neuronales tales como glutamato y en mucha menor proporción ChAT. Esto nos ha permitido tener una idea más acertada del número de neuronas GABAérgicas.

---

## **CONCLUSIONES**

---

PRIMERA. Existen diferencias significativas en la presencia de las isoformas GAD65 y GAD 67 en la región septal. La enzima GAD65 se expresa en una mayor proporción en el septum lateral en relación al septum medial, mientras que GAD67 muestra una densidad de expresión similar en ambas estructuras. Ambas enzimas GAD65 y GAD67 son expresadas en las terminales nerviosas de todo el septum. Además las neuronas septohipocampales expresan preferentemente GAD67, respecto a GAD65, según el marcaje retrogrado de Fluorogold.

SEGUNDA. La región septal, generalmente considerada como una región en la que se había demostrado la presencia de solo dos neurotransmisores (acetilcolina y GABA), muestra un tercer grupo neuronal constituido por una población de neuronas glutamatérgicas. En relación a esta población glutamatérgica nuestro trabajo demuestra que:

(a) El número de neuronas glutamatérgicas es de aprox. 16,000 con la mayoría de cuerpos celulares en la región del septum medial.

(b) Un subgrupo de estas neuronas se proyectan al hipocampo, incluyendo las regiones de CA1, CA3 y giro dentado.

(c) Los cuerpos celulares de estas neuronas son de menor diámetro que los de las neuronas colinérgicas, siendo la mayoría somas pequeños, que no se tiñen con fluorogold, lo que sugiere que son neuronas que integran circuitos locales

(d) La colocación de varios neurotransmisores en un subgrupo de neuronas glutamatérgicas con proyección al hipocampo sugiere la presencia cotransmisión en dichas neuronas.

TERCERA. El recuento del número de neuronas totales en el septum, más los recuentos específicos de neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas,

---

indica la existencia de otros neurotransmisores, diferentes a los mencionados, y que están involucrados en las redes neuronales de esta estructura

CUARTA. En base a los resultados obtenidos, en el contexto de la literatura, se propone un modelo de la red neuronal del septum medial. Dichas conexiones podrían tener un importante papel en la generación del ritmo theta que participa en la memoria. Dado que la memoria esta afectada en la enfermedad de Alzheimer, y otras patologías neurológicas , el conocimiento de estos circuitos podría ser de gran relevancia para entender la etiopatogenia de estas enfermedades.

---

## **REFERENCIAS**

---

## 8.-REFERENCIAS

**Se incluyen solo las referencias utilizadas para el desarrollo del texto, las demas están completamente detalladas en las publicaciones:**

“Glutamic acid decarboxylase isoform are differentially distributed in the septal region of the rat”. Maria T. Castaneda, Emilio R. Garrido Sanabria, Sofia Hernandez, Adriana Ayala, Tania A. Reyna, Jan-Yen Wu, Luis V. Colom. *Neurosci Res.* 2005. 52:107-119.

“Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus”. Colom L. V., Castañeda M.T., Reyna T. and Hernandez S. *Synapse.* 2005. 58: 151-164

1. Adams SV, Winterer J, Müller W (2004) Muscarinic signaling is required for spike-pairing induction of long-term potentiation at rat Schaffer collateral-CA1 synapses. *Hippocampus* 14(4):413-6
2. Akiyama H, Kaneko T, Mizuno N, McGeer PL (1990) Distribution of phosphate-activated glutaminase in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* Jul 8; 297(2):239-52.
3. Alonso A, Kohler C (1982) Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 31:209-214.
4. Alreja M, Wu M, Liu W, Atkins JB, Leranth C, Shanabrough M (2000) Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA

- 
- but not cholinergic pathway: implications for learning and memory. *J Neurosci* 20: 8103-8110.
5. Amaral D.G. (1978) A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 182:851-914.
  6. Amaral DG, Kurz J (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* Oct 1; 240(1):37-59.
  7. Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31(3):571-91.
  8. Arendt T, Brückner MK, Pagliusi S, Krell T (1995) Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury. Degeneration and plastic response of basal forebrain neurons. *Neuroscience* Apr; 65(3):633-45.
  9. Baxter MG, Bucci DJ, Sobel TJ, Williams MJ, Gorman LK, Gallagher M (1996) Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroreport* May 31; 7(8):1417-20.
  10. Bell KF, Claudio Cuello A (2006) Altered synaptic function in Alzheimer's disease *Eur J Pharmacol* Sep 1; 545(1):11-21.
  11. Bizon J.L., Han J.S., Hudon C. and Gallagher M (2003) Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. *Hippocampus* 13: 676–684.
  12. Brashear HR, Zaborszky L, Heimer L (1986) Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience* 17: 439-451.
  13. Butcher, L (1989) Reassessing the Cholinergic forebrain :Nomenclature schemata and Concepts. *Trends Neurosci* 12:483-485.
  14. Chandler, J.P y Crutcher K.A (1983) The septohippocampal projection in the rat: an Electronic microscopic horseradish peroxidase study. *Neuroscience*. 1983 10:685-689.
  15. Chrobak JJ, Lörincz A, Buzsáki G (2000) Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 10(4):457-65. Review.
  16. Colbert CM, Levy WB (1992) Electrophysiological and pharmacological characterization of perforant path synapses in CA1: mediation by glutamate receptors. *J Neurophysiol*. Jul; 68(1).
  17. Colom LV, Bland BH (1991) Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine. *Hippocampus* 1:15-30.
  18. Colom LV, Castañeda MT, Bañuelos C, Puras G, Garcia-Hernandez G, Hernandez S, Mousey S, Benavides J, Lecker C (2008) Medial septal Beta Amyloid 1-40 injections alter septohippocampal anatomy and function. *Neurobiology of Aging* (in press).
  19. Dringenberg HC (2000) Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' – evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 115(2):235-49.

- 
20. Dusek JA, Eichenbaum H (1997) The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24; 94(13):7109-14.
  21. Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev.* Apr; 75(2):393-427. Review.
  22. Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14: 1834-1855.
  23. Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ (1993) Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res* 34:689-706.
  24. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.
  25. Francis Paul T (2005) The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease *CNS Spectr* 10(11 Suppl 18):6
  26. Freund TF, Antal M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* Nov10; 336(6195):170-3.
  27. Frielingsdorf H, Thal LJ, Pizzo DP (2006) The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze. *Behav Brain Res* Mar 15; 168(1):37-46.
  28. Frotscher M, Leranth C (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* Sep 8; 239(2):237-46.
  29. Garrido Sanabria ER, Castañeda MT, Banuelos C, Perez-Cordova MG, Hernandez S, Colom LV (2006) Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience* 2006 Oct 27; 142(3):871-83.
  30. Gogolák G, Stumpf C, Petsche H, Sterc J (1968) The firing pattern of septal neurons and the form of the hippocampal theta wave. *Brain Res* Feb;7(2):201-7
  31. Gołbiewski H, Eckersdorf B, Konopacki J (1999) The effect of intraseptal procaine injection of hippocampal theta in freely moving cat. *Brain Res Bull* Aug; 49 (6):407-12.
  32. Gonzalo-Ruiz A, Morte L (2002) Localization of amino acids, neuropeptides and cholinergic markers in neurons of the septum-diagonal band complex projecting to the retrosplenial granular cortex of the rat. *Brain Res Bull* Aug; 52(6):499-510.
  33. Goodson JL, Evans AK, Lindberg L (2004) Chemoarchitectonic subdivisions of the songbird septum and a comparative overview of septum chemical anatomy in jawed vertebrates. *J Comp Neurol* May 31; 473(3):293-314.

- 
34. Gritti I, Mainville L, Mancina M, Jones BE (1997) GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol* Jun 30; 383(2):163-77.
  35. Gritti I, Henny P, Galloni F, Mainville L, Mariotti M, Jones BE (2006) Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience* Dec 28; 143(4):1051-64.
  36. Gulyas AI, Hajos 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(9):1861-1872.
  37. Harkany T, De Jong GI, Soós K, Penke B, Luiten PG, Gulya K (1995) Beta-amyloid (1-42) affects cholinergic but not parvalbumin-containing neurons in the septal complex of the rat. *Brain Res* Nov 6; 698(1-2):270-4.
  38. Izquierdo I, Medina JH. (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol* Jan; 63(1):19-32. Review.
  39. Jaffard, R., and Meunier M (1993) Role of hippocampal formation in learning and memory. *Hippocampus* 3:203-208.
  40. Jakab R.L. and Leranth C. (1995) Septum. IN: Paxinos G, ed. *The rat nervous system*. San Diego: Academic Press 5; 405-442.
  41. Kimura H, McGeer PL, Peng F, McGeer EG (1980) Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science*. May 30; 208(4447):1057-9.
  42. Kiss J, Csáki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000) The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [<sup>3</sup>H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neurobiol Aging* Jan-Feb; 16(1):29-40.
  43. Kohler C, Chan-Palay V, Wu JY (1984) Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat Embryol (Berl)* 169(1):41-4.
  44. Krzywkowski P, De Bilbao F, Senut MC, Lamour (1995) Age-related changes in parvalbumin- and GABA-immunoreactive cells in the rat septum. *Neurobiol Aging* Jan-Feb; 16(1):29-40.
  45. Lamour Y, Epelbaum J (1988) Interactions between cholinergic and peptidergic systems in the cerebral cortex and hippocampus. *Prog Neurobiol* 31(2):109-48. Review.
  46. Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsáki G (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* Oct; 62(4):1033-47.
  47. Leranth C, and Frotscher M (1989) Organization of the septal region in the rat brain, cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *Comp Neurol* Nov 8; 289(2):304-14.

- 
48. Leung LS, Martin LA, Stewart DJ (1994) Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus* Apr; 4(2):136-47.
  49. Leung LS, Shen B (2004) Glutamatergic synaptic transmission participates in generating the hippocampal EEG. *Hippocampus* 14: 510-525.
  50. Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ, Mesulam MM (1984) Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience* Oct; 13(2):341-53.
  51. Lewis, PR and Shute CC (1967) The cholinergic limbic nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supraoptic crest. system: projection to hippocampal formation, medial cortex. *Brain Res* Aug 8; 653(1-2):73-80.
  52. Linke R, Schwegler H, Boldyreva M (1994) Cholinergic and GABAergic septo-hippocampal projection neurons in mice: a retrograde tracing study combined with double immunocytochemistry for choline acetyltransferase and parvalbumin. *Brain Res* Aug 8; 653(1-2):73-80.
  53. Madl JE, Larson AA, Beitz AJ (1986) Monoclonal antibody specific for carbodiimide-fixed glutamate: immunocytochemical localization in the rat CNS. *J Histochem Cytochem* 34: 317-326.
  54. Manns ID, Alonso A, Jones BE (2003) Rhythmically discharging basal forebrain units comprise cholinergic, GABAergic, and putative glutamatergic cells. *J Neurophysiol* 89: 1057-1066.
  55. Manseau F, Danik M, Williams S (2005) A functional glutamatergic neuron network in the medial septum and diagonal band area. *J Physiol* Aug 1; 566(Pt 3):865-84.
  56. Mesulam M-M, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia inominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214: 170-197.
  57. Michaelis E. (1990) Molecular Biology of Glutamate Receptors in The Central Nervous System and their role in Excitotoxicity, oxidative stress and Aging. *Progress in Neurobiol* 54: 369-451.
  58. Mufson EJ, Kordower JH (1989) Nerve growth factor receptor expressing human basal forebrain neurons: pathologic alterations in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog Clin Biol Res* 317:401-14
  59. Muller RU, Stead M, Pach J (1996) The hippocampus as a cognitive graph. *J Gen Physiol* Jun; 107(6):663-94. Review.
  60. O'Keefe, J. & Nadel, L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford: Oxford U.P.
  61. Onteniente B, Geffard G, Campistron and Galas A (1987) An ultrastructural study of GABA-immunoreactive neurons and terminals in the septum of the rat, *J. Neurosci* 7:48-54.
  62. Panula P, Revuelta AV, Cheney DL, Wu JY, Costa E (1984) An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in rat septum. *J Comp Neurol* 222: 69-80.

- 
63. Papez JW. (1937) A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* ;Winter; 7 (1):103-12.
  64. Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* Jan-Feb; 11(1):9-20. Review.
  65. Peterson GM (1989) A quantitative analysis of the crossed septohippocampal projection in the rat brain. *Anat Embryol Berl* 180(5):421-5.
  66. Phelan KD, Hasuo H, Twery MJ, Gallagher JP (1989) Projection neurons in the rat dorsolateral septal nucleus possess recurrent axon collaterals. *Neurosci Lett* Feb 27; 97(3):259-65.
  67. Raisman G. (1966) The connexions of the septum. *Brain* Jun; 89(2):317-48.
  68. Risold PY, Swanson LW (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev* Sep 19; 24(2-3):115-95. Review.
  69. Rye DB, Wainer BH, Mesulam MM, Mufson EJ, Saper CB (1984) Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience* Nov; 13(3):627-43.
  70. Sakanaka M, Shiosaka S, Takatsuki K, Inagaki S, Hara Y, Kawai Y, Senba E, Tohyama M (1982) Origins of substance P-containing fibers in the lateral septal area of young rats: immunohistochemical analysis of experimental manipulations. *J Comp Neurol* Dec 10; 212(3):268-77.
  71. Scoville, WB & Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20, 11-21.
  72. Senut, MC. Menetrey D, Lamour Y (1989) Cholinergic and Peptidergic projections from the medial septum and the nucleus of the diagonal band of Broca to dorsal hippocampus, cingulate cortex and olfactory bulb: a combined wheat germ agglutinin-apohorseradish peroxidase-gold immunohistochemical study. *Neuroscience* 30:385-403.
  73. Shiosaka S, Takatsuki K, Sakanaka M, Inagaki S, Takagi H, Senba E, Kawai Y, Iida H, Minagawa H, Hara Y, Matsuzaki T, Tohyama M (1982) Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. II. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol* Jan 20; 204(3):211-24.
  74. Shute C and Lewis P (1963) Cholinesterase-containing systems of the brain of the rat. *Nature* 199, 1160-1164.
  75. Siegel SJ, Brose N, Janssen WG, Gasic GP, Jahn R, Heinemann SF, Morrison (1994) Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jan 18; 91(2):564-8.
  76. Siegel JM (2004) The neurotransmitters of sleep. *J Clin Psychiatry* ; 65 Suppl 16:4-7. Review.
  77. Soghomonian JJ, Martin DL (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* Dec; 19(12):500-5. Review.

- 
78. Squire LR, Cave CB. (1991). The hippocampus, memory, and space. *Hippocampus* 1(3), 269-71.
  79. Squire LR, Stark CE, Clark RE (2004) The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27:279-306. Review.
  80. Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Glutamatergic, cholinergic and GABAergic neurons contribute to the septohippocampal pathway and exhibit distinct electrophysiological properties: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 6; 551: 927-943.
  81. Stewart M, Fox SE. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci.* 1990 May, 13(5):163-8.
  82. Swanson LW, Cowan WM, Swanson LW, Cowan WM (1979) The connections of the septal region in the rat. The septohippocampal system. In: A. Bjöklund, T. Hökfelt and L. W. Swanson, Editors, *Handbook of chemical neuroanatomy* 5, Elsevier, Amsterdam, pp. 125–277
  83. Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM (1978) An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* Oct 15; 181(4):681-715.
  84. Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Mizutani T, Iwata M. (2007). Memory deficits in amyotrophic lateral sclerosis patients with dementia and degeneration of the perforant pathway: A clinicopathological study. *J Neurol Sci* Sep 15; 260(1-2):225-30.
  85. Teitelbaum H, Lee JF, Johannessen JN (1975) Behaviorally evoked hippocampal theta waves: a cholinergic response. *Science* Jun 13; 188(4193):1114-6.
  86. Ujfalussy B, Kiss T (2006) How do glutamatergic and GABAergic cells contribute to synchronization in the medial septum? *J Comput Neurosci* July 25; 3:343-57.
  87. Vertes RP. (1988) Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. *Neuroscience* Mar; 24(3):907-35.
  88. Vertes RP, McKenna JT (2000) Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synapse* 2000 38: 281-293.
  89. Vinogradova OS, Brazhnik ES, Karanov AM, Zhadina SD (1980) Neuronal activity of the septum following various types of deafferentation. *Brain Res* Apr 14; 187(2):353-68.
  90. Vinogradova OS. (1995) Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol.* Apr; 45(6):523-83. Review.
  91. Wainer BH, Levey AI, Rye DB, Mesulam MM, Mufson EJ (1985) Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett* Feb 28; 54(1):45-52.
  92. Wainer B. H. and Mesulam M (1990) Ascending cholinergic pathways in the rat brain, in *Brain Cholinergic Systems* (Steriade M. and Biesold D., eds.), Oxford University Press, Oxford: 65–119.

- 
93. Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL (1982) Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Ann Neurol* Nov; 12(5):494.
  94. Winson J. (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science*. Jul 14; 201(4351):160-3.
  95. Winters BD, Dunnett SB. (2004) Selective lesioning of the cholinergic septo-hippocampal pathway does not disrupt spatial short-term memory: a comparison with the effects of fimbria-fornix lesions. *Behav Neurosci* Jun; 118(3):546-62.
  96. Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *1989 Prog Neurobiol.* 1989; 33(3):161-253. Review.
  97. Woolf NJ, Butcher LL (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull.* May, 16(5):603-37.
  98. Wu M, Shanabrough M, Leranath C, Alreja M (2000) Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci.* May 15; 20(10):3900-3906.
  99. Wu M, Hajszan T, Leranath C, Alreja M (2003) Nicotine recruits a local glutamatergic circuit to excite septohippocampal GABAergic neurons. *Eur J Neurosci* 18:1155-1168.
  100. Xu C, Datta S, Wu M, Alreja M (2004) Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. *Eur J Neurosci.* Apr; 19(8):2299-309.
  101. Yoder RM, Pang KC (2005) Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 15(3):381-92.
  102. Zola-Morgan, S. and Squire, L (1985) Medial temporal lesions in monkeys impair memory in a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience* 100: 165-170.

---

## **9.-ANEXOS**

**(Ver articulos publicados)**