

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA ESCUELA DE
POSTGRADO**



**Rol de los receptores H1 de histamina en las oscilaciones
hipocampales del tipo theta durante navegación espacial.**

Stephanie Constanza Cortez Blacutt

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN NEUROCIENCIAS

Director de Tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero.

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA ESCUELA DE
POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

Stephanie Constanza Cortez Blacutt

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magister en Neurociencias en el Examen de Defensa de
Tesis rendido el día**

Prof. Dr. José Luis Valdés

Director(a) de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Magdalena Sanhueza

Prof. Dr. Pablo Fuentealba

Prof. Dr. Paul Délano

Presidente Comisión

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo incondicional y comprensión en esta etapa.

A mis amigos por sus palabras de apoyo y ánimo.

A mis compañeros de laboratorio que han sido una fuente de gran ayuda.

Y, principalmente, a Dios quien ha sido un soporte y sustento diario a mi espíritu y corazón, pues me ha dado la fortaleza para seguir adelante.

INDICE

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
➤ Memoria.....	9
➤ Oscilaciones y Memoria.....	11
➤ <i>Place Cells</i> y Onda Theta.....	14
➤ Histamina y Memoria.....	15
➤ Onda Theta, Histamina y Memoria.....	19
Hipótesis.....	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos.....	21
Material y Métodos	
➤ Animales.....	22
➤ Universo Muestral.....	22
➤ Cirugía.....	22
➤ Farmacología.....	23
➤ Tarea Conductual.....	24
➤ Registros.....	25
➤ Análisis de Datos.....	25
Resultados.....	29
Discusión.....	38
Bibliografía.....	44
Anexos.....	53

RESUMEN

Las funciones cognitivas, como la memoria y el aprendizaje, son de gran importancia en el diario vivir de los organismos ya que permiten la generación de conductas que son imprescindibles para la sobrevivencia frente al continuo cambio del medio ambiente. Durante los últimos 40 años los diferentes estudios han demostrado la existencia de una estrecha asociación entre el hipocampo y los procesos de aprendizaje y memoria. El hallazgo de las *place cells* hipocampales permitió determinar que el hipocampo es capaz de codificar eventos de navegación espacial durante el desplazamiento del animal y generar un mapa cognitivo, que se propone sería el substrato neurofisiológico de la codificación de memorias del tipo episódicas. La actividad de descarga de estas células ocurre en regiones específicas del espacio (*place field*) y además se acopla con oscilaciones características del campo local, la onda theta (4-10 Hz), permitiendo a este tipo de oscilación modular la actividad de las *place cells* durante la navegación. El hipocampo recibe proyecciones de variados sistemas neuromodulares tales como el núcleo histaminérgico tuberomamilar, productor de histamina cerebral. Este neuromodulador tiene efectos positivos sobre el aprendizaje espacial, ya que la ausencia de este neurotransmisor o el bloqueo de sus receptores, especialmente el H1, tienen como resultado un déficit en el desempeño de tareas de memoria espacial, indicando que la histamina tendría un papel relevante durante el proceso de adquisición en estas pruebas de memoria. Por lo tanto, nuestro objetivo es determinar el efecto que tiene el receptor H1 de histamina sobre las oscilaciones theta hipocampales y si esta alteración en el ritmo theta pudiese ser explicado por una alteración en la coordinación temporal de la actividad de las *place cells* hipocampales, que den cuenta de las alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria observados en presencia de antihistamínicos en el modelo animal.

ABSTRACT

Learning and memory are essential functions through the lifespan of an organism; it helps to develop optimal strategies to survive in a changing environment. In the last four decades, several studies have been shown a enclose relationship between the hippocampus, and learning, and memory process. The findings of hippocampal place cells help us to understand how the hippocampus can code events of spatial navigation during the animal behavior and how the hippocampus can generate representation of the space, "the spatial map" or "cognitive map," which is proposed to be the neurophysiological substrate of episodic memory coding. The firing activity of those place cells occurs in a particular location of the space when the animal is navigating, this region of the space where a place cell fire is known as the place field. The patterns of activity of place cells are phase-locked to theta waves (4-10 Hz) to oscillations of the local field potential. Then this oscillation modulates the activity of the place cells during navigation. The tuberomammillary nucleus is the only source of histamine in the brain, and this histaminergic system sends projections to the hippocampus. There is evidence that histamine has a positive effect on spatial memory because of the absence of this neurotransmitter, or the blocking of its receptor (H1 receptor), impairs spatial memory performance, accounting for a relevant role of histamine in the acquisition of memory. Our principal aim is to determine the adverse effect of the histamine H1 receptor antagonist on hippocampal theta oscillations, and if this alteration on this oscillation could be explained by a disruption of the temporal coordination of hippocampal place cells neuronal activity which helps us to explain, therefore, the impairments in the learning and memory process.

INTRODUCCIÓN

Memoria

El cerebro es un órgano complejo cuyo propósito es llevar a cabo diversas funciones cognitivas, conductuales, emocionales, sociales, entre otras, otorgándonos un lugar privilegiado en la escala evolutiva. El proceso de memoria y aprendizaje es una de las funciones cognitivas de mayor importancia en el desempeño de tareas conductuales y cotidianas ya que le permiten a un organismo poder adaptarse a su entorno detectando e incorporando de manera continua información para responder a las alteraciones de su ambiente, a través de cambios conductuales específicos.

Por mucho tiempo se pensó que la memoria era un proceso cerebral único y que no había estructuras específicas implicadas en este proceso. Sin embargo, los estudios de microestimulación eléctrica en el lóbulo temporal de pacientes epilépticos, quienes reportaban recuerdos vívidos cuando dicha región era estimulada (Penfield W. 1958; Milner B. 1977) permitió establecer una relación entre el lóbulo temporal y memorias del tipo biográficas. Años después el caso clínico del paciente H.M y su incapacidad de generar nuevos recuerdos como consecuencia de la remoción bilateral de las dos terceras partes del hipocampo y estructuras asociadas (Scoville W. y Milner B. 1957), permitió concluir la importancia del lóbulo temporal medial en la formación de memorias de carácter biográfico, no obstante, otros tipos de memorias como las de habilidades motoras permanecían intactas en este paciente. Gracias a estos hallazgos hoy sabemos que no existe un único tipo de memoria ni una única estructura cerebral que explique todo el fenómeno.

Posteriormente, estudios de individuos con lesiones en el lóbulo temporal o pacientes a los cuales se les realizó la remoción unilateral o bilateral del hipocampo mostraron déficit en

pruebas de memoria de localización espacial de objetos (Smith M.L y Milner B. 1989). Similares resultados se obtuvieron en hipocampectomía unilateral y bilateral realizada en monos y ratas, los cuales mostraron una reducción en acertar correctamente en pruebas de asociación entre objeto y lugar (Parkinson J.K. et al 1988) o en tareas de memoria espacial como en el Morris Water Maze (Clark R. et al., 2005). Estos resultados revelaron que el hipocampo es una estructura relacionada además con la orientación y memoria espacial. Observación que ha sido corroborada posteriormente en estudios de pacientes con lesiones en distintas estructuras del lóbulo temporal medial quienes fallaron en pruebas de memoria espacial (Bohbot et al 1998).

De este modo, diversos estudios en pacientes y en modelos animales a lo largo de los años han contribuido a establecer la existencia de distintos tipos de memoria. Por un lado, existen memorias que son dependientes del lóbulo temporal medial e hipocampo denominadas memorias del tipo explícita o declarativa, las cuales incluyen eventos, hechos e información aprendida conscientemente. Por otro lado, está la memoria que es independiente de hipocampo y ésta se denomina implícita o no declarativa, puesto que es un tipo de memoria que parte de un aprendizaje no consciente, como por ejemplo memorias asociativas, condicionadas, procedurales, entre otras (Kandel E. 2000; Squire Larry R. 2009). La memoria también puede clasificarse de acuerdo a su temporalidad o duración, un ejemplo de ello es la memoria de corta duración representada por la memoria de trabajo, la cual es un sistema con capacidad limitada que permite almacenar información de manera transitoria en el cerebro y que es muy importante para el desarrollo de tareas que requieran un orden secuencial o el recuerdo latente y *online* de la información inmediatamente precedente a alguna acción. Por el contrario, una memoria de larga duración es aquella que persiste en el tiempo (meses, años o toda la vida) y cuya información almacenada es estable, duradera y puede ser recuperada cuando sea

necesario. Para que una memoria de corta duración sea transformada en una de larga duración la información, primeramente, debe ser adquirida ya sea por estímulos externos o representaciones internas, lo que implica un proceso de *aprendizaje*. Posteriormente, y para que la información aprendida sea almacenada como memoria a largo plazo, ésta debe pasar por una segunda etapa que es la de *consolidación*, lo que significa que la información aprendida es establecida de manera duradera en el cerebro, pudiendo tener acceso a dicha información almacenada con posterioridad. Este proceso de consolidación ocurriría principalmente durante el sueño de ondas lentas, mediante un fenómeno de reactivación en el cual los patrones de actividad neuronal generados durante el aprendizaje se repiten o reverberan en el transcurso del sueño inmediatamente posterior al aprendizaje. Este fenómeno, teóricamente propuesto por David Marr (1971) y después descrito experimentalmente por Wilson M. y McNaughton (1994) se ha sugerido como el sustrato neurofisiológico para la consolidación de la memoria, es decir, el proceso mediante el cual la información codificada en el hipocampo es transferida a la neocorteza para transformarse en conocimiento permanente (Wilson M. y McNaughton 1994).

Oscilaciones y Memoria

Toda conducta tiene un correlato neuronal, las funciones cerebrales serían el resultado de la actividad de complejos ensambles neuronales que actúan de manera sincronizada entre ellos. Esto es originado por la actividad sináptica que provoca la generación de campos eléctricos extracelulares dando origen a un amplio rango de oscilaciones de diversas frecuencias y que pueden ser registrados por diferentes métodos (Buzsáki G. et al 2012). En el hipocampo se observan diferentes oscilaciones que están asociadas a distintas funciones en el proceso de memoria y aprendizaje, entre éstas podemos encontrar la presencia de la onda

theta, que tiene la característica de llevar un patrón de onda lento con un rango de frecuencia entre 4 a 12 Hz. Esta oscilación se encuentra presente cuando el animal se desplaza y navega en un ambiente, y es relevante durante el proceso de aprendizaje. Se sugiere que este tipo de oscilación es capaz de propagarse a través del hipocampo a lo largo del eje septo-temporal, dado que durante la navegación espacial del animal esta oscilación muestra cambios graduales en su fase desde la región dorsal a la región ventral del hipocampo. Este hallazgo podría indicar que las ondas theta viajeras estarían mapeando, a lo largo del eje septo-temporal, cada segmento del espacio almacenado en un ciclo theta (Lubenov E. et al 2009). Las oscilaciones *gamma* son otro tipo de ondas que se encuentran presentes en el hipocampo. Éstas abarcan un rango de frecuencia de 30 a 100 Hz (Bragin A. et al 1995) y se sugiere que este tipo de oscilaciones podría estar correlacionado con el aprendizaje espacial. Estudios en humanos dan cuenta de esto al registrar una mayor actividad hipocampal en frecuencia gamma (onda rápida) durante el descanso posterior a una prueba virtual de memoria espacial (Cornwell B.R et al 2014). En otros estudios, se demostró que ratas con un mejor desempeño en pruebas de memoria de codificación y reconocimiento de objetos presentaban una mayor sincronización de las regiones intrahipocampales CA3-CA1 en el rango de frecuencia gamma de 30-50 Hz (Trimper J. et al 2013). Un tercer tipo de oscilación hipocampal son las denominadas “*ripples*”, éstas son ondas de mayor frecuencia que se registran en un rango de 150 – 250 Hz. Están presentes durante el sueño de ondas lentas y en estados de reposo, y tienen un rol de gran relevancia en la consolidación de la memoria, puesto que hoy sabemos que los eventos de reactivación serían coincidentes o estarían asociadas a la ocurrencia transitoria de las denominadas *sharp wave ripples complex*, durante los cuales se desencadena la reactivación de neuronas hipocampales de manera secuencial y comprimida temporalmente transfiriendo la

información entre hipocampo y neocorteza (Girardeau G. et al 2009; Girardeau G. y Zugaro M. 2011; Nádasdy Z. et al 1999; Battaglia F.P et al 2004, Nakashiba T. et al 2009).

La onda theta ha sido detectada en diversas regiones cerebrales, entre ellas hipocampo, complejo subicular, corteza entorrhinal, corteza perirrinal, corteza cingulada y amígdala, entre otras. Por décadas numerosas investigaciones han visto la presencia del ritmo theta en variadas conductas, tales como: locomoción, *sniffing*, *whisking* o estimulación sensorial en estado de anestesia (Macrides F. 1975; Berry SD. et al 1978; Ranade S. et al 2013). Sin embargo, este ritmo tiene una presencia de mayor consistencia en conductas de movimiento voluntario y exploratorio, aprendizaje, memoria y durante el sueño REM (Buzsáki G. 2002). Se ha demostrado que las oscilaciones theta hipocampales tienen un rol fundamental en modular las descargas de neuronas en la corteza prefrontal medial (mPFC), dando cuenta que estas células muestran un acoplamiento de fase a este ritmo theta, lo que se cree es esencial para la memoria de trabajo y codificación de memoria episódica (Hasselmo ME. 2002; Siapas AG. 2005).

Observaciones del grupo de Buszaki han demostrado que la activación de los receptores de endocannabinoides CB1, expresados en el hipocampo, provocan una interrupción en la coordinación temporal de las neuronas hipocampales sin alterar su frecuencia de descarga, consecuentemente se observa una interrupción de la sincronía de los ensambles neuronales hipocampales provocando una disminución en el poder espectral de las oscilaciones theta, lo que llevaría a un déficit en la memoria dependiente de hipocampo (Robbe D. et al 2006).

De esta manera la coordinación temporal de la actividad de las neuronas hipocampales durante la navegación espacial pareciera ser una condición permisiva o relevante para que los procesos de adquisición de memoria ocurran.

Place cells y onda theta

En la década de los 70s el científico John O'Keefe fue uno de los pioneros en el descubrimiento de células hipocampales que descargan en áreas específicas del espacio acuñando el término de *place cells* para este tipo de neuronas. En sus estudios O'Keefe y colaboradores mediante registros en la región CA1 del hipocampo de rata llegaron a definir a las *place cells* como aquellas neuronas en donde la posición de la rata en el plano (*place field*) era condición necesaria para un máximo disparo de potenciales de acción (O'Keefe J. y Dostrovsky J. 1971; O'Keefe J. et al 1976). Este hallazgo llevó a concluir que la actividad de las *células de lugar* (o *place cells*) estarían participando en la generación de un mapa cognitivo o mapa espacial, que permitiría tener una orientación y posición del individuo en un ambiente determinado.

Cuando un animal realiza una tarea de navegación espacial la presencia de ondas theta y la actividad de las células hipocampales (*place cells*), su tasa de disparo y el tiempo en el que ocurren sus descargas, se encuentran en estrecha relación. Esto significa que la actividad de descarga de los ensambles de neuronas hipocampales que están siendo modulados por la oscilación theta presenta una sincronía y un acoplamiento a las fases de esta oscilación. Un fenómeno que ha sido observado en estas neuronas es que cuando el animal atraviesa un *place field* los ensambles de *place cells* comienzan a disparar en fases tardías del ciclo theta y progresan, en sus descargas, a fases más tempranas del ciclo a medida que el animal atraviesa el *place field*, este fenómeno ha sido descrito como *precesión de fase* permitiendo codificar posiciones del animal hacia una trayectoria pasada o futura. Se sugiere que esta comprensión de secuencias temporales de los *place fields*, en un ciclo theta, permite la activación de mecanismos de Potenciación de Largo Plazo (LTP) para el aprendizaje de estructuras

secuenciales dándoles una dimensión temporal a las trazas de memoria (Skaggs W. et al 1996; Harris K.D. et al 2002 y 2003; Foster D.J. et al 2007; Itskov V. et al 2008).

De esta manera la precisa relación temporal entre la actividad de las espigas y la fase de onda theta durante la navegación espacial es de crucial importancia para la correcta codificación del espacio en el cual el animal se desplaza.

Histamina y Memoria

En el sistema nervioso central se encuentra un conjunto de células neuronales que sintetizan y liberan histamina, agrupadas exclusivamente en el Núcleo Tuberomamilar (TMN), en la parte posterior y ventral del hipotálamo. El descubrimiento del Sistema Histaminérgico cerebral llevó a pensar que la histamina no sólo cumplía funciones periféricas, ya ampliamente conocidas en las reacciones alérgicas e inflamación, sino que también este hallazgo impulsó la búsqueda del rol de este neurotransmisor en el sistema nervioso central. Se descubrió que la molécula de histamina es sintetizada a partir de la descarboxilación del aminoácido histidina por acción de la enzima específica Histidina Decarboxilasa (HDC), proceso que ocurre en el cerebro, únicamente en las neuronas del TMN (Pannula P. et al 1984; Watanabe T. et al 1984).

El sistema histaminérgico extiende sus axones desde el TMN a una gran cantidad de estructuras cerebrales, tales como: corteza cerebral, amígdala, sustancia nigra, hipotálamo, estriado, hipocampo, tálamo e inclusive la médula espinal. Además, la presencia de varicosidades en las fibras axonales histaminérgicas sugiere una transmisión sináptica en volumen, como principal mecanismo de liberación del neurotransmisor, con un amplio efecto en el sistema nervioso central, sugiriendo un papel neuromodulador (Airaksinen MS. y Panula P. 1988; Panula P. et al 1989; Jin CY. et al 2002). La amplia variedad de regiones a las cuales llegan las eferencias del TMN llevan a pensar que existe una regulación histaminérgica en una

amplia gama de funciones cerebrales, que van desde los ciclos de sueño-vigilia, termorregulación, ingesta de comida, hasta emociones, aprendizaje y memoria (Haas H. et al 2008; Valdés J.L. et al 2010, Torrealaba F. et al 2012). Está demostrado que este núcleo forma parte del Sistema Ascendente Activante (SAA), el cual permite mantener, entre otras funciones, un estado de alerta y de conciencia en los individuos. Se sabe que las neuronas del TMN reciben el mayor input de fibras GABAérgicas provenientes del área pre-óptica ventrolateral (VLPO), la cual está activa durante el sueño, por lo que tendría un rol importante en silenciar las neuronas histaminérgicas durante ese período, mientras que el principal input excitatorio del núcleo TM es la corteza infralímbica, la que ha demostrado ser necesaria para la correcta activación de este núcleo (Haas H. et al 2003; Valdés J.L. et al 2006; Blandina P. et al 2012).

La histamina puede generar diversos efectos en las regiones a las cuales se proyectan sus fibras, por la existencia de cuatro tipos de receptores H1, H2, H3 y H4. Los receptores H1, H2, H3 se encuentran ampliamente distribuidos en el tejido nervioso y el receptor H4 se encuentra principalmente en tejido periférico. Los receptores H1 están presentes en el tálamo, corteza, núcleos neuronales colinérgicos del tegmento mesopontino y en el cerebro basal anterior, así como también en el locus coeruleus y núcleos del raphe. Además, una alta densidad de este receptor está presente en el sistema límbico, en numerosos núcleos del hipotálamo, la mayor parte del núcleo septal, amígdala media y varias regiones hipocampales (Palacios J.M et al., 1981; Martínez M. et al., 1990). Con respecto a los receptores H2, estos se expresan en la corteza cerebral (capas I-III) (Traiffort E. et al., 1992), médula y con una mayor densidad en el ganglio basal y en partes del sistema límbico, tales como la formación hipocampal y amígdala. Estos dos receptores, H1 y H2, muestran una co-localización en varias áreas del cerebro, entre ellas las células piramidales y granulares en la formación hipocampal y

en otros grupos de células aminérgicas (locus coeruleus, núcleos del raphe, sustancia nigra, área tegmental ventral). Además, sus distribuciones postsinápticas modulan la actividad excitatoria debido a la depolarización inducida por el acoplamiento de estos receptores a proteínas Gq y Gs respectivamente, mientras que la activación del receptor H3 media la auto-inhibición de neuronas del TMN e inhibe la síntesis y liberación de histamina, dado que como autorreceptor se encuentra acoplado a proteína Gi/Go, así como también se encuentra presente en otras neuronas (como heterorreceptor) modulando la liberación de otros neurotransmisores tales como acetilcolina, glutamato, noradrenalina, dopamina, serotonina o GABA (Arrang J.M. et al., 1983; Clark E.A et al., 1996). Este receptor (H3) se ha observado en todas las áreas y capas de la corteza cerebral, presenta mayor densidad en el núcleo accumbens, estriado, tubérculo olfatorio, sustancia nigra e hipocampo, mientras que niveles moderados son vistos en el hipotálamo (Pollard H. et al., 1993; Schlicker E. et al 1992; Schlicker E. et al 1994; Brown R.E. et al 1999; Brown R.E. et al 2001; Pillot C. et al 2002; Köhler C.A. et al 2011; Blandina P. et al 2012).

La proyección de fibras histaminérgicas hacia el hipocampo y la expresión de sus receptores en esta estructura llevó a sugerir un posible rol de la histamina en las funciones hipocámpales, especialmente asociado a procesos de memoria (Villemagne V.L. et al 1991; Alves-Rodriguez A. et al 1998; Alvarez E.O. y Banzan A.M. 2001; Alvarez E. 2009). Diversos estudios se han enfocado en dar una respuesta a la pregunta del efecto de la histamina sobre el hipocampo, llegando a descubrir que este neuromodulador tiene una acción importante sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Estudios en los que se ha visto un déficit en la memoria espacial inducidos por la administración intra-peritoneal (IP) de scopolamina (un antagonista de los receptores muscarínicos) pudieron ser revertidos con la administración sistémica, intra-cerebro-ventricular o intra-hipocámpal de histidina (precursor

de la histamina) o histamina (Chen Z. y Kamei C. 2000; Xu L.S. 2009); sin embargo, esta mejoría en la memoria se reduce cuando se administran antagonistas de los receptores H1 y H2. Además, se ha observado que ratas tratadas con el antagonista del receptor NMDA (MK-801) induce un déficit en la memoria espacial de estos animales, pero que con la administración intrahipocampal de histamina y/o intraperitoneal de histidina el efecto de MK-801 es también revertido, e inversamente la administración de un inhibidor de la síntesis de histamina provocó efectos negativos sobre la memoria (HuangYu-Wen, 2003). El bloqueo con antagonistas del receptor H1 o ratones knock-out para este receptor provocan los mismos efectos de deterioro cognitivo (Dere E. et al 2010) anteriormente descritos. En una investigación realizada en humanos se observó el efecto de antihistamínicos provocando alteraciones en pruebas de desempeño psicomotor, aumentando sus tiempos de reacción, cambios significativos en el desarrollo de tareas atencionales, disminución en los estados de alerta y alteración en pruebas de aprendizaje espacial (Van Ruitenbeek P. et al 2008). Por su acción como heterorreceptor, el H3R ha sido considerado un blanco farmacológico importante en neuropatologías asociadas con déficit cognitivo, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que el déficit cognitivo a consecuencia de esta enfermedad puede ser aliviado por acción de antagonistas de H3R, que aumenta los niveles de histamina cerebral y que además como heterorreceptor tiene un efecto modulador en la liberación de acetilcolina, provocando un aumento del neurotransmisor en la corteza prefrontal (PFC), así como también una acción en reducir los efectos negativos debido a la formación de las placas β -amiloides (placas $A\beta$) y Ovillos Neurofibrilares (NFT: *Neurofibrillary Tangles*). También se le ha asociado un efecto pro-cognitivo y pro-atencional en el síndrome ADHD (Déficit Atencional e Hiperactividad) y se ha sugerido una posible función sobre el sistema recompensante involucrado en trastornos de adicción, ya que es un hecho que la histamina también modula la

transmisión dopaminérgica mesolímbica. Por lo que, es necesario continuar con la investigación del sistema histaminérgico, así como de la histamina y sus receptores, ya que pueden ser un potencial blanco terapéutico para enfermedades neurodegenerativas y enfermedades que conllevan déficit cognitivos (Vohora D. y Bhowmik M. 2012).

Onda theta, histamina y memoria

Kamei C. y colaboradores (2007) observaron que la administración de pirilamina, así como el uso de otros antagonistas del receptor H1, intrahipocampal o intraperitoneal, generaron déficits en pruebas de memoria de trabajo espacial. El efecto por la aplicación del antagonista además generó cambios en el ritmo theta hipocampal observándose una reducción en el poder espectral de la onda theta. No obstante, este efecto pudo ser revertido al inyectar histamina o un agonista del receptor H1 (HTMT), intrahipocampalmente (Masuoka T. et al 2007). Sin embargo, este trabajo utilizó una tarea que no es puramente hipocampal y no estudió la relación entre la actividad de las neuronas hipocampales y las alteraciones en la onda theta que puedan explicar mecánicamente la reducción en el poder espectral de esta banda, y como se mencionó anteriormente la coordinación entre la actividad de neuronas hipocampales y la onda theta pareciera ser de mucha relevancia en el proceso de adquisición de memoria.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio han mostrado que la administración de pirilamina, un antagonista del receptor H1, en la región de CA3 del hipocampo produce un deterioro significativo en las capacidades de memoria espacial en la prueba de memoria espacial *oasis maze* (Sanchez et al. *En preparación*). Adicionalmente, este antagonista en el hipocampo produce un efecto sobre las *place cells*, observándose que los *place fields* de estas células pierden su estabilidad con respecto a la situación control (ver figuras ANEXO 1 y 2)

durante sucesivas navegaciones en un mismo ambiente y sin cambios importantes en sus frecuencias de disparo. Estos datos preliminares dan una idea de lo que podría estar ocurriendo cuando la administración de antihistamínicos provoca errores en prueba de memoria; no obstante, es fundamental determinar qué puede estar ocurriendo a nivel de poblaciones neuronales hipocampales y las oscilaciones características para poder explicar de mejor manera el fenómeno observado.

Todos los datos anteriores sugieren que neuromoduladores tales como la histamina, canabinoides u otros, podrían ser relevantes en los procesos de coordinación temporal de la actividad hipocampal, durante el proceso de aprendizaje y memoria. Investigaciones previas demuestran que la histamina juega un rol importante en funciones cognitivas, como la memoria, tanto a nivel conductual como a nivel de dinámica neuronal hipocampal, y respaldan la idea de que la ausencia o disminución de este neurotransmisor es clave en el aprendizaje y también en la memoria. No obstante, hasta hoy se desconoce específicamente a qué nivel este neuromodulador podría estar afectando estos procesos en particular. Por esta razón y dado que ya conocemos a nivel conductual el efecto negativo de pirilamina (antagonista del receptor H1), es que nuestro mayor interés es el de estudiar el rol que tiene la histamina en los patrones de la onda theta hipocampal durante la navegación espacial y el potencial efecto que puede generar sobre las células hipocampales asociadas con navegación espacial, como lo son las *place cells*.

HIPOTESIS.

Las oscilaciones theta hipocampales y la coordinación temporal de descarga de las neuronas hipocampales durante la navegación espacial, son moduladas por la transmisión histaminérgica cerebral.

Objetivo general.

Determinar el efecto del antagonista de los receptores H1 de histamina (pirilamina) sobre las oscilaciones theta hipocampales y la actividad de espigas de neuronas hipocampales, por medio de registros extracelulares en animales despiertos con movimiento libre durante una tarea de navegación espacial.

Objetivos específicos.

1. Implementación simultánea de registro electrofisiológico acoplado a la administración intra-hipocampal del fármaco.
2. Determinar cambios de poder espectral en las oscilaciones theta hipocampales en animales tratados con el antagonista de los receptores H1 versus control salino, durante navegación espacial.
3. Determinar cambios en el patrón de descarga de las células hipocampales principales, en animales tratados con el antagonista de los receptores H1 versus control salino, durante navegación espacial.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Animales

Se utilizaron 5 ratas macho Sprague-Dawley de 250-300 grs. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hrs. a una temperatura controlada de 23°C en las habitaciones de mantención y entrenamiento, con acceso ad libitum de agua y comida excepto cuando fue indicado. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales del Instituto Nacional de Salud (NIH No. 80-23, revisado en 1996) y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBAH 0337 FMUCH)

- Universo Muestral

Lo datos analizados corresponden a un total de 23 sesiones de registro en 5 animales, 3 de ellos tratados con 20 ug/ul de pirilamina y 2 de ellos tratados con 100ug/ul de pirilamina y sus respectivos controles salino. Todas estas sesiones fueron utilizadas para los análisis de LFP. De estas 23 sesiones se obtuvieron 400 neuronas en condición salino (4 ratas/10 sesiones) y 251 neuronas para la condición pirilamina 100ug/ul (2 ratas/8 sesiones), 217 neuronas en condición pirilamina 20ug/ul (3 ratas/5 sesiones).

- Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de anestésico gaseoso isofluorano 2.5% para inducción, 1.5% para mantención en oxígeno a un flujo de 1 Litro/minuto. Luego los animales fueron puestos en una aparato estereotáxico para proceder a una craniotomía y exponer el

cerebro a los implantes crónicos de electrodos y cánula de inyección. Estas ratas fueron implantadas con una cánula de inyección (26 gauge, Plastics One) en la región CA3 (Fig. 1) de 3,8 mm de largo para la administración del antagonista de los receptores H1 de histamina, pirilamina (bregma -3,30 mm; línea media 5,7 mm; profundidad 2,8 mm desde la

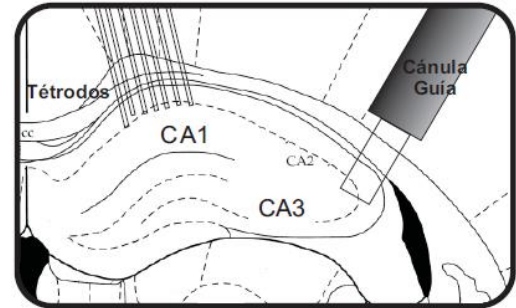


Figura 1: Esquema de la ubicación del micromanipulador (izquierda) y cánula guía (derecha) en el hipocampo de rata. CA1: Cornu Ammonis 1. CA3: Cornu Ammonis 3. CC: Cuerpo Calloso.

superficie craneal, inclinación 30°) y con un micromanipulador consistente en 6 tétrodos de níquel-cromo de 18 micrones de grosor, 1 electrodo de referencia y una tierra, para el registro electrofisiológico desde CA1 ipsilateral (Fig. 1) (bregma -3,30 mm; línea media 0,7 mm e inclinación -15°), todas las coordenadas estereotáxicas según el atlas del cerebro de la rata (Paxinos G. et al., 2007). Cánula y micromanipulador fueron fijados al cráneo con tornillos de anclaje y acrílico dental. Adicionalmente se insertaron dos electrodos en la musculatura dorsal del cuello para obtener la señal de electromiografía que nos permiten detectar el estado conductual del animal (sueño/vigilia). Después de la cirugía se administró antibiótico (Enrofloxacino 5%; 20 mg/Kg i.p., Bayer, Santiago de Chile) más anti-inflamatorio ketoprofeno (Ketofen 1%; 2 mg/Kg i.p., Rhodia Merieux).

- Farmacología

Se inyectó como antagonista del receptor H1 pirilamina maleato (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 µg/µl (0.5 µl) y a 20 µg/µl (0.5 µl), ya que en nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que esta última dosis es la mínima necesaria para obtener efectos conductuales, o el vehículo salino (NaCl 0.9%). El fármaco fue disuelto en salino estéril e inyectado en la región CA3 del hipocampo por medio de una cánula de inyección acoplada a

una jeringa Hamilton. El volumen inyectado fue de 0,5 μ l dejando difundir 30 segundos antes de retirar la cánula.

- Tarea conductual

Una vez que las ratas se recuperaron de la cirugía (7 días) fueron restringidas de alimento hasta que alcanzaron el 85% del peso corporal para facilitar motivación, luego fueron entrenadas a navegar en una pista circular elevada de 1,2 m de diámetro, con 2 regiones de recompensa. Las ratas debieron recorrer la

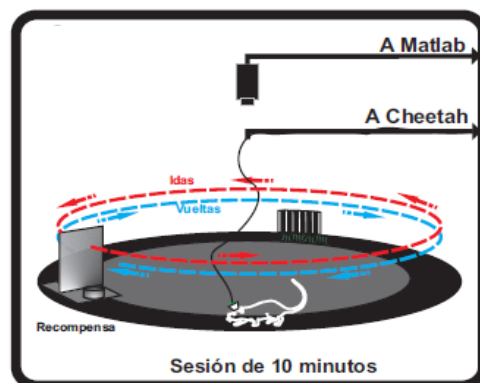


Figura 2: Esquema de la tarea que el animal debe realizar en el maze circular.

pista completa de un punto a otro ida y vuelta al menos 10 veces (Fig. 2). En cada punto de parada hubo una recompensa (pequeños trozos de pellet de chocolate), lo que motivó a las ratas a realizar la tarea de navegación espacial. Aquellos animales con administración del antagonista o vehículo completaron cuatro sesiones de navegación de 10 minutos por sesión por día (Fig.3). La primera sesión de 10 minutos fue un control sin inyección del fármaco o vehículo; en el intervalo de descanso entre la primera y la segunda sesión de navegación la rata fue inyectada intra-hipocampalmente con 20 o 100 μ g/ μ l del antagonista del receptor H1 de histamina o con vehículo (control salino), luego 10 minutos de navegación; la tercera y cuarta sesión de navegación se realizó sin administración adicional del antagonista o del vehículo.

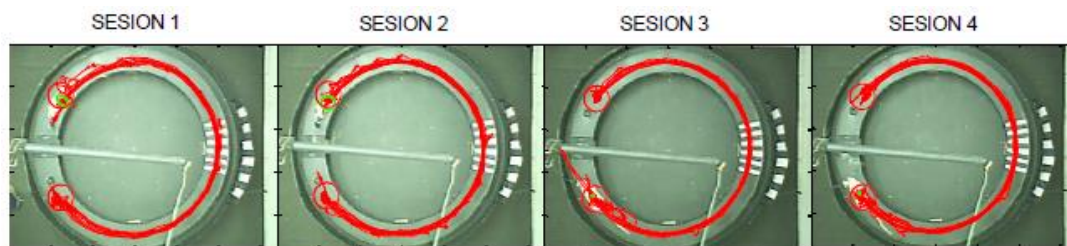


Figura 3: Imagen del maze circular, vista superior. En rojo se muestra la trayectoria de la rata durante cada sesión. Entre la sesión 1 y 2 se inyectó el antagonista o el vehículo.

Entre cada sesión se dio 5 minutos de descanso. Cada sesión conductual fue videograbada para posteriores análisis offline de la actividad eléctrica y conducta del animal.

- Registros Electrofisiológicos

La actividad de campo local y de espigas fue registrada durante todo el desarrollo de la tarea mediante un sistema de registro Cheetah System de 32 canales (Neuralynk). Las señales obtenidas de 24 canales fueron utilizadas para espigas y 8 canales para LFP. El micromanipulador fue conectado a un pre-amplificador situado en la cabeza del animal; la señal electrofisiológica fue amplificada posteriormente entre 1000 y 2000 veces, filtrada con un pasa banda para detección de espigas de 600 a 6000 Hz y un pasa banda de 0.1 a 475 Hz para señales continuas (LFP). Las señales fueron digitalizadas a 32KHz para espigas y 2KHz para LFP. Las espigas fueron procesadas mediante el software automático de clasificación de Espigas KlustaKwik y posteriormente revisadas con el software de supervisión manual MClust.

- Análisis de datos

Primero se llevó a cabo la reconstrucción de la trayectoria del animal mediante una rutina de video tracking en Matlab la cual fue alineada en el tiempo con el registro de LFP y actividad de células unitarias. Luego se graficó el desplazamiento del animal en uno de los ejes del plano como se muestra en la Fig. 4A y se estimó la velocidad instantánea de navegación (Fig. 4B) y la envolvente del poder de theta de la señal filtrada entre 4 y 12 Hz (Fig. 4C), con esto se pudo determinar los momentos exactos en que hubo navegación del animal para el posterior cálculo de poder espectral. El poder espectral se calculó mediante la técnica de multitaping (Mitra P.P et al, 1999) durante las sesiones de reposo (internavegaciones) y durante los cuatro

ensayos de navegación. El porcentaje de cambio del poder espectral en theta fue calculado a partir de los datos obtenidos con los análisis del multitaping para cada sesión en cada condición de tratamiento y para el promedio del poder espectral de theta durante los períodos de reposo (internavegaciones). El poder de theta en reposo fue considerado como el 100% y el poder espectral en theta de cada sesión de navegación fue calculado con respecto al poder de theta basal (100%) en descanso, calculando posteriormente el cambio porcentual de cada sesión.

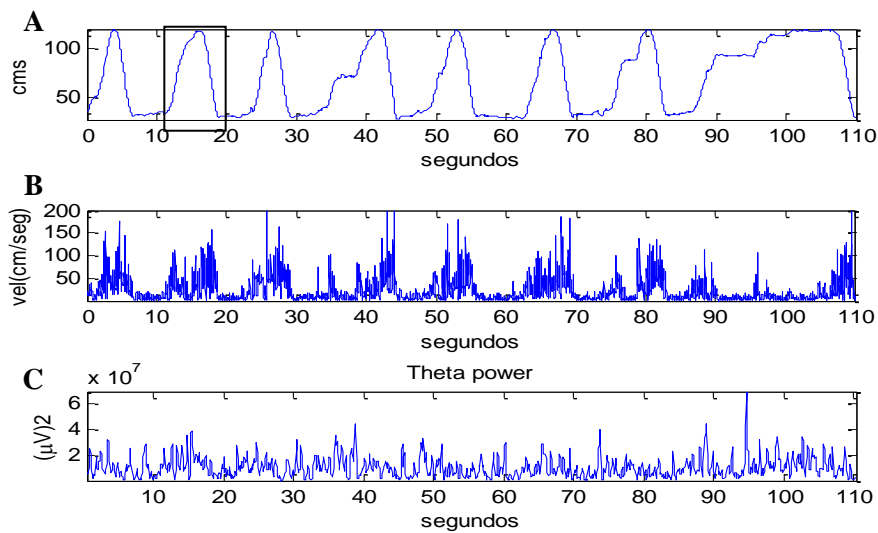


Figura 4: El gráfico A muestra el desplazamiento del animal en el maze circular en función de un período de tiempo durante una sesión de salino. El gráfico B representa la velocidad del animal durante su desplazamiento en el maze. Gráfico C muestra el poder de theta durante el fragmento de desplazamiento del animal en la sesión de tarea. El recuadro en el gráfico A indica la región que fue considerada para la Fig.5.

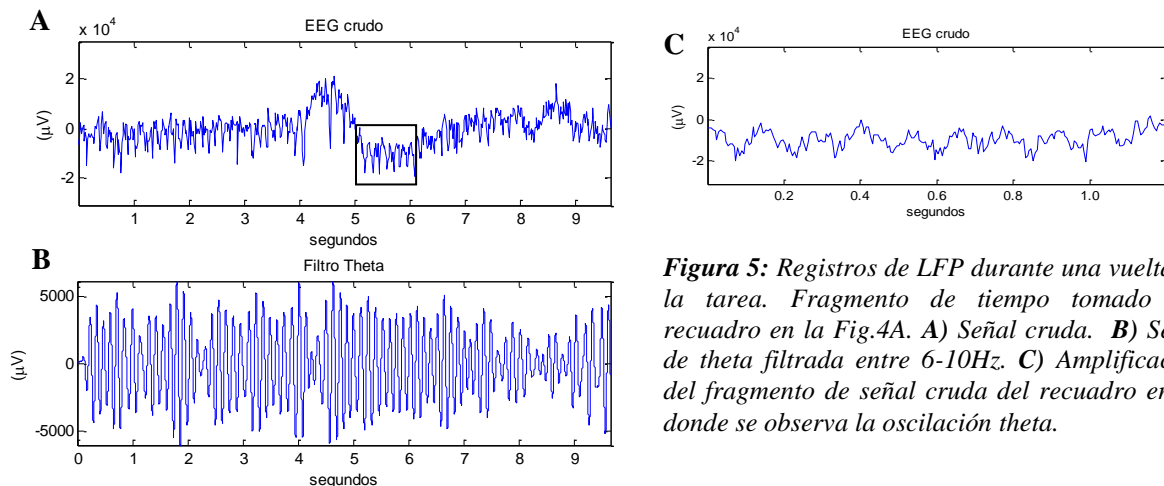


Figura 5: Registros de LFP durante una vuelta de la tarea. Fragmento de tiempo tomado del recuadro en la Fig.4A. A) Señal cruda. B) Señal de theta filtrada entre 6-10Hz. C) Amplificación del fragmento de señal cruda del recuadro en A, donde se observa la oscilación theta.

Las células obtenidas mediante el procesamiento de espigas fueron sometidas a criterios de clasificación para separar células piramidales de aquellas no piramidales o interneuronas. Los criterios de selección fueron los siguientes: i) las células con frecuencias de descarga superior a los 10 Hz en período de reposo y con una relación pico/valle de la forma de la espiga cercano a 1, fueron consideradas potenciales interneuronas (Fig.6B); ii) células con una información por espiga (IPS) mayor a 0.3 fueron consideradas como neuronas piramidales del tipo place cells (Fig.6A) (Skaggs WE. et al 1992). Todas las células que cumplieron los requisitos de clasificación fueron utilizadas para la construcción de autocorrelogramas individuales y de poblaciones, mediante rutinas de MATLAB, bajo las distintas condiciones de tratamiento. Entonces, una vez identificadas las potenciales células piramidales y dado que no todas las células registradas presentan un acoplamiento con la onda theta, éstas fueron sometidas a un test de no uniformidad de preferencia de fase (Rayleigh test, con un $p < 0.05$) (Zar JH., 1974).

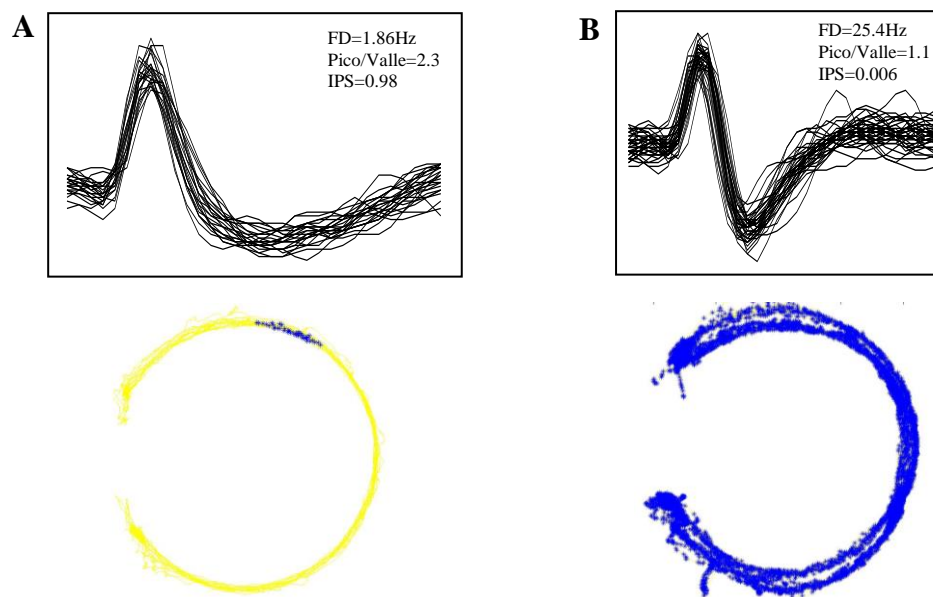


Figura 6: Ejemplos de forma de espiga y descarga de la neurona en el maze circular, de acuerdo con los criterios mencionados en el texto. **A)** Neurona piramidal. Debajo una representación de su descarga en el maze. **B)** Interneurona. Debajo una representación de su descarga en el maze. Información de la neurona de acuerdo a los parámetros utilizados al interior del recuadro de la forma de la espiga. FD= frecuencia de disparo; IPS=información por espiga. En amarillo se describe la trayectoria de la rata en el maze circular, azul corresponde a la descarga de la neurona en el maze.

Los análisis estadísticos consistieron en análisis de ANOVA de medidas repetidas y ANOVA dos-vías cumpliendo los criterios de normalidad y homogeneidad de varianza. Si los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron test no-paramétricos ANOVA de medidas repetidas on ranks (Friedman Test) usando el software SigmaStat. En el caso de los autocorrelogramas para determinar si los patrones de autocorrelación fueron significativos, se realizó un bootstrapping de los intervalos inter-espigas de cada neurona tantas veces como espigas se encuentran contenidas en la serie de tiempo a ser analizada, de esta manera se pudo determinar el número de eventos sincrónicos mayores a lo esperable por el simple azar (3 SD, sobre el promedio del total de bootstraps, equivalente a un intervalo de confianza del 99%) (Valdés JL, et al 2015)

RESULTADOS

Análisis de poder espectral theta

Una vez puestos en marcha los registros electrofisiológicos en el animal durante cada día de sesión, junto con la respectiva administración del salino o droga, se analizaron los datos crudos y se observó el efecto del antagonista del receptor H1 sobre las oscilaciones theta. Los resultados muestran el poder espectral normalizado de esta oscilación, como ejemplo se observa un día de registro en la condición salino (Fig.7). La normalización del poder espectral se realizó considerando el máximo y el mínimo del poder crudo dentro de un rango de frecuencia de 1-100 Hz.

Se puede observar que con la administración intrahipocampal de salino (Fig.7) no se produce un cambio aparente en el poder de theta puesto que las curvas rojo (sesión 1), verde (sesión 2), amarillo (sesión 3) y negro (sesión 4), se encuentran absolutamente sobrepuestas en el rango de frecuencia theta, esto es de 4-12 Hz. La línea azul graficada en la figura 7

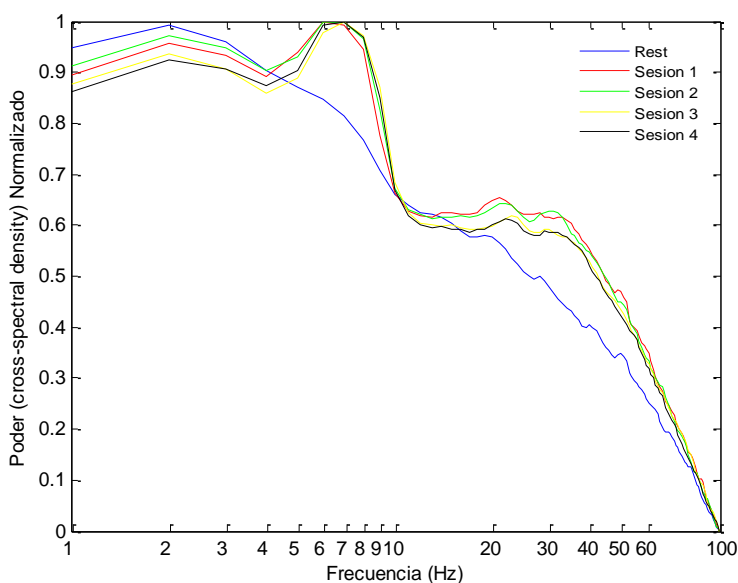


Figura 7: Ejemplo del poder espectral de theta en las cuatro sesiones de navegación, en el maze circular, y reposo, de un día de registro para la condición salino. Línea roja: sesión 1; línea verde: sesión 2; línea amarilla: sesión 3; línea negra: sesión 4; azul: reposo.

representa el poder espectral normalizado durante el período de descanso (internavegaciones), éste fue considerado como el poder de theta basal entre el rango de 4-12 Hz. Con respecto a

este poder basal se calculó el porcentaje de cambio, en el rango de theta, para cada una de las sesiones de navegación, esta cuantificación fue utilizada para los análisis posteriores.

Utilizando este cálculo se realizaron comparaciones del poder espectral en el rango de frecuencia theta entre pirilamina y salino (Fig.8). En la figura 8A se grafican las cuatro sesiones en las que se observan las curvas de salino y pirilamina 20ug/ul por sesión de la tarea. La primera sesión es un control ya que no hay administración del fármaco o vehículo (salino), y consecuentemente, no se observa una diferencia entre ambas curvas. En las siguientes sesiones se puede notar que no hay diferencias entre ambas curvas (salino y pirilamina 20ug/ul), indicando que el poder de theta no fue alterado con esta dosis del antagonista. Aunque en las sesiones 2 y 3 la condición con salino presenta una reducción significativa (ANOVA dos vías, $p < 0.05$, post hoc Tukey Test) en el poder de theta al ser comparada con la condición pirilamina en el mismo bin de frecuencia, este resultado no indica alteraciones en el poder espectral por efecto del fármaco.

En la figura 8B se grafica esta misma comparación de salino ahora con la mayor dosis de pirilamina (100ug/ul). Lo que se puede observar es un efecto del antagonista sobre el poder de theta en la sesión 2 (post-inyección) y sesión 3 de navegación. Este cambio responde a una evidente reducción en el poder de esta banda entre las frecuencias 5–9 Hz (ANOVA dos-vías, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, post hoc Tukey Test) al ser comparadas con su respectiva sesión de salino (control). El efecto con esta dosis de pirilamina se prolonga hasta la sesión 3, en la cual también se observa una disminución en el cambio del poder de theta. Ya en la sesión 4 de navegación desaparece el efecto de la droga pues el cambio en el poder de theta alcanza niveles semejantes a los obtenidos en animales inyectados con la dosis de salino.

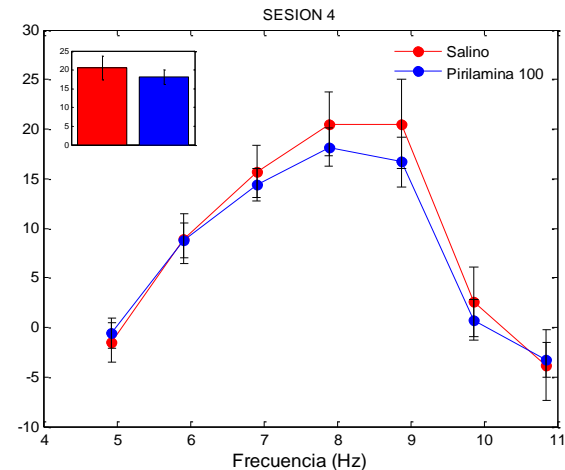
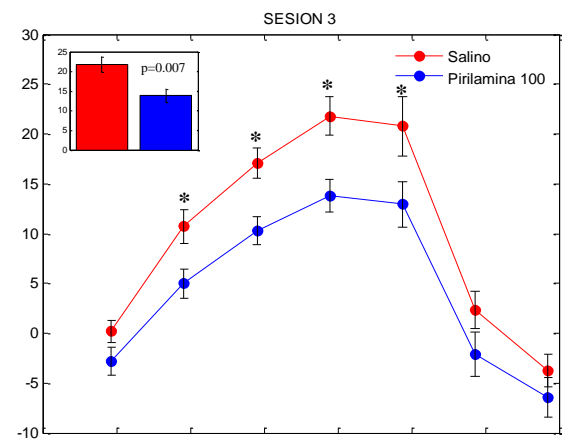
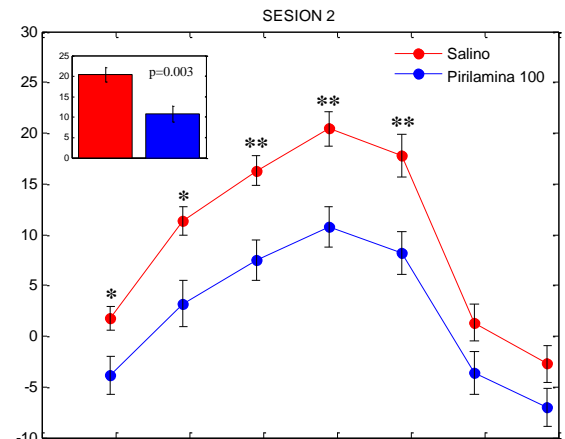
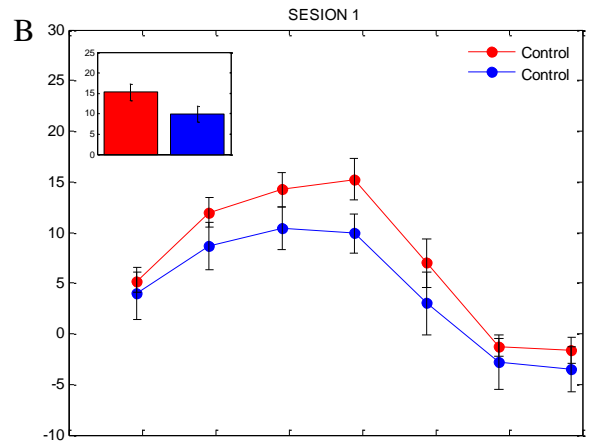
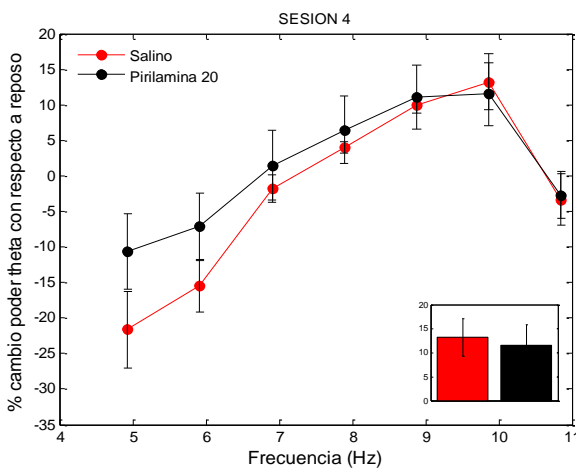
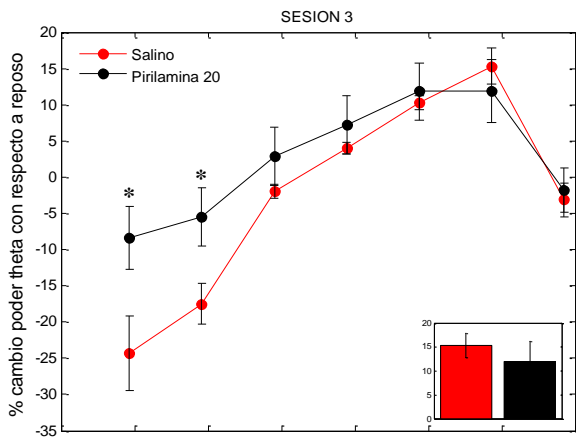
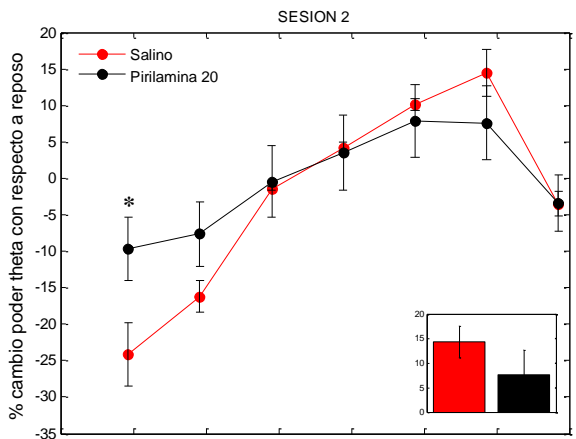
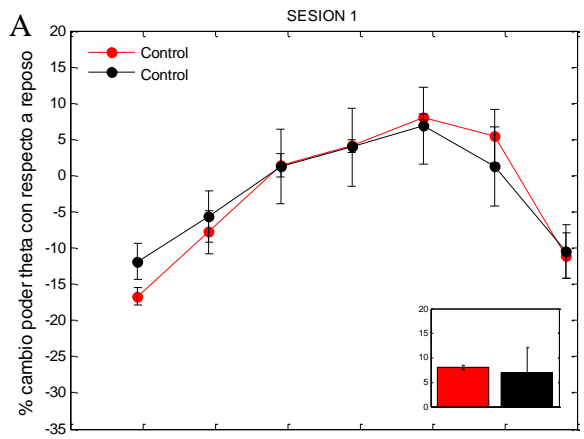


Figura 8: Porcentaje de cambio del poder espectral en el rango de frecuencia theta para cada una de las cuatro sesiones en la condición de pirilamina 20ug/ul y pirilamina 100ug/ul. Gráfico interior de barra representa el peak de frecuencia para cada condición, análisis estadístico con t-test. **A)** Animales fueron inyectados con salino, n=3 sesiones/2 ratas o 20ug/ul de pirilamina intra-hipocampal, n=5 sesiones/3 ratas. ANOVA dos-vías *=p<0.05. **B)** Animales fueron inyectados con salino, n=7 sesiones/2 ratas o 100ug/ul de pirilamina intra-hipocampal, n=8 sesiones/2 ratas. ANOVA dos-vías *=p<0.05; **=p<0.001, post hoc Tukey Test.

Los gráficos de barra al interior de cada figura muestran el valor máximo del porcentaje de cambio dentro de este rango, para salino y su respectiva dosis de pirilamina. Esta comparación entre los peaks de cada sesión muestra una diferencia entre salino y la inyección con la mayor dosis del antagonista (Fig. 8B) en la sesión 2 (p=0.003, t-test) y sesión 3 (p=0.007, t-test).

Estos datos sugieren que el antagonista del receptor H1 tuvo un efecto en la oscilación theta provocando una reducción en su poder espectral, una posible explicación podría ser por una acción del fármaco sobre la frecuencia de disparo de las células o por un cambio en el patrón de descarga de las neuronas respecto a la onda theta.

Cambios en frecuencia de disparo

De acuerdo al resultado obtenido con la administración de 100ug/ul de pirilamina en la disminución del poder de theta, se consideró que una alteración en la frecuencia de descarga de las neuronas podría explicar esta reducción. Para evaluar esta posibilidad tomamos el promedio de las descargas de las neuronas para cada una de las sesiones correspondientes bajo su tratamiento respectivo. En la figura 9 se muestra que las descargas entre sesiones de la tarea y entre tratamientos no presentan diferencias significativas (ANOVA dos-vías, p > 0.05).

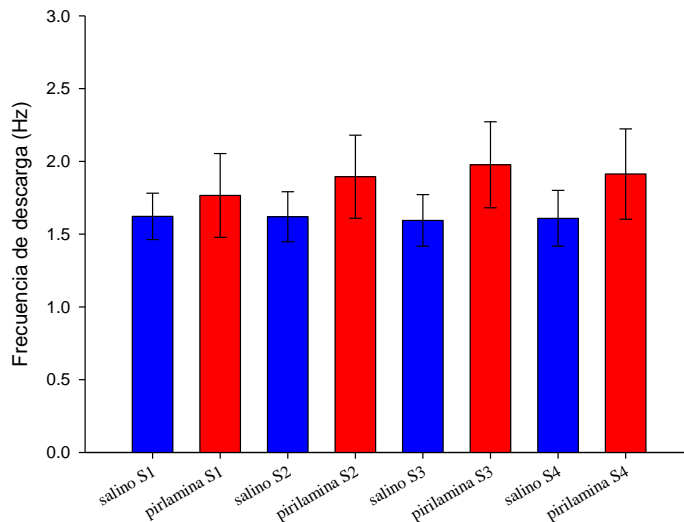


Figura 9: Frecuencia de disparo de la población de células para cada condición, durante la navegación. En azul las sesiones con salino. En rojo las sesiones con pirilamina 100ug/ul. ANOVA dos-vías $p > 0.05$

Este resultado indica que la explicación a la caída en el poder espectral de theta pudiese no estar dado por un cambio en la frecuencia de disparo de las células, sino que podría deberse a cambios en la coordinación de la actividad de las neuronas respecto a theta.

Cambios en la coordinación de descarga

Los resultados anteriores describen una reducción en el poder de theta, efecto provocado por la aplicación de una mayor dosis de pirilamina, lo que no pudo ser explicado por una alteración en la frecuencia de disparo de las neuronas ya que no hubo cambios en esta variable. Razón por la cual se evaluó si la reducción en theta se debe a alteraciones en el patrón de descarga de las células hipocampales bajo las distintas condiciones de tratamiento. Para analizar este punto se realizaron autocorrelogramas célula a célula y para la población de células en las distintas condiciones de tratamiento.

Primeramente, se observó el patrón de actividad de células individuales, en la figura 10 se muestra el ejemplo de una célula para cada condición. El patrón de descarga en las neuronas

con aplicación de salino (Fig.10A) y de 20ug/ul de pirilamina (Fig.10B) muestra que se mantiene a lo largo de las cuatro sesiones de navegación, junto con una ritmicidad característica de la oscilación theta. Los valores presentes al pie de cada gráfico indican la

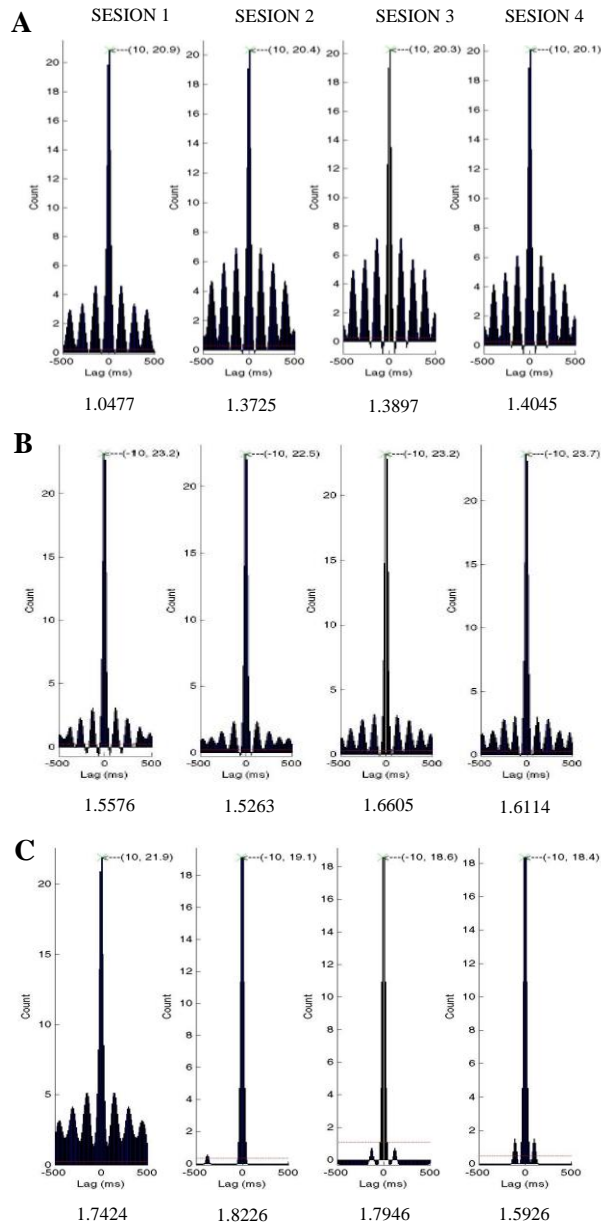


Figura 10: Autocorrelogramas de una célula por condición. **A)** autocorrelograma de una célula del grupo control (salino) registrada en las cuatro sesiones de la tarea. **B)** se grafica lo mismo que en **A)** pero para una célula del grupo tratamiento pirilamina 20ug/ul. **C)** Autocorrelograma de una célula del grupo tratamiento pirilamina 100ug/ul. Los valores al pie de cada gráfico indican la frecuencia de descarga (Hz) promedio de esta neurona. La línea roja indica 3 desviaciones estándar (99% intervalo de confianza).

frecuencia promedio de descarga de la neurona correspondiente a cada sesión. En la figura 10C se observa una célula del grupo tratamiento de 100ug/ul de pirilamina, cuyo patrón de

descarga muestra una pérdida en la coordinación oscilatoria durante las navegaciones 2 y 3, post-inyección del fármaco, pero que comienza a restituirse nuevamente en la última sesión de navegación. En la sesión 1 no se observaron cambios en este aspecto manteniendo una ritmicidad en sus descargas similar a la obtenida en la célula con salino (fig.10A).

El efecto de los distintos tratamientos sobre el patrón de descarga en la población de células registradas se muestra en las figuras 11. La actividad oscilatoria de las neuronas con la administración de salino (Fig.11A) se mantiene estable a través de las cuatro sesiones de la tarea. En la condición de pirilamina 20ug/ul (Fig.11B) el patrón de descarga de las células es semejante al obtenido en los autocorrelogramas de célula única (Fig.10B), cuya estabilidad se mantiene a lo largo de las sesiones de navegación. En la figura 11C se muestra el autocorrelograma poblacional en la condición de 100ug/ul del fármaco, en éste se observa una disminución del patrón oscilatorio en la sesión 2 (post administración de la droga) y en la sesión 3, pero que en la sesión 4 comienza a restaurarse esta actividad similar a la obtenida en la sesión 1. El patrón de actividad en la población de células es similar al observado en el autocorrelograma de célula individual (Fig.10C), el cual muestra una pérdida en el patrón oscilatorio de las neuronas.

Para evaluar si los resultados observados en los autocorrelogramas de población de células presentan variaciones significativas entre sus sesiones de navegación, se consideró el promedio de los datos normalizados de cada una de estas células en cada una de las sesiones para cada una de las condiciones tratadas. Este resultado se puede ver graficado en las figuras 11D, E, F y lo que se observa con la administración de salino (Fig.11D) y pirilamina 20ug/ul (Fig.11E) es una superposición de las curvas correspondiente a las cuatro sesiones, indicando que no existe una diferencia en patrón de autocorrelación poblacional, entre las sesiones de navegación en ambos casos.

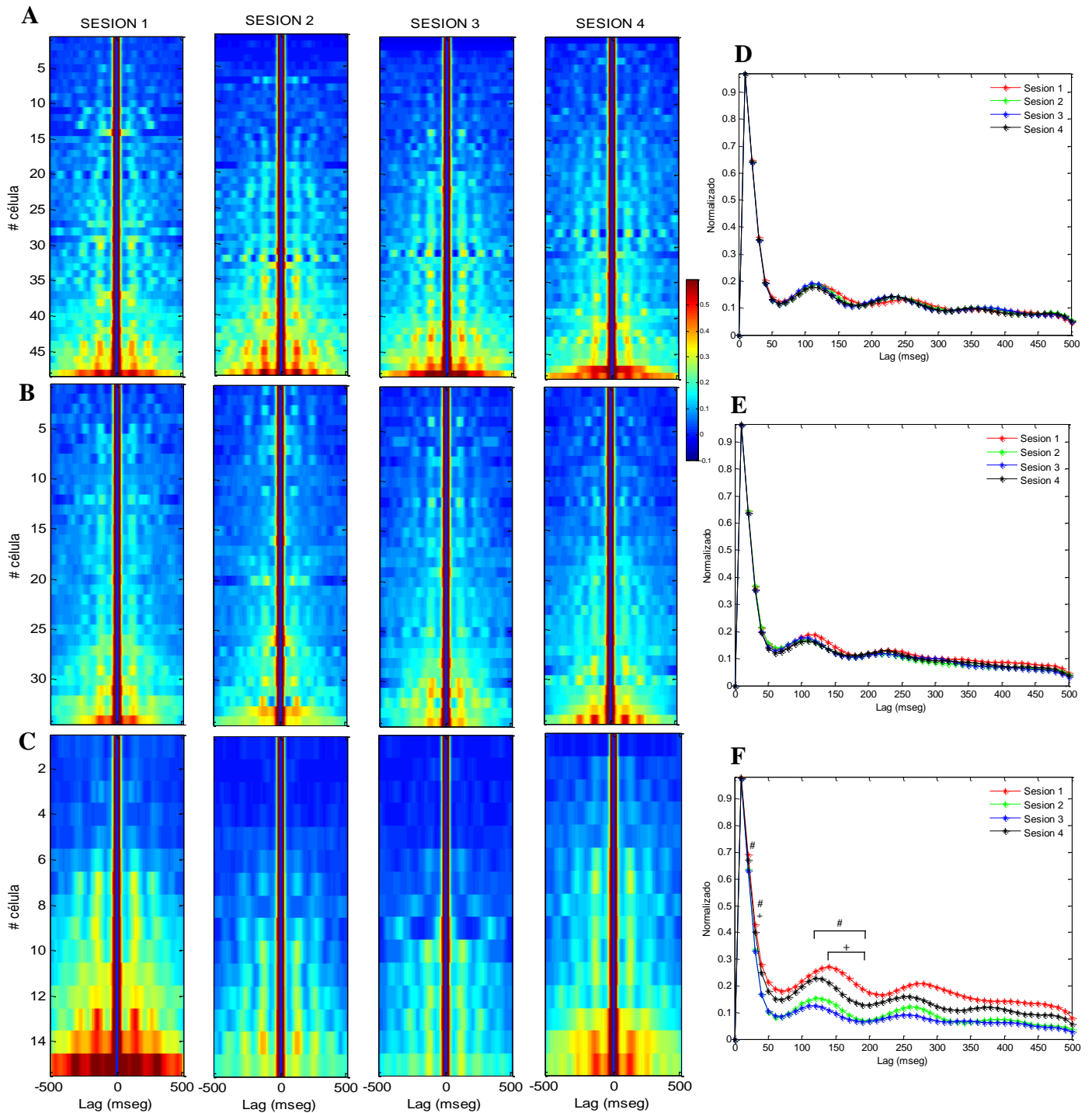


Figura 11: Mapa de color de autocorrelogramas de población de células que cumplieron los criterios indicados. **A)** Autocorrelogramas para cada sesión de la tarea bajo la condición salino, $n = 48$ células. **B)** Lo mismo que en A) bajo la condición pirilamina 20ug/ul, $n = 34$ células. **C)** Autocorrelogramas de la población de células bajo la condición pirilamina 100ug/ul, $n = 15$ células. **D), E) y F)** Promedio del número de eventos normalizado de la población de células en cada sesión de navegación de su respectiva condición de tratamiento. ANOVA on Ranks, post hoc Dunn's Test comparación S1 (control)-S2: +, $p < 0.05$. Comparación S1 (control)-S3: #, $p < 0.05$.

Un resultado distinto se observa en la figura 11F, perteneciente a la condición de pirilamina 100ug/uL, en que la superposición de las curvas deja en evidencia a las sesiones 2 (línea verde) (ANOVA on ranks * $p < 0.05$) y 3 (línea azul) (ANOVA on ranks # $p < 0.05$) con un patrón oscilatorio por debajo de la sesión 1 (control, línea roja), y que esta diferencia entre las curvas resulta ser significativa en algunos fragmentos temporales (20-30 mseg; 120-190 mseg, post hoc Dunn's Test). Por otro lado, la comparación entre la sesión 1 con la sesión 4 no resultaron tener diferencias significativas. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre la sesión 1/sesión 2, sesión 1/sesión 3 y sesión 1/sesión 4, ya que la primera sesión es un control dentro del mismo tratamiento. Cada punto de la curva representa un bin de 10 milisegundos, y cada uno de estos se comparó con el respectivo bin de la otra sesión. Este resultado respalda el efecto observado en la figura 10 y 11A, B, C, de célula individual y población de células, respectivamente, los cuales muestran que por acción de la mayor dosis del antagonista se genera una pérdida en el patrón oscilatorio de las neuronas hipocampales.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la factibilidad del diseño experimental de registros electrofisiológicos de espigas y LFP durante navegación acoplados a la manipulación farmacológica simultánea del sistema histaminérgico.

Como se pudo observar en la figura 7 el poder espectral considera un amplio rango de frecuencias (1-100 Hz), dentro del cual nos hemos enfocado en la oscilación theta para todos los análisis realizados en este trabajo. No obstante, en la figura es evidente notar un aumento en el poder de las oscilaciones en el rango beta (12-35 Hz) cuando el animal desarrolla la tarea de navegación pero no así cuando el animal esta en reposo. Estudios previos han demostrado la existencia de oscilaciones beta hipocampal con un aumento en su poder espectral durante navegación espacial, sin embargo, esta oscilación ha sido reportada cuando los animales navegan en ambientes nuevos, y luego este poder en la banda beta se reduce cuando el ambiente se hace familiar para el animal (Berke J. et al., 2008), por lo que un análisis más detallado de esta oscilación a lo largo de las sucesivas navegaciones durante el desarrollo de nuestra tarea sería apropiado para poder concluir detalladamente o determinar el potencial rol del sistema histaminérgico en este fenómeno. Por otro lado, se ha visto también un aumento de la oscilación beta junto con una disminución de la oscilación theta en paradigmas de aprendizaje asociativo donde la presentación de una clave espacial anticipaba una recompensa (Rangel LM. et al., 2015), sugiriendo un rol distinto para esta oscilación a lo ya descrito para oscilaciones del tipo theta. En esta misma línea y en nuestro caso, se podría considerar que el aumento de la oscilación beta observado en la figura 7 puede ser explicado por el momento en que la rata se aproxima a consumir la recompensa en cada extremo de la pista circular, análisis

más detallados y dirigidos a esta banda en particular serían necesarios para una mejor conclusión al respecto.

Suficiente evidencia ha descrito que las oscilaciones theta están presentes cuando el animal navega, obteniéndose un aumento de su poder espectral durante esta conducta con respecto a un estado de reposo. En este estudio, nuestros análisis muestran evidencia de un efecto sobre las oscilaciones hipocampales en el rango de frecuencia theta (4-12 Hz) registrado durante el movimiento del animal, provocando una disminución en el poder espectral de esta banda mediante el bloqueo del receptor H1 de histamina presente en la región del hipocampo (Palacios JM. et al., 1981), en concordancia con estudios previos en tareas de memoria de trabajo pero que implican navegación espacial. Los análisis de poder espectral en la banda theta muestran que una reducción de este poder, durante el movimiento del animal, fue provocado con la inyección intrahipocampal de pirilamina 100ug/ul, y este efecto fue observado inmediatamente post-inyección (sesión 2) del fármaco. Sin embargo, esta reducción en el poder de theta no fue vista con la administración de salino o pirilamina 20ug/ul. Por otro lado, el efecto del fármaco fue de carácter reversible como se observa en la figura 8B, ya que se puede ver en la sesión 4 como el poder de theta se restituye, aproximadamente, al mismo nivel de los salinos (control). A diferencia del efecto obtenido con la mayor dosis del antagonista, la respuesta con la dosis de 20ug/ul del fármaco no mostró cambios que dieran evidencias de algún efecto con esta dosis sobre el poder de la oscilación theta registrada durante el movimiento del animal, sugiriendo una acción dosis dependiente de la droga.

Debido a la estrecha relación entre las oscilaciones theta hipocampales y la descarga de las células piramidales durante el movimiento (O'Keefe J. et al., 1976; 1993) tomamos en consideración que la reducción en el poder de theta durante la navegación pudiese ser explicado simplemente por una reducción en la excitabilidad de las neuronas principales

hipocampales, por lo que una acción del antagonista en su mayor dosis tendría un efecto en la frecuencia de descarga de estas neuronas. Sin embargo, pudimos ver que no hubo cambios en la frecuencia de disparo de estas neuronas con la inyección de 100ug/ul de pirilamina, como se observa en la figura 9, pese a la reducción del poder theta. Este resultado revela que el cambio en theta no puede ser explicado por la vía de cambios en la frecuencia de descargas de las neuronas. Otros neuromoduladores tales como los canabinoides ha demostrado que pueden alterar el patrón temporal de descargas de células hipocampales en asociación con una reducción en el poder de theta (Robbe D. et al., 2006), sin alterar la frecuencia de disparo, sugiriendo que la coordinación temporal de la descarga de neuronas hipocampales durante la navegación pudiese ser crítica para los procesos de memoria. En vista de esta evidencia previa, nos interesó ver si la reducción en el poder de theta por acción del antagonista de los receptores H1 (pirilamina), podría provocar alteraciones similares a las observadas con canabinoides, en el patrón de descarga de las neuronas. Para ello, medimos este patrón mediante autocorrelogramas célula a célula y pudimos observar que bajo las dosis de salino y pirilamina de 20ug/ul el patrón temporal de descarga se mantuvo sin cambio, es decir altamente coordinada con la oscilación theta a lo largo de las cuatro sesiones (Fig.10A y B, respectivamente), esto quiere decir que la actividad oscilatoria de las place cells, en la región CA1 del hipocampo no fue afectada ni por salino ni tampoco por la dosis menor de pirilamina. Por el contrario, la actividad de las place cells en condiciones de mayor dosis del antagonista (100 ug/ul) resultó en una completa disrupción del patrón temporal de descargas oscilatorias, como se puede apreciar en el autocorrelograma (Fig.10C) y este efecto se observa, justamente, a partir de la sesión 2 en adelante, posterior a la inyección del antagonista del receptor H1. Al mirar la población de neuronas que cumplieron con los criterios de inclusión de ser place cells y poseer una distribución no uniforme en sus descargas asociado a la oscilación theta (Rayligh

test), los análisis de autocorrelaciones para la población de neuronas generan una respuesta al fármaco similar a la obtenida con las células individuales, puesto que con la menor dosis no se observa un cambio en el transcurso de las cuatro sesiones, pero con una mayor dosis de pirilamina el efecto poblacional es evidente en reducir la actividad oscilatoria del conjunto de neuronas, perdiéndose el patrón temporal en sus descargas, lo que contribuiría a explicar los efectos observados en la reducción del poder de la oscilación theta, durante el movimiento del animal, por acción de la mayor dosis de la droga, siendo posiblemente, la actividad coordinada de las neuronas en sus patrones de descarga las que contribuyen a la generación de oscilaciones del LFP en rango theta, similar a lo observado por el grupo de Buzsaki (2006), donde encontraron que la activación del receptor de canabinoide del tipo CB1, expresado en hipocampo, provocó una reducción en el poder de theta y una pérdida en la sincronía de las neuronas piramidales, asociado a deterioro cognitivo.

Existe suficiente evidencia que respalda la expresión de los receptores H1, H2 y H3 de histamina en la región CA1 y CA3 del hipocampo, además de la proyección de fibras histaminérgicas a estas regiones, es por esta razón que se ha visto que la histamina tiene un efecto sobre las neuronas hipocampales en la región CA3, provocando un aumento en la actividad de descarga de las células piramidales (Yanovsky Y. et al., 1998). Ahora, dado que la histamina aumenta la frecuencia de disparo de las células principales hipocampales pero el uso de antagonistas H1 no produce cambios importantes en la frecuencia de disparo de estas neuronas, es posible pensar que este neuromodulador cambia levemente el potencial de membrana de las células hipocampales principales siendo permisivo para que estas neuronas puedan acoplarse de mejor manera a eventos oscilatorios como la onda theta. Una explicación para esto pudiese ser que las neuronas de CA3, donde fue inyectado el antagonista, reduzcan su excitabilidad, sin embargo, la excitabilidad de las neuronas de la región CA1, que es donde

nosotros registramos la actividad neuronal, no se vea afectada en términos de frecuencia pero si en su capacidad de acoplarse a una oscilación en particular. Ya que ha sido documentado que la relación de descargas entre células piramidales de las regiones CA1 y CA3 son importantes en determinar la oscilación theta hipocampal (O'Keefe J. et al., 1993; Skaggs W. et al., 1996), esta pérdida en el patrón oscilatorio de los disparos de las células hipocampales registrados en CA1 nos llevan a pensar que la aplicación de pirilamina en la región CA3 estaría alterando la actividad en un porcentaje de células piramidales en CA1, a través de la conectividad existente entre ambas regiones vía colaterales de Schaffer, que proyecta inputs hacia CA1 desde CA3. Las células piramidales en CA1 descargan sincrónicamente y formando ensamblajes transitorios entre ellas durante el desplazamiento (Harris KD. et al., 2003), en este sentido entonces, lo observado en los autocorrelogramas de población de neuronas con la mayor dosis de pirilamina podría indicar que el bloqueo de los receptores H1 tiene un efecto sobre la actividad de las neuronas piramidales alterando su coordinación de descarga, lo que provocaría una pérdida en sincronía de ensambles neuronales durante el desplazamiento del animal, implicando una pérdida en las capacidades de codificar correctamente la información espacial que se obtiene de la actividad en conjunto de células hipocampales, a través del establecimiento de ensambles neuronales. Sin embargo, para respaldar con certeza esta posibilidad es necesario realizar más estudios en esta misma línea, que nos permitan confirmar el efecto del antagonista del receptor H1 sobre la actividad sincrónica y coordinada entre las células hipocampales de las distintas regiones de esta estructura, como por ejemplo poder determinar el efecto que tiene este fármaco directamente en la región inyectada.

Los resultados obtenidos podrían dar cuenta de las consecuencias negativas en los procesos de aprendizaje y memoria, a nivel conductual, que han sido observados por acción de

los antihistamínicos, hasta ahora. Los efectos obtenidos debido a la aplicación del fármaco podrían sugerir una acción negativa sobre las capacidades de las place cells de generar mapas espaciales o cognitivos durante la navegación espacial y podría ser una explicación mecánica posible a las alteraciones observadas durante la adquisición de memoria en presencia de antihistamínicos. Estos hallazgos sugieren que la histamina juega un rol importante en modular la actividad de poblaciones o redes neuronales hipocampales durante el proceso de aprendizaje. Los antihistamínicos podrían modificar la actividad de ensamblajes neuronales hipocampales durante la navegación espacial e incluso provocar la pérdida o inestabilidad de sus campos receptivos o *place field* (como ha sido visto en nuestro laboratorio, Sanchez et al. En preparación), siendo capaz de interrumpir el sustrato neurofisiológico necesario para la codificación y formación de nuevas memorias episódicas. De esta manera entender el mecanismo a través del cual la histamina actúa a nivel de actividad de ensamblajes neuronales en nuestro hipocampo nos dará luces de cómo los neuromoduladores son necesarios para la coordinación temporal de ensamblajes neuronales que se acoplan a oscilaciones del potencial de campo local. Es absolutamente plausible que otros neuromoduladores que actúan sobre el hipocampo tales como acetilcolina, noradrenalina o serotonina utilicen mecanismos similares para promover o disminuir las capacidades de memoria de nuestro sistema.

BIBLIOGRAFÍA

- Airaksinen MS, Panula P. (1988) The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. *J Comp Neurol.* 273(2):163-86.
- Alvarez EO (2009) Role of histamine on cognition. *Behavioral Brain Research* 199:183–189.
- Alvarez EO, Banzan AM (2001) Functional regional distribution of histamine receptors in the rat hippocampus: Modulation of learning of an active avoidance response. *J Neural Transm* 108:1249–1261.
- Alves-Rodrigues A, Timmerman H, Willems E, Lemstra S, Zuiderveld OP, Leurs R (1998) Pharmacological characterization of the histamine H3 receptor in the rat hippocampus. *Brain Research* 788:179–186.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor *Nature* 302(5911):832-7.
- Battaglia FP, Sutherland GR, McNaughton BL (2004) Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical “up-state” transitions. *Learn Mem* 11(6):697-704.
- Berry SD, Rinaldi PC, Thompson RF, Verzeano M (1978) Analysis of temporal relations among units and slow wave in rabbit hippocampus. *Brain Res Bull* 3(5):509-18.
- Berke JD, Hetrick V, Breck J, Greene RW (2008) Transient 23-30 Hz oscillation in mouse hippocampus during exploration of novel environments. *Hippocampus* 18:519–529.

- Blandina P, Munari L, Provensi G, Passani MB (2012) Histamine neurons in the Tuberomammillary Nucleus: a whole center of distinct subpopulations? *Frontiers in Systems Neuroscience* 6(33):1-6.
- Bohbot VD, Kalina M, Stepankova K, Spackova N, Petrides M, Nadel L (1998) Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychology* 36(11):1217-38.
- Bragin A, Jandó G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, January 15(1): 47-60.
- Brown RE, Haas HL (1999) On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *J Physiol.* 515:777-86.
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL (2001) The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology* 63:637–672.
- Buzsáki G (2002) Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33:325–340.
- Buzsáki G, Anastassiou C A, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents- EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience* 13:407-420.
- Chen Z, Kamei C (2000) Facilitating effects of histamine on spatial memory deficit induced by scopolamine in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 21(9):814-818.
- Clark EA, Hill SJ (1996) Sensitivity of histamine H3 receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma[S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol.* 296(2):223-5.

- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15:260-272.
- Cornwell BR, Overstreet C, Grillon C (2014) Spontaneous fast gamma activity in the septal hippocampal region correlates with spatial learning in humans. *Behavioural Brain Research* 261:258– 264.
- Dere E, Zlomuzica A, De Souza Silva MA, Ruocco LA, Sadile AG, Huston JP (2010) Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behavioural Brain Research* 215:209–220.
- Foster D, Wilson M (2007) Hippocampal Theta Sequences. *Hippocampus* 17(11):1093-9.
- Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev. Neuroscience* 4:121-130.
- Haas H, Sergeeva O, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 88:1183-1241.
- Harris KD, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, Czurkó A, Buzsáki G (2002) Spike train dynamics predicts theta related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 417:738-741.
- Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, Dragoi G, Buzsáki G (2003) Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424:552-556.
- Hasselmo ME, Bodelon C, Wyble BP (2002) A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput.* 14(4):793-817.

- Higuchi M, Yanai K, Okamura N, Meguro K, Arai H, Itoh M, Iwata R, Ido T, Watanabe T, Sasaki H (2000) Histamine H1 receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography. *Neuroscience* 99(4):721-9.
- Itskov V, Pastalkova E, Mizuseki K, Buzsáki G, Harris KD (2008) Theta-mediated dynamics of spatial information in hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 28(23):5959–5964.
- Jin CY, Kalimo H, Panula P (2002) The histaminergic system in human thalamus: correlation of innervation to receptor expression. *European Journal of Neuroscience* 15:1125-1138.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci.* 12:1222-1223.
- Girardeau G, Zugaro M (2011) Hippocampal Ripples and Memory Consolidation. *Current Opinion in Neurobiology* 21:452-459.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T *Principles of neural science*. McGraw-Hill 4th edition 2000.
- Köhler CA, Da Silva WC, Benetti F, Bonini J Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. *Neural Plasticity* 2011:1-16.
- Lubenov EV, Siapas AG (2009) Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 459:534-539.
- Macrides F. (1975) Temporal relationships between hippocampal slow waves and exploratory sniffing in hamsters. *Behav Biol.* 14:295–308.

- Martinez Mir MI, Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC, Palacios JM, (1990) Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates. *Brain Res.* 526:322–327.
- Masuoka T, Kamei C (2007) Role of hippocampal H1 receptors in radial maze performance and hippocampal theta activity in rats. *Brain Research Bulletin* 73:231–237.
- Masuoka T, Mikami A, Yasuda M, Shinomiya K, Kamei C (2007) Effects of histamine H1 receptor antagonists on hippocampal *theta* rhythm during spatial memory performance in rats. *European Journal of Pharmacology* 576:77–82.
- Milner Brenda (1977) Memory mechanisms. *CMA journal* 116:1374-1376.
- Nádasdy Z, Hirase H, Czurkó A, Csicsvari J, Buzsáki G (1999) Replay and Time Compression of Recurring Spike Sequences in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 19(21):9497–9507.
- Nakashiba T, Buhl D, McHugh T, Tonegawa S (2009) Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron* 62:781–787.
- Ogomori K, Kitamoto T, Tateishi J, Sato Y, Suetsugu M, Abe M (1989) β -Protein Amyloid Is Widely Distributed in the Central Nervous System of Patients with Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology* 134(2):243-251.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34:171-175.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology* 51:78-109.

- O'Keefe J, Recce ML (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3(3):317-330.
- Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81(8):2572-2676.
- Panula P, Flügge G, Fuchs E, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the mammalian spinal cord. *Brain Res* 484(1-2):234-9.
- Palacios JM, Wamsley JK, Kuhar MJ (1981) The distribution of histamine H1-receptors in the rat brain: an autoradiographic study. *Neuroscience* 6:15–37.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28(3):585-610.
- Paxinos G. and Watson Ch. *The rat brain, in stereotaxic coordinates*. Elsevier, 2007.
- Penfield Wilder (1958) Some mechanisms of consciousness discovered during electrical stimulation of the brain. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 44(2):51-66.
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H3 receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114(1):173-193.
- Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52(1):169-89.
- Ranade S, Hangya B, Kepecs (2013) A Multiple modes of phase locking between sniffing and whisking during active exploration. *The Journal of Neuroscience* 33(19):8250 – 8256.

- Rangel LM, Chiba AA, Quinn LK (2015) Theta and beta oscillatory dynamics in the dentate gyrus reveal a shift in network processing state during cue encounters. *Front. Syst. Neurosci.* 9(96):1-10.
- Robbe D, Buzsaki G (2009) Alteration of theta timescale dynamics of hippocampal place cells by a cannabinoid is associated with memory impairment. *Journal of Neuroscience* 29(40):12597-12605.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nature Neuroscience* 9(12):1526-1533.
- Schlicker E, Behling A, Lümmer G, Göthert M (1992) Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 345(4):489-93.
- Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M, Göthert M (1994) Modulation of neurotransmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 8(2):128-37.
- Scoville W, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 20:11-21.
- Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA (2005) Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* 46:141–151.
- Skaggs WE, McNaughton BL, Gothard KM (1992) An Information-Theoretic Approach to Deciphering the Hippocampal Code. *Advances in Neural Information Processing System* 5:1030-1037.

- Skaggs WE, McNaughton BL, Wilson MA, Barnes CA (1996) Theta Phase Precession in Hippocampal Neuronal Populations and the Compression of Temporal Sequences. *Hippocampus* 6:149-172.
- Squire LR Memory and Brain Systems: 1969 –2009. (2009) *The Journal of Neuroscience* 29(41):12711–12716.
- Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL. (2012) Histamine and motivation. *Front Syst Neurosci* 6(51):1-14
- Traiffort E, Pollard H, Moreau J, Ruat M, Schwartz JC, Martinez Mir MI, Palacios JM (1992) Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [¹²⁵I]iodoaminopotentidine. *J. Neurochem.* 59(1):290-9.
- Trimper JB, Stefanescu RA, Manns JR (2013) Recognition Memory and Theta–Gamma Interactions in the Hippocampus. *Hippocampus* 24:341–353.
- Valdés JL, McNaughton BL, Fellous J-M (2015) Offline reactivation of experience-dependent neuronal firing patterns in the rat ventral tegmental area. *J Neurophysiol.* 114:1183–1195.
- Valdés JL, Maldonado P, Recabarren M, Fuentes R, Torrealba F (2006) The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat. *European Journal of Neuroscience* 23:1352-1364.
- Valdés JL, Sánchez C, Riveros ME, Blandina P, Contreras M, Farías P, Torrealba F (2010) The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *Eur J Neurosci.* 31(11):2073-85.

- Van Ruitenbeek P, Vermeeren A, Riedel W (2009) Histamine H1- receptor blockade in humans affects psychomotor performance but not memory. *British Journal of Pharmacology* 157(1):76-85.
- Villemagne VL, Dannals RF, Sánchez-Roa PM, Ravert HT, Vazquez SV, Wilson AA, Natarajan TK, Wong DF, Yanai KY, Wagne, Jr HN (1991) Imaging histamine H1 receptors in the living human brain with Carbon-11-Pyrimilamine. *The Journal of Nuclear Medicine* 32(2):308-311.
- Vohora D, Bhowmik M (2012) Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Frontiers in Systems Neuroscience* 6(72):1-10.
- Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295(1):13-25.
- Xu LS, Fan YY, He P, Zhang WP, Hu WW, Chen Z (2009) Ameliorative effects of histamine on spatial memory deficits induced by scopolamine infusion into bilateral dorsal or ventral hippocampus as evaluated by the radial arm maze task. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* 36(8):816-21.
- Yanovsky Y, Haas H (1998) Histamine increases the bursting activity of pyramidal cells in the CA3 region of mouse hippocampus. *Neuroscience Letters* 240:110-112.
- Zar Jerrold H (1974) Probabilities of Rayleigh's test statistics for circular data. *Behavior Research Methods & Instrumentation* 6(4):450-450.

ANEXO 1

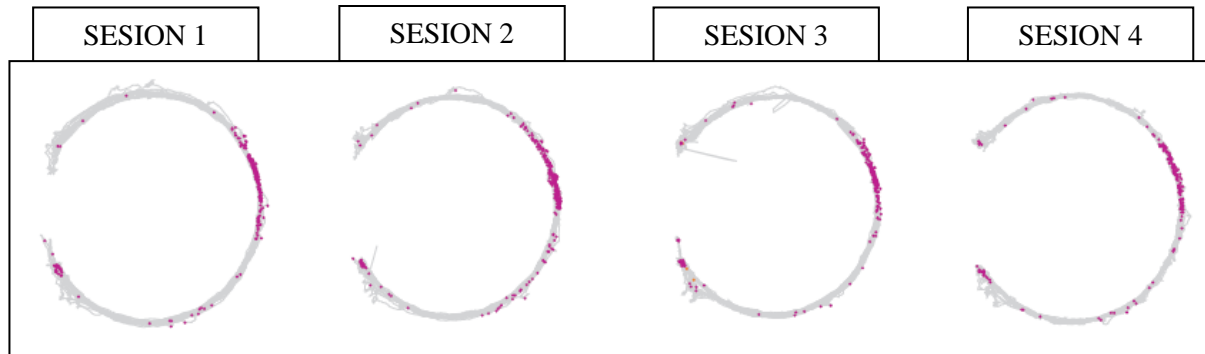


Figura 1: Descarga de place cell sobre un laberinto circular. Registro de animal control. En cada sesión la descarga de la célula ocurre en la misma región (place field). Notar la estabilidad del place field a lo largo de las cuatro sesiones.

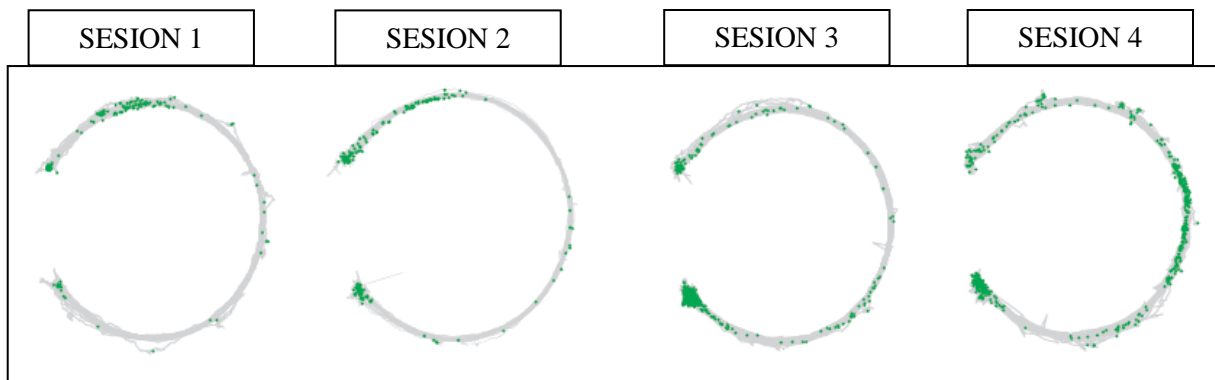


Figura 2: Descarga de place cell sobre laberinto circular. Registro de animal tratamiento, inyección de pirilamina antes de iniciar la sesión 2. A partir de la sesión 2 se observa un cambio en el sitio de descarga de la place cell. Nótese el desplazamiento (o pérdida de la estabilidad) del place field desde la sesión 1 (pre inyección) a la sesión 4 (post inyección).

ANEXO 2

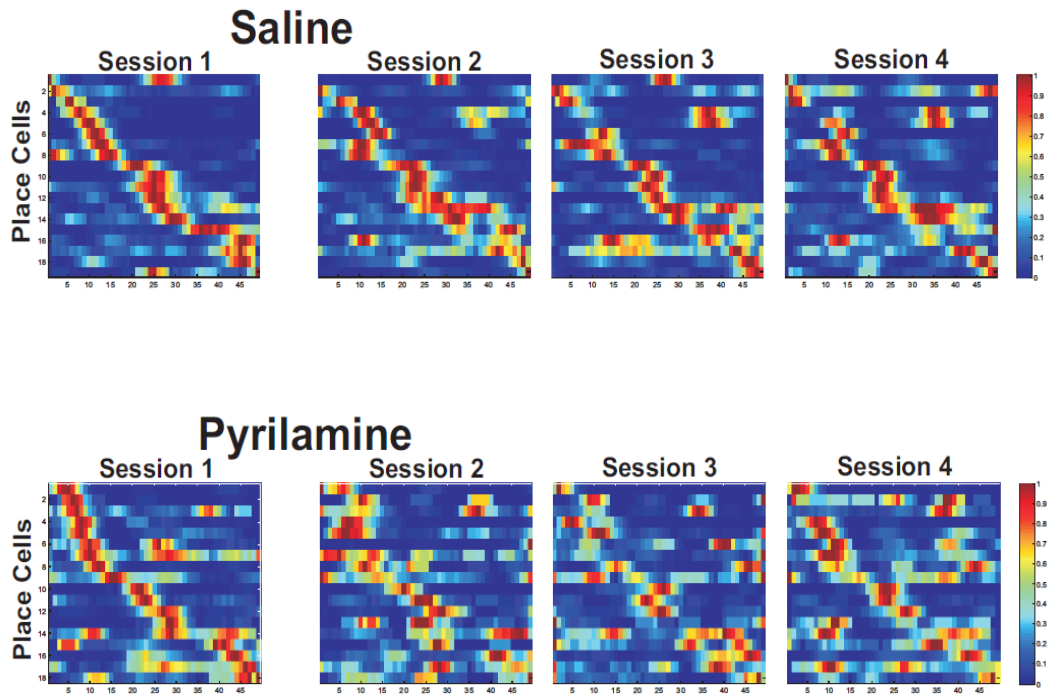


Figura 3: Actividad de descarga de place cells en laberinto circular. Arriba salino, abajo pirilamina. Notar que la aplicación de pirilamina provoca una pérdida en la consistencia del lugar de descarga de las place cells, se observa un desorden de los place field con la administración de pirilamina (sesión 2, 3 y 4, con respecto al salino).