



**ACTIVIDAD PLÁSTICA Y OSCILATORIA POBLACIONAL  
ESPONTÁNEA Y PROVOCADA EN CONEXIONES  
NEURONALES EN UN MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD  
DE ALZHEIMER.**

**Autor:**

**CÉCILE GAUTHIER UMAÑA**

**Ingeniera electrónica**

**Master en ingeniería electrónica y de computadores**

**Trabajo presentado como requisito para optar por el  
título de Doctor en Ciencias Biomédicas y Biológicas**

**Director:**

**MAURICIO O. NAVA-MESA, MD, MSC, PHD**

**Universidad del Rosario**

**Co-Director:**

**FRANCISCO ALEJANDRO MÚNERA GALARZA, MD, MSc, PhD**

**Universidad Nacional de Colombia**

**Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas**

**Universidad del Rosario**

**Bogotá – Colombia**

**2023**

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a quienes me acompañaron en este camino. A mis profesores, Mauricio Nava, Alejandro Múnera y Mario Valderrama, quienes creyeron en mí y me dieron la posibilidad de cumplir este sueño. Gracias por sus enseñanzas, sus consejos, su tiempo y sobre todo por su ejemplo. A Jonathan, sin su ayuda, paciencia y amistad, este trabajo no sería posible. A todos mis compañeros por su apoyo y compañía.

A mi familia quienes siempre han creído en mí, muchas veces más que yo misma. Abuelita con tu ejemplo y cariño, Peri con tu presencia y ayuda constante, Analu por todo tu apoyo y tu incondicionalidad.

Papá gracias por tu apoyo y tu ejemplo. Mamita, yo sé que estarías tan feliz, fuiste tu quien me enseñó, me guió y me trajo hasta acá, me habría encantado que me vieras graduarme, pero sé que desde el cielo me acompañarás siempre. Valérie, usted me ha motivado y acompañado en todo, es mi gran amiga, compañera, confidente, cómplice, no tengo palabras, gracias por todo!

Brayan, mi amor, gracias por ayudarme a seguir mis sueños, por estar siempre a mi lado, por la familia tan linda que tenemos, por siempre hacerme feliz.

María Emilia y Eloísa ustedes son mi gran amor, el motor de mi vida, esta tesis es para ustedes.

Cécile

## Abreviaturas

AAC	Amplitude amplitude coupling
A $\beta$	Amiloide- $\beta$
AP	Action potentials
APP	Amyloid precursor protein
CA	Cornus Ammonis
CFC	Cross frequency coupling
CWD	Choi Williams distribution
DG	Giro dentado
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAF	Estimulación de alta frecuencia
EAP	Extracellular action potential
ECoG	Electrocortigrama
EEG	Electroencefalografía
EMG	Electromiografía
ERP	Event related potentials
d.f.	Freedom degrees
FFT	Fast Fourier Transform
Fq	Frecuencia
FT	Fourier Transform
GAP	Gap junctions
GUI	Graphic user interface
HFO	High frequency oscillation
HFS	High frequency stimulation
INB	Red interneuronal $\beta$
ING	Red interneuronal
LFP	Local field potentials
LIA	Large irregular activity
LTP	Long term potentiation
MCI	Mild cognitive impairment
MI	Modulation index
PAC	Phase amplitude coupling
PC	Phase coherence

PINB	Red pyramidal interneuronal $\beta$
PING	Red pyramidal interneuronal
PPC	Phase to phase coupling
PSD	Power spectral density
PSP	Postsynaptic potentials
RE	Neuronas reticulares talámicas
REM	Rapid eye movement
SIA	Small irregular activity
TC	Neuronas talamocorticales
BOARD-FTD-PACC	Brain Oscillations Analysis and Resourceful Display in Frequency and Time Domains Plus Phase Amplitude Coupling and Coherence

# Tabla de contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1. Ritmos cerebrales</b> .....	<b>15</b>
2.1.1. Breve historia de la electroencefalografía.....	15
2.1.2. Oscilaciones del cerebro humano.....	16
2.1.3. Relación en la actividad oscilatoria cerebral y la función cognitiva .....	21
<b>2.2. Mecanismos neurobiológicos de las oscilaciones cerebrales</b> .....	<b>23</b>
2.2.1. Oscilaciones de baja frecuencia.....	23
2.2.2. Oscilaciones de alta frecuencia.....	25
2.2.3. Oscilaciones neuronales en diferentes condiciones patológicas.....	26
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Objetivo general.....	29
4.2. Objetivos específicos .....	29
<b>5. CAPÍTULO 1. BOARD-FTD-PACC: UNA INTERFAZ GRÁFICA DE USUARIO PARA EL ANÁLISIS SINÁPTICO Y DE FRECUENCIAS CRUZADAS DERIVADO DE SEÑALES NEURONALES</b>	

<b>5.1. Marco teórico .....</b>	<b>30</b>
5.1.1. Caracterización de las oscilaciones cerebrales.....	30
5.1.2. Herramientas de análisis y visualización.....	32
<b>5.2. Metodología .....</b>	<b>34</b>
5.2.1. Caracterización en el dominio del tiempo de las oscilaciones.....	34
5.2.2. Componente espectral de la actividad oscilatoria .....	40
5.2.3. Representación de las oscilaciones en tiempo-frecuencia.....	44
5.2.4. Caracterización de las interacciones entre frecuencias .....	49
<b>5.3. Resultados.....</b>	<b>56</b>
5.3.1. Configuración inicial.....	58
5.3.2. Carga de datos.....	58
5.3.3. Unidad de procesamiento en el tiempo .....	61
5.3.4. Unidad de procesamiento en la frecuencia y filtrado .....	64
5.3.5. Unidad de procesamiento en la frecuencia y potencia.....	65
5.3.6. Unidad de procesamiento en tiempo-frecuencia.....	67
5.3.7. Unidad de procesamiento de acople (PAC y PC).....	69
<b>5.4. Conclusiones y discusión .....</b>	<b>71</b>
<b>6. CAPÍTULO 2. EFECTOS AGUDOS DE B-AMILOIDE EN LA ACTIVIDAD OSCILATORIA Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL CIRCUITO CA3-CA1 DEL HIPOCAMPO.....</b>	<b>76</b>
<b>6.1. Marco teórico .....</b>	<b>76</b>
6.1.1. Enfermedades de Alzheimer.....	76
6.1.2. Oscilaciones Características del hipocampo.....	84
6.1.3. Efectos del $\beta$ -Amiloide sobre la actividad del hipocampo y sus implicaciones en la memoria .	90
<b>6.2. Metodología .....</b>	<b>92</b>
6.2.1. Declaración ética.....	92
6.2.2. Animales .....	93
6.2.3. Diseño experimental .....	93
6.2.4. Cirugía.....	95
6.2.5. Electrofisiología extracelular in vivo: .....	95
6.2.6. Preparación del vehículo y soluciones de B-Amiloide:.....	97
6.2.7. Microinyección intrahippocampal .....	97
6.2.8. Análisis de datos.....	97
6.2.9. Estadística:.....	99
<b>6.3. Resultados.....</b>	<b>99</b>

6.3.1.	A $\beta$ no alteró la eficiencia sináptica, pero indujo cambios en la variabilidad sináptica .....	99
6.3.2.	A $\beta$ afectó la plasticidad sináptica a largo plazo.....	99
6.3.3.	A $\beta$ 25 – 35 indujo un aumento en la densidad de poder espectral (PSD) relativo en las bandas $\gamma$ y HFO1 .....	102
6.3.4.	La inyección de A $\beta$ alteró el acople $\theta$ $\gamma$ y afectó los cambios inducidos por la estimulación de alta frecuencia.....	106
6.4.	<b>Conclusiones y discusión .....</b>	<b>107</b>
7.	<b>PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN A CORTO Y MEDIANO PLAZO .....</b>	<b>111</b>
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>113</b>

## Tabla de figuras

Figura 1. ....	16
Figura 2. ....	17
Figura 3. ....	18
Figura 4. ....	19
Figura 5. ....	24
Figura 6. ....	35
Figura 7. ....	35
Figura 8. ....	36
Figura 9. ....	37
Figura 10. ....	37
Figura 11. ....	38
Figura 12. ....	38
Figura 13. ....	39
Figura 14. ....	40
Figura 15. ....	40
Figura 16. ....	41
Figura 17. ....	42
Figura 18. ....	43
Figura 19. ....	44
Figura 20. ....	45

Figura 21.....	46
Figura 22.....	47
Figura 23.....	48
Figura 24.....	48
Figura 25.....	49
Figura 26.....	51
Figura 27.....	53
Figura 28.....	55
Figura 29.....	57
Figura 30.....	60
Figura 31.....	62
Figura 32.....	63
Figura 33.....	64
Figura 34.....	65
Figura 35.....	66
Figura 36.....	68
Figura 37.....	70
Figura 38.....	71
Figura 39.....	77
Figura 40.....	78
Figura 41.....	78

Figura 42. ....	79
Figura 44. ....	81
Figura 45. ....	82
Figura 46. ....	85
Figura 47. ....	86
Figura 49. ....	98
Figura 50. ....	101
Figura 52. ....	107

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común y desorden neurodegenerativo progresivo a nivel mundial, su diagnóstico es tardío y difícil, es por esta razón que se busca encontrar biomarcadores que permitan tener un diagnóstico temprano. La evidencia reciente indica que las especies solubles de amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ) inducen desequilibrios en la transmisión excitatoria e inhibitoria, lo que resulta en el deterioro funcional de la red neuronal y los déficits cognitivos durante las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer (EA).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos agudos del péptido  $A\beta$  en el hipocampo estudiando la actividad oscilatoria y plasticidad sináptica en el circuito CA3-CA1 a través de las fibras comisurales y la fimbria.

Con este fin, se ha desarrollado y diseñado una nueva interfaz gráfica de usuario (*Graphic User Interface GUI*), denominada BOARD-FTD-PACC (*Brain Oscillations Analysis and Resourceful Display in Frequency and Time Domains Plus Phase Amplitude Coupling and Coherence*), que facilita la visualización y análisis de los registros neurofisiológicos. En un software flexible y fácil de usar que puede ser utilizado por usuarios con formaciones diversas para extraer información valiosa de las señales neurofisiológicas como el acoplamiento fase-amplitud y la densidad espectral de potencia relativa, entre otros.

Para evaluar los efectos in vivo de dos especies de  $A\beta$  ( $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$ ) sobre la transmisión sináptica y la plasticidad de CA3 a CA1 (cCA3 a CA1) comisural, y la actividad oscilatoria de CA1, utilizamos microinyecciones intrahipocampales agudas en ratas Wistar macho adultas anestesiadas. La especie  $A\beta_{25-35}$  es una variedad artificial, altamente soluble, que no se encuentra en el cerebro, pero que permite evaluar el efecto de la región más tóxica del péptido, mientras que  $A\beta_{1-40}$  está presente en estado natural y nos permite evaluar alteraciones naturales en pacientes con EA.

La microinyección de  $A\beta$  soluble aumentó la variabilidad sináptica de cCA3 a CA1 sin cambios significativos en la eficiencia sináptica, e hizo ineficaz la estimulación de alta frecuencia de CA3 para inducir la potenciación a largo plazo y para aumentar la variabilidad sináptica en CA1. La microinyección también aumentó significativamente la potencia relativa de las

oscilaciones de la banda  $\gamma$  y desplazó significativamente el vector promedio del acoplamiento fase-amplitud (PAC)  $\theta - \gamma$  en CA1, impidió el desplazamiento del acople  $\theta - \gamma$  inducido por la estimulación de alta frecuencia en CA3. Ninguno de estos efectos se observó en los animales inyectados con vehículo.

Estos resultados proporcionan evidencias adicionales de que las especies solubles de  $A\beta$  inducen disfunción sináptica causando variabilidad sináptica anormal, plasticidad deteriorada a largo plazo y actividad oscilatoria alterada, lo que lleva a cambios de la actividad de la red en el hipocampo.

# 1. Introducción general

Actualmente más de 46.8 millones de personas sufren de demencia (1), siendo la EA el tipo más común, así como el principal trastorno neurodegenerativo progresivo. La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad y en personas mayores de 90 años es del 50% (2). A medida que aumenta la esperanza de vida, aumenta el número de afectados generando un costo, familiar, social y económico. Se espera que para el 2030 el número de casos en personas mayores a 65 años suba del 7 al 12% (3). La EA se caracteriza por presentar una pérdida neuronal selectiva y dos hallazgos histopatológicos en tejido post mortem: placas amiloides extracelulares compuestas por péptidos beta amiloide ( $A\beta$ ) y ovillos neurofibrilares intracelulares cuyo componente principal es la proteína tau hiperfosforilada (4). Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la EA, esto se debe principalmente a que su diagnóstico es tardío y los síntomas aparecen con la degeneración del tejido cuando ya el tratamiento no es eficaz. Detectar entonces de forma temprana la EA es un reto importante que permitiría prevención de la degeneración y el tratamiento adecuado de los síntomas. Por lo tanto, determinar biomarcadores que nos lleven a este diagnóstico es de vital importancia (5). Para esto, es importante entender los efectos de las formas solubles del péptido  $A\beta$  ya que estas inducen a un desequilibrio de los sistemas glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico que resulta en un deterioro funcional de redes neuronales durante las etapas tempranas de la enfermedad (6–9). La disfunción sináptica inducida por los péptidos  $A\beta$ , puede explicar el deterioro cognitivo leve, una etapa prodrómica de la EA, así como el deterioro de la memoria durante sus primeras etapas (10,11). En altas concentraciones, dicho péptido afecta principalmente el hipocampo (12), lo que explica el orden de la aparición de los síntomas.

La comprensión de los mecanismos que subyacen la enfermedad, así como del papel fisiológico de los péptidos amiloides nos puede llevar a comprender mejor el desarrollo de la EA y posiblemente abrir la puerta a un diagnóstico temprano y un posible tratamiento. Es por esta razón que estudiar el hipocampo en presencia del péptido  $A\beta$  antes que se produzcan lesiones cerebrales evidentes es pertinente. Se conocen los efectos del  $A\beta$  a nivel celular, pero existen muy pocos estudios sobre su inferencia en la actividad oscilatoria de los circuitos cerebrales. Los desequilibrios a nivel celular alteran las oscilaciones neuronales las cuales se ven reflejadas

en los registros electrofisiológicos y detectar estos cambios nos permitiría realizar un análisis funcional del sistema completo *in vivo*.

Desde los primeros registros electroencefalográficos (EEG) realizados por Hans Berger (13), la actividad oscilatoria cerebral, ha sido asociada con procesos cognitivos. Desde entonces, los avances en técnicas neurofisiológicas, los métodos de adquisición, la capacidad computacional y procesamiento de señales han permitido obtener importantes descubrimientos acerca de la función de estructuras cerebrales específicas y su relación con el comportamiento y los procesos cognitivos (14).

El análisis de registros neurofisiológicos puede requerir diferentes enfoques metodológicos con diversos niveles de complejidad, que van desde la cuantificación de la amplitud y la latencia en registros en neuronas individuales hasta el análisis de la actividad coordinada de una red de las señales registradas de respuestas en varios cientos de miles de neuronas individuales. Adicionalmente, la variabilidad en procedimientos y protocolos experimentales, así como la diversidad del tipo de información que se busca extraer de los registros aumentan la complejidad. Para realizar estos análisis, se extraen de manera manual un número alto de mediciones, este es un proceso tedioso que consume gran cantidad tiempo, es subjetivo y limitado.

En este sentido, desarrollar una herramienta que permita llevar a cabo los estudios de forma semiautomática, aprovechando el conocimiento del experimentador y la velocidad de una interfaz gráfica, así como la implementación de métodos que no se pueden realizar de manera manual, permitirá entender mejor el sistema que queremos estudiar y puede aportar claridad y un mejor entendimiento de los procesos de la EA.

En este documento se presenta el marco teórico de lo que conocemos del origen y función de las diferentes oscilaciones cerebrales que se van a estudiar, así como el trabajo realizado durante la presente tesis doctoral. En el primer capítulo se mostrarán en detalle los métodos de análisis existentes, así como la forma en la que se implementaron en la herramienta BOARD-FTD-PACC (software desarrollado durante la presente tesis). En el capítulo 2, presentaremos los efectos *in vivo* de microinyecciones intrahipocampales de A $\beta$  sobre la transmisión sináptica y la plasticidad de CA3 a CA1 (cCA3 a CA1) comisural, y la actividad oscilatoria en el hipocampo, los cuales se podrían usar como biomarcadores tempranos de la EA.

## **2. Marco teórico**

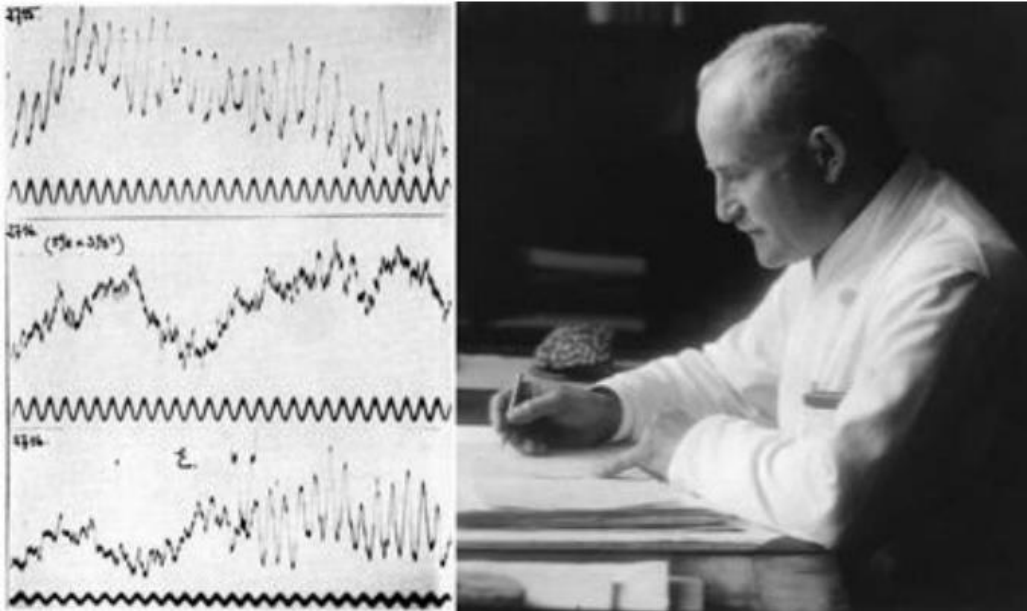
### **2.1. Ritmos cerebrales**

#### **2.1.1. Breve historia de la electroencefalografía**

Las raíces de los estudios de electrofisiología se remontan a investigaciones realizadas por científicos como Luigi Galvani (1737-1798), Alessandro Volta (1755-1798), George Ohm (1787-1854) y Michael Faraday (1791-1867). Ellos generaron una comprensión general de los potenciales eléctricos y de la corriente, demostrando así que los organismos y sus tejidos pueden generar actividad de este tipo y la importancia de su rol en procesos biológicos tales como el movimiento muscular (15).

En el caso particular del tejido cerebral se realizaron avances muy importantes. Por ejemplo, Richard Caton (1842-1926) en 1874, usando un galvanómetro reflector, proyectó ondas cerebrales de simios y conejos, en donde observó que éstas aumentaban en el sueño y desaparecían en el momento de la muerte. Más tarde en 1890, Adolf Beck mediante estudios en ranas, caracterizó la respuesta cerebral a la estimulación sensorial (1863-1942), encontrando así respuestas evocadas, así como actividad espontánea de los potenciales cerebrales (16). Por otro lado, en 1913 Vladimir Pravdich-Neminsky (1879-1952), publicó el primer electroencefalograma (EEG) y registro de potenciales evocados en el cerebro de un mamífero (13).

El primero en registrar las variaciones del cerebro humano fue el neurólogo y psiquiatra alemán Hans Berger (1873-1941) (Figura 1), quien, experimentando en el mismo y en su hijo, registró los primeros EEG en humanos en 1924 (13). Sus descubrimientos fueron publicados en 1929, así como la caracterización de los ritmos “ $\alpha$ ”, los cuales en 1937 fueron confirmados (17). Finalmente, los primeros registros invasivos fueron realizados por Otfried Foerster (1873-1941) y Herbert Altenburger (18).



*Figura 1.*

*Hans Berger (1873-1941). En la parte izquierda se muestran los primeros registros de EEG en humanos (19).*

El desarrollo de nuevos sistemas de adquisición, y los avances en las cirugías estereotáxicas y en los electrodos, han llevado a nuevas técnicas de registro estándar utilizadas actualmente tanto en clínica como en investigación. Existen diferentes tipos de EEGs, los que miden señales en la superficie (con electrodos ubicados en cuero cabelludo) y los intracraneales, que son de carácter invasivo. Para estos últimos existen electrocortigramas (ECoG) y registros de profundidad (20); cada una de estas técnicas tiene objetivos y alcances diferentes.

### **2.1.2. Oscilaciones del cerebro humano**

Los ritmos y patrones periódicos de actividad se pueden encontrar en diferentes especies, las cuales son producto de condiciones ambientales e internas del propio individuo, como por ejemplo los ciclos circadianos (21). Esta actividad rítmica se encuentra a diversas escalas y en los sistemas de nuestro cuerpo. En el caso del cerebro, existen actividades oscilatorias tanto en la corteza, como en estructuras particulares e incluso en grupos neuronales particulares que pueden ser detectadas y medidas mediante electrodos de superficie (Figura 2) (22)Figura 2.

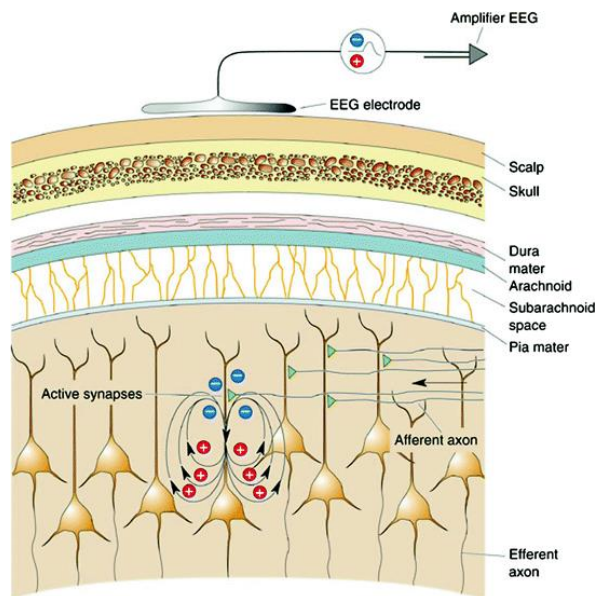


Figura 2.  
Registro de EEG superficial. (22)

En efecto, cuando se transmite información en la sinapsis entre dos neuronas, se generan corrientes extracelulares en las dendritas de la neurona receptora, llamados potenciales post sinápticos (*Postsynaptic potentials* PSP). Estas corrientes se transmiten en el cerebro y pueden ser registradas por un electrodo. Cuando un grupo de neuronas disparan sincrónicamente en respuesta a un estímulo, se puede medir un cambio en el voltaje del EEG, llamado potencial evocado relacionado a un evento (*Event Related Potential* ERP), el cual se puede observar como un pico, o un valle, según la orientación de las neuronas en la onda registrada por el electrodo (22). En algunas ocasiones, ya sea debido a un estímulo o de manera espontánea, grupos de neuronas disparan de manera sincrónica y periódica, generando una onda cuasi-periódica que refleja la actividad colectiva de una región del cerebro y por ende, la actividad registrada por EEG tiene un patrón oscilatorio. Cuando un grupo de neuronas está generando señales periódicas, estas se transmiten a otros grupos neuronales conectados al grupo emisor. La respuesta colectiva de este segundo grupo de neuronas, también se verá registrada en el EEG con una latencia mayor. Estas conexiones funcionales entre diferentes regiones cerebrales se ven reflejadas en una señal oscilatoria en el EEG. Este comportamiento colectivo de las neuronas es una mezcla de ritmos.

El tejido cerebral no es uniforme y está organizado de manera funcional. Estas señales varían según la ubicación de los electrodos, así como el tipo de registro, ya sea de superficie o de profundidad (20) (Figura 3).

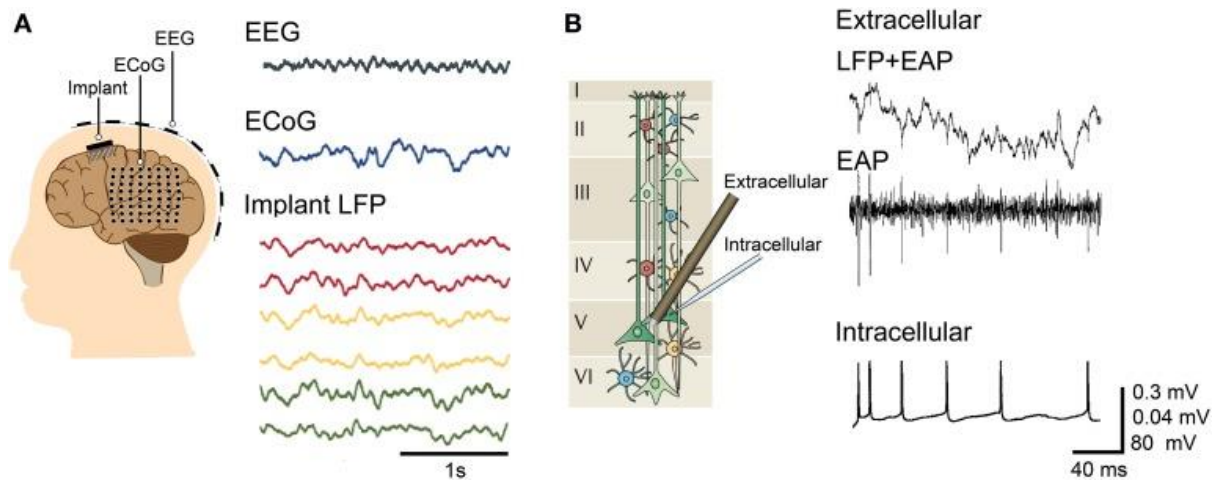


Figura 3.

*Registros electrofisiológicos a diferentes escalas. A- Registro macroscópico con electrodos superficiales (EEG), registro mesoscópico mediante electrocorticografía (ECoG) y potenciales locales de campo (Local Field Potentials LFP) adquiridos con electrodos implantables. B- Registro mesoscópico y microscópico utilizando un tetrodo (extracelular) y una micropipeta de vidrio (intracelular). Registro de potenciales de acción extracelulares (extracellular action potential EAP) y potenciales de acción intracelulares (action potentials AP) registrados en una neurona piramidal. (23)*

Las redes neuronales de la corteza de los mamíferos se generan en bandas oscilatorias distintas, que cubren frecuencias inferiores a 0,05 Hz hasta 600 Hz (24). Una de las clasificaciones más comunes, para estas bandas, fue introducida en 1974 por la Federación Internacional de Sociedades para Electroencefalografía y Neurología Clínica, la cual sigue la tradición de Berger de usar letras del alfabeto griego y determina límites relativamente arbitrarios:  $\delta$  (0.5-4 Hz),  $\theta$  (4-8 Hz),  $\alpha$  (8-12 Hz),  $\beta$  (12- 30 Hz),  $\gamma$  (superiores a 30 Hz) (Figura 4) (24). Esta clasificación nace de los límites tecnológicos de la época y no tiene en cuenta que una oscilación detectada en la misma región cerebral durante una tarea puede cambiar según la especie, la edad y el estado del sujeto. Por ejemplo, la actividad  $\theta$  registrada en el hipocampo de un animal anestesiado y uno despierto puede variar de 2-6 Hz hasta 5-10Hz (24). Por esta razón, una clasificación funcional o espacial de las oscilaciones sería de gran utilidad, sin embargo, ya sea por desconocimiento, falta de tiempo, costo, falta de personal o por tradición, no la tenemos todavía.

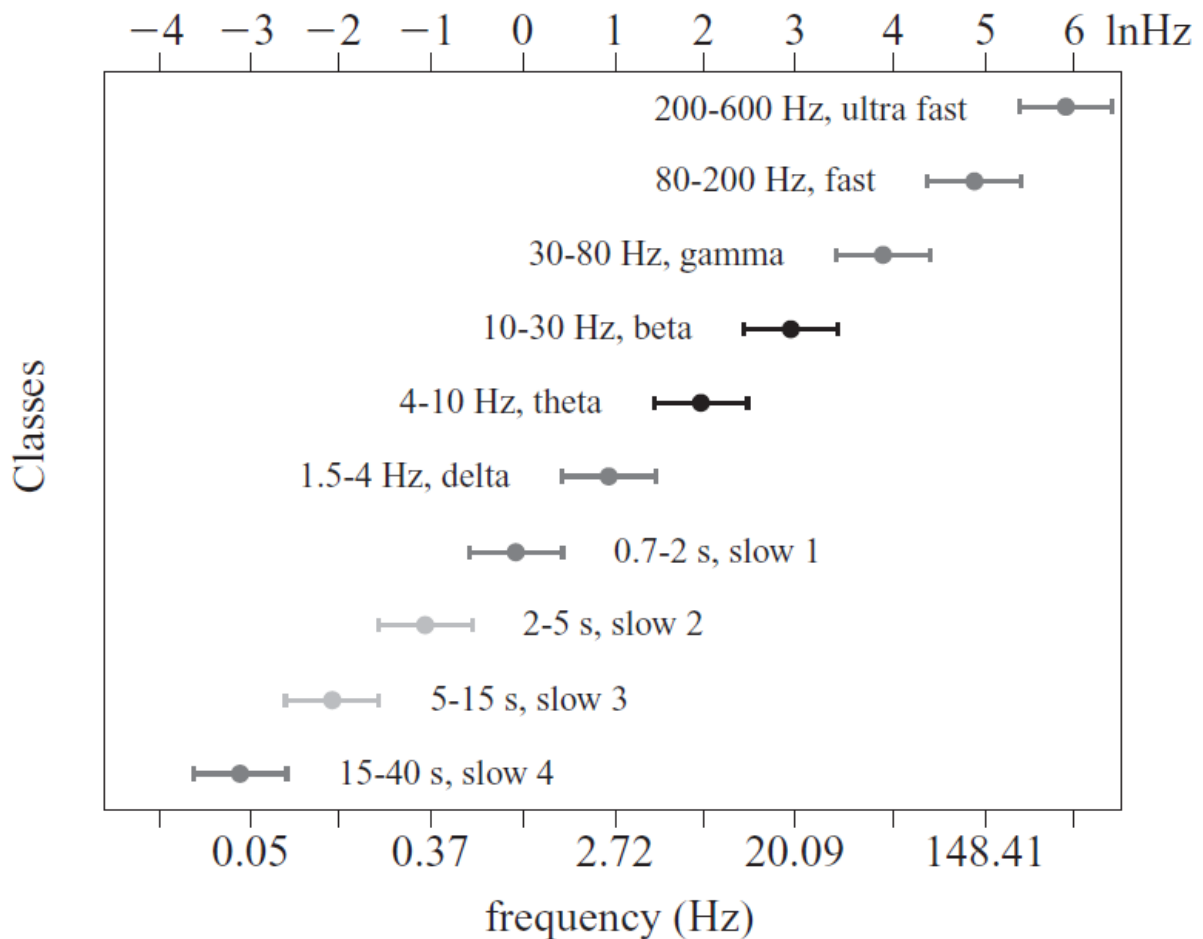


Figura 4.  
Bandas o rangos de frecuencia. (24).

Las oscilaciones neuronales se observan en muchas escalas espaciales y temporales (25), en general siempre podemos observar actividad en todas las bandas de frecuencia, algunas son predominantes según el estado de alerta del sujeto, o el lugar donde se registre. En muchas ocasiones podemos asociar a diferentes funciones cognitivas la actividad acoplada en dos bandas diferentes (26).

### 2.1.2.1. Oscilaciones de baja frecuencia

Definimos como señales de baja frecuencia o lentas las bandas  $\delta$ ,  $\theta$  y  $\alpha$ , estas se encuentran con mayor prominencia durante los estados de relajación y sueño. Las ondas de baja frecuencia se relacionan con procesos homeostáticos (27), característicos de actividades “internas”. El sueño es un ejemplo de cómo se autoorganiza el cerebro, es una actividad independiente de estímulos externos y se desarrolla de manera natural y determinística.

En la actividad lenta, el tálamo participa en diferentes procesos, actuando como marcapasos y generando conexiones funcionales basadas en la modulación de actividad rápida en diferentes fases de las bandas lentas. El papel que juega en la generación de estas oscilaciones no se ha caracterizado completamente, pero sabemos que las conexiones talamocorticales están relacionadas con su origen (28).

### **2.1.2.2.Oscilaciones de alta frecuencia**

Definimos como señales de alta frecuencia o rápidas las bandas  $\beta$ ,  $\gamma$  y las oscilaciones de alta frecuencia (HFO- *High Frequency Oscillations* por sus siglas en inglés), estas se encuentran con mayor prominencia durante los estados de vigilia y atención (29). Los estudios de actividad rápida están fuertemente ligados a avances tecnológicos, puesto que a medida que mejora nuestra capacidad de registrar y almacenar oscilaciones neurológicas con frecuencias de muestreo mayores, podemos registrar actividad cada vez más rápidas.

La actividad en alta frecuencia se ha ligado a procesos cognitivos, motores y sensoriales complejos (30–32) y se detectan en diversas regiones del cerebro; esto sugiere que tiene orígenes y funciones diversas. Sin embargo, estas se agrupan por el hecho de que oscilan en el mismo rango espectral, lo cual dificulta su estudio.

### **2.1.2.3.Interacciones entre frecuencias**

Podemos caracterizar algunos mecanismos y funciones de la actividad neuronal, en los cuales evidenciamos claramente la presencia de un ritmo dado en un proceso cognitivo, o una región y circuito particular. Adicionalmente, observamos que existen interacciones entre las bandas de frecuencia asociadas a dichos procesos. El análisis del acoplamiento caracteriza la interacción entre las oscilaciones a través de las bandas de frecuencia. Se han descrito diferentes tipos, incluyendo fase-fase (*Phase-to-Phase Coupling* PPC), amplitud-amplitud (*Amplitude-Amplitude Coupling* AAC), fase-amplitud (*Phase-to-Amplitude Coupling* PAC) y sincronía o coherencia de fase (*Phase Coherence* PC). Esta interacción se puede observar en una misma estructura (33), o entre dos regiones distantes (34).

Los estudios sugieren que estos acoplos juegan un rol funcional en los diferentes procesos cerebrales. Esto ha llevado al desarrollo de técnicas tanto de registro como de análisis de alta resolución (espacial y temporal) para poder extraer esta información de los datos (26,35,36).

Estas relaciones no son fijas, cambian a lo largo del desarrollo neuronal, con la edad, y en algunas patologías (37). La adquisición, estudio y caracterización de estas interacciones, acoples y modulaciones es fundamental en la comprensión de las oscilaciones neuronales.

### **2.1.3. Relación en la actividad oscilatoria cerebral y la función cognitiva**

#### **2.1.3.1. Oscilaciones $\delta$ (modulación)**

Las oscilaciones  $\delta$  son prominentes durante el sueño profundo (22), en regiones cerebrales lesionadas o con encefalopatía (38,39) y en registros occipitales de bebés despiertos (40). También aparecen durante diferentes procesos cognitivos, por ejemplo, durante algunos procesos que implican concentración, tales como los cálculos mentales en donde se ha observado que las oscilaciones  $\delta$  aumentan en el lóbulo frontal (41), esto se relaciona con un indicador de atención interna (42).

Es importante mencionar que la fase de la oscilación  $\delta$  determina la excitabilidad del circuito en tareas que pueden ser anticipadas, o que no representan reacciones a estímulos externos (43). Esto lleva a pensar que existe un mecanismo de control, que permite bloquear reacciones ante este tipo de estímulos. Durante procesos de atención podemos registrar claramente actividad  $\gamma$ , por lo tanto, las oscilaciones de baja frecuencia ( $\delta$ ) parecen regular el nivel de la aparición de la actividad rápida ( $\gamma$ ) (44).

#### **2.1.3.2. Oscilaciones $\theta$ (memoria, movimiento y sincronización)**

La mayoría de los estudios realizados en esta banda se ha llevado a cabo en ratas despiertas. Uno de los trabajos más importantes es la caracterización de las neuronas de lugar “*place cells*” (45), estas neuronas se activan en regiones específicas “*place fields*” del entorno que la rata está explorando. Mientras que el animal se encuentre en un campo “*field*” determinado, sus neuronas de lugar disparan en una fase tardía de  $\theta$ , a medida que el animal se desplaza, las neuronas disparan en fases cada vez más tempranas, esto se conoce como precesión de la fase  $\theta$  (46).

Este fenómeno implica que estas activaciones juegan un rol importante en la comunicación entre regiones, para la cual es esencial la fase del ciclo  $\theta$  (47). Esto se lograría gracias a la sincronización de fase entre regiones, fenómeno que se ha detectado en estudios de memoria (48). Las oscilaciones  $\theta$ , no sólo modulan la activación neuronal, sino que también modulan

oscilaciones en bandas más rápidas, como  $\gamma$  (49). Acoples  $\theta$  -  $\gamma$  en diferentes frecuencias se han detectado en las conexiones de corteza entorrinal y de CA3 a CA1, en el hipocampo (50), así como en regiones corticales durante procesamiento de memoria de corto y largo plazo (51).

### **2.1.3.3.Oscilaciones $\alpha$ (inhibición y reposo)**

Berger en 1929, reportó por primera vez, que al cerrar los ojos se puede observar el aumento en la amplitud de las oscilaciones  $\alpha$  en el lóbulo occipital de la corteza visual. En principio, esto está asociado con un estado de descanso y relajación en la vigilia. Se puede observar cuando el sujeto está despierto, pero no está realizando una tarea en particular.

Esta idea se ha ido desafiando a medida que varios estudios muestran la presencia de  $\alpha$  cuando se realiza una inhibición activa, cuando se busca suprimir o enfocar la atención dándole un rol principal en el proceso de información (52). Las oscilaciones  $\alpha$  parecen modular la atención, vemos un aumento durante procesos de atención espacial, cuando la información visual es tan importante (53), y aumenta cuando se inhibe el estímulo de información irrelevante (54,55), regulando la atención prestada a la información somatosensorial (56) y auditiva (57).

El procesamiento de información visual realizado en la corteza se ha caracterizado por actividad  $\gamma$  en la capa superior de la corteza visual, y por actividad  $\alpha$  detectada en capas más profundas. La potencia de estas dos bandas está anti correlacionada, indicando la modulación de  $\alpha$  en procesos de atención visual (58). En procesos de memoria se detecta una interacción entre la banda  $\alpha$  y la  $\theta$ , tanto en amplitud como en acople de fase según el tipo de memoria (59). Durante los procesos de recuperación,  $\theta$  se comporta como una onda viajera que muchas veces tiene anidada actividad  $\alpha$  (60).

Las oscilaciones  $\alpha$  tienen un rol inhibitorio en la atención de información irrelevante para una tarea (61), sin embargo, están presentes en muchos procesos neuronales y su estudio es un área de gran interés.

### **2.1.3.4.Oscilaciones $\beta$ (sistema motor)**

Las oscilaciones  $\beta$  están relacionadas al sistema motor (62), su amplitud aumenta durante contracciones musculares y disminuye en la anticipación de movimiento activo (63). Se ha asociado al intercambio de información entre la corteza motora y el tejido muscular, ya que se observa coherencia entre el EEG y el electromiograma (62). En este sentido, se ha ligado en

algunos casos a la toma de decisiones (64), lo que podría explicar su presencia en el sistema motor debido a un proceso de decisiones conscientes durante el movimiento.

### **2.1.3.5. Oscilaciones $\gamma$ (procesamiento de información)**

Las Oscilaciones  $\gamma$  son actividades rápidas que están generalmente ligadas a activaciones focalizadas en procesamiento de información, su presencia generalmente se ve ligada a la modulación por una frecuencia más lenta, lo que permitiría ese efecto de sincronía en un grupo de neuronas. Se han asociado a procesos visuales (30), de atención (31), memoria (32), así como diferentes regiones cerebrales, como la corteza (65), el hipocampo (66) y el tálamo (67), entre otras. Adicionalmente, las oscilaciones  $\gamma$  están presentes en muchos de los procesos cognitivos, sin embargo, debido a su variedad se hace difícil su caracterización y estudio, ya que están determinadas por frecuencia y no por su rol funcional.

## **2.2. Mecanismos neurobiológicos de las oscilaciones cerebrales**

### **2.2.1. Oscilaciones de baja frecuencia**

Se ha propuesto que las oscilaciones  $\delta$  son generadas por una interacción entre las neuronas reticulares talámicas (RE), las talamocorticales (TC) y la excitación cortical de las neuronas reticulares. Las neuronas TC se proyectan con conexiones excitatorias a la corteza y a las neuronas RE, para generar husos, las RE inhiben las TC a través de receptores y, cuando la conductancia de las neuronas RE se modifica de manera que se vuelven menos sensibles a la entrada excitatoria de las neuronas TC, se reduce la inhibición de las neuronas TC, generando así el ritmo  $\delta$  (43) (Figura 5).

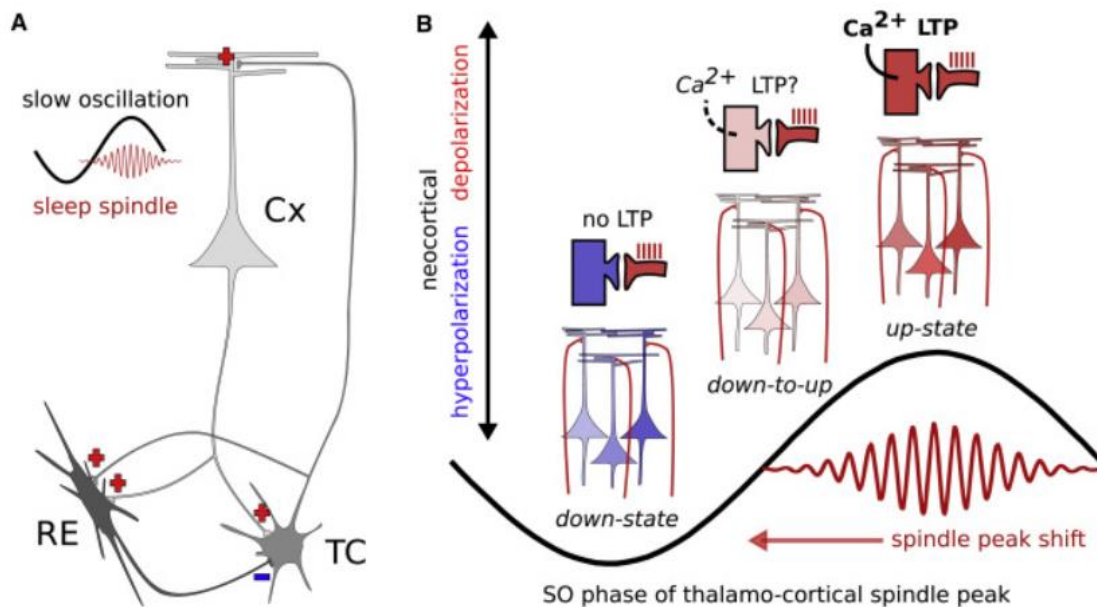


Figura 5.

*Acoplamiento fase-amplitud para la plasticidad sináptica A - PAC del huso del sueño con las oscilaciones lentas generado en el ciclo cortico-tálamo-cortical. B - Impacto del avance de fase como mecanismo general para la plasticidad sináptica. (68)*

La actividad  $\theta$  está presente tanto en somnolencia como en vigilia, espacialmente se observa principalmente en la corteza y en el hipocampo, lo que puede sugerir que existen diferentes tipos de  $\theta$ , con distintos mecanismos subyacentes. Típicamente se asocia a la interacción entre diferentes regiones neuronales y es difícil de explicar por un modelo local (69). Sabemos que el septum medial juega un papel importante en la generación del ritmo  $\theta$  hipocampal (70) y provee un impulso colinérgico altamente relacionado con su amplitud (71). Adicionalmente, las interneuronas GABAérgicas del septum medial se proyectan sobre interneuronas del hipocampo afectando su fase (72). Actualmente sabemos que procesos intra hipocampales son esenciales para la generación de ritmo  $\theta$ , y que pueden ser generados de forma autónoma (73).

Cómo lo vimos anteriormente, las oscilaciones  $\alpha$  se pueden observar muy claramente tanto en el tálamo como en la corteza (74,75), especialmente en la región occipital al cerrar los ojos, se detectan cuando el sujeto está despierto y relajado. Todavía se debate qué región es la generadora principal de este ritmo, aunque es probable que tenga su origen en la interacción de estas dos estructuras (76). Una primera aproximación en estudios animales muestra que el núcleo geniculado del tálamo recibe información desde la retina y la transmite a la corteza visual. El tálamo tiene un grupo particular de neuronas TC con un umbral de disparo alto, estas están conectadas con uniones gap y generan picos sincronizados en  $\alpha$  (77). Sin embargo, la mayoría de las proyecciones que llegan al lóbulo occipital desde el tálamo son neuronas en

modo de relevo (78) que transmiten la información y no oscilan a una frecuencia particular. Un modelo propuesto, es que las neuronas TC de umbral alto proyectan sobre interneuronas GABAérgicas locales (79) que siguen una actividad  $\alpha$ , modelando así las que están en modo de relevo (80).

En la banda de frecuencia  $\alpha$  también se encuentran los husos del sueño, los cuales aparecen simultáneamente con la actividad  $\delta$  en esta actividad (81). El origen de estas oscilaciones se relaciona al núcleo reticular y aparecen cuando hay una inhibición general relacionada al sueño (82).

### **2.2.2. Oscilaciones de alta frecuencia**

La generación de la actividad rápida ha sido ampliamente estudiada debido a su presencia en múltiples procesos tales como: actividad  $\gamma$  en procesamiento visual (83), oscilaciones  $\gamma$  moduladas por ondas  $\theta$  en mecanismos de memoria en el hipocampo (50) y actividad  $\beta$  en actividad motriz (84). Aunque presente, su función puede ser debatida (85), además su detección está ligada a la frecuencia a la que oscila y no al circuito subyacente que las produce. Lo más probable es que estemos agrupando muchos tipos de respuestas debido a su actividad espectral (86).

Actualmente se conocen dos circuitos principales para actividad rápida y generación de actividad  $\gamma$ : red interneuronal  $\gamma$  (ING) y red piramidal-interneuronal  $\gamma$  (PING) (87), con sus equivalentes para la banda  $\beta$  red interneuronal  $\beta$  (INB) y red pyramidal-interneuronal  $\beta$  (PINB) (88).

El mecanismo ING se refiere a la interacción entre dos interneuronas conectadas con sinapsis GABAérgicas. La neurona tiene una retroalimentación inhibitoria, una vez estimulada, dispara activando la neurona GABAérgica inhibitoria que la hiperpolariza, la duración de la inhibición está ligada al receptor y dura entre 10 a 20 ms lo que resulta en un ritmo gama de 50-100Hz (43). Estas conexiones se pueden encontrar entre dos neuronas; en el caso en el que se disparan al tiempo se inhiben al tiempo, o pueden disparar de manera oscilatoria generando así diferentes oscilaciones.

Por otro lado, el mecanismo PING, también acopla dos poblaciones neuronales, excitatorias e inhibitoria. Las excitatorias proyectan conexiones AMPAérgicas a las inhibitorias, quienes

tienen conexiones GABAérgicas, estas se estimulan con un pequeño retraso generando así un estado oscilatorio (89).

Existen muchos tipos de neuronas inhibitorias y varían en diferentes regiones cerebrales donde encontramos oscilaciones  $\gamma$ . Sabemos además que estos dos mecanismos no siempre explican la presencia de actividad rápida (90), de tal manera que no conocemos todos los mecanismos subyacentes al ritmo  $\gamma$ . Grupos de neuronas piramidales disparan en conjunto de manera espontánea, esta actividad activa neuronas de canasta parvalbúmina-positivas, generando ráfagas de actividad rápida, *ripples*, fijadas en fase (91).

En los sistemas de generación de  $\beta$  observamos una hiperpolarización más lenta debido a canales de potasio. En ocasiones las neuronas excitatorias se activan a sí mismas, lo que hace que se “salten” un ciclo en cada activación resultando así en una actividad  $\beta$  (43), sin embargo, este mecanismo no explica todas las activaciones de la banda  $\beta$ .

Existe una actividad aún más rápida, los HFO, que se encuentran de manera patológica, como en epilepsia, pero también fisiológica. Se han descrito algunos mecanismos para su generación que combinan oscilaciones intrínsecas de la membrana y circuitos sinápticos, que en algunos casos involucran uniones GAP (*Gap Junctions*) (92); su estudio es muy reciente y en muchos casos se liga a actividad  $\gamma$  “alta”.

### **2.2.3. Oscilaciones neuronales en diferentes condiciones patológicas**

Los estudios electroencefalográficos y electrofisiológicos han sido utilizados en el diagnóstico de diferentes enfermedades desde su invención, incluso se contemplan métodos de inteligencia artificial para realizar diagnóstico automático basado en dichos registros, en los cuales se observan la interacción entre millones de neuronas (93).

La comunicación neuronal depende de estructuras anatómicas y de procesos de transmisión de información, esta transmisión se realiza mediante la interacción eficiente y sintonizada de actividades en diferentes bandas de frecuencia (94). La importancia de la relación y sincronización entre las diferentes oscilaciones en los procesos sensoriales y cognitivos se hace cada vez más evidente, su delicado equilibrio garantiza el correcto funcionamiento cerebral y las alteraciones en estos procesos aparecen en diversas neuropatologías (95). El avance en las técnicas de registro y estudio permite ahora relacionar fallas o desajustes en estas relaciones con diferentes enfermedades.

La epilepsia, ha sido un ejemplo muy estudiado de alteraciones en las oscilaciones neuronales, particularmente debido a desajustes en la sincronización (96). Incluso hay estudios que indican que las variaciones en el acople entre frecuencias pueden llegar a ser utilizado para predecir crisis (97). En la enfermedad de Parkinson, alteraciones en la actividad  $\alpha$  y  $\beta$  enfatizan la importancia del acople entre el ganglio basal y la corteza en el correcto control del movimiento (98,99). Desajustes en los acoples entre frecuencias también se evidencian en enfermedades psiquiátricas, como el trastorno bipolar, la depresión, y la esquizofrenia (100). En diferentes tipos de demencias, incluida la enfermedad de Alzheimer (EA), se evidencian alteraciones en la amplitud de las diferentes bandas espectrales (101), así como los estados de conectividad (102) y en los acoples de fase y amplitud entre las bandas  $\theta$  y  $\gamma$  (103).

### 3. Planteamiento del problema y preguntas de investigación

El presente trabajo busca identificar los efectos de dos especies tóxicas del amiloide:  $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$ , sobre la neurotransmisión del circuito CA3-CA1 mediante un abordaje electrofisiológico.

De esta manera, se plantea identificar si existen alteraciones funcionales agudas, que podrían explicar parte de los mecanismos celulares que producen alteraciones en el funcionamiento sináptico y que, a su vez, desencadenan el déficit cognitivo temprano, antes de que una neurodegeneración sea establecida.

El circuito CA3-CA1 es particularmente sensible a sufrir daños debido al  $A\beta$ , y además está implicado directamente en los procesos de aprendizaje y memoria. Dicho circuito es responsable de la generación de ritmos cerebrales necesarios para el procesamiento de la información.

Nuestra hipótesis plantea que las formas tóxicas solubles del péptido  $A\beta$  afectan la actividad oscilatoria de las conexiones CA3-CA1, así como los mecanismos de control y de transferencia de información, tal como la modulación de la actividad rápida por la actividad lenta y la cantidad de energía contenida en diferentes bandas de frecuencia.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Evaluar los efectos del péptido Beta amiloide 2-35 y 1-40 sobre la actividad sináptica y oscilatoria del circuito CA3- CA1 del hipocampo mediante registros neurofisiológicos in vivo.

### 4.2. Objetivos específicos

- Desarrollar las herramientas de software que permitan medir y analizar la actividad oscilatoria de los registros adquiridos en los dominios del tiempo, la frecuencia y el tiempo frecuencia.
- Evaluar los efectos agudos del péptido  $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$  sobre las oscilaciones en el hipocampo y sobre la plasticidad sináptica del circuito CA3-CA1

## **5. Capítulo 1. BOARD-FTD-PACC: una interfaz gráfica de usuario para el análisis sináptico y de frecuencias cruzadas derivado de señales neuronales**

Este Capítulo está basado en la investigación realizada en conjunto con Mario Valderrama, Francisco Alejandro Múnera Galarza y Mauricio O. Nava-Mesa publicada en el artículo: “*BOARD-FTD-PACC: a graphical user interface for the synaptic and cross-frequency analysis derived from neural signals*”. Publicado el 8 de mayo del 2023 en la revista “Brain Informatics” de la editorial Springer con ID 37155028 (104).

### **5.1. Marco teórico**

#### **5.1.1. Caracterización de las oscilaciones cerebrales**

El objetivo de los análisis de la actividad oscilatoria neuronal es entender los procesos de la cerebrales como memoria, lenguaje, percepción y emoción, y ligarlos a procesos fisiológicos dinámicos del cerebro a través del estudio de las ondas eléctricas y electromagnéticas que se producen mientras éste lleva a cabo dichos procesos cognitivos (105).

Los últimos años avances tecnológicos en los procesos de adquisición, almacenamiento y análisis han permitido identificar información contenida en las señales registradas, esto nos lleva a entender mejor diferentes procesos cerebrales (35). Entender estos registros determina el estado de alerta, o somnolencia (106), la respuesta a diversos estímulos (107) e incluso realizar diagnósticos (105,108).

El análisis de registros neurofisiológicos puede requerir diferentes enfoques metodológicos con diversos niveles de complejidad, que van desde la cuantificación de la amplitud y la latencia en registros unicelulares hasta el análisis de la actividad coordinada en red de varios cientos de miles de neuronas activas (redes cerebrales a gran escala). Estos análisis se pueden realizar en diferentes dominios (tiempo, frecuencia) para así extraer diversos tipos de información.

En el dominio del tiempo se mide actividad sincrónica, generalmente ligada a un estímulo (*Event Related Potential-ERP*) con el objetivo de identificar los cambios en la actividad eléctrica global de un grupo de neuronas. Medir la actividad sincrónica en una región específica nos permite entender cómo responde el cerebro a un estímulo determinado. Por lo que estudiar cambios en estas respuestas derivadas de variaciones en las condiciones de estimulación, puede explicar cómo y dónde se procesa la información (107). Estos análisis se han estudiado con técnicas sencillas desde hace décadas y no requieren sistemas computacionales avanzados.

Por otro lado, si la actividad no es sincrónica, proveniente de una actividad espontánea o no está ligada a un estímulo particular, es muy probable que no sea visible en el promedio de los diferentes ensayos o *trials*, ya que solo estará presente en una de las ventanas que se promedia.

En el dominio de la frecuencia, se mide la actividad rítmica del cerebro, como se ilustró anteriormente. La actividad eléctrica cerebral tiende a ser oscilatoria según el tipo, la ubicación y el número de neuronas implicadas en un proceso. Dicha actividad genera una frecuencia específica, al representar los registros en el dominio de la frecuencia, se revela que tan prevalente es cada ritmo durante el registro; es un método sencillo, muy estudiado, pero no muestra el momento donde cambia la actividad. Adicionalmente, este método trata los datos como si fueran constantes o estacionarios y la actividad cerebral es por el contrario dinámica.

Como uno de los mayores intereses de los análisis de registros neurofisiológicos es estudiar las fluctuaciones que acompañan los procesos cognitivos, es interesante combinar estos dos dominios y estudiar el tiempo-frecuencia. En este caso, se muestra como varía la actividad frecuencial o espectral en el tiempo, y busca encontrar un equilibrio entre la precisión temporal y la resolución en frecuencia que permite hacer análisis más completos. Cabe resaltar que el estudio tiempo-frecuencia es un método exploratorio que permite extraer más información de las señales, siendo una técnica más compleja, que requieren mayor capacidad computacional y es la base para otros estudios, tales como conectividad o acople.

La información extraída con estos métodos iniciales puede ser estudiada más a fondo, entendiendo cómo interactúan las oscilaciones en diferentes regiones cerebrales y en diferentes rangos de frecuencia. En el caso del acoplamiento de frecuencias cruzadas (*Cross-Frequency Coupling CFC*) se puede estudiar desde diferentes perspectivas, como el acople entre fases (*Phase-to-Phase Coupling PPC*), el acople entre amplitudes (*Amplitude-to-Amplitude Coupling AAC*) y el acople entre fase y amplitud (*Phase-to-Amplitude Coupling PAC*).

La coherencia de fase (*Phase Coherence* PC) es otro método que nos permite inferir información de los registros. Estos análisis dan claridad sobre cómo se comunican entre ellas diferentes regiones cerebrales. Estas técnicas de análisis nos permiten entender relaciones y conexiones entre regiones o procesos. En los últimos años se han hecho muchos avances con estas técnicas lo que ha revelado información muy valiosa y ha aumentado la comprensión que teníamos del funcionamiento cerebral (109).

El proceso de analizar estos registros neurofisiológicos depende del tipo de información que se busca obtener, del protocolo experimental, del origen de las señales, entre otros muchos factores. Esto implica buscar la(s) técnica(s) más adecuada(s) para extraer información significativa y presentarla de forma intuitiva y sencilla. Debido a la compleja naturaleza de las señales neuronales, se pueden aplicar una enorme variedad de técnicas desarrolladas en matemáticas, ingeniería y ciencia de datos en las últimas décadas.

Para obtener resultados, es necesario contar con diferentes herramientas para la visualización y el análisis de datos, además de conocimientos avanzados de programación. Las soluciones actuales están destinadas a un tipo de análisis muy específico de datos, generalmente son costosas y no incluyen una interfaz gráfica.

### **5.1.2. Herramientas de análisis y visualización**

La aplicación de procedimientos analíticos avanzados requiere habilidades específicas en métodos matemáticos complejos y de programación. Para facilitar este proceso a personas no expertas en estos temas, se generan interfaces de usuario o aplicaciones de software que llevan a cabo dichos métodos analíticos. Sin embargo, las aplicaciones generales tienen algunas limitaciones; pueden haber sido diseñadas para fines particulares y, por lo tanto, pueden no ser fácilmente personalizables, ser costosas o no estar disponibles al público.

En general existen dos tipos de programas, los que están destinados a estudiar señales macro, los cuales generalmente permiten el estudio de muchos canales de registro, cuentan con herramientas de análisis de acople y los que se enfocan en estudiar la actividad micro, que permiten caracterizar respuestas sinápticas.

A continuación, presentaremos algunas herramientas representativas e interesantes a conocer:

Entre las herramientas orientadas a señales EEG, el más completo y conocido es EEGLAB (110), un toolbox de MATLAB (The Mathworks, Inc.) muy completo y de gran alcance, orientado a registros “*scalp*” que constan de varios canales y requieren técnicas de preprocesamiento. Permite visualizar y estudiar diferentes canales de registro, tiene funciones para caracterizar los ERPs en dominios de tiempo y frecuencia, hacer análisis de componentes independientes, cuenta con PACTools (111) que permite aplicar diferentes métodos de PAC, es una herramienta versátil ya que se puede utilizar interfaz gráfica, o en código original. Es una herramienta tan completa que es necesario hacer “pipelines” de análisis, lo que implica una gran familiaridad y entrenamiento con la herramienta y con el lenguaje de MATLAB, de lo contrario es difícil ajustar los parámetros del experimento que se desea analizar.

Además de EEGLab, otros softwares como Fieldtrip (112) también desarrollado en MATLAB no es una interfaz gráfica, requiere habilidades de programación, está orientada a diferentes tipos de registros (EEG, EMG) y cuenta con una función básica de segmentación, donde se divide el registro en ventanas de tiempo determinadas por un estímulo, pero no funciona al aumentar el número de estímulos.

Otra herramienta es Brainstorm (113), desarrollada en MATLAB que está orientada a analizar actividad cortical (EEG, EMG) aplica los diferentes métodos a ventanas de tiempo determinadas y puede calcular promedios, pero no segmenta en ventanas de tiempo determinadas por un estímulo, estas también son llamadas épocas o *trials*.

MNE (114) y Tensorpac (115) son otras herramientas, desarrolladas en python, no son interfaces gráficas, también orientada a registros *scalp*, y los datos se deben ingresar segmentados. Todas estas herramientas son capaces de estimar PC, PAC y realizar diversos análisis en el dominio de tiempo-frecuencia.

Las herramientas presentadas anteriormente, requieren sin embargo conocimientos avanzados de programación, muchos no incluyen una interfaz gráfica, no permiten la segmentación automática o sólo implementan un método de estimación del PAC.

En cuanto las herramientas orientadas a estudiar la actividad sináptica, existe una gran cantidad, una de ellas es Neuromatic (116) una interfaz que funciona en tiempo real durante la adquisición de los datos, permite realizar mediciones así como detección de eventos dado un umbral y hacer algunos análisis como filtrado, promediado y Transformada rápida (*Fast Fourier Transfom* FFT), pero no hace segmentación, para lograrlo, es necesario exportar los

datos y analizarlos con otras herramientas. Otro ejemplo es MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, US) que está orientado a estudiar actividad espontánea, realiza estadísticas con la actividad que detecta, pero no hace segmentación.

Herramientas como Minhee Analysis Package (117), Easy Electrophysiology v2.3 (Easy Electrophysiology Ltd., UK), pClamp 11 (Molecular Devices) y WCP Strathclyde Electrophysiology Software, que se centran en la detección y cuantificación de eventos postsinápticos, análisis de potenciales de acción y filtrado, entre otras muchas funciones. Pocos de ellos disponen de herramientas para el análisis espectral de potencia, como la transformada rápida de Fourier (FFT) o la densidad espectral de potencia (PSD), y ninguna de ellas cuenta con herramientas específicas para el análisis de frecuencias cruzadas.

Las herramientas disponibles son insuficientes para llevar a cabo todos los análisis de manera rápida y precisa, estos son necesarios para el logro del objetivo general de esta tesis, por esta razón desarrollamos BOARD-FTD-PACC (*Brain Oscillations Analysis and Resourceful Display in Frequency and Time Domains Plus Phase Amplitude Coupling and Coherence*) en MATLAB que integra varios procedimientos analíticos en una interfaz única y ajustable. Es una herramienta diseñada específicamente para el análisis neurofisiológico de diversos registros realizados en el laboratorio de neurofisiología comportamental de la Universidad Nacional, incluyendo el análisis sináptico y de redes a gran escala, es accesible, fácil de usar, confiable práctica y se ajusta a diversas configuraciones experimentales. Se escogió MATLAB porque es flexible, versátil, ajustable y permite realizar aplicaciones de interfaz gráfica, y finalmente, es un lenguaje ampliamente utilizado en la comunidad científica.

## **5.2. Metodología**

Utilizando MATLAB desarrollamos una interfaz gráfica de usuario BOARD-FTD-PACC, donde se implementaron diferentes técnicas matemáticas y de análisis con el fin de extraer información de las señales electroencefalográficas en diferentes dominios. A continuación, se describen los métodos desarrollados en este trabajo.

### **5.2.1. Caracterización en el dominio del tiempo de las oscilaciones**

Desde que existen técnicas para adquirir señales se realizan análisis en el dominio del tiempo y por lo tanto existen muchos referentes y una gran variedad de aplicaciones tales como

hipnogramas para estudiar los diferentes estados del sueño (118), registro de crisis epilépticas para determinar características de la patología (119), entre otros (120–122).

Las señales se pueden caracterizar haciendo mediciones de la actividad neurofisiológica a través de medidas de amplitud, latencia y pendientes. Adicionalmente se determinan los momentos en los cuales se alcanzan los valores máximos o mínimos, así como el valor promedio en reposo, con lo cual se obtiene una línea de base para su comparación. Se puede estudiar también la forma de las ondas, la densidad de los picos, la presencia de patrones conocidos, entre otros.

Los registros neuronales pueden ser muy diversos, en las siguientes gráficas vemos algunos ejemplos con o sin estímulo donde podemos observar que al estimular periódicamente obtenemos *trials*, que se pueden promediar o estudiar de manera individual.

Registro sin estímulo (Figura 6):

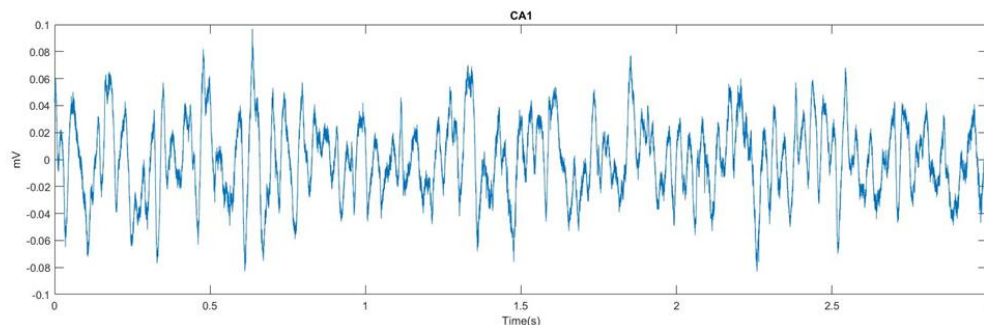


Figura 6.

*Registro intracraneal in vivo sin estímulo de la corteza motora de una rata anestesiada.*

Registro con estímulo (Figura 7):

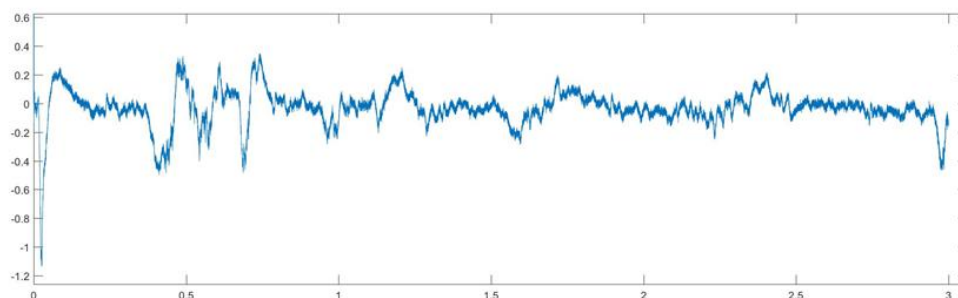


Figura 7.

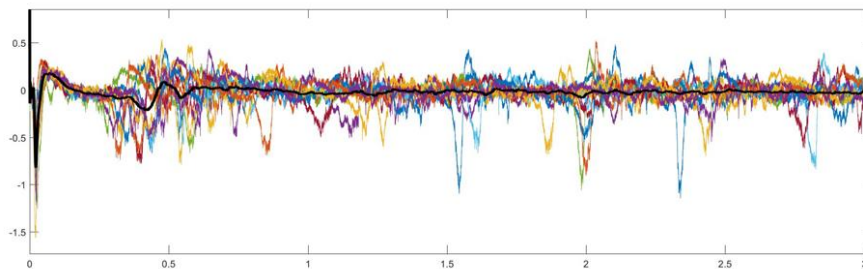
*Registro intracraneal in vivo de la corteza motora de una rata anestesiada, estimulando eléctricamente el parche de vibrissas*

### 5.2.1.1. Promedios y potenciales relacionados a eventos (ERP)

Una de las aproximaciones más importante es estudiar la actividad generada por un estímulo, es decir, los potenciales relacionados a eventos (ERP).

Antes de la invención de los computadores se utilizaban técnicas en las cuales se asumía que la actividad registrada era muy ruidosa, y que únicamente las respuestas que se repetían luego de un estímulo eran consistentes, por lo tanto, se dividían los registros en ventanas de tiempo que iniciaban con cada estímulo y se promediaban. Esta técnica se utilizaba de manera análoga (123) y marca la referencia para el estudio de fenómenos somatosensoriales y cognitivos, ya que determina con alta resolución temporal los cambios en la latencia de las señales cerebrales (124). Sigue siendo una de las técnicas más comunes y aceptada para el análisis de registros neurofisiológicos y ha dado referentes tanto sensoriales, cognitivos como clínicos (107).

Existen muchas técnicas para poder cuantificar la actividad cerebral, una de ellas es el cálculo de ERPs que usa el promedio de los registros. Este promedio tiende a ser casi un orden de magnitud menor al registro inicial, y solo permite determinar la actividad sincrónica. Como vemos en la (Figura 8), existe actividad espontánea que no se ve reflejada en el promedio:



*Figura 8.  
En color trials individuales, en negro promedio (ERP)*

Esto puede ser útil al enfocarnos en la respuesta de un estímulo puntual, ya que podemos determinar el cambio de la respuesta ante la intensidad del estímulo, realizando curvas input/output (In/Out) (Figura 9). Estas curvas son muy importantes ya que la intensidad de la respuesta varía entre los individuos, determinar el estímulo que permita observar la variabilidad en la respuesta es muy importante:

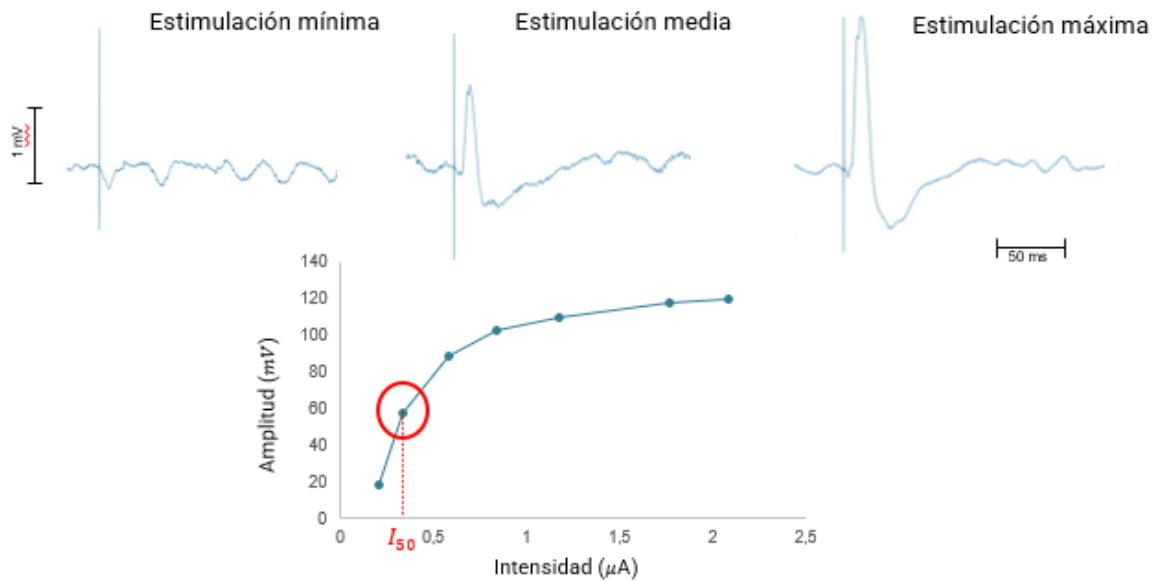


Figura 9.  
Curva In/Out Hipocampo

De esta manera se determina la intensidad de estimulación que permite ver cambios en la respuesta. La intensidad no debe ser tan fuerte porque satura la respuesta, ni tan débil porque en este caso no la determina. Lo anterior, nos permite estudiar el efecto de variar la intensidad del estímulo, así como el efecto de la estimulación múltiple. A continuación, vemos como el segundo estímulo genera una respuesta mayor al primero, este proceso es conocido como facilitación (Figura 10).

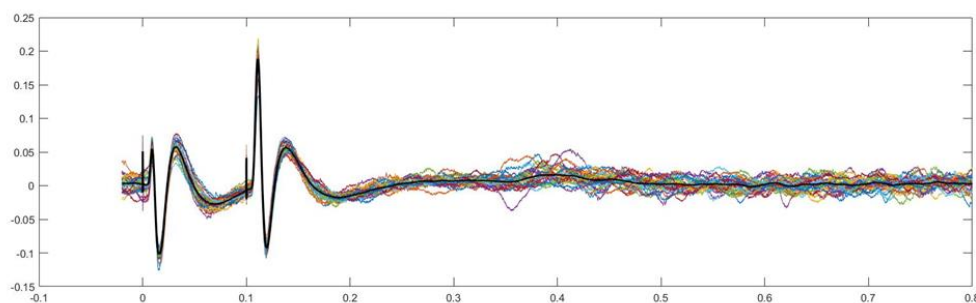


Figura 10.  
Facilitación sináptica

### 5.2.1.2. Técnicas de visualización

Uno de los problemas a los que nos podemos enfrentar es que los registros pueden ser largos, en estos casos se requiere visualizar los datos por ventanas de tiempo de tal manera que

podamos analizar la actividad registrada de manera correcta. En el caso de los ERPs es importante determinar el punto donde se realizó el estímulo y visualizar el tiempo registrado hasta el siguiente estímulo (*trial* o época). En ocasiones ocurre que los *trials* se superponen, a estos casos los llamamos “*butterfly plot*” (Figura 11) ya que cada *trial* tiene un color diferente.

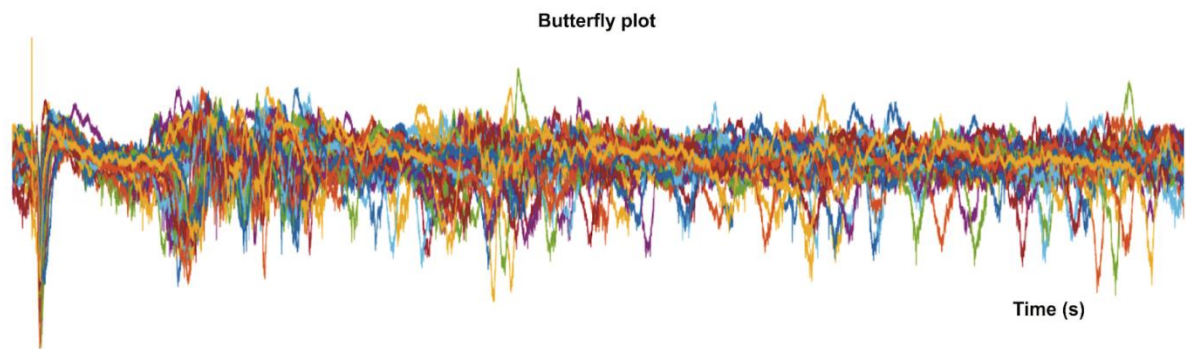


Figura 11.  
*Butterfly plot*

En este tipo de gráficas es muy difícil determinar la diferencia entre *trials* debido a la densidad en la imagen, por esto se pueden representar a modo de matriz (Figura 12):

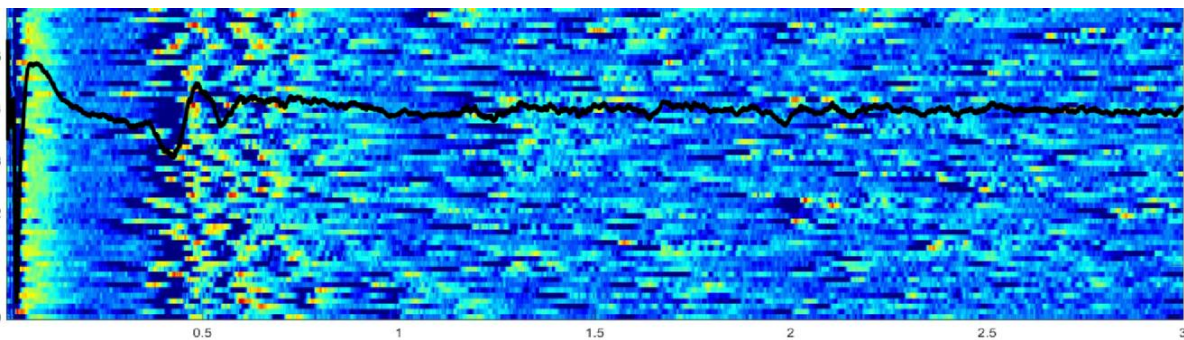


Figura 12.  
*Representación como matriz, en el eje y trials, en el eje x tiempo, amplitud a escala de color y el promedio en negro.*

Otra opción, es estudiar la señal rectificadora, en este caso no es relevante el sentido (positivo o negativos de la actividad) sino su variación con respecto a la media medida en z-score. Para cada *trial*,  $i$ , que se inicia con un estímulo (punto rojo), se calcula la raíz cuadrada, luego se obtienen la media y la desviación estándar para determinar el valor z-score. Estos pasos se repiten para cada uno de los  $n$  ensayos, y luego se representan en una imagen 3D (Figura 13).

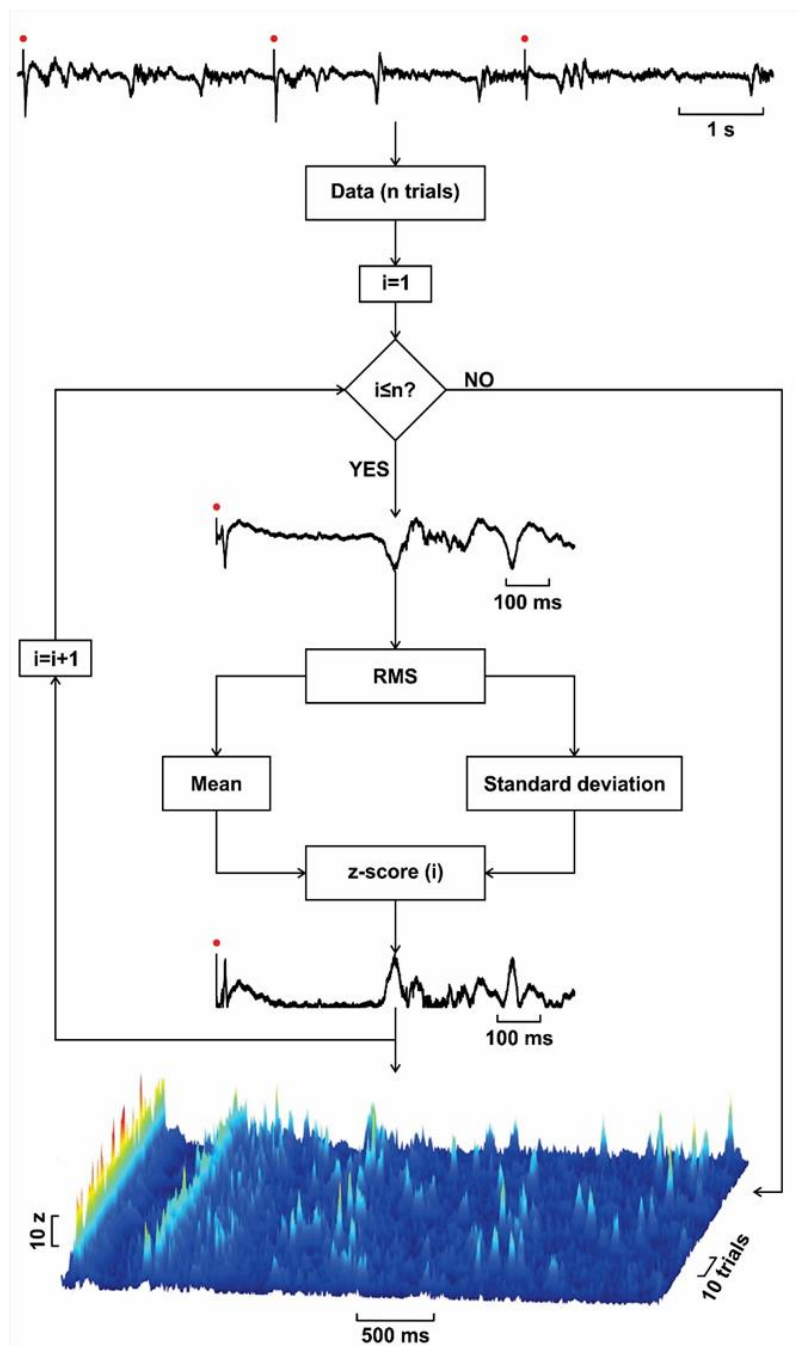


Figura 13.

Diagrama de flujo del algoritmo para el método RMS z-score implementado.

## 5.2.2. Componente espectral de la actividad oscilatoria

### 5.2.2.1. Espectro en frecuencia

En 1821 Joseph Fourier demostró que cualquier función puede representarse como la sumatoria de señales periódicas sinusoidales (125). La transformada de Fourier (Ft) (Ecuación 1) permite transformar señales temporales al dominio de la frecuencia (126)

$$\mathcal{F}(x(t)) = X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-j\omega t} dt$$

Ecuación 1 Transformada de Fourier

Como se ve en la (Figura 14), al sumar funciones sinusoidales periódicas se obtiene una señal compuesta.

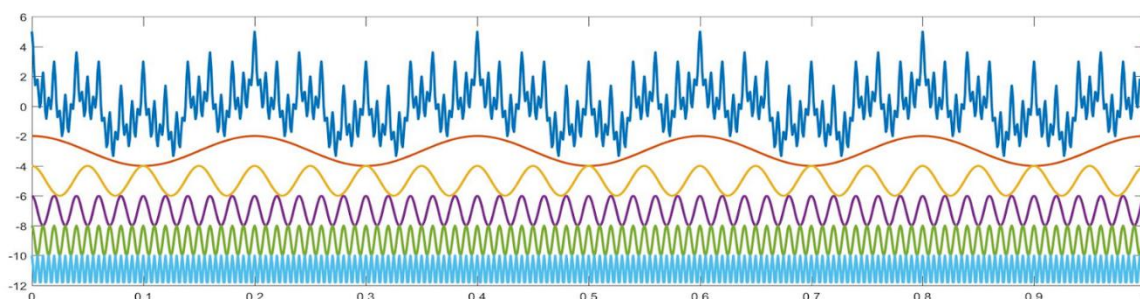


Figura 14.  
*Señal compuesta por funciones sinusoidales.*

Al aplicar la transformada de Fourier a esa señal compuesta se recuperan las frecuencias a las que oscilaban las señales que se sumaron, así como su amplitud (Figura 15):

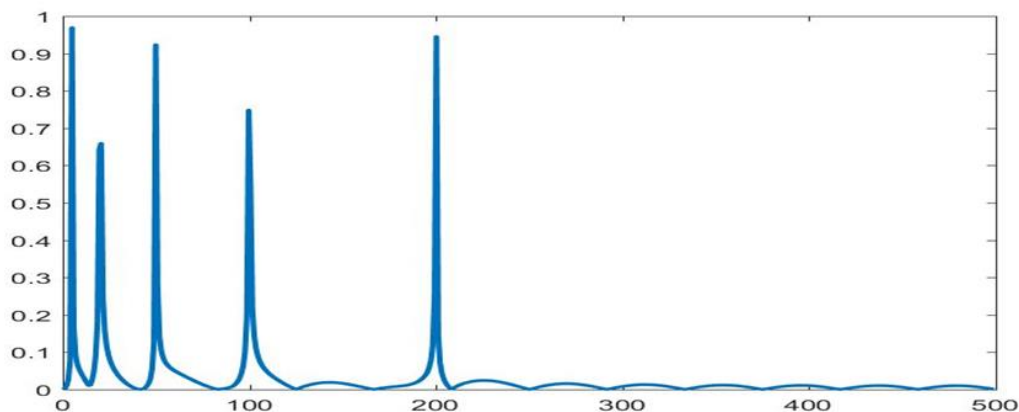
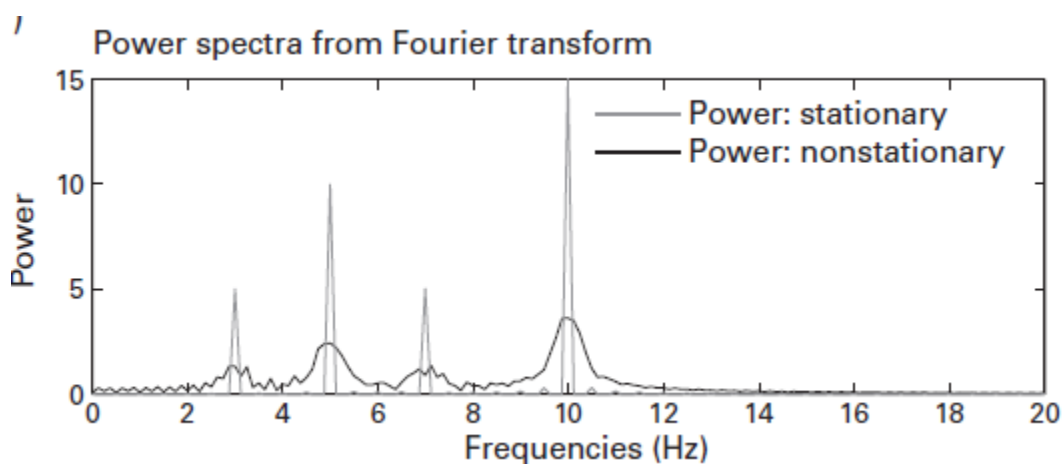


Figura 15.

### *Transformada FFT de la señal compuesta*

En 1965 Cooley y Tukey desarrollaron un algoritmo que permite implementar esta transformada a señales temporales discretas finitas, como los registros neurofisiológicos digitalizados, la transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform* FFT) (127). Los análisis basados en esta transformada se basan en la presunción de estacionariedad, es decir que asumen que la media, la varianza y la estructura frecuencial no varían en el tiempo.

Dado que la actividad cerebral es temporalmente variable, cambia al responder a un estímulo y a procesos endógenos, no se ajusta a los criterios de estacionariedad, por lo que los métodos mencionados tienen una sensibilidad limitada a estos cambios en las señales neuronales y reducen su resolución en frecuencia (Figura 16) (105).



*Figura 16.  
Diferencia en la FFT de señales estacionarias y no estacionarias. (105)*

La representación en el dominio de la frecuencia nos permite determinar la presencia de actividad en bandas determinadas de frecuencia ( $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ,  $\gamma$ ), lo que a su vez nos da información de los procesos fisiológicos neuronales asociados a esa actividad (Figura 17).

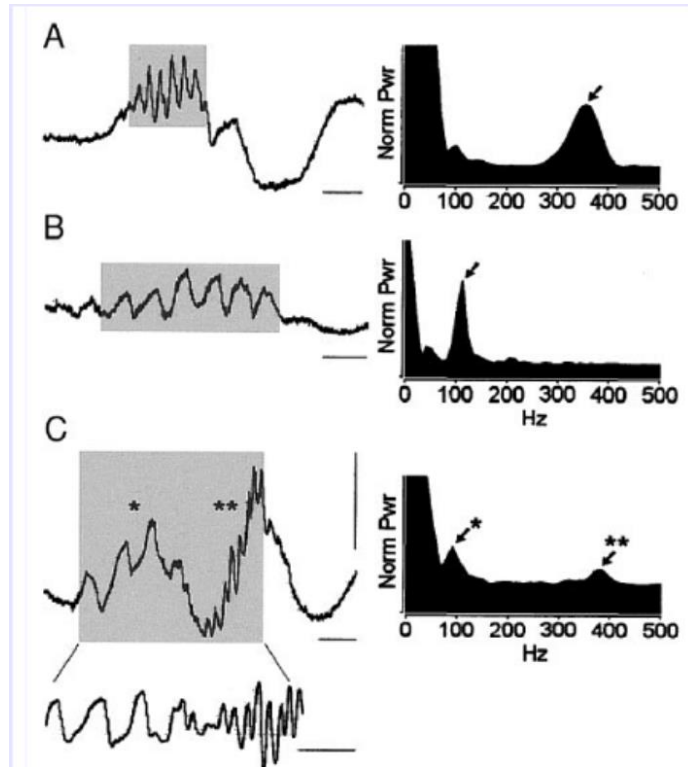


Figura 17.  
Registros observados en tiempo y en frecuencia. (128)

#### 5.2.2.2. Densidad espectral de potencia

Aunque la FFT nos da el contenido espectral de las señales existen aproximaciones, como el método de Welch (129) que permite estimar la densidad espectral de potencia (*Power Spectral Density* PSD). Este método calcula la distribución de potencia en los diferentes componentes frecuenciales de una señal y puede utilizarse para corregir la influencia del ruido (130). Se puede calcular la PSD relativa (131), que determina el porcentaje de energía en una banda de frecuencia específica, esta permite caracterizar la actividad espectral en una banda de frecuencia en relación con las demás, posibilitando el estudio de cambios de la potencia en una banda en relación a la actividad espectral general de la señal (Figura 18).

Las señales de potencias en diferentes bandas están interrelacionadas, por lo tanto, la potencia es relativa. Si, por ejemplo, una señal de potencia determinada no se modifica, pero la señal de otra banda disminuye, entonces la potencia de la primera no aumenta y sin embargo la relativa si, y por lo tanto la prevalencia de esa primera señal aumenta.

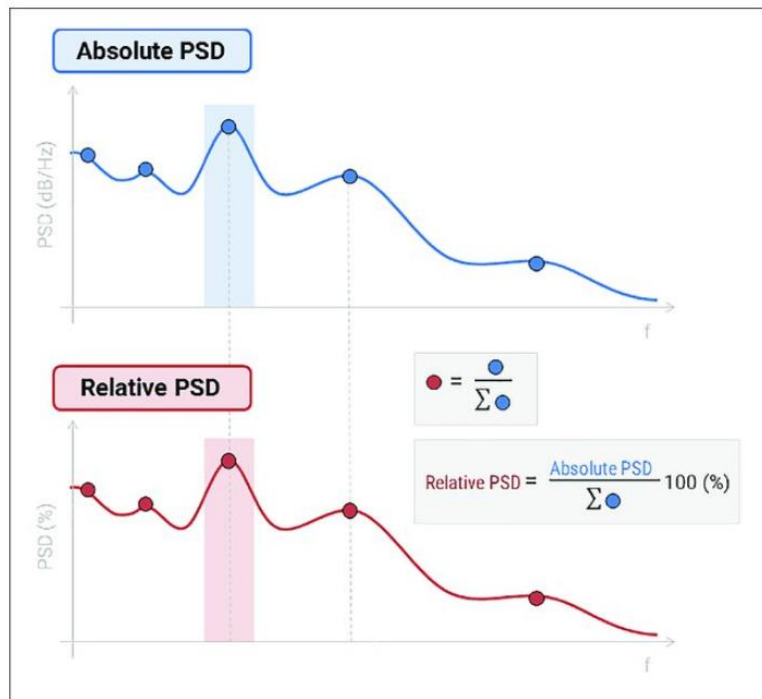


Figura 18.  
Densidad espectral de potencia absoluta y relativa. (132)

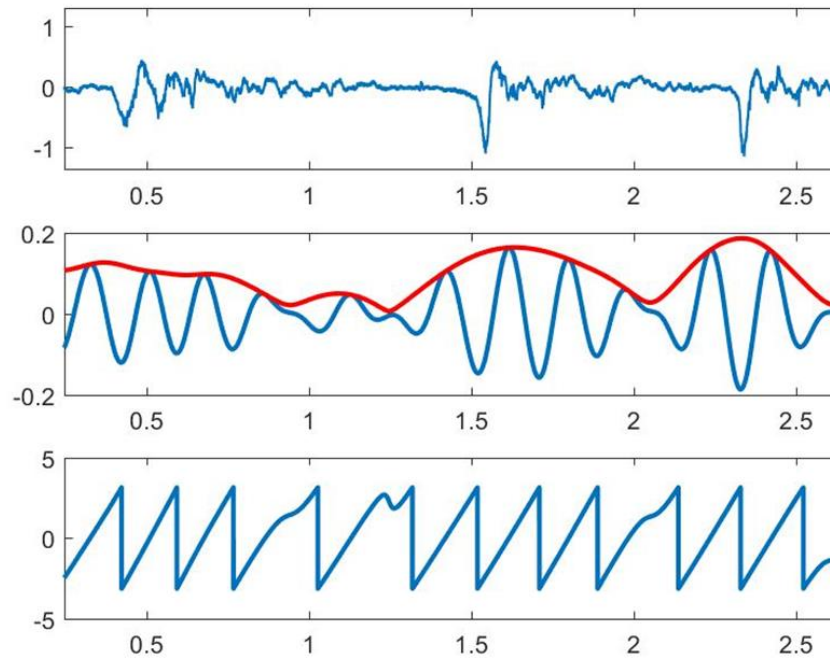
### 5.2.2.3. Filtrado y transformada Hilbert

El proceso de filtrado de señales es una herramienta crucial en el momento de estudiar señales electrofisiológicas. Este proceso permite eliminar frecuencias no deseadas, es decir, ruido. La red eléctrica es una de las causas más comunes del ruido en los registros ya que genera un campo electromagnético que oscila a la frecuencia de 50 o 60 Hz (según la ubicación geográfica) (133).

Lo anterior, puede limitar el alcance del análisis, puesto que al manipular señales digitalizadas debemos tener en cuenta que no podemos obtener información codificada para frecuencias superiores a la mitad de la tasa de muestreo, debido a la propiedad de Nyquist (134). Determinar los rangos de análisis adecuados es importante para no hacer inferencias falsas.

Esto permite estudiar la actividad en una única banda de frecuencia. Tal como vimos anteriormente, la FFT nos da información sobre las bandas frecuenciales en las cuales hay actividad, pero no nos permite saber en qué momento se presenta. Como estamos analizando señales variables, determinar en qué momento cambia la actividad frecuencial es crucial para el análisis correcto. Una manera de estudiar los cambios de actividad en una frecuencia determinada es filtrar la señal en esa banda y estudiarla en el dominio del tiempo. Para entender

bien las variaciones es importante conocer tanto la amplitud como la fase de la señal en esa banda particular, esto se logra aplicando la transformada de Hilbert (Figura 19) (135).



*Figura 19.*  
*Señal EEG intracraneal filtrada en  $\theta$*

### **5.2.3. Representación de las oscilaciones en tiempo-frecuencia**

Para estudiar las variaciones espectrales, en un contexto temporal, se han desarrollado diferentes métodos que permiten representar las señales simultáneamente en el dominio del tiempo y de la frecuencia. Esta consideración multidimensional puede facilitar el análisis y se han desarrollado diferentes métodos con este fin.

#### **5.2.3.1. Espectrograma**

Un primer enfoque consistió en calcular iterativamente la FFT en ventanas temporales de una duración determinada, con o sin solapamiento entre ellas, asumiendo que la señal es estacionaria en esa duración. Para cada FFT resultante se codifica la amplitud en color y se rota con el objetivo de construir una visualización tridimensional, (espectrograma) (Figura 20) (136).

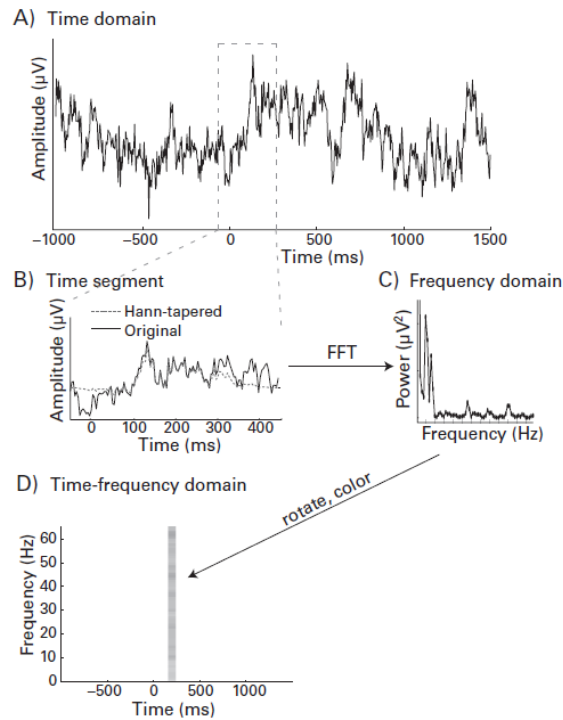


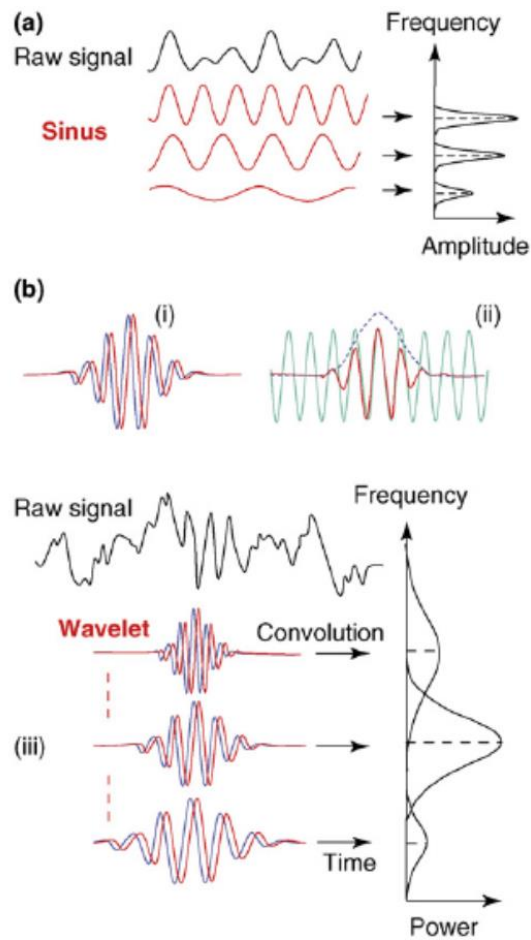
Figura 20.  
*Generación de un espectrograma. (105)*

Una restricción de este método es que el tamaño de la ventana limita la sensibilidad frecuencial del espectrograma y sesga los resultados (135). En efecto, el ancho de la ventana que se usa determina la cantidad de ciclos presentes para cada frecuencia. En una ventana de 1s solo se puede presentar un ciclo de una oscilación a 1 Hz; pero podemos visualizar 50 ciclos de una que oscile a 50Hz. Para cada ventana la presencia de actividad muy lenta será indetectable y la presencia de actividad rápida se perderá en el promedio si no es constante. Por lo tanto, debemos tener ventanas de tamaño constante para todas las bandas de frecuencia lo cual introduce una limitación en la resolución y por esta razón sólo podemos analizar rangos cortos de frecuencia.

### 5.2.3.2. Escalograma - Wavelets

En 1984 Morlet y Grossman utilizaron wavelets para solucionar el problema de resolución, a través de ventanas temporales ajustables utilizando el número de ciclos de una wavelet de una frecuencia determinada (escalograma) (Figura 21) (137,138). Para cada banda de frecuencia se determina una wavelet y se realiza la convolución de la señal, esto genera una medida de similitud entre la señal y la wavelet en el tiempo. En los momentos donde la señal contiene esa actividad frecuencial, la similitud aumenta, y cuando no, disminuye, encontrando así los

momentos en los que se presenta actividad en esa banda determinada. El proceso se repite para cada banda obteniendo así la información en ambos dominios con una buena resolución tanto en tiempo como en frecuencia (35).



*Figura 21.  
Generación de un escalograma. (35)*

Aunque la resolución en ambos dominios es buena, es inferior a la de la representación en tiempo y la representación en frecuencia de manera individual (Figura 22), esta representación no sustituye el análisis en cada dominio por separado.

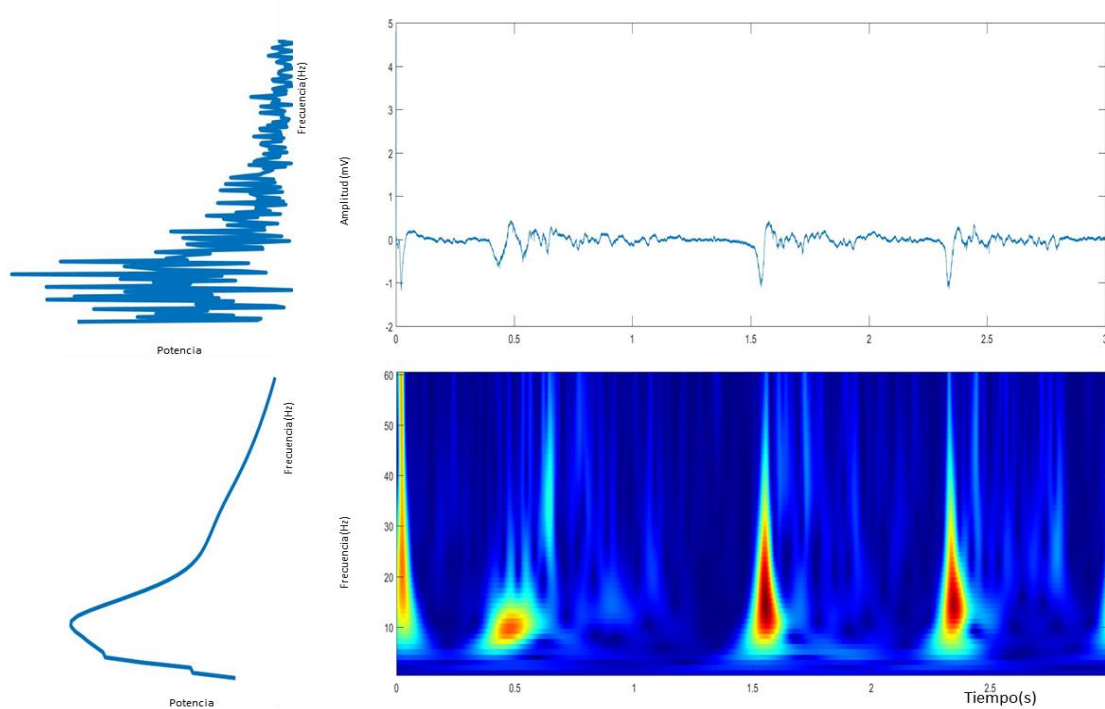


Figura 22.  
Representación en tiempo, en frecuencia y en tiempo-frecuencia

Las wavelets son ondas de corta duración y tienen un valor promedio de 0. Dichos componentes pueden tener diferentes formas y se debe elegir una para realizar el análisis. A esta la llamamos wavelet madre (Figura 23). Una vez elegida se debe escalar, lo que hace que se comprima o se expanda ajustándose a representar diferentes contenidos frecuenciales (Ecuación 2):

$$\psi_{\tau,s}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t - \tau}{s}\right)$$

Ecuación 2 Transformada wavelet

donde  $s$  es el escalamiento y  $\tau$  el desplazamiento (138)

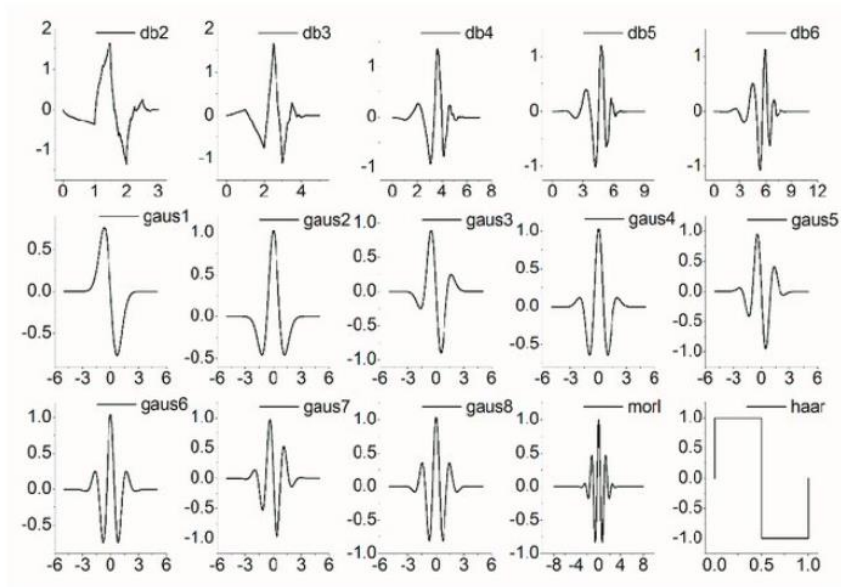


Figura 23.  
*Repositorio de wavelet madre. (139)*

La wavelet Morlet (Figura 24) es el modelo gaussiano de una onda sinusoidal con mejores resultados en el contexto del análisis de señales EEG (140).

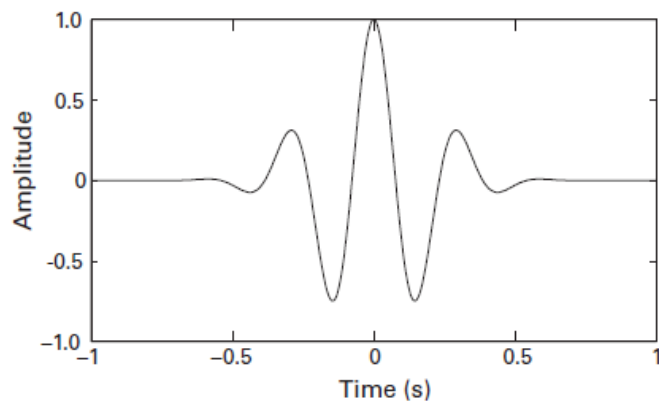


Figura 24.  
*Wavelet Morlet, creada tomando una ventana gaussiana de una onda sinusoidal. (140).*

Existen otros métodos de análisis como la distribución de Choi-Williams (*Choi-Williams Distribution CWD*) que basan su análisis en el uso de *kernels*, generalmente en funciones

exponenciales en lugar de sinusoidales. Aunque puede presentar buenos resultados, necesita un ajuste de parámetros para reducir los artefactos, así como para evitar el *aliasing*. Además, las señales analizadas por CWD deben ser cortas y tiene un alto costo computacional (141). El método más flexible que presenta una buena relación costo-beneficio entre resolución, costo computacional y flexibilidad es la wavelet Morlet, y por ello se implementó en la interfaz BOARD-FTD-PACC.

#### 5.2.4. Caracterización de las interacciones entre frecuencias

Los avances en técnicas computacionales han permitido mejorar la calidad y resolución de los registros electroencefalográficos, así como la capacidad de procesamiento de las señales. Gracias a estos avances se ha podido estudiar el acoplamiento de frecuencias cruzadas, es decir, la relación entre diferentes bandas de frecuencias. Estas relaciones pueden utilizarse para estudiar organizaciones locales usando un único electrodo, o conectividad entre regiones utilizando varios electrodos.

Este acople se ha medido en diferentes especies y se puede relacionar con procesos cognitivos (142). El estudio de estas dinámicas puede explicar cómo se procesa información en el cerebro e identificar qué actividad se relaciona con tareas específicas (Figura 25). Es un método muy potente, sin embargo, tiene algunas dificultades, por un lado, el espacio de búsqueda es amplio (frecuencias  $\times$  frecuencias  $\times$  electrodos  $\times$  condiciones  $\times$  tiempo) (105) lo que genera muchas variables a controlar y por el otro, debe contar con registros de alta resolución tanto en tiempo como en frecuencia, es decir frecuencias de muestreo altas.

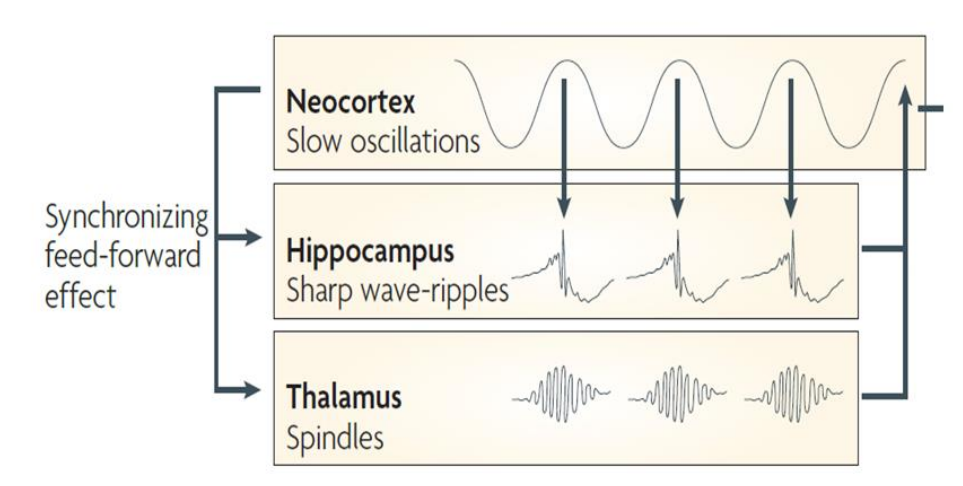


Figura 25.

*Proceso de consolidación de memoria gracias a PAC durante el sueño (143)*

Las interacciones entre frecuencias se pueden dar en diferentes relaciones, como el incremento simultáneo de la amplitud en dos bandas de frecuencia diferentes (*amplitude to amplitude coupling* AAC), actividad que relaciona dos fases (*phase to phase coupling* PPC), y la más estudiada, la relación entre amplitud y fase (*Phase-amplitude coupling* PAC). En este trabajo nos enfocamos en dos relaciones coherencia de fase (*phase coherence* PC) y PAC

#### 5.2.4.1. Acople fase amplitud (PAC)

El PAC se puede utilizar para medir la modulación local o entre dos regiones cerebrales. A continuación, presentamos tres enfoques diferentes para calcularlo.

**Primer enfoque:** Índice de modulación basado en el comodulograma (144) (Figura 26). Para este método, se seleccionan dos bandas de frecuencia: una banda moduladora estrecha y de baja frecuencia ( $f_p$ ), y una banda moduladora amplia y de alta frecuencia ( $f_A$ ). Para cada combinación de estas ventanas de frecuencia, se determina el índice de modulación (IM). Al final, se traza un comodulograma con el IM de cada combinación. La señal bruta  $x(t)$  se filtra en dos rangos de frecuencias ( $f_p$  y  $f_A$ ), obteniendo  $x_{f_p}(t)$  y  $x_{f_A}(t)$ . Las fases  $\phi_{f_p}(t)$  de  $x_{f_p}(t)$ , así como la amplitud  $A_{f_A}(t)$  de  $x_{f_A}(t)$ , se calculan mediante la transformada de Hilbert. Las fases  $\phi_{f_p}(t)$  se dividen en rangos (*bins*) y se calcula una serie temporal compuesta de fase-amplitud ( $\phi_{f_p}, A_{f_A}$ ) para obtener la distribución de amplitud media sobre los *bins* de fase. El IM se obtiene normalizando la media de cada par de ventanas de frecuencia. Estos pasos se repiten para cada una de las  $m$  ventanas de baja frecuencia y las  $n$  ventanas de frecuencia rápida y se representan en un comodulograma  $n$  por  $m$ .

Los pasos para aplicar este método pueden seguirse para un único canal o para la interacción de dos canales. En este caso, para ilustrar el método, utilizamos una señal modulada artificial para mostrar una modulación pura. Para cada banda de baja frecuencia,  $i$ , se filtra la señal y se utiliza la transformada de Hilbert para determinar la fase. Para cada ventana de frecuencia rápida,  $k$ , se filtra la señal y se utiliza la transformada de Hilbert para determinar la amplitud.

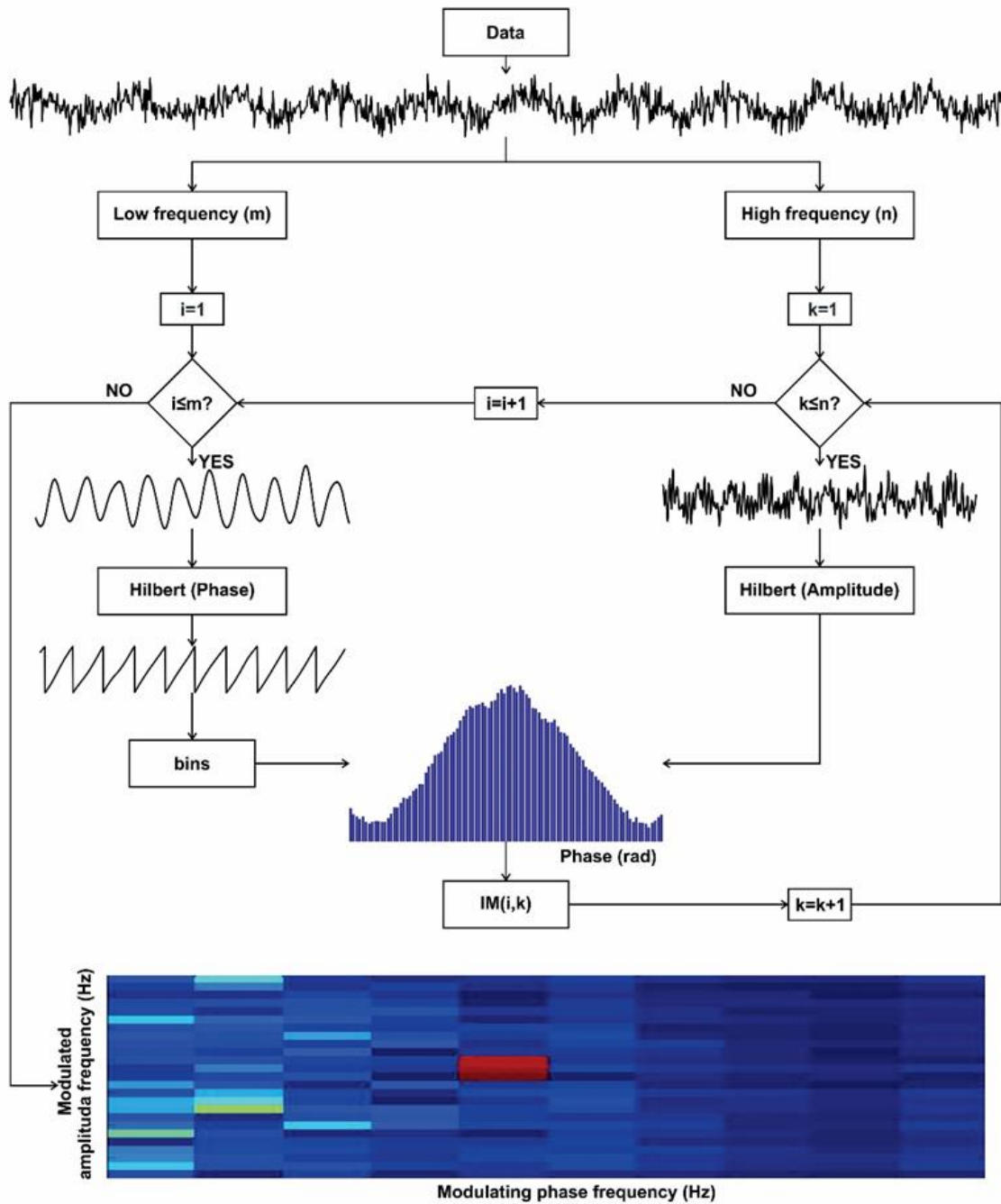


Figura 26.

Diagrama de flujo del algoritmo para el método PAC (comodulograma) implementado.

**Segundo enfoque:** La potencia media de alta frecuencia sobre la banda baja modulante (49), es una variación del método anterior. Solo se realizan los cálculos para una frecuencia lenta, es decir una banda moduladora  $f_p$ , por lo que solo se dividen en *bins* las fases  $\phi_{f_p}(t)$ . Para la banda modulada, es decir el rango de frecuencias rápidas, se realiza un análisis tiempo-frecuencia mediante una transformada wavelet Morlet,  $TF_{f_A}$ . Ahora tenemos una dupla compuesta de fase-amplitud  $(\phi_{f_p}, TF_{f_A})$  que nos permite obtener la potencia media por *bins* de

fase. Se puede calcular la media de toda la banda para obtener la distribución de potencia y su media da un único valor para el par de bandas de frecuencia. Este método también se puede utilizar para cada ensayo que se está analizando y promediar para obtener una idea general de todo el experimento.

**Tercer enfoque:** Promedio de la potencia de alta frecuencia sobre los ciclos de banda baja modulante (Figura 27). Este método es especialmente útil cuando las oscilaciones de la banda moduladora no están presentes de forma continua en el tiempo. En algunas ocasiones la banda lenta, que determina la banda moduladora, presenta actividad variable, pero nos interesa entender su papel en el fenómeno estudiado. Si se aplica el método sin alteraciones, se va a medir la modulación incluso si la banda lenta no está activa, es por esto que es necesario aislar los eventos, o ciclos de esta banda lenta.

Este método puede utilizarse para medir la modulación en un solo canal o para la interacción de dos canales. La señal moduladora de un canal elegido se filtra en una única banda moduladora; se utiliza un algoritmo de detección de picos para determinar los mínimos y máximos locales en el rango de bandas. Los mínimos y máximos locales se utilizan para determinar la duración de los ciclos, determinando así varias ventanas temporales  $wd(i)$ , para las que se calcula la transformada wavelet de los datos modulados brutos para el canal modulado. Mediante la transformada de Hilbert, se determina la fase de los ciclos de modulación para obtener la potencia media en la banda modulada sobre *bins* de fase. La potencia es la media de toda la banda modulada, y se calcula una serie temporal media compuesta de fase-amplitud  $(\phi_{f_p}, TF_{f_A})$ .

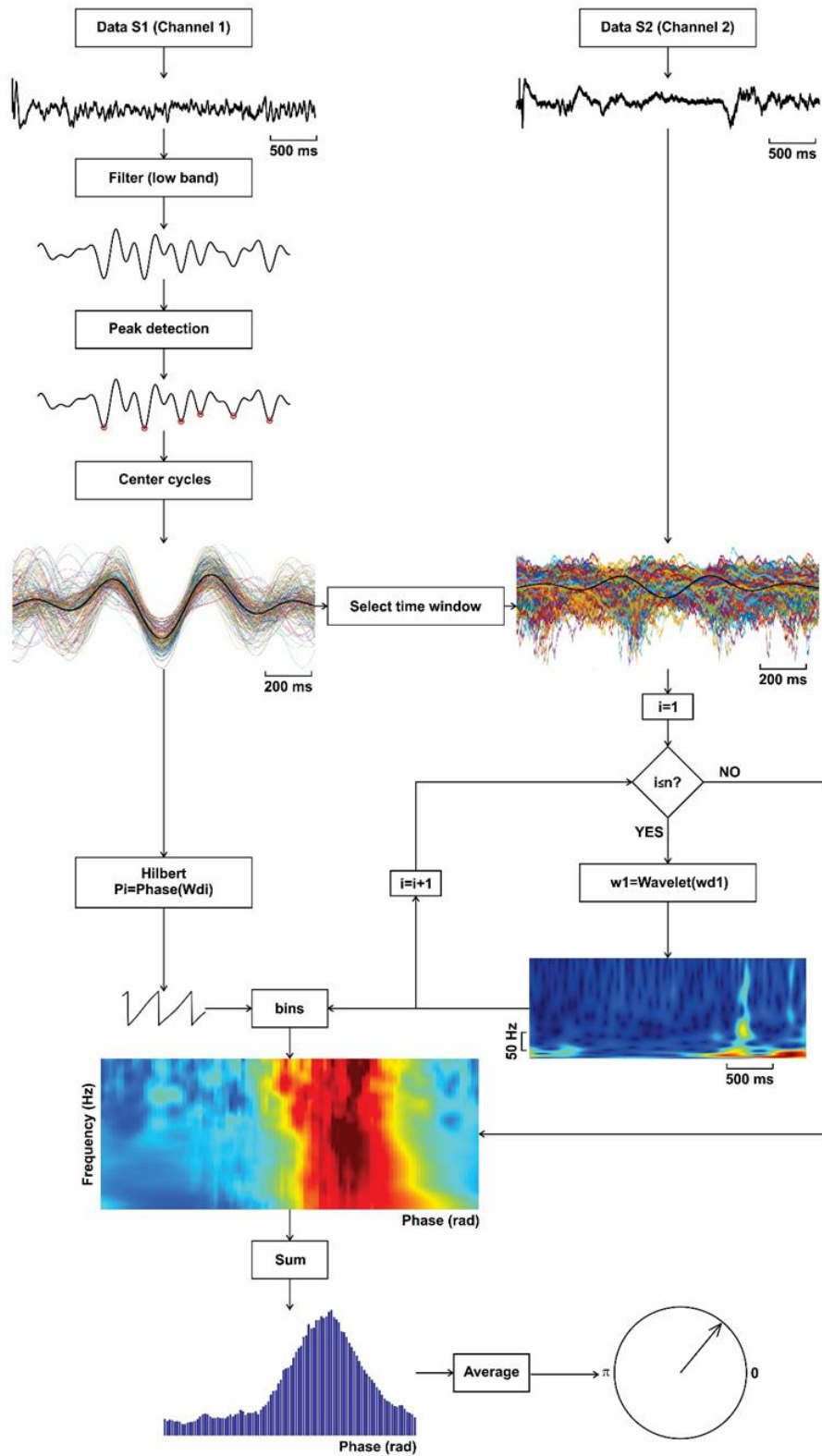


Figura 27. Diagrama de flujo del algoritmo para el método PAC (detección de ciclo) implementado.

#### 5.2.4.2. Coherencia de fase (PC)

La PC muestra información temporal de la sincronía de fase entre áreas cerebrales separadas y se define entre pares de canales, lo que constituye una prueba indirecta de su interacción funcional (145). Para este análisis, se seleccionan varias ventanas de tiempo y, en cada una, se aplica la transformada wavelet Morlet a cada canal ( $W_1(j)$ ), luego se selecciona una ventana de frecuencia para obtener la fase de cada canal ( $P_1(j)$  y  $P_2(j)$ ) a partir de la salida wavelet. Para cada época de tiempo-frecuencia, se calcula la diferencia entre las dos fases ( $d = P_1(j) - P_2(j)$ ) y se utiliza para definir el valor de coherencia de fase  $PC(j, k) = \text{media}(e^{id})$ , que se representa en una matriz de  $n$  por  $m$  (Figura 28).

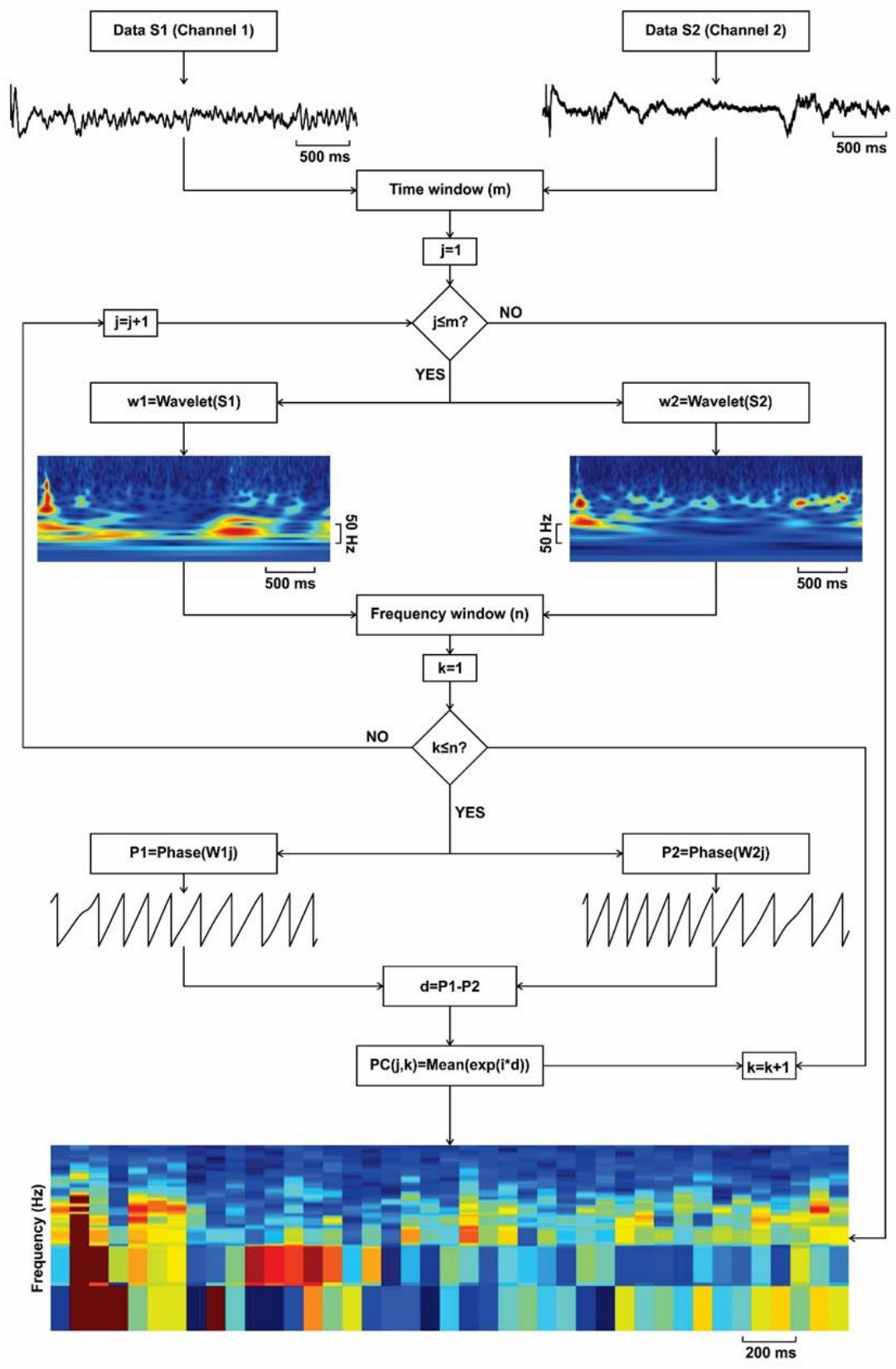


Figura 28. Diagrama de flujo del algoritmo para el método PC implementado.

### 5.3. Resultados

El resultado de este trabajo se resume en la interfaz gráfica de usuario BOARD-FTD-PACC. Presentamos a continuación algunos ejemplos y un recorrido general de su uso (Figura 29).

BOARD-FTD-PACC es una aplicación informática desarrollada para el análisis de oscilaciones neuronales utilizando el *App Designer* de MATLAB, un entorno informático de alto nivel y un lenguaje de programación ampliamente utilizado en neurociencia. Teniendo en cuenta que MATLAB ofrece varias ventajas sobre otros lenguajes, este software se diseñó para trabajar con estructuras de datos lineales, como las matrices utilizadas en este caso, y es un lenguaje de alto nivel que proporciona herramientas que permiten diseñar y utilizar aplicaciones e interfaces de forma muy intuitiva.

Adicionalmente, combina dos tipos de herramientas, las especializadas en procesamiento de señales EEG y las que permiten estudiar respuestas sinápticas. Esta aproximación permite realizar el análisis de señales electrofisiológicas adquiridas en diferentes configuraciones experimentales. Configuraciones donde varían las condiciones de registro, como la ubicación y el número de electrodos, los protocolos de estimulación, la selección de la ventana temporal y el promedio de los ensayos.

La herramienta se diseñó para ser adaptable e intuitiva, dirigida a usuarios con diversos bagajes computacionales. Está concebida como una herramienta semiautomática, en la que los usuarios pueden ajustar parámetros como los límites de tiempo y frecuencia, o la selección de ensayos, en función del diseño experimental y los requisitos analíticos, con el fin de obtener un análisis más robusto. Este software permite utilizar diferentes técnicas para extraer más información oculta en las oscilaciones regionales del cerebro. Dado que el código está escrito exclusivamente en MATLAB, no se requieren funciones ni bibliotecas externas. Además, cabe mencionar que la caja de herramientas puede utilizarse en arquitecturas OS X, Linux y Windows, e instalarse como una aplicación de MATLAB.

La presente interfaz de software proporciona resultados para las diferentes técnicas de análisis, pueden ser tanto valores numéricos como gráficos independientes que pueden guardarse y manipularse individualmente sin perder los análisis anteriores. Así mismo, tiene bloques de herramientas para cada tipo de análisis y se pueden usar de manera independiente, ajustando en cada bloque desde la frecuencia de muestreo hasta los rangos de frecuencia estudiados.

BOARD-FTD-PACC resulta especialmente útil para ayudar a los investigadores en el análisis de frecuencias cruzadas, reduciendo el tiempo necesario para realizar dichos análisis en diferentes entornos experimentales incluyendo diferentes métodos para la cuantificación del PAC.

A continuación, se encuentra una visión general de la interfaz:

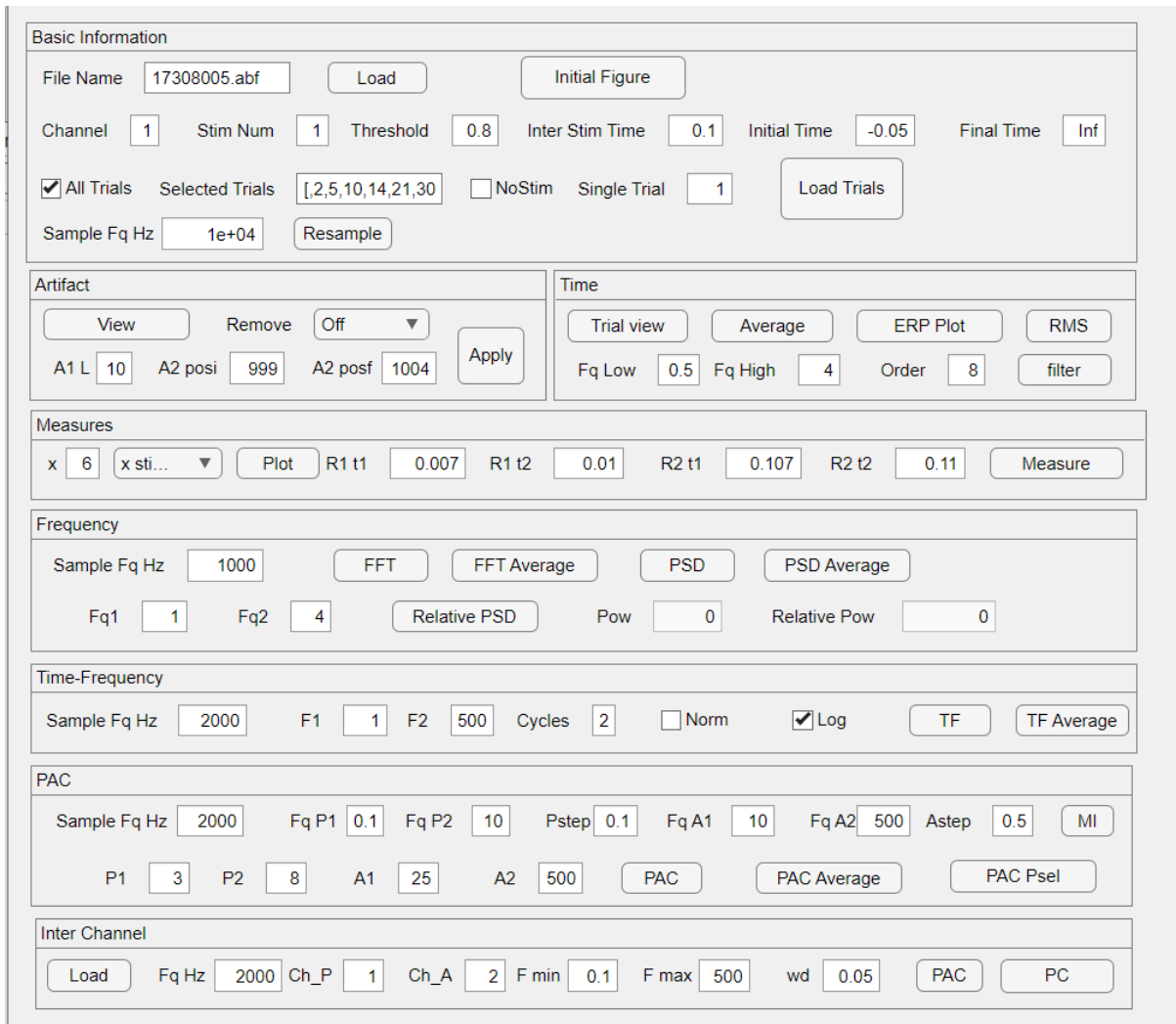


Figura 29.  
Ventana principal de la interfaz

De modo a ilustrar el uso de la interfaz presentamos imágenes producidas como ejemplos que provienen de registros intracraneales de ratas anestesiadas, particularmente en hipocampo, corteza y tálamo.

### 5.3.1. Configuración inicial

Abriendo el archivo BOARD\_FTD\_PACC.mlapp en MATLAB, se despliega la ventana general que muestra las diferentes herramientas y análisis que se pueden utilizar (Figura 29). Es importante conocer el nombre del archivo y la estructura del experimento, ya que son necesarios a la hora de definir los parámetros que permiten realizar correctamente el análisis.

Una de las principales fortalezas de BOARD-FTD-PACC es que se trata de una herramienta semiautomática, diseñada para ser utilizada por alguien que conozca tanto el experimento como las condiciones de adquisición. Utilizando esta interfaz, pueden ajustar con precisión las condiciones de análisis a su experimento y no dejar tales decisiones en manos de un programa totalmente automático.

Permite tener la posibilidad de determinar rangos y tiempos de análisis, así como poder escoger los *trials* a analizar, los tiempos de visualización, la frecuencia de muestreo y permite mantener el control sobre los análisis. Una vez ajustados dichos parámetros, el análisis será automático, lo que disminuye los tiempos de semanas a horas.

Las funciones desarrolladas se almacenan de manera independiente de modo que puedan ser utilizadas en implementaciones propias o a manera de interfaz. A continuación, se explica el *pipeline* que se debe realizar para cada herramienta desarrollada

### 5.3.2. Carga de datos

BOARD-FTD-PACC permite analizar registros almacenados en diferentes tipos de archivo. Se puede utilizar el formato de archivo binario axón (.abf) y el formato de datos europeo (.edf).

Para iniciar el *pipeline* es necesario seleccionar el archivo que contiene los registros, esto se hace introduciendo el nombre en el cuadro “**File name**” de archivo (Figura 30) y, a continuación, hacer clic en el botón “**Load**” lo que activa la función (f\_LoadSignal).

Al hacer clic en el botón “**Initial Figure**” (f\_Plot\_Ch) (Figura 30 ①), aparece una ventana que muestra la señal sin procesar de cada canal del archivo.

Basándose en la información que se despliega, como número de canales, número de estímulos, tiempo entre estímulos y duración del *trial* se llenan los parámetros ajustables para preparar los datos, en la casilla “**channel**” si ingresa el canal a analizar.

En caso de tratarse de una señal adquirida en un experimento con estímulos se debe ingresar la información que permitirá segmentar o descomponer la señal en *trials*.

En “**Stim num**” se ingresa el número de estímulos para cada *trial*, y el tiempo entre estímulos (en segundos) para cada *trial* en “**Inter stim time**”.

El valor del umbral “**Threshold**” se utiliza para determinar la amplitud mínima de estimulación (mV), a partir de la señal del canal de estimulación.

Usando estos datos el programa separará el registro continuo en una matriz de *trials* que se podrá utilizar en los siguientes análisis.

De modo a visualizar esos *trials* es necesario definir los límites de la ventana de tiempo en las casillas “**Initial time**”, que determina el tiempo previo al estímulo y “**Final time**”, en caso de no conocer la duración de los *trials* escribir “inf” y la herramienta graficará hasta el final (Figura 30 ②).

El usuario puede determinar si usa todos los *trials*, seleccionando “**All Trials**” o solo un conjunto para los análisis, ingresándolos en “**Selected Trials**”.

Debe también escoger un *trial* “ejemplo” que se podrá visualizar de manera aislada, escribiendo el número en la casilla “**Single Trial**”.

En caso de tratarse de un registro continuo sin estímulos se hace clic en la casilla “**No stim**”.

Siempre que sea necesario, el usuario puede reducir la frecuencia de muestreo de la señal, introduciendo la nueva tasa deseada en la casilla “**Sample Fq Hz**”. Disminuir la tasa de muestreo afecta el rango de frecuencias que se puede analizar, pero también disminuye los tiempos de procesamiento y análisis. Esta opción se repite a lo largo de la interfaz, ya que este cambio es localizado y se puede disminuir para unos análisis y para otros no.

Una vez elegidos todos estos parámetros, el usuario los aplica pulsando el botón “**Load trials**” lo que activa la función (`f_Select_Trials`), que grafica los *trials* seleccionados.

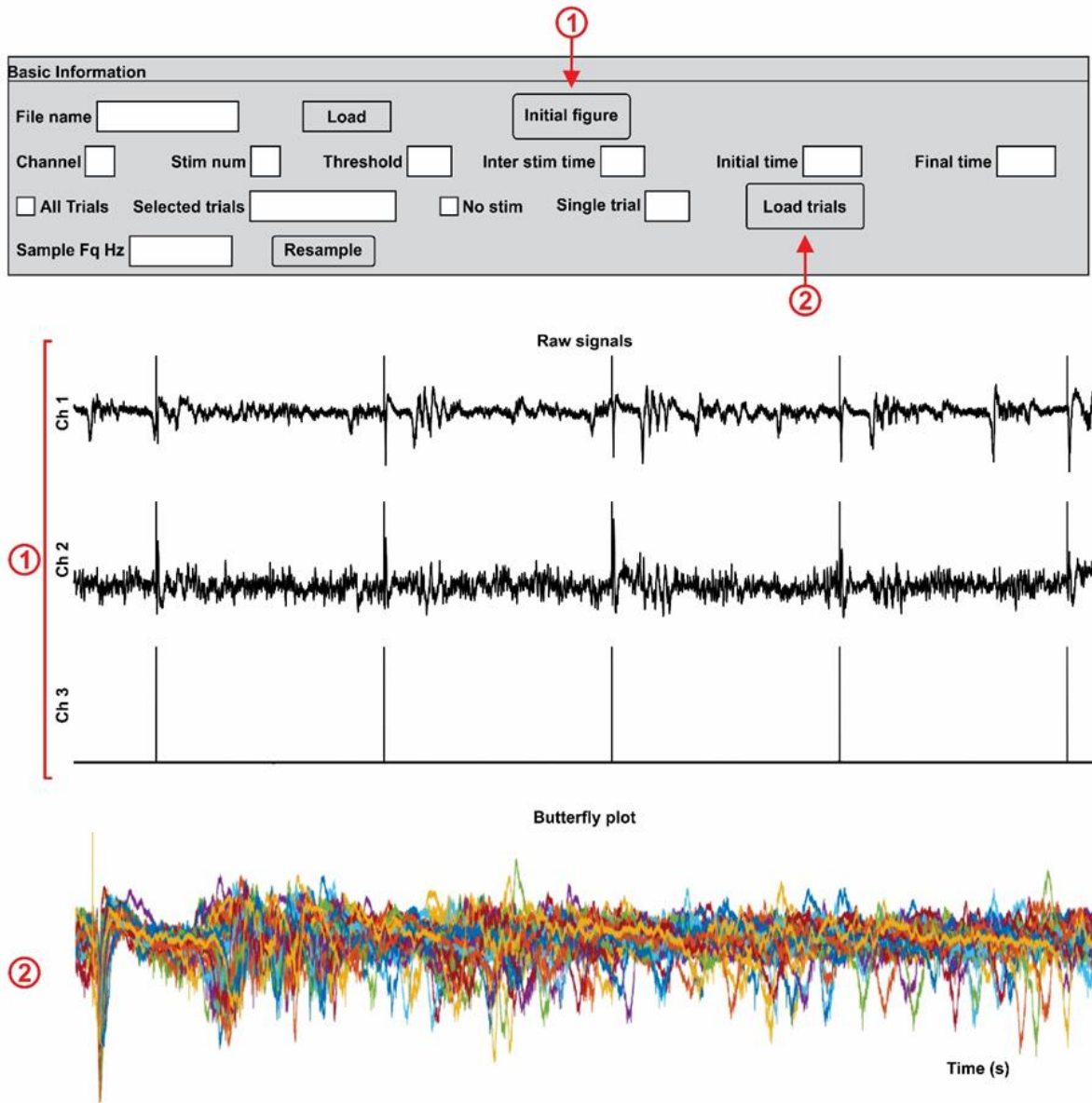


Figura 30.  
Configuración inicial

Existe un bloque adicional que se puede usar si el artefacto de estimulación afecta la calidad de los análisis. Al oprimir el botón “View” se muestra el registro, no en función del tiempo sino de las posiciones en el vector de almacenamiento. En esta figura se puede seleccionar hasta 2 artefactos y eliminar manualmente las posiciones donde se encuentra el artefacto, eliminando así ese sesgo.

### 5.3.3. Unidad de procesamiento en el tiempo

Para el dominio temporal, hay cinco análisis disponibles:

“**Trial view**” (Figura 31 ①) que activa la función (`f_plot_single`), donde se puede visualizar el *trial* ejemplo que se seleccionó previamente. Aquí se puede visualizar la respuesta a un estímulo de manera individual, y usando las herramientas de MATLAB se pueden determinar latencias, periodos de actividad o de interés para determinar el *pipeline* de análisis. Muchas veces todo el registro o todos los *trials* contienen tanta información que es difícil visualizar la actividad.

“**Average**” (Figura 31 ②) que activa la función (`f_Average`), se despliega una ventana que muestra el promedio de los diferentes *trials*.

“**ERP plot**” (Figura 31 ③) que activa la función (`f_Butterfly`), esta ventana contiene 2 imágenes, el butterfly plot (actividad de cada ensayo superpuesta en la misma figura) y la visualización en una matriz (( $m \times n$ ), donde  $m$  es el tiempo,  $n$  es cada *trial*, y la amplitud se codifica en el color). Estas están ligadas en el eje  $x$  lo que permite hacer zoom y siempre visualizar la misma ventana de tiempo para ambas representaciones. Esta imagen permite ver todas las respuestas a los estímulos de manera simultánea.

“**RMS**” (Figura 31 ④) activa la función (`f_RMS_zscore`) donde se muestra la señal rectificada y representada en desviaciones estándar a partir de la media.

Cada función se hace de manera independiente de modo a tener ventanas que se puedan manipular y utilizar para extraer la información que aportan.

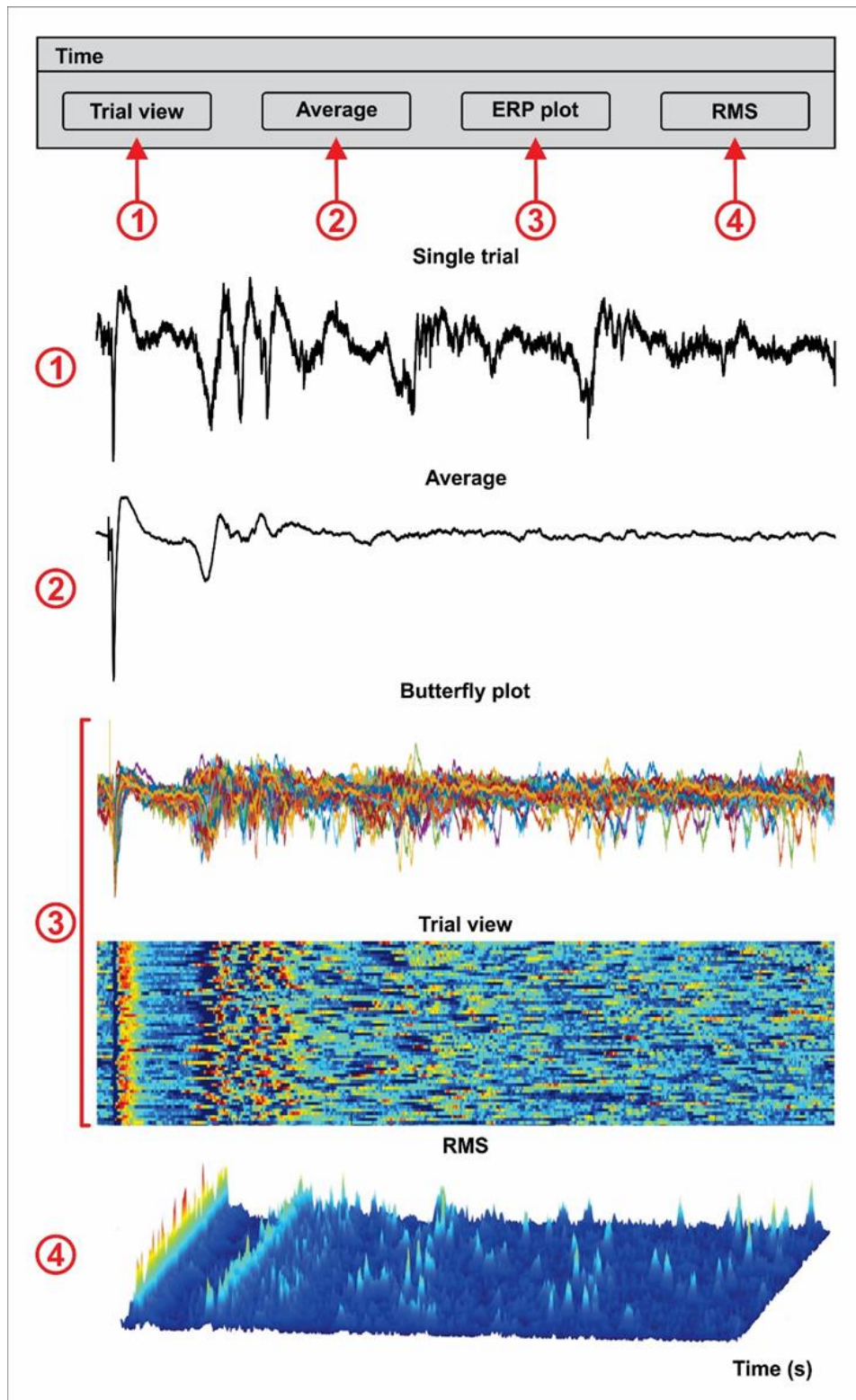
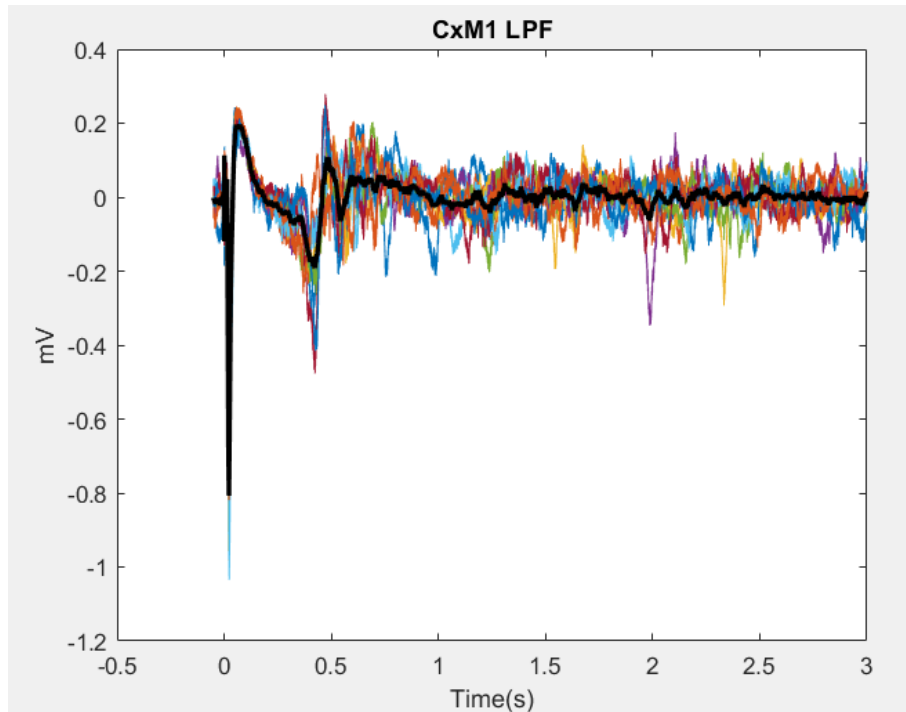


Figura 31.

Análisis del dominio temporal. El usuario puede visualizar un único ensayo ① la media ②, una ventana ERP ③ que consiste en el gráfico de mariposa y una representación de cada ensayo y, por último, la puntuación  $z$  de la RMS de cada ensayo ④.

Por último, existe la opción de medir las pendientes de las respuestas sinápticas (Figura 32). Para ello se determina cuántas respuestas se van a promediar para cada medida en “x”, y se determina si se quiere x promedios o un promedio general. En caso de escoger x promedios se obtendrán x medidas y en caso de escoger promedio general, se obtendrán medidas para cada respuesta. En ambos casos en negro se gráfica el promedio general.



*Figura 32.*  
*Respuesta a un estímulo*

Aquí se pueden determinar los tiempos de hasta dos respuestas: el tiempo inicial de la respuesta 1 se escribe en “R1 t1” y el tiempo final en “R1 t2”, y los tiempos de la segunda en “R2 t1” y “R2 t2”. Estos tiempos se extienden a todas las respuestas, es por esta razón que se visualizan de manera simultánea (Figura 33).

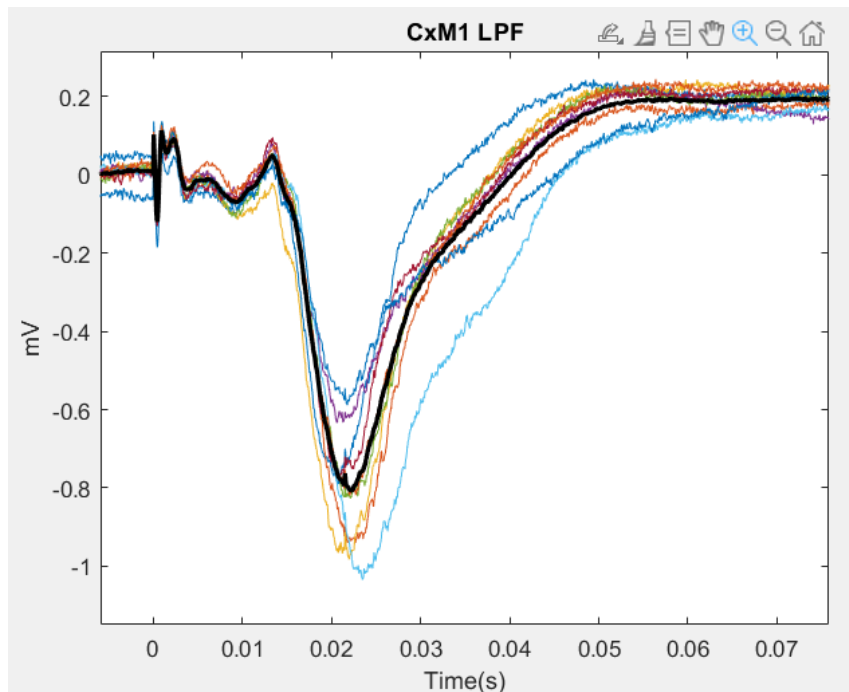


Figura 33.  
*Componente a medir en la respuesta a un estímulo*

Al oprimir “**Measure**” se activa la función (`f_Measure_Slope`) y se listan en la consola de MATLAB todas las medidas de pendiente para los tiempos seleccionados.

Este proceso usualmente se realiza para cada intervalo de interés, es un proceso largo y tedioso, pero que es difícil de automatizar, ya que las respuestas cambian a lo largo del registro. Con esta aproximación el experimentador puede determinar los tiempos, pero el proceso se generaliza, lo que lo hace rápido y eficaz.

#### 5.3.4. Unidad de procesamiento en la frecuencia y filtrado

La visualización de la actividad en una banda de frecuencias definida nos permite ver cómo varía con el tiempo; para ello utilizamos un filtro paso banda de Butterworth ajustable (126). BOARD-FTD-PACC permite implementar un filtro pasabandas Butterworth donde se determinan las frecuencias de corte en “**Fq Low**” y “**Fq High**”, el orden del filtro en “**order**” y oprimiendo “**Filter**” (Figura 34) se activa la función (`f_Filter_order_manual`).

Para verificar la eficacia del filtro se despliegan varias ventanas: la respuesta en frecuencia del filtro, el registro completo filtrado, el *trial* ejemplo filtrado, así como su fase. Adicionalmente

se despliegan tres matrices de visualización como las implementadas para los ERPs, una para señal filtrada, otra para la envolvente y otra para la fase.

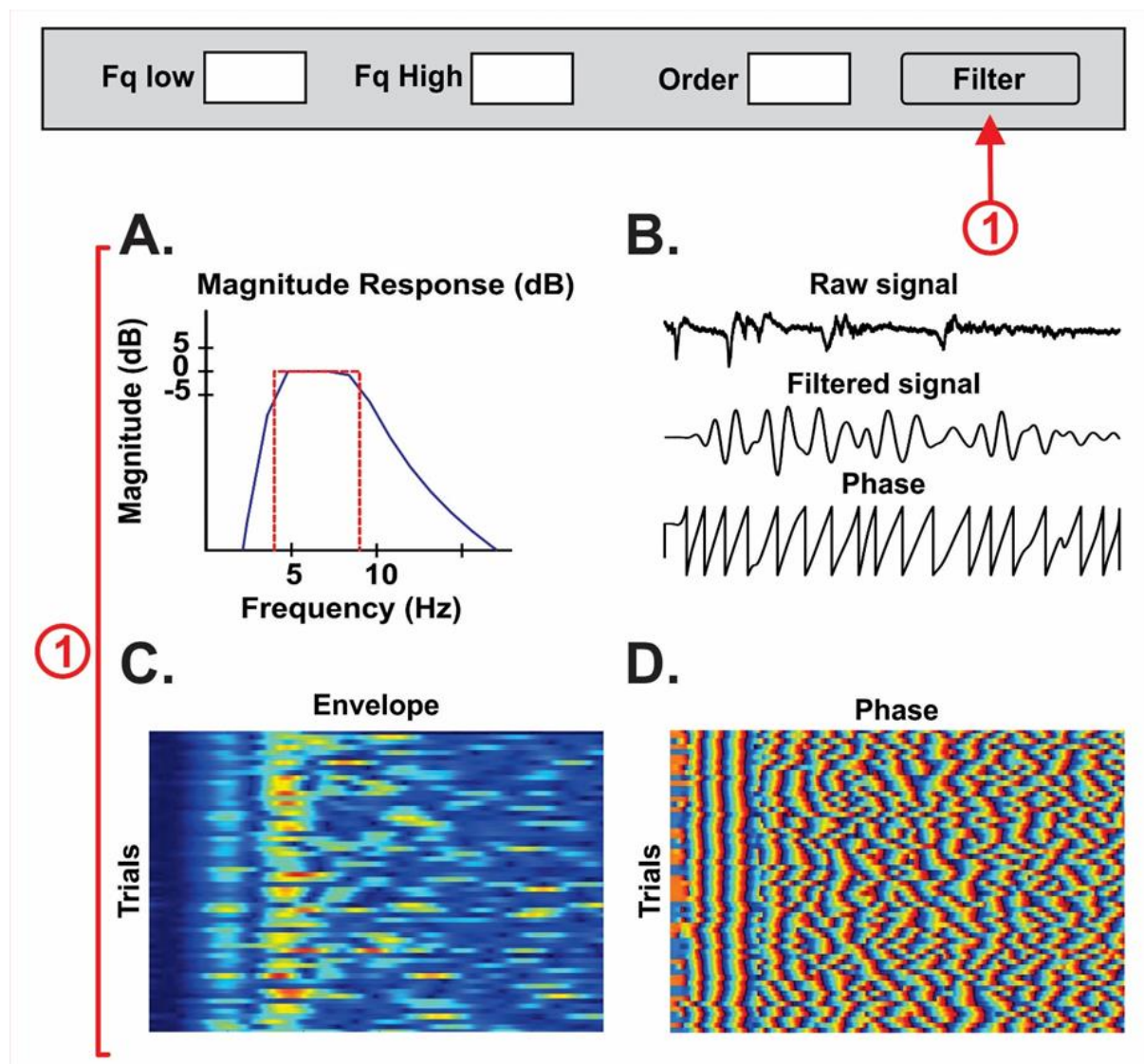


Figura 34.

Filtrado. A - la respuesta en frecuencia del filtro. B – El trial ejemplo filtrado y su fase C- envolvente de la señal filtrada. D Fase de la señal filtrada.

### 5.3.5. Unidad de procesamiento en la frecuencia y potencia

BOARD-FTD-PACC permite visualizar la FFT (Figura 35 ①) usando la función (`f_FFT`) y la PSD (Figura 35 ②) con la función (`f_PSD`). Este análisis se hace para el *trial* ejemplo.

Se puede calcular la FFT (Figura 35 ③) y la PSD (Figura 35 ④.) para todos los *trials* y calcular el promedio, usando las funciones (`f_FFT_average`) y (`f_PSD_Average`).

El rango de estudio depende de la frecuencia de muestreo, así que se puede ajustar para disminuir el tiempo de análisis. Aquí se puede calcular la frecuencia relativa para todas las bandas de frecuencia, al oprimir “Relative PSD” se imprimen en la consola de MATLAB las potencias absolutas y relativas para cada banda.

Como vimos anteriormente, los límites de las bandas son arbitrarios y podemos estar interesados en un rango particular, estos límites se ingresan en “Fq1” y “Fq2”, el resultado de la potencia absoluta y relativa se despliega en la interfaz en las casillas “Pow” y “Relative Pow” respectivamente.

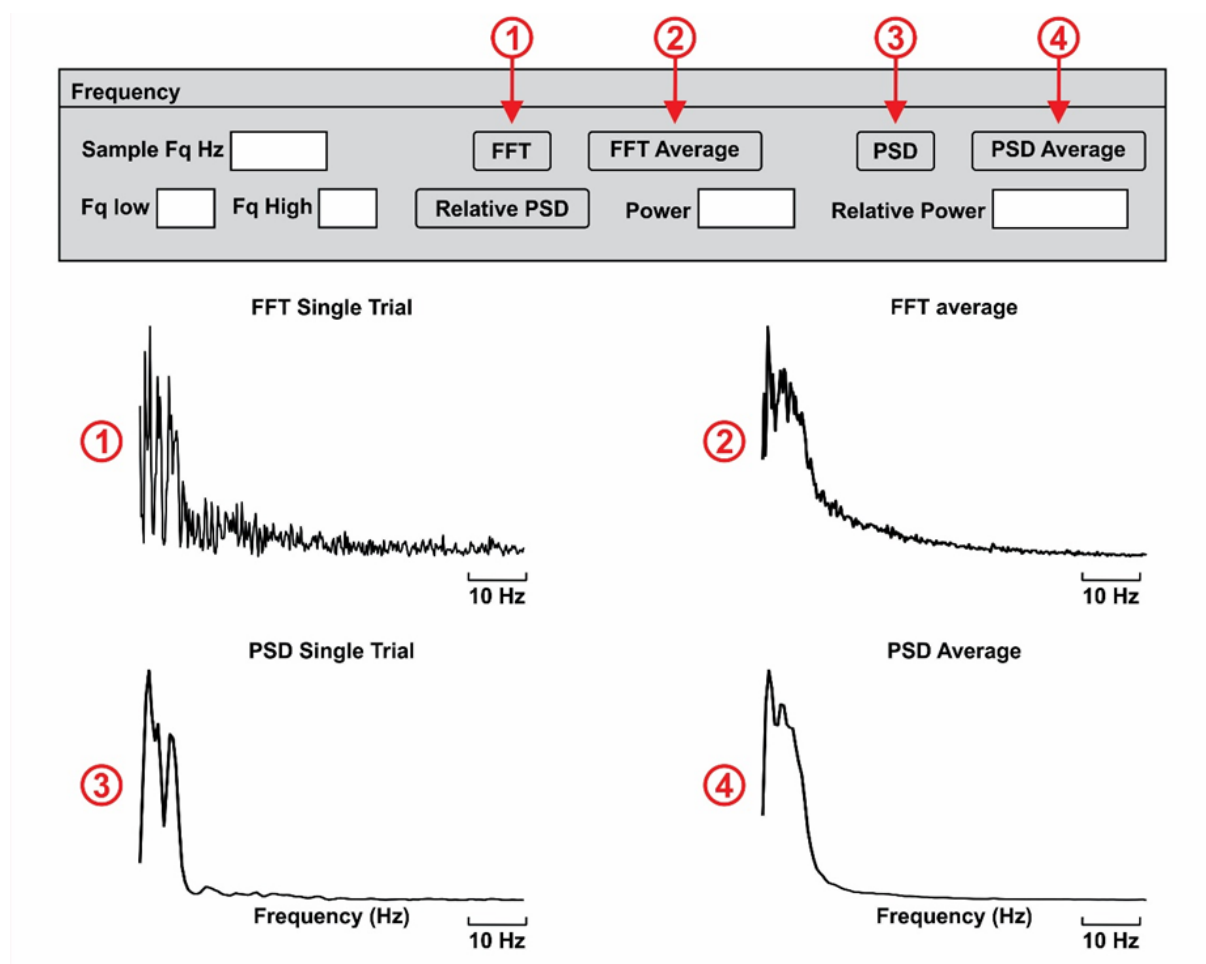


Figura 35.

*Dominio de la frecuencia. Esta sección muestra la FFT de un único ensayo ①, y la media FFT de todos los ensayos seleccionados ②, así como la PSD del ensayo único ③, y la PSD media ④. La PSD y la PSD relativa de cualquier banda son calculadas por el software, mientras que los límites de frecuencia (Fq bajo a Fq alto) son determinados por el usuario.*

Calcular la PSD y la PSD relativa de una banda determinada por el usuario puede ayudar a determinar las bandas de frecuencia que se van a explorar con los métodos de acoplamiento tiempo-frecuencia y frecuencia cruzada.

### 5.3.6. Unidad de procesamiento en tiempo-frecuencia

BOARD-FTD-PACC permite al usuario elegir los límites de frecuencia para el cálculo de la transformada tiempo-frecuencia utilizando la wavelet Morlet (Figura 36 ① y ②). Para realizar este análisis se define la frecuencia de muestreo “**Sample Fq Hz**”, como en el módulo de frecuencia, ya que los tiempos de procesamiento pueden ser muy largos y no es necesario tener frecuencias de muestreo más altas de las necesarias para tener un buen resultado.

También es necesario definir el rango de frecuencias que se desea visualizar en las casillas “**F1**” y “**F2**”. La interfaz permite ajustar el número de ciclos de cada frecuencia que se va a tener en cada *wavelet* “**cycles**”, usualmente 2 o 3.

Al tratarse de un software adaptable, la normalización “**Norm**” (Figura 36 ③) y uso de la escala logarítmica “**Log**” (Figura 36 ④) son opciones que permiten mejorar la respuesta, según las características del experimento.

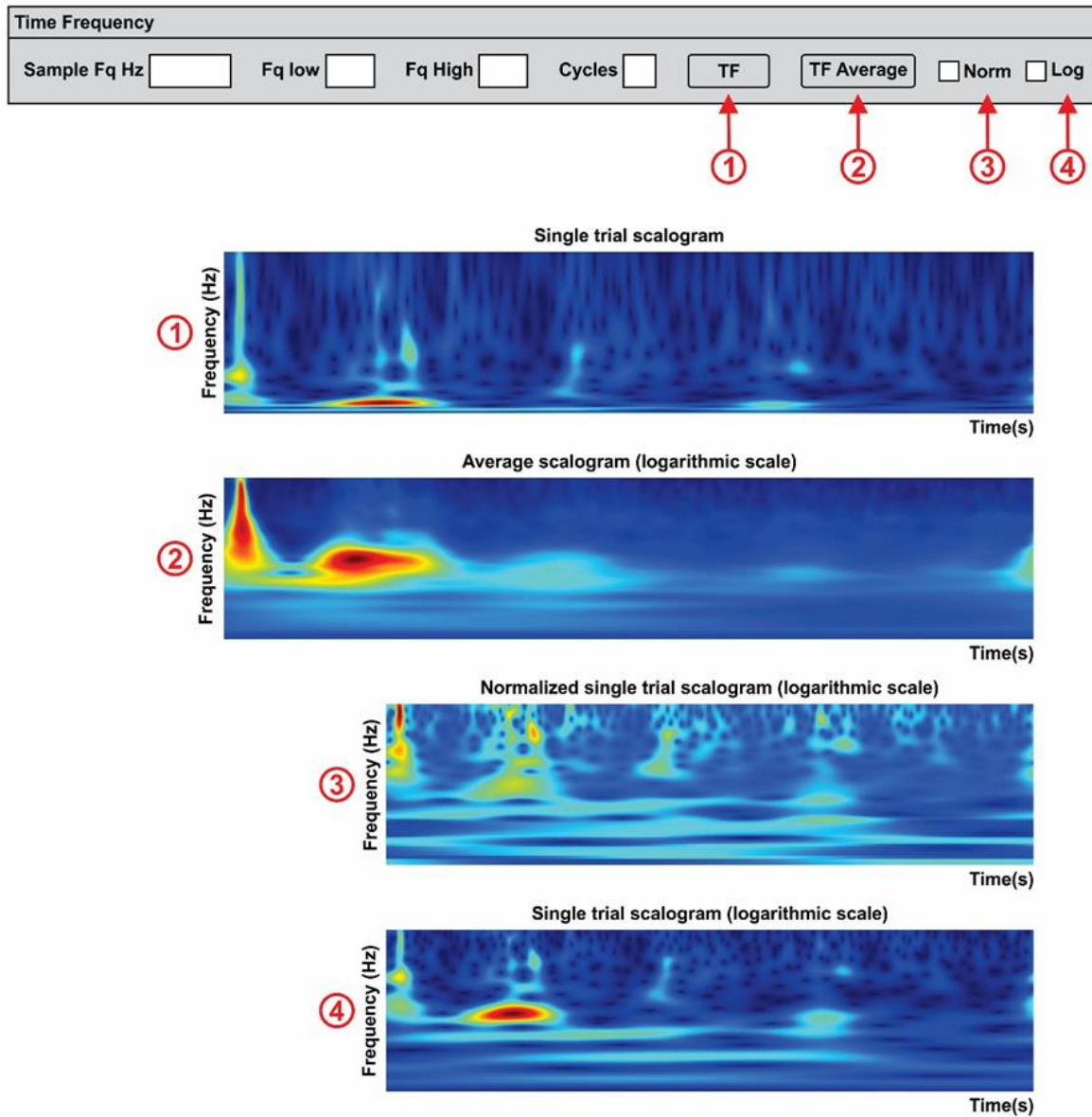


Figura 36.

*Dominio tiempo-frecuencia. Esta sección muestra la transformada de la wavelet tiempo-frecuencia (escalograma) en los límites de frecuencia (Fq bajo a Fq alto) utilizando un número de ciclo determinado, fijado por el usuario. Incluye la frecuencia temporal (TF) de un único ensayo ① y la media ②. Para visualizar mejor los resultados, el usuario puede elegir la opción de normalización (Norm) ③ y/o una escala logarítmica (Log) ④. Unidad de procesamiento en el acople de frecuencias*

### 5.3.7. Unidad de procesamiento de acople (PAC y PC)

Uno de los objetivos principales de este software era calcular el acoplamiento de frecuencias. Por lo que nos centramos en dos: el acoplamiento fase-amplitud (PAC) y la coherencia de fase (PC). Inicialmente se presentan las herramientas para estudiar conexiones locales, definiendo análisis que usan un único canal.

Un primer módulo permite aplicar diferentes métodos de análisis PAC. El primero método calcula el comodulograma (Figura 37 ①) que nos da información general en varias bandas de frecuencia. El usuario determina los rangos de frecuencias para estudiar la fase “**FqP1**” y “**FqP2**”, los rangos para la amplitud “**FqA1**” y “**FqA2**” y los pasos de cambio entre las frecuencias “**Pstep**” para fase y “**Astep**” para amplitud. Se oprime “**MI**” y esto permite visualizar el comodulograma usando la función (`f_PAC_sing`) este método funciona mejor con señales continuas o de longitud media.

Para señales más largas, puede analizarse para una frecuencia moduladora (lenta) fija, cuyos límites se ingresan en “**P1**” y “**P2**”, y un rango mayor de frecuencias donde se evaluará la modulación de amplitud “**A1**” y “**A2**”.

En este caso hay 3 opciones:

Calcularlo para el *trial* ejemplo oprimiendo “**PAC**” (Figura 37 ②) que activa la función (`f_Phase_PAC`).

Realizar el mismo análisis para cada *trial* y definir el promedio “**PAC Average**” (Figura 37 ③) usando la función (`f_Phase_PAC_Average`)

O en caso que la frecuencia moduladora no sea constante, usar el método donde se realiza una detección previa de picos en “**PAC Psel**” (Figura 37 ④) usando (`f_Phase_PAC_Pdetect`).

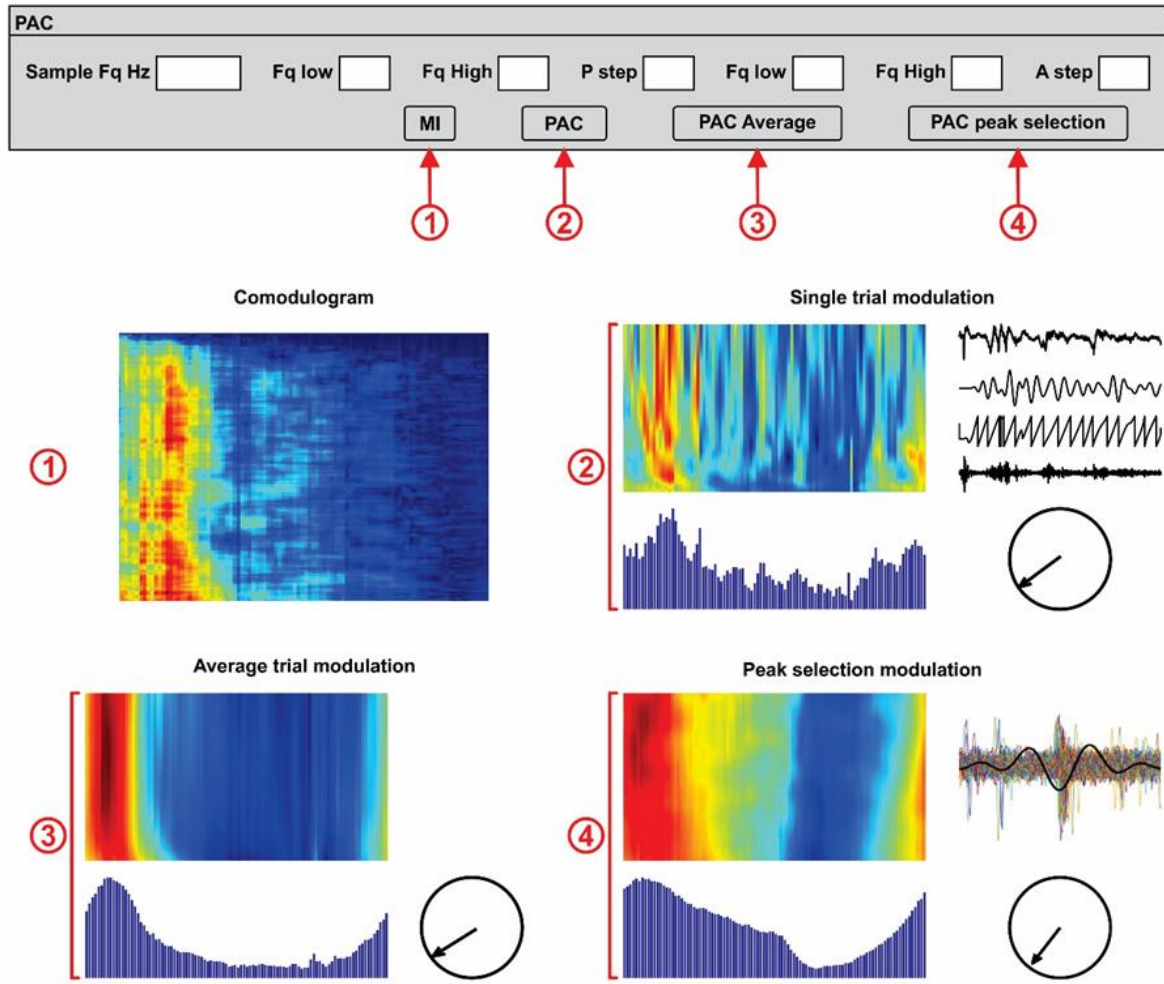


Figura 37.

Acoplamiento fase-amplitud de un solo canal. El usuario puede determinar las bandas de frecuencia alta y baja (Fq Low y Fq High), así como las ventanas de frecuencia, paso P para la frecuencia de modulación lenta (fase) y paso A para la frecuencia de modulación rápida (amplitud). Esta sección muestra el comodulograma ①, el PAC de un solo canal, que puede calcularse para un solo ensayo ②, y el PAC medio de cada ensayo ③, utilizando el método de la potencia media de alta frecuencia sobre la banda baja modulante, y de todo el registro ④ utilizando el método de la potencia media de alta frecuencia sobre los ciclos de banda baja modulante.

Nuevamente es posible ajustar la frecuencia de muestreo “**Sample Fq Hz**” para limitar los tiempos de análisis. Para cada uno se muestra la fase donde se encuentra la máxima amplitud.

Para determinar la interacción entre dos zonas del cerebro, el PAC se puede calcular utilizando dos canales. En este caso hay que definir los canales de interés “**Ch\_P**” para estudiar la fase que modula y “**Ch\_A**” para la amplitud modulada, así como la frecuencia de muestreo “**Fq Hz**” y se vuelven a cargar los datos oprimiendo “**Load**”, aquí se segmentan ambos canales con los valores iniciales. En este caso se usan los límites definidos en el módulo anterior y se

presiona “PAC” (Figura 38 ①) en el módulo marcado con “Inter Channel”, que activa la función ( $f\_Phase\_PAC\_Pdetect\_inter$ ).

Para estudiar la coherencia de fase, se necesita el rango de frecuencias en “F min” y “F max”, así como el tamaño de la ventana en segundos “wd”. Al oprimir “PC” (Figura 38 ②) se activa la función ( $f\_Phase\_coherence$ ) que despliega una matriz donde para cada ventana de tiempo y cada frecuencia se visualiza el valor de coherencia usando una escala de color.

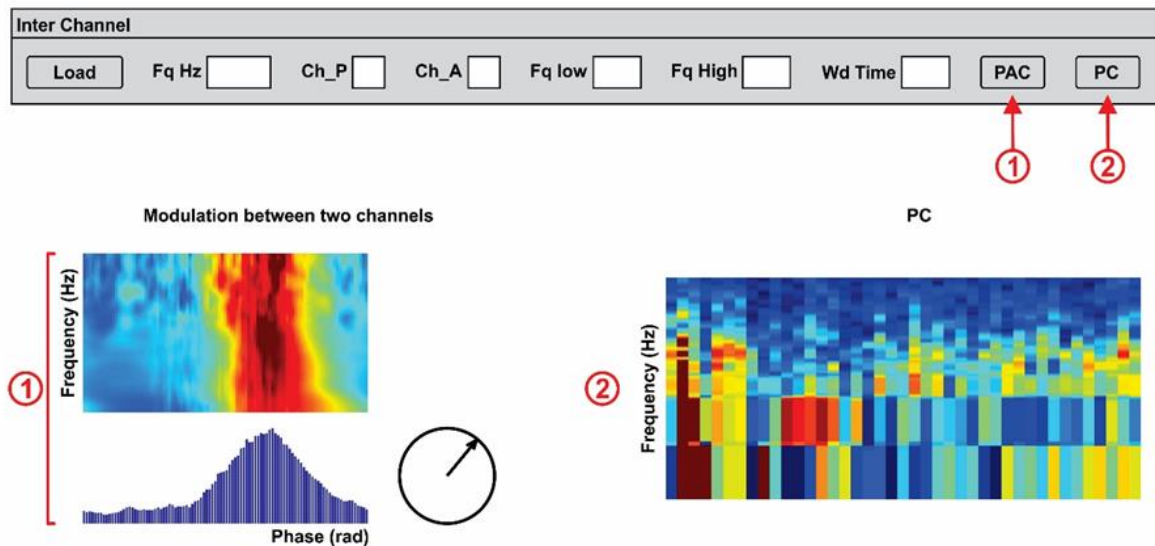


Figura 38.

Acoplamiento de frecuencias cruzadas entre dos canales. Esta sección muestra la interacción entre dos canales. El usuario determina la frecuencia de muestreo ( $Fq$  Hz), el canal modulador ( $Ch\_P$ ) y el canal modulado ( $Ch\_A$ ), así como los límites de frecuencia ( $Fq$  bajo a  $Fq$  alto) y la ventana temporal para el análisis de coherencia de fase ( $Wd$  Time). La interfaz calcula el PAC ① utilizando el método de selección de picos (Figura 27), y la coherencia monofásica (PC) ②.

## 5.4. Conclusiones y discusión

En el presente trabajo se implementó una nueva herramienta para el procesamiento de señales neurofisiológicas derivadas de registros en diferentes configuraciones experimentales, cuya principal fortaleza es su capacidad de adaptación. BOARD-FTD-PACC combina diferentes herramientas matemáticas para analizar datos o señales adquiridas.

Estos métodos se pueden aplicar a un solo canal con la excepción de PAC y PC, ya que está diseñada para ser utilizada en un laboratorio donde se realizan generalmente experimentos in

vivo e intracraneales en ratas anestesiadas, los cuales incluyen generalmente muy pocos canales.

La interfaz reúne métodos en diferentes dominios, en un solo canal (temporal, frecuencia anclada en el tiempo, frecuencia y modulación) o interacciones entre dos canales (coherencia y modulación). Creando así una única herramienta que cubre todos los análisis que se hacen en el laboratorio y que puede ser utilizada con conocimientos de programación básicos.

La otra gran ventaja que tiene es que deja la parametrización al investigador para que pueda controlar el alcance del análisis. Fue concebido como una herramienta semiautomática de fácil manejo, para ser utilizada por investigadores con o sin formación informática y matemática, y permite la visualización de la información extraída de diferentes análisis realizados a partir de registros neurofisiológicos obtenidos mediante diseños experimentales muy variables.

Se implementaron varias técnicas analíticas en diferentes dominios de tiempo y/o frecuencia, tales como promedio, visualización ERP, z-score, filtrado, FFT, PSD, análisis wavelet PAC y PC. Dichas técnicas son adecuadas para ser aplicadas a uno o dos canales a la vez, y son fácilmente ajustables según el tipo de experimentos realizados en un laboratorio de neurofisiología. Otra característica importante es el control que los usuarios tienen sobre el procedimiento analítico, en lo que respecta a la selección de parámetros y la elección de límites temporales, lo que permite una comprensión completa de los resultados y su contexto.

El objetivo de desarrollar esta interfaz era el de crear una herramienta de análisis que permita estudiar las variaciones rítmicas de los potenciales de campo cerebrales en diferentes bandas de frecuencia. Estas variaciones dependen de interacciones entre diferentes regiones y de la relación entre osciladores locales y/o distribuidos (146,147).

Los ritmos de baja frecuencia, como  $\theta$ , comprometen áreas cerebrales más grandes y modulan oscilaciones rápidas espacialmente localizadas, como  $\gamma$  (142,148). El estudio de esta modulación particular,  $\theta$ -  $\gamma$ , ha demostrado que se encuentra en procesos cognitivos importantes, como el almacenamiento y la recuperación de memoria (66,149,150). Estos procesos son de gran importancia en los estudios de la enfermedad de Alzheimer.

Ilustramos, con ejemplos, el uso de la interfaz BOARD-FTD-PACC, presentando su uso como interfaz gráfica, sin embargo, es importante notar que las funciones individuales pueden ser utilizadas en código original por un desarrollador. Mostramos sus resultados al aplicar análisis

en diferentes dominios de análisis en señales reales, adquiridas en el laboratorio y en particular en el desarrollo de este trabajo. Cabe notar que la interfaz se usa actualmente por diferentes integrantes del grupo de investigación.

La selección de métodos se realizó basándonos en literatura actual, sin dejar de lado los métodos clásicos, necesarios para contextualizar en el marco teórico los resultados experimentales.

En esta interfaz escogimos para los análisis de tiempo-frecuencia el uso de la transformada *wavelet*, usando la Morlet como onda madre. Aunque existen otras aproximaciones con este método el tamaño de la ventana varía en función del número de ciclos para cada frecuencia, mejorando la resolución tanto en frecuencia como en tiempo (105). La posibilidad de ajustar el tamaño de ventana que tiene el escalograma y que no tiene el espectrograma mejora la calidad de los resultados en este caso particular. Existen otras aproximaciones como son los métodos de distribución cuadrática tiempo-frecuencia (por ejemplo la distribución de Choi-Williams-CWD), estos métodos son más estables en señales no estacionarias (151,152) y, por lo tanto, en algunas aplicaciones, se han considerado más precisos para la detección basada en EEG (153). Sin embargo, las señales electrofisiológicas adquiridas durante actividad dinámica se estiman mejor usando la transformada *wavelet* en comparación con la transformada de Fourier de tiempo corto, la distribución de Wigner-Ville y la CWD (154). Es importante notar que el método *wavelet* cuenta con un historial de uso muy extenso, lo que genera además la posibilidad de comparar los resultados obtenidos en la literatura. Pensamos que a futuro se podrían evaluar otros métodos analíticos o alguna combinación de métodos a implementar según el circuito estudiado, de la misma manera que lo hicimos para evaluar el método PAC.

Como hemos mencionado antes, existen muchos programas que permiten el estudio y análisis de señales electrofisiológicas, como EEGLab (110), Extended Modulation Index toolbox (155), MEAnalyser (156), ERPlab (157), ERPwavelab (158), Brainstorm (113) y FieldTrip (112), así como librerías y toolbox como EMEGS (159) o PyEEG (160).

Estos programas están orientados a análisis de señales EEG, registros generalmente extracraneales, que constan de muchos canales, requieren una cantidad importante de preprocesamiento, ya que incluyen diferentes fuentes de ruido, como el movimiento, el ritmo cardíaco, problemas de contacto de los electrodos, entre otros. Adicionalmente, permiten realizar muchos tipos de análisis, pero no tienen módulos integrados para el análisis sináptico.

Estas herramientas, como ERPwavelab (158) se centran en el análisis multicanal tiempo-frecuencia de la actividad relacionada con eventos de EEG y magnetoencefalografía (MEG), pero su rango analítico es limitado debido a su énfasis en las interacciones entre canales. Además, está diseñado para configuraciones experimentales muy diferentes a las implementadas en nuestro laboratorio. RIPPLELAB (161) fue diseñado exclusivamente para la detección, análisis y clasificación de oscilaciones de alta frecuencia (HFO), es una herramienta muy completa que se usa en el contexto tanto investigativo como clínico, pero su uso se especializa en actividad de alta frecuencia, no en hacer análisis de frecuencia cruzada ni sinápticos. ERPLab (157), una herramienta integrada con EEGLab, se diseñó específicamente para analizar las ERP, mostrando la actividad en todos los electrodos simultáneamente y haciendo posible localizar la fuente de cada componente de la ERP; analiza la relación entre muchos canales en lugar de realizar diferentes análisis en cada canal individual.

EEGLab es una herramienta tan completa y tan extensa que para utilizarla de manera natural es necesario saber programar, permite hacer tantas cosas que es difícil limitar un *pipeline* que se ajuste a las necesidades de un laboratorio de neurofisiología experimental. MEAnalyser es una herramienta centrada en el análisis de trenes de picos con la ventaja de incluir análisis estadísticos y de conectividad funcional, así como una interfaz gráfica de usuario (156). Las herramientas que permiten análisis de respuestas sinápticas son generalmente tan especializadas que no permiten la automatización de procesos, ni la segmentación en *trials* de los datos, lo que aumenta considerablemente los tiempos de análisis.

BOARD-FTD-PACC combina estos dos tipos de herramientas, adaptándose a su contexto de uso. Utiliza tres métodos diferentes para el análisis del PAC con el fin de obtener una mejor estimación numérica. Para el estudio particular del PAC existen diferentes herramientas especializadas (155), a diferencia de BOARD-FTD-PACC, que también incluye el análisis de PC y PSD. Además de herramientas especializadas se generan diferentes aproximaciones metodológicas para calcular el PAC. En un desarrollo reciente, se propuso un estimador no paramétrico que resuelve algunas dudas de la validez estadística del PAC (162). En futuras versiones se podrían incluir este tipo de métodos.

En diferentes contextos de investigación, los experimentadores se enfrentan a muchas opciones para llevar a cabo sus estudios. Pueden utilizar interfaces automáticas, donde pierden el control del análisis, ya que definen umbrales de manera automática, o miden respuestas basándose en características que pueden variar mucho (como el mínimo y el máximo de una respuesta), pero

funciona de forma rápida sencilla y eficiente. Este tipo de programas, en muchos casos, no permiten ajustar parámetros que varían en diferentes experimentos y que pueden ser definidos visualmente por el experimentador muy fácilmente, tales como rangos de tiempo, selección de componentes dentro de una misma respuesta, umbrales, incluso el método a implementar.

Otra opción es diseñar y programar herramientas que se ajustan únicamente a sus señales, en este caso, el experimentador debe dominar la programación y generar un banco de funciones para llevar a cabo todos los análisis que desea realizar. Es muy común que no todos los integrantes de los grupos de investigación sepan programar, en este caso muchos procesos se realizan manualmente en interfaces de visualización. La cantidad de análisis que puede realizar, por ende, la cantidad de resultados y de información que puede obtener de sus registros es limitada. Además, la mayoría de *toolbox* disponibles reciben los datos exclusivamente en un formato específico y no se adaptan a diferentes configuraciones experimentales, como cambios en el número de estímulos o en el tiempo entre estímulos.

Por el contrario, BOARD-FTD-PACC permite el estudio de registros teniendo en cuenta dichas variaciones. Está diseñado específicamente para investigadores que desean implementar diferentes métodos de forma específica y única. Los autores que desarrollaron los métodos implementados en esta interfaz (144,163) generalmente publican el código, con algunas señales donde se pueden probar. Sin embargo, su implementación está ajustada a esos ejemplos y debe ser alterada para poderse generalizar a diferentes tipos de registro. Lo anterior implica un cierto grado de experiencia computacional y/o matemática, lo que dificulta enormemente que los usuarios no expertos puedan incluirlos en sus estudios.

El enfoque de BOARD-FTD-PACC consiste en dejar las decisiones de los parámetros de análisis al investigador, que pueda así introducir la configuración experimental específica, y dejando la implementación de método a la interfaz. Este enfoque supone una ventaja y también una limitación: el usuario debe conocer y comprender la estructura del experimento o, de lo contrario, los ajustes no tendrán sentido y la interfaz no producirá resultados adecuados. BOARD-FTD-PACC incorpora una amplia variedad de análisis, con los que el usuario debe estar familiarizado para comprender los resultados que se ofrecen y determinar los ajustes correctos. Esperamos que esta herramienta aumente la información obtenida a partir de los diferentes experimentos y anime a investigadores de distintas procedencias a probar diferentes métodos y enfoques analíticos que quizá no hubieran considerado antes.

## **6. Capítulo 2. Efectos agudos de $\beta$ -Amiloide en la actividad oscilatoria y la plasticidad sináptica en el circuito CA3-CA1 del hipocampo.**

Este Capítulo está basado en la investigación realizada en conjunto con Jonathan Muñoz-Cabrera, Mario Valderrama, Alejandro Múnera y Mauricio O Nava-Mesa publicada en el artículo “*Acute Effects of Two Different Species of Amyloid- $\beta$  on Oscillatory Activity and Synaptic Plasticity in the Commissural CA3-CA1 Circuit of the Hippocampus*”. Publicado el 19 de diciembre del 2020 en la revista “Neural Plasticity” en el ejemplar “Cortical Circuitry and Synaptic Dysfunctions in Alzheimer’s Disease and Other Dementias” Volumen 2020 con ID 8869526 (150)

### **6.1. Marco teórico**

#### **6.1.1. Enfermedades de Alzheimer**

En 1911, el doctor Alois Alzheimer (1864-1915) describió por primera vez las anomalías histopatológicas observadas en el cerebro de una paciente de 51 años que sufría de demencia (164). A la muerte del paciente se realizaron múltiples estudios en su cerebro (165) revelando atrofia cerebral. Estos hallazgos, así como los estudios histológicos y las notas clínicas se convirtieron en la base para caracterizar este tipo de demencia particular como la enfermedad de Alzheimer (EA).

Existen dos tipos de EA (166), la más común es llamada “esporádica” o “tardía”, se manifiesta después de los 65 años de edad y representa entre el 90 y el 95% de los casos (167). Existen diferentes factores que aumentan el riesgo de desarrollar este primer tipo de la enfermedad, como la diabetes, la hipertensión, la obesidad, el tabaquismo, la depresión, el sedentarismo y la inactividad cognitiva (168). El segundo tipo de la EA es llamado “temprana”, y se refiere a la enfermedad que se presenta antes de los 65 años, generalmente tiene una causa genética (167).

##### **6.1.1.1. Características clínicas y patológicas**

La EA se caracteriza inicialmente por una pérdida progresiva de la memoria, disfunción ejecutiva, cambios en el estado de ánimo y otras alteraciones cognitivas que afectan su diario

vivir (169). A medida que avanza la enfermedad se afectan casi todas las funciones cognitivas, como por ejemplo el lenguaje, las habilidades visuoespaciales, el sistema motor y sensorial e incluso se presentan alteraciones en el comportamiento (170). Los problemas de memoria son los primeros síntomas que llevan a un diagnóstico inicial de la EA. En estados tempranos se pierde la memoria a corto plazo, particularmente en la memoria declarativa (171), así como la habilidad de pasar de una actividad a otra, lo que dificulta su autonomía, y también se afecta la memoria espacial (172). Estos síntomas son las consecuencias de un proceso fisiopatológico que empieza décadas antes de su aparición (173) (Figura 39). La posible detección y comprensión de estas alteraciones permitiría el desarrollo de tratamientos preventivos que retrasen o incluso detengan su desarrollo.

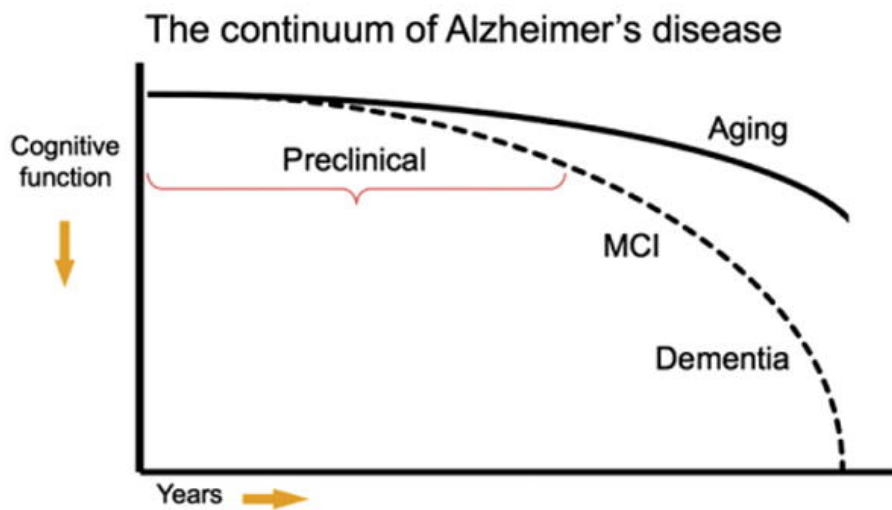


Figura 39.  
*Deterioro de la función cognitiva en la EA. (173)*

Fisiológicamente se observa una pérdida neuronal selectiva (Figura 40) y dos características histopatológicas en el tejido postmortem: placas amiloides extracelulares compuestas de péptido  $A\beta$  y ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por proteína Tau hiperfosforilada (4) (Figura 41).

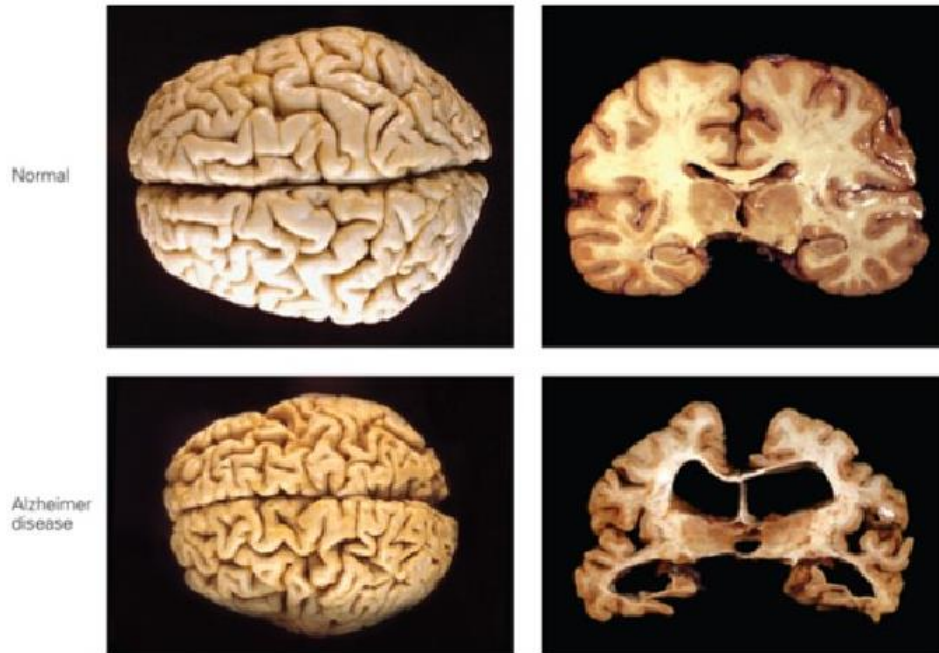


Figura 40.  
Degeneración neuronal en la EA.(174)

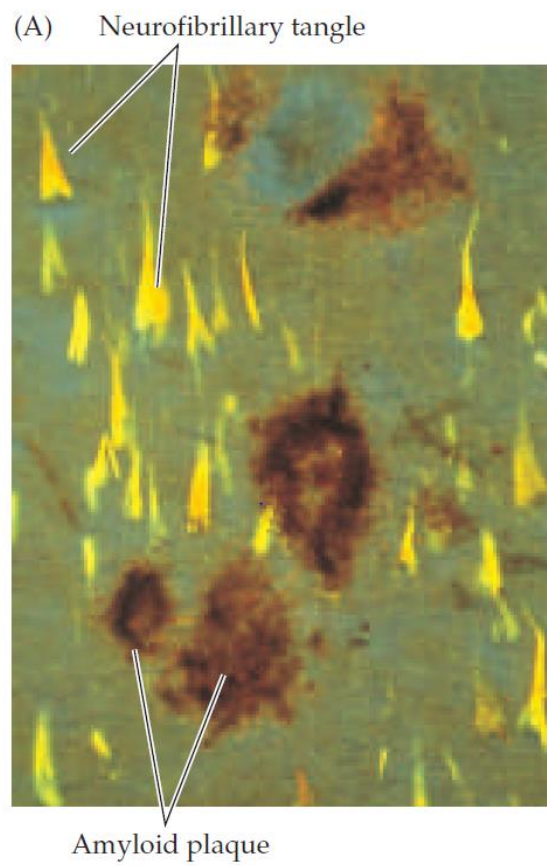


Figura 41.  
Placas amiloides y ovillos neurofibrilares. (22)

El deterioro cognitivo es un proceso fisiológico natural que se presenta con la edad, algunas patologías pueden acelerar este proceso, entre ellas se encuentra la EA (175). En caso de que el paciente presente síntomas de deterioro cognitivo, más graves de los esperados para su edad, generalmente se diagnostica déficit cognitivo leve (*Mild Cognitive Impairment* MCI) y se considera una forma prodrómica de la EA. Actualmente no hay tratamientos para evitar la transición a demencia, sin embargo, algunos cambios en la dieta, la actividad física y el entorno de los pacientes han ayudado a retrasar este proceso (175). Esto se debe a que antecede la degeneración neuronal selectiva, lo cual puede explicar el MCI, así como las primeras etapas de deterioro de la memoria (10,11).

Gracias a las nuevas técnicas de neuroimagen podemos visualizar el cerebro y medir niveles de atrofia en regiones específicas (volumetría), como el hipocampo (Figura 42), y por lo tanto predecir alteraciones cognitivas en los pacientes, particularmente las alteraciones de memoria (176).

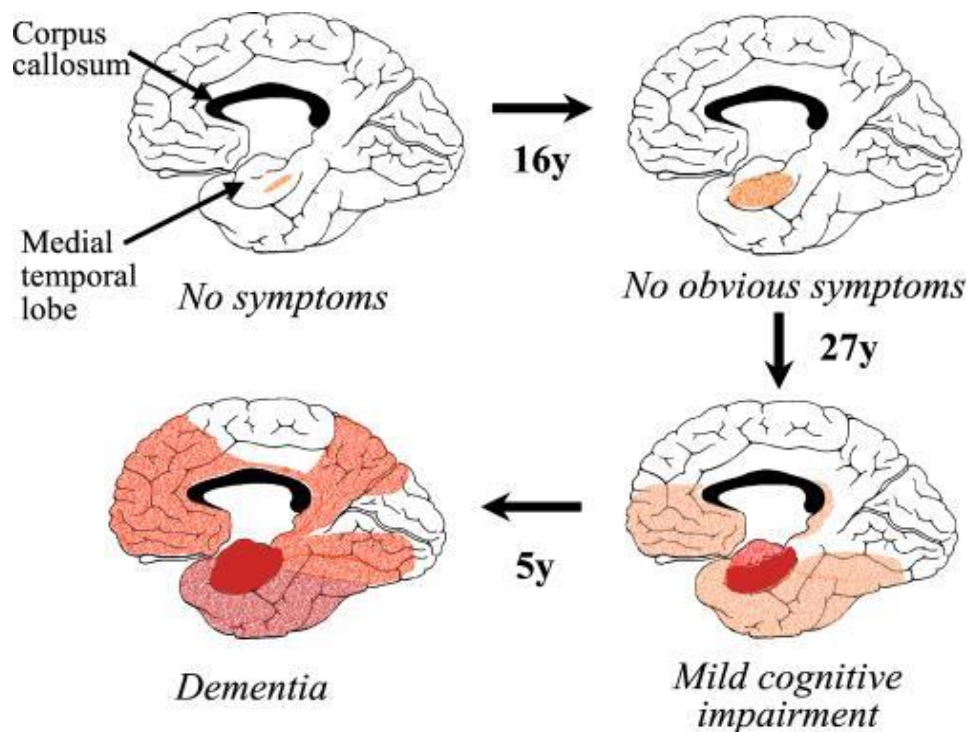


Figura 42.  
Progresión de la EA en el cerebro (176)

Actualmente podemos medir algunos biomarcadores ligados a la EA, como  $A\beta$  y los niveles de proteína Tau, los cuales son responsables de las placas amiloides extracelulares y de los ovillos neurofibrilares intracelulares característicos de esta enfermedad. Las alteraciones en

estas proteínas también se presentan antes de la aparición de los síntomas (Figura 43), así que no permiten un diagnóstico temprano.

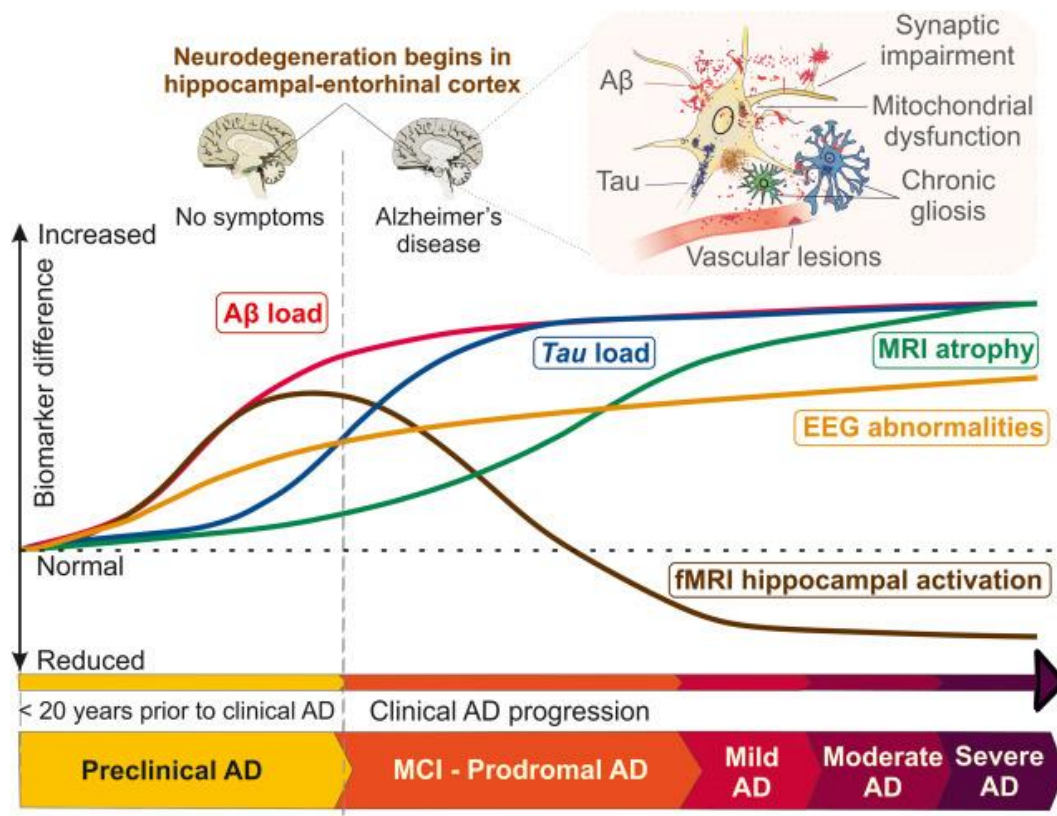


Figura 43. Cambios en biomarcadores en relación con la progresión de la EA.(177)

Estudios recientes muestran que la acumulación progresiva de A $\beta$  solubles son el origen de las diferentes alteraciones de la EA (179). En efecto, serían responsables de un desequilibrio glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico que produce alteraciones funcionales en las redes neuronales (180). Adicionalmente, producirían disfunciones sinápticas previas a la degeneración neuronal selectiva, particularmente del hipocampo y de la corteza, la ubicación de estas lesiones explica las alteraciones en la memoria, la ubicación espacial y el aumento en el deterioro cognitivo (11).

Existen pocos tratamientos para esta enfermedad, algunas terapias buscan modular la neurotransmisión GABAérgica (181), otras terapias sintomáticas incluyen únicamente inhibidores de la colinesterasa y antagonistas de los receptores NMDA (182). Nuevas inmunoterapias dirigidas contra los pépticos A $\beta$  han sido probados en distintos ensayos clínicos, sin embargo, no han demostrado un beneficio claro (177,183). En este momento no

contamos con un tratamiento efectivo para la EA, principalmente debido a la falta de comprensión de los mecanismos fundamentales que subyacen esta enfermedad, así como del papel fisiológico de los péptidos amiloides lo cual dificulta el diagnóstico temprano. En este sentido, comprender las alteraciones que produce el A $\beta$  soluble en el cerebro nos llevaría a entender mejor el desarrollo de la EA ya que sabemos que afecta el delicado equilibrio de varios neurotransmisores, los cuales impactan las diferentes oscilaciones neuronales y por lo tanto estudiar este impacto del A $\beta$  soluble en estas, puede aportar valiosa información a este problema.

### 6.1.1.2. Procesamiento del APP y papel fisiológico de A $\beta$

La proteína precursora de amiloide (*amyloid precursor protein APP*) ubicada en la región sináptica de la membrana, es la responsable de la aparición de A $\beta$  solubles. No conocemos totalmente sus roles funcionales en su estado inicial, aunque en los últimos años se ha visto que su dominio intracelular (*amyloid precursor protein – Intra Celular Domain APP-ICD*) regularía la plasticidad sináptica (184) así como la ausencia de los genes que la codifican, causando graves afecciones neurológicas (185). Adicionalmente, a una proteína la segmentan diferentes enzimas y origina fragmentos que tienen impacto en la neurona (Figura 44)

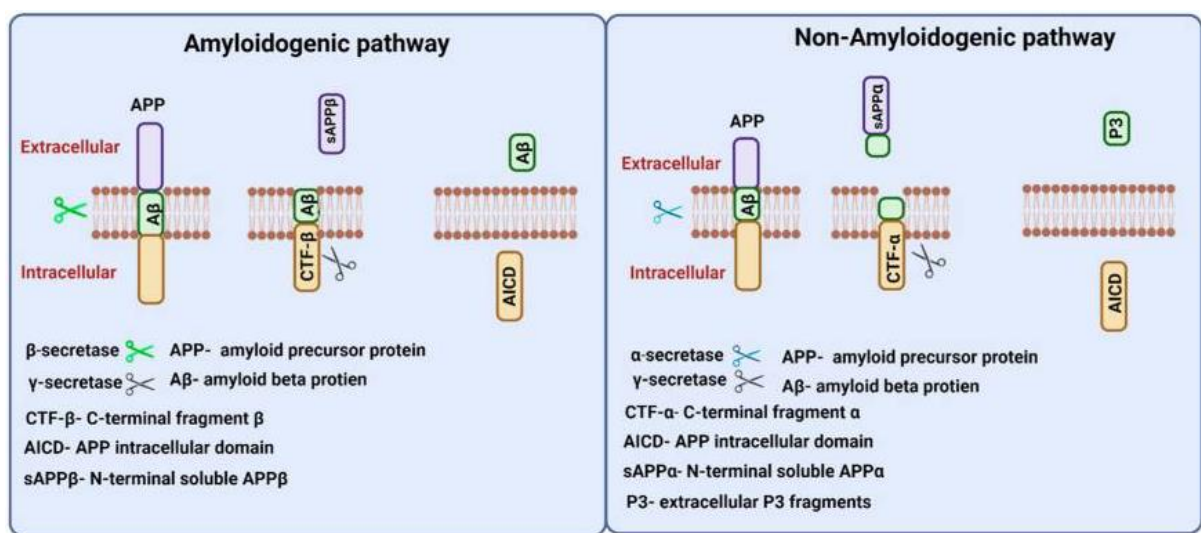


Figura 44.

*Procesamiento de la APP. La vía amiloidogénica implica las secretasas  $\beta$  liberando fragmentos solubles y péptidos A $\beta$  en la región extracelular. La vía no amiloidogénica implica secretasas  $\alpha$  y libera APP  $\alpha$  y péptidos p3. (186)*

El proceso no amiloidegénico se da cuando la  $\alpha$ -secretasa divide la APP en sAPP $\alpha$  y C83, este lo divide la  $\gamma$ -secretasa para generar p3. sAPP $\alpha$ , es neuroprotectora y regula los niveles excitatorios y por ende la sinapsis (187).

El proceso amiloide génico se da cuando la  $\beta$ -secretasa libera sAPP $\beta$ , C88 y A $\beta$ . A $\beta$  es un péptido pequeño, hidrofóbico, el cual en exceso parece tener un efecto neurotóxico (188), sin embargo, su ausencia está ligada a muerte neuronal y no se conoce el proceso en detalle, pero parece involucrar la regularización de canales de potasio y de sodio (189). Conocemos menos el rol de otros fragmentos, pero se cree que las alteraciones de su actividad funcional tienen un efecto en el correcto funcionamiento de la neurona (Figura 45) (187).

Peptide	Cleavage process	Known function	Reference
sAPP $\alpha$	$\alpha$ -secretase cleavage of APP	Neuroprotective? Involved in blood clotting? Up-regulates BK <sub>Ca</sub> activity	Smith <i>et al.</i> 1990 Furukawa <i>et al.</i> 1996
C83	$\alpha$ -secretase cleavage of APP	None known, but may be associated with neurodegeneration	Rockenstein <i>et al.</i> 2005
p3	$\gamma$ -secretase cleavage of C83	None known?	Pardossi-Piquard <i>et al.</i> 2005
AICD/CFT $\gamma$	$\gamma$ -secretase cleavage of C83	Transcriptional regulation (e.g. of neprylisin)	Leissring <i>et al.</i> 2002
sAPP $\beta$	$\beta$ -secretase cleavage of APP	Neuroprotective?	
C99	$\beta$ -secretase cleavage of APP	Altered acetylcholinesterase activity and behavioural influences	Dumont <i>et al.</i> 2005
A $\beta$	$\gamma$ -secretase cleavage of $\beta$ -secretase cleaved of APP	Depress synaptic activity Regulation of K <sub>v</sub> expression  Regulation of Ca <sub>v</sub>	Kamenetz <i>et al.</i> 2003 Ramsden <i>et al.</i> 2001; Plant <i>et al.</i> 2005 Ramsden <i>et al.</i> 2002

Figura 45.

*Péptidos obtenidos a partir del clivaje de APP y sus roles fisiológicos. (189)*

### 6.1.1.3. Hipótesis amiloidea de la EA

En 1992, Hardy y Higgins proponen la hipótesis amiloidea, la cual plantea que los depósitos de A $\beta$  generan las placas amiloides y que son la causa inicial de la patología de la EA (190). En efecto, en pacientes diagnosticados se evidencian mutaciones en los genes que codifican la APP, así como en las enzimas que participan en la producción de A $\beta$  y es claro que las alteraciones en estos procesos están ligadas a la EA (191).

Hay evidencia que sugiere que una de las principales características fisiopatológicas de la EA es la sobreproducción y acumulación del péptido A $\beta$  (192,193). Los monómeros solubles de A $\beta$  interactúan entre sí generando oligómeros, fibrillas y finalmente placas amiloides. Estudios en pacientes con EA y en modelos animales sugieren que las placas se componen de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (principalmente en los depósitos vasculares de amiloide) y A $\beta$ <sub>1-42</sub> (presentes en el núcleo de

las placas tempranas) (194,195). Adicionalmente, la evidencia muestra que la acumulación de oligómeros solubles de A $\beta$  conllevan a la interrupción de las conexiones de las sinapsis, al daño en la transmisión sináptica y de la plasticidad, lo cual conduce a la pérdida neuronal y a la disminución de los procesos cognitivos (10,196–198).

Por lo tanto, diferentes procesos asociados a la EA parecen ser detonados por el A $\beta$  soluble, así como la fosforilación de la proteína Tau (199). La proteína Tau tiene un rol principal en el citoesqueleto de las neuronas estabilizando los microtúbulos, su alteración afecta la estructura de la neurona lo que produce los ovillos neurofibrilares (200). La presencia de A $\beta$  aumenta también el nivel de radicales libres lo que induce la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y formación de especies reactivas al oxígeno, afectando los niveles de calcio y por ende la función neuronal (201). El péptido A $\beta$  también está ligado a alteraciones en la membrana, al interactuar con los lípidos puede formar canales iónicos alterando la permeabilidad de las neuronas (202). Se ha descrito que, además, puede afectar la función mitocondrial y a la permeabilidad de su membrana, alterando la producción de ATP lo que lleva a apoptosis (203).

Por estas razones se ha postulado que las alteraciones en la producción del péptido A $\beta$  es una de las principales causas de la EA.

#### **6.1.1.4. Disfunción sináptica, oscilatoria y amiloidosis**

La presencia de A $\beta$  está ligada a procesos que llevan a la degeneración neuronal, sin embargo, se ha afirmado que antes de que esto ocurra, se afecta la conexión sináptica (204). En todas sus formas, solubles, oligoméricas y en forma de placas, la presencia de A $\beta$  altera la función sináptica (204). La administración de A $\beta$  soluble en cultivos puede disminuir la densidad y madurez de las espinas dendríticas (205), lo que afecta las corrientes iónicas postsinápticas (206).

Los tratamientos en ratones transgénicos que buscan reducir oligómeros de A $\beta$  en el cerebro, logran revertir déficits cognitivos (207), lo que indica que tienen un rol en la EA. La inyección de A $\beta$  directamente en la corteza prefrontal altera la plasticidad sináptica y afecta la memoria (208).

Es relevante mencionar que el A $\beta$  actúa como regulador de la liberación de neurotransmisores (209), en su forma soluble induce a un desbalance glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico,

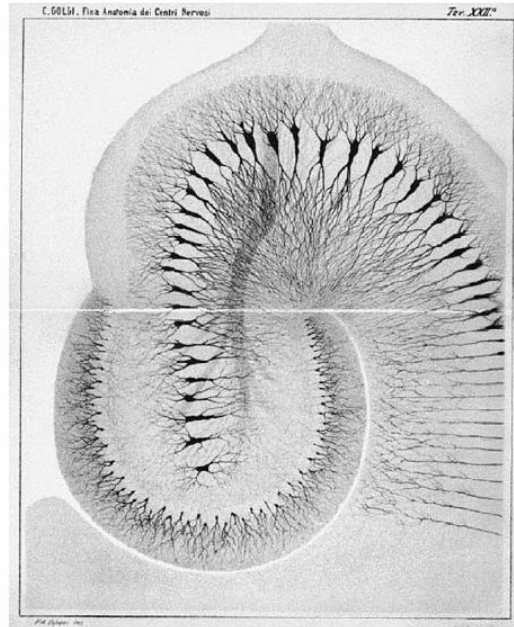
lo que ocasiona un deterioro funcional de las redes neuronales durante las primeras etapas de la EA (6,7,9,210).

Se ha sugerido que los fragmentos cortos, generados artificialmente de  $A\beta$ , como  $A\beta_{25-35}$ , pueden ser las secciones responsables de las propiedades neurotóxicas de  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  (211).  $A\beta_{25-35}$  no puede expresarse en cerebros de pacientes con EA (212–214). Varios estudios reportan efectos similares en el cerebro con formas cortas o largas de  $A\beta$  (211–213). Sin embargo,  $A\beta_{25-35}$  produce efectos tóxicos más agudos que  $A\beta_{1-42}$  debido a una mayor solubilidad (188), y a su vez, tiene diferentes efectos sobre la plasticidad sináptica y los mecanismos fisiopatológicos intracelulares en comparación con  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  (215–217).

## **6.1.2. Oscilaciones Características del hipocampo**

### **6.1.2.1.El hipocampo**

El hipocampo es una estructura cerebral que ha llamado la atención desde hace siglos por los anatomistas clásicos, y desde hace décadas por los neurofisiólogos y clínicos, dado su papel en diferentes funciones cognitivas y en el procesamiento de la información. El primer reporte que se tiene registrado de la descripción del hipocampo es del anatomista italiano Julio César Aranzi, quien en 1564 la nombró de esta manera por su similitud con el caballo de mar; en 1729 el anatomista alemán Johan Duvernoy lo dibujó con gran exactitud y más adelante Camilo Golgi y Ramón y Cajal lograron estudiar su ultraestructura (Figura 46). En 1732 el anatomista francés Jacob Winslow asoció su forma a los cuernos del dios egipcio Amón, *Cornus Ammon* (218). Muchas décadas después se nombró oficialmente la estructura como hipocampo y algunos de sus componentes como *Cornus Ammon (CA)* CA1 a CA3 (por su similitud con los cuernos del dios egipcio Amun), los cuales todavía conservan su nombre (219).



*Figura 46.*  
*Hipocampo de conejo, tinción con el método de Golgi (1886). (220)*

El hipocampo es una estructura subcortical, localizada en el lóbulo temporal medial y hace parte del denominado clásicamente sistema límbico. Asimismo, hace parte de una estructura más compleja llamada la formación hipocampal, la cual está constituida por el subículo, el para subículo y la corteza entorrinal (221). El hipocampo está formado por el giro dentado (DG) y los componentes del *Cornus ammonis* (CA1, CA2 y CA3). A su vez, el DG contiene pequeñas neuronas granulares cuyas dendritas se dirigen hacia la fisura hipocampal (222) y las regiones CA contienen neuronas piramidales muy concentradas y organizadas (223). En la estructura del hipocampo encontramos también neuronas musgosas, neuronas intrínsecas e interneuronas (224).

La región CA3 recibe aferencias del DG, continua a CA2 y finalmente a CA1, donde se conecta con el subículo. La organización de las neuronas varía en las diferentes subestructuras, donde CA3 encontramos mayor variación de tamaño neuronal y organización y en CA1, las neuronas tienden a ser más pequeñas y homogéneas (225).

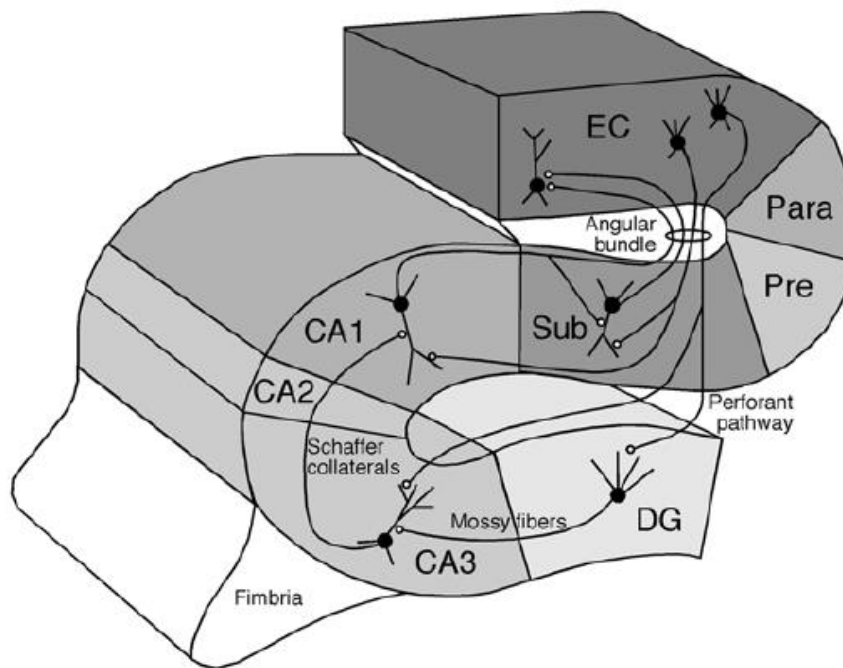


Figura 47.  
Circuito del hipocampo (220).

Como se muestra en la (Figura 47), DG, CA1 y CA3 forman un circuito trisináptico, el cual es unidireccional y glutamatérgico. La principal entrada de información del hipocampo es la proyección cortico-hipocámpica, donde las neuronas de la corteza entorrinal proyectan sus axones sobre las neuronas granulares de DG por la vía perforante. A su vez, las neuronas del DG proyectan por fibras musgosas hacia las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3, las cuales proyectan sobre CA1 por la colateral de Shaffer. De esta manera se completa el circuito con una vía eferente al subículo y nuevamente a la corteza entorrinal (226). En las sinapsis de este circuito se encuentra el mecanismo fisiológico de la memoria. Dichos mecanismos se pueden evidenciar, ya que al estimular las sinapsis de este circuito, podemos observar a largo plazo una potenciación de la respuesta sináptica (*long term potentiation* LTP) (227), lo cual implica un incremento en la eficiencia de comunicación sináptica, y mayor respuesta postsináptica glutamatérgica luego de una estimulación a alta frecuencia, y por ende, al uso de dicho circuito.

Uno de los primeros indicios de la función del hipocampo se determinó en 1953 cuando un paciente (HM) fue sometido a la extracción quirúrgica bilateral del hipocampo para disminuir la incidencia de sus crisis epilépticas. Después de la cirugía el paciente fue incapaz de realizar

algunos procesos cognitivos como la consolidación de la memoria (amnesia anterógrada), sin embargo, podía recordar algunos eventos de su pasado lejano, así como aprender y memorizar tareas motoras (228,229).

Estos estudios llevaron a identificar dos tipos de memoria diferentes, por un lado, la memoria declarativa o explícita y por otro lado la no declarativa o procedimental (230). El primer tipo depende de la actividad del hipocampo y corresponde a la memoria del saber, que es fácilmente expresable y que se almacena y evoca de forma consciente (231). Por otro lado, el segundo tipo corresponde a la memoria del hacer y depende de otras estructuras, tales como el estriado, el cerebelo, amígdala y otras estructuras subcorticales.

El hipocampo sería responsable de la adquisición, mientras que las conexiones cortico-hipocampales serían responsables de la consolidación de la memoria. En adición, el almacenamiento de la memoria se produciría en la corteza, mientras que al hipocampo se le atribuye la reactivación y organización de dicha información (232).

#### **6.1.2.2.EEG hipocampal y su correlato funcional**

La interacción entre los diferentes tipos de neuronas y las conexiones sinápticas que existen entre ellas, producen diferentes tipos de oscilaciones que rigen el procesamiento de la información en el hipocampo. Se destacan seis tipos de patrones cuatro rítmicos a saber:  $\theta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y HFO y dos no-rítmicos, SIA (*Small Irregular Activity*) y LIA (*Large Irregular Activity*) (220).

Cada tipo de oscilación se ha ligado a una función particular, por ejemplo, la actividad en las bandas  $\theta$  (4–8 Hz) está asociada con procesos de consolidación de memoria (233) y navegación espacial (234). Por su parte, la actividad  $\gamma$  está asociada a procesos cognitivos de alto nivel, como atención (235), percepción (236) y recuperación de memoria (237) y la actividad en la banda  $\beta$  se ha detectado en procesamiento sensorial, como el olfato en ratas (238). Por último, la actividad irregular LIA se registra cuando el animal no cambia de ubicación, al comer, acicalarse o durante sueño de ondas lentas (239), mientras que SIA es menos frecuente y ocurre en transiciones del animal inmóvil como sueño/alerta, o entre etapas de sueño (240).

Teniendo en cuenta lo anterior, la actividad de bandas específicas de frecuencia nos da información sobre la actividad que se lleva a cabo, sin embargo, la relación entre bandas tiene efectos importantes. Existe una estrecha correlación entre los mecanismos de potenciación a

largo plazo (LTP), el acople  $\theta$  -  $\gamma$  y la memoria dependiente del hipocampo (241–243). Estas relaciones se ven a nivel local (49), pero también entre regiones, por ejemplo, el acople fase amplitud de  $\theta$  hipocampal con  $\gamma$  cortical está presente en la recuperación de memoria (244).

#### 6.1.2.2.1. Actividad $\theta$

La actividad  $\theta$  se ha estudiado ampliamente en el hipocampo. Esta se ha relacionado con diferentes funciones e incluso su ubicación en el espectro frecuencial puede variar entre especies (245). Se puede dividir en dos componentes, a-  $\theta$  y t-  $\theta$ . El primero,  $\theta$  atencional depende de sinapsis colinérgicas, ya que se ve afectada por fármacos antagonistas como la atropina (246). El segundo,  $\theta$  de traslación y movimiento, no depende de sistemas colinérgicos, sino de la serotonina y el glutamato (220).

La presencia de  $\theta$  no es uniforme a lo largo del hipocampo, varía además en fase y amplitud en diferentes estructuras, por ejemplo, en el DG y en CA1 se registra una actividad  $\theta$  de gran amplitud muy sincrónica (247). En CA3 la actividad  $\theta$  no es constante, pero, CA3 presenta correlaciones de fase en  $\theta$  muy alta con CA1 y DG, lo que sugiere que la producción de  $\theta$  no es un proceso de una neurona sino de la actividad regional (72).

La generación de ritmos  $\theta$  depende de su conexión con otras regiones. Ambos componentes de  $\theta$  dependen de la información que proviene del núcleo septal-medial. Al lesionar esta región, se eliminan ambas actividades  $\theta$  (248). En contraste, las lesiones de la corteza entorrinal eliminan el componente t-  $\theta$ , pero no afectan el a-  $\theta$  (249). Esto implica que la actividad t-  $\theta$  depende de fibras que pasan o hacen sinapsis en el septum medial en su camino a la corteza entorrinal, mientras que a-  $\theta$  requiere la proyección colinérgica de septum medial (220).

Existen diferentes posibles funciones de  $\theta$ . La primera que sirva como mecanismo de sincronización para la formación hipocampal, registros simultáneos en diferentes regiones muestran que la actividad  $\theta$  es comparable (250). La segunda es que sirva como marcador de actividad más rápida, la fase de  $\theta$  a la que las neuronas disparan actividad rápida varía durante la navegación, este fenómeno se llama precesión de fase y está muy relacionado con la ubicación (251). La última, es que sirva como control de la LTP, ya que impulsos llegando a CA1 en una fase positiva de  $\theta$  resultan en potenciación, mientras que los que llegan en una fase negativa resultan en depresión (252,253).

#### 6.1.2.2.2. Actividad no- $\theta$

Durante la actividad irregular LIA, podemos observar ondas agudas (*sharp waves*) que se presentan durante el sueño de ondas lentas y el reposo; estas ondas son menos frecuentes durante actividades estáticas como comer, beber, asearse, entre otras. Parecen estar ligadas a un estado de “reposo funcional” del hipocampo (220,254), donde el hipocampo no ejerce sus funciones conocidas. Ocurren de manera sincrónica en CA1, ya que mantienen su coherencia de fase (255). Estimular las fibras de la colateral de Shaffer resulta en potenciales evocados muy similares, por esa razón se cree que se originan en CA3 y son proyectados a CA1 (256). Una de las funciones de LIA, es que es un estado durante el cual se fortalecen las modificaciones de las sinapsis que ocurrieron en periodos previos recientes (257). Otra función es regular la transferencia de información del hipocampo a la corteza durante el sueño profundo. Lo que se relaciona con estudios que encontraron correlación entre la honda aguda de LIA y los husos del sueño (*sleep spindles*) corticales (258).

La actividad irregular pequeña SIA, se detecta en transiciones de estado de sueño y vigilia (259) cuando un animal en movimiento se detiene (260) y/o al alternar de estados de sueño (240); se presenta durante algunos segundos durante sueño de ondas lentas, después de cada actividad REM (*rapid eye movement*) (261). Durante la actividad SIA, casi todas las neuronas piramidales dejan de disparar, el 3-5% que mantienen su actividad son, probablemente, las neuronas de lugar que representan el lugar donde el animal está durmiendo (262).

En la formación hipocampal, la actividad rápida más prevalente se encuentra en la corteza entorrinal y en el DG pero también se registra en las regiones CA (263). Las oscilaciones  $\gamma$  se generan en un ciclo donde la activación de las neuronas piramidales excita las interneuronas de activación rápida, y estas inhiben rápidamente todas las neuronas piramidales gracias a sinapsis GABAérgicas, este proceso se realiza cíclicamente (148).

Las ondas  $\gamma$  aparecen en el procesamiento de información sensorial y en otras operaciones cognitivas. Debido a su alta frecuencia, son ideales para realizar coordinación entre neuronas distribuidas en una escala de tiempo que se sale de la percepción consciente. Cumplen funciones de coordinación y enrutamiento dinámicos, fundamentales para los procesamientos de almacenamiento y recuperación de la memoria, el mantenimiento a corto plazo de la memoria de trabajo, la representación espacial y navegación (66). Aunque las ondas  $\beta$  también tienen un rol importante en el procesamiento de memoria (264), parecen ser más relevantes a

la hora de procesar información sensorial, por ejemplo, se asocian al sistema olfativo en ratas (238).

### **6.1.2.2.3. Acople $\theta$ - $\gamma$**

Es importante decir que las oscilaciones rápidas registradas en el hipocampo presentan mayor amplitud cuando están anidadas dentro de las oscilaciones  $\theta$  más lentas (265,266). Aunque la actividad en estas bandas,  $\theta$  y  $\gamma$ , suelen coincidir, parecen generarse de forma independiente (267). En la realización de tareas cognitivas que relacionan diferentes regiones cerebrales, podemos encontrar coherencia en la fase y las oscilaciones se acoplan para activar diferentes regiones simultáneamente (268). En el hipocampo encontramos esta relación de manera local. Esta codificación es muy clara al estudiar neuronas de lugar (*place cells*), ya que estas se activan en una fase particular del ciclo  $\theta$ . De la misma forma, se observa en el procesamiento de memoria e información sensorial. En este sentido, el acople  $\theta$  -  $\gamma$  se usa para codificar la información en el hipocampo y para transmitirla a otras regiones implicadas en el proceso que se esté realizando.

### **6.1.3. Efectos del $\beta$ -Amiloide sobre la actividad del hipocampo y sus implicaciones en la memoria**

Los primeros síntomas de la EA tales como desorientación y fallas en la memoria, están relacionados con funciones que se realizan en el hipocampo. Esto sugiere que los eventos tempranos, asociados a la EA, inician en las terminales sinápticas del hipocampo en presencia de  $A\beta$ . Se ha observado que la administración directa de  $A\beta$  en el hipocampo conduce a alteraciones cognitivas similares a los síntomas tempranos de la EA (269), debido a que el hipocampo y la corteza entorrinal son especialmente susceptibles a los efectos nocivos de  $A\beta$  (12).

La plasticidad del hipocampo, necesaria para los procesos de memoria y el aprendizaje, se encuentra sintonizada por la actividad  $\theta$ . El equilibrio en las oscilaciones hipocampales se mantiene gracias a un equilibrio químico en la sinapsis, donde cada neurotransmisor contribuye a la ritmicidad del hipocampo (270). La actividad  $\theta$  depende de la activación colinérgica del septum medial (6), adicionalmente, el sistema septo hipocampal se define por la conexión y acople funcional a través de sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas que la forman (6,271). Así mismo, la actividad  $\gamma$  se genera gracias a sinapsis inhibitoras entre interneuronas

GABAérgicas y neuronas piramidales (272). Esta actividad oscilatoria, que incluye el acoplamiento fase-amplitud entre  $\theta$  y  $\gamma$ , es necesario para relacionar dos regiones diferentes, en este caso particular, codificar y almacenar adecuadamente información en la corteza proveniente del hipocampo (273,274).

Estudios *in vivo* en animales, han demostrado la importancia de la sinapsis entre CA3-CA1 en el aprendizaje asociativo y el procesamiento de la memoria (275,276), así como sus implicaciones en la EA (277). En un reciente estudio, la actividad electrofisiológica de la región CA3-CA1 en humanos presentó una correlación con ciertas tareas relacionadas con la memoria, observando respuestas muy similares a las obtenidas en estudios realizados en roedores (277). Por esta razón, podemos inferir que los resultados obtenidos en modelos animales son capaces de proporcionar información fisiológica que podría ser aplicada en regiones específicas de relevancia clínica en el cerebro humano.

La plasticidad observada en el hipocampo se puede entender gracias al estudio de los mecanismos de potenciación a largo plazo (long term potentiation-LTP), estos están estrechamente correlacionados con las oscilaciones  $\theta - \gamma$  (278-280). La actividad oscilatoria observada en las diferentes estructuras del hipocampo está altamente regulada por la fase de la actividad  $\theta$  y es necesaria para los procesos de memoria a largo plazo, así como para las funciones relacionadas con la memoria declarativa y espacial, las cuales se ven afectadas en las primeras etapas de la EA (7,280,281).

Se ha observado que la presencia de  $A\beta$  afecta la actividad generada en las bandas  $\theta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  en diferentes modelos preclínicos de EA (7,282). Además, en pacientes con EA se observan alteraciones patológicas en la actividad oscilatoria en diferentes bandas frecuenciales, como la relación  $\alpha \beta - \theta$ , la coherencia de fase de la actividad  $\gamma$  y la sincronización entre  $\theta$  y  $\delta$  (283,284).

Se ha propuesto que alteraciones en el acople  $\theta - \gamma$  podría utilizarse como un biomarcador temprano de EA, ya que se encuentran en ratones transgénicos (CRND8) (285). La presencia de  $A\beta_{1-42}$  se ha relacionado con alteraciones en la actividad oscilatoria, particularmente, en el acoplamiento entre  $\theta - \gamma$  en las sinapsis en el giro dentado a través de la vía perforante (286). Se ha observado en numerosos estudios que los cambios en las oscilaciones cerebrales en diferentes bandas afectan, e incluso eliminan, la inducción y expresión de LTP (278,279,287,288), asociando los cambios en la actividad de oscilación de la red y el correcto funcionamiento de la sinapsis. Por lo tanto, el deterioro de la LTP inducido por  $A\beta$  podría estar

relacionado con los cambios en la actividad oscilatoria en las estructuras cerebrales afectadas durante las etapas iniciales de la EA.

Diferentes estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando diferentes formas agregadas y configuraciones de A $\beta$  han resultado en alteraciones presentes a lo largo de la progresión de la EA. Esto implica diferencias en el tiempo de exposición a A $\beta$  (aguda vs crónica) y en los estados de agregación de A $\beta$  (monomérico, oligomérico y fibrilar), los cuales han reportado efectos sobre la actividad neuronal que varían en términos de excitabilidad, propiedades de membrana activa y pasiva, actividad de la red y plasticidad neural (193,198,271,289–291).

Aunque existen una gran cantidad de estudios que muestran los efectos del A $\beta$ , se sabe poco acerca del impacto de sus diversas formas solubles sobre la actividad oscilatoria, la excitabilidad y la plasticidad sináptica (193,292).

La información que obtenemos al estudiar estas formas solubles se asemeja a estados tempranos de la EA, cuando todavía no se encuentran placas amiloides ni neurodegeneración. Nuestro objetivo es evaluar los efectos de A $\beta_{25-35}$  y A $\beta_{1-40}$  en las oscilaciones del hipocampo, la transmisión basal, la variabilidad y la plasticidad a largo plazo en las sinapsis en cCA3 a CA1.

## **6.2. Metodología**

### **6.2.1. Declaración ética**

Todos los procedimientos realizados en animales vivos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos del Animal Research Reporting In vivo Experiments (ARRIVE) (293), siguiendo la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (8ª edición, National Institutes of Health), y cumpliendo con la normatividad colombiana (Ley 84/1989 y Resolución 8430/1993). Además, todos los diseños experimentales y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario.

### 6.2.2. Animales

Como sujetos experimentales se utilizaron 17 ratas *Wistar* macho de  $300 \pm 30$  g de peso, suministradas por el bioterio de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron alojados en una sala insonorizada en jaulas de policarbonato, en grupos de cuatro, bajo condiciones ambientales controladas:  $20 \pm 1$  °C de temperatura,  $50 \pm 10$  % de humedad relativa, y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas de 07:00 a 19:00). Los animales tenían libre acceso a agua y comida. Se puso especial cuidado en minimizar el sufrimiento de los animales y en reducir el número de animales utilizados.

### 6.2.3. Diseño experimental

En este trabajo el tratamiento farmacológico fue el único factor que se modificó. Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los tres grupos siguientes:

- Grupo control ( $n = 6$ ), que recibió microinyección de vehículo (solución salina normal al 0,9% + azul de metileno al 0,5%). En estos animales se determinaron las propiedades sinápticas basales y la plasticidad del sistema CA3-CA1.
- Grupo  $A\beta_{25-35}$  ( $n = 6$ ), que recibió microinyección del péptido A25-35.
- Grupo  $A\beta_{1-40}$  ( $n = 5$ ), que recibió microinyección del péptido A1-40.

En resumen, cada experimento se desarrolló de la siguiente manera:

- Bajo anestesia general, se insertaron estereotáxicamente electrodos de registro y estimulación en CA1 y CA3 contralateral.
- Una vez obtenidas respuestas estables, se estableció la relación entrada/salida.
- Se realizó un registro basal de 30 minutos para caracterizar la eficiencia sináptica basal.
- Se realizó una microinyección de la solución diseñada en CA1.
- El efecto de la solución microinyectada sobre la transmisión sináptica se caracterizó registrando las respuestas sinápticas durante los 30 min posteriores a la microinyección.
- Se realizó una estimulación de alta frecuencia para inducir plasticidad a largo plazo.
- El efecto de la estimulación de alta frecuencia (EAF) sobre la eficiencia sináptica se caracterizó registrando las respuestas sinápticas durante los 60 min posteriores a la EAF (Figura 48 A).

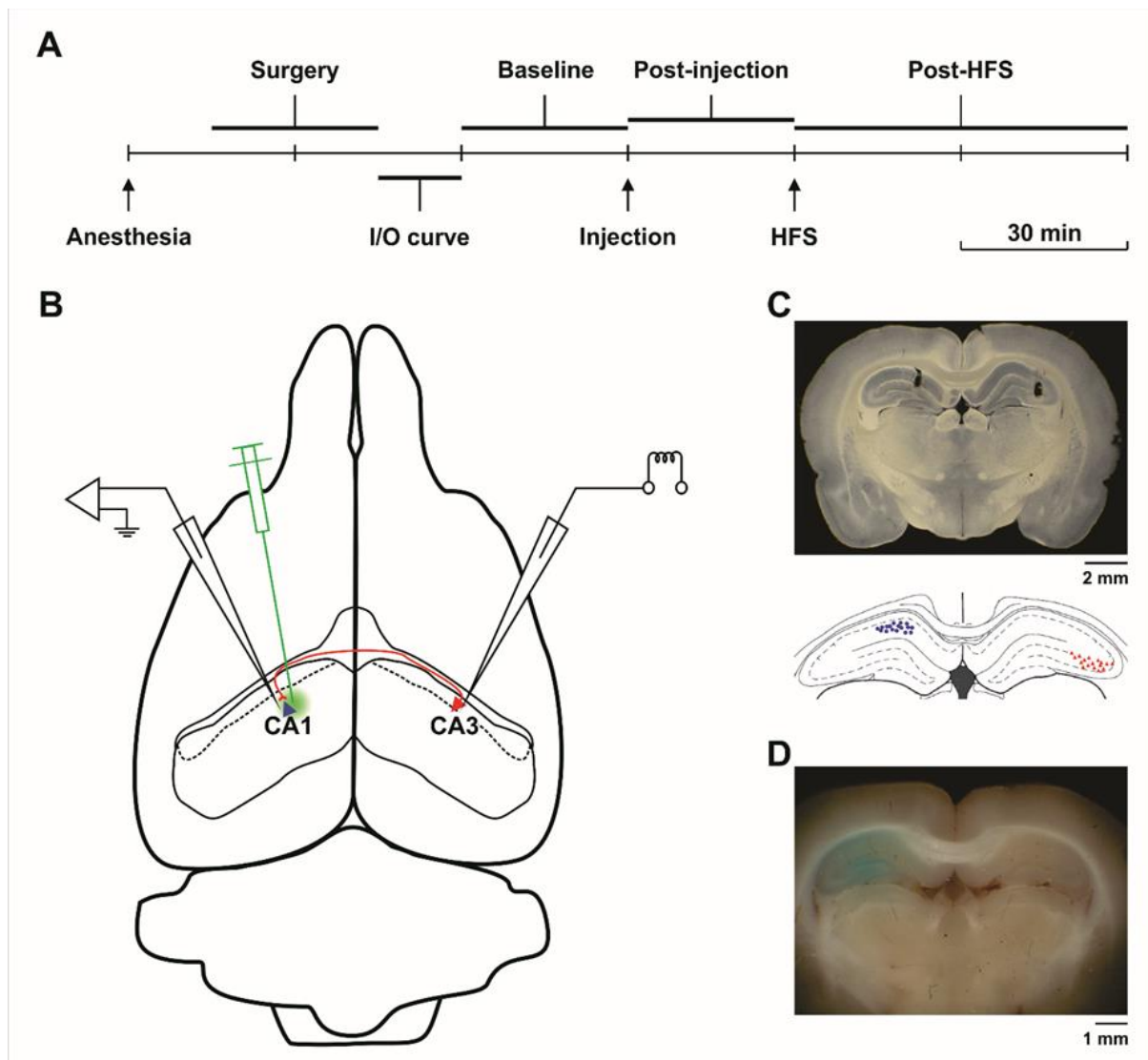


Figura 48.

*Cronología y preparación del experimento. (a) Cronograma que indica los procedimientos experimentales durante una sesión de registro. (b) Diagrama de un cerebro de rata que ilustra la ubicación de las cánulas de microelectrodos (para el registro del potencial de campo local y la microinyección en la CA1 izquierda) y de los electrodos de estimulación (en la CA3 derecha). (c) Fotografía panorámica de un corte coronal de cerebro iluminado oblicuamente que contiene lesiones electrolíticas representativas realizadas mediante el paso de corriente a través de electrodos de registro (izquierda) y de estimulación (derecha) (panel superior), emparejado a un diagrama coronal correspondiente del hipocampo (extraído y modificado a partir del diagrama bregma: -3,6 mm del atlas de cerebro de rata de Paxinos), que resume la colocación de los electrodos de registro (izquierda, círculos azules) y de estimulación (derecha, triángulos rojos) en cada sujeto experimental. (d) Fotografía panorámica de un bloque cerebral que contiene el hipocampo izquierdo coloreado con azul de metileno, lo que atestigua una difusión adecuada de la solución inyectada.*

#### **6.2.4. Cirugía**

Bajo anestesia general inducida con 1,5 g/kg de uretano al 25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y 10 mg/kg de xilacina (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania), se colocó al sujeto en un marco estereotáxico para ratas (SR-6R, Narishige Inc., Tokio, Japón). Se practicó una incisión longitudinal fronto-occipital, seguida de disección del tejido conjuntivo y muscular, para exponer el cráneo. Se perforaron dos orificios en los huesos parietales: uno para insertar un electrodo de registro dirigido a la CA1 izquierda (coordenadas estereotáxicas desde bregma: AP = -3,8 mm, L = 2,5 mm, izquierda); y, uno para insertar un electrodo de estimulación dirigido a la CA3 derecha (coordenadas estereotáxicas desde bregma: AP = -3,8 mm, L = 3,7 mm, derecha) (294). Se cortó y retiró la duramadre a través de los orificios para permitir la inserción del electrodo (Figura 48 B). Las cirugías fueron realizadas en el laboratorio de neurofisiología comportamental por Jonathan Muñoz siguiendo los protocolos definidos.

#### **6.2.5. Electrofisiología extracelular in vivo:**

Se insertó una cánula de microelectrodos (un cable recubierto de esmalte de 5 M $\Omega$  de impedancia unido a una aguja de 25 G) a 2,5 mm de la superficie pial utilizando un micromanipulador hidráulico (SM-25C, Narishige Inc., Tokio, Japón) para el registro del potencial de campo local (LFP) y la microinyección local en la región CA1 izquierda. Se insertó un electrodo bipolar concéntrico a 3,5 mm de la superficie pial utilizando un micromanipulador (SM-25A, Narishige Inc., Tokio, Japón) para estimular la región CA3 derecha. Se colocó un electrodo de plata en la musculatura del cuello como referencia.

La actividad del campo registrada en CA1 se amplificó (100 X) utilizando un preamplificador acoplado a CA (NEX-1, Biomedical Engineering, Nueva York, EE.UU.). A continuación, la señal preamplificada se filtró con paso de banda (frecuencias de corte de 0,1 Hz y 10 kHz) y se amplificó 20 veces (lo que supone una ganancia total de 2.000 veces). Dicha señal condicionada se digitalizó utilizando un convertidor analógico-digital (DigiData 1200, Molecular Devices, San José, EE.UU.) con una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se almacenó para su análisis fuera de línea utilizando la interfaz BOARD-FTD-PACC presentada previamente.

La región CA3 se estimuló aplicando pulsos cuadrados monofásicos de 100  $\mu$ s, emitidos a una frecuencia de 0,33 Hz, utilizando una unidad de aislamiento de estímulos (Isolator-11, Molecular Devices, San José, EE.UU.), controlada por un generador de pulsos (9514 Plus,

Quantum Composers, Bozeman, EE.UU.). La intensidad del estímulo (100-400  $\mu$ A) se ajustó para obtener potenciales postsinápticos excitatorios de campo CA1 (fEPSP) estables y fiables. La profundidad de los electrodos de estimulación y registro desde la superficie pial se ajustó con precisión para obtener fEPSP de latencia corta, con una forma de onda característica del estrato piramidal CA1.

Una vez conseguida una fEPSP CA1 estable, se definió la intensidad umbral del estímulo disminuyendo la intensidad a la mitad hasta que la tasa de fallo de la fEPSP fuera igual o superior al 50 % (característicamente de 50 a 200  $\mu$ A). A continuación, se duplicó sucesivamente la intensidad del estímulo hasta alcanzar la saturación de la respuesta fEPSP (característicamente de 4 a 8 veces la intensidad umbral). A continuación, se seleccionó la intensidad del estímulo necesaria para obtener ~50% de la respuesta máxima (I50) para evaluar la plasticidad a corto y largo plazo. La actividad sináptica basal se caracterizó registrando la fEPSP provocada por la estimulación de CA3 en CA1 (intensidad I50, duración 100- $\mu$ s, frecuencia 0,1-Hz) durante 30 min. El efecto de la microinyección intrahipocampal sobre la actividad sináptica basal se caracterizó registrando dicha fEPSP durante 30 min tras la microinyección. La potenciación a largo plazo en las sinapsis cCA3-CA1 se indujo mediante la administración de seis trenes (1-s de duración, 100-Hz de frecuencia) a intervalos de 60-s entre trenes (HFS). El efecto del HFS sobre la eficacia sináptica de cCA3 a CA1 se estudió registrando la respuesta de CA1 izquierda a la estimulación de CA3 derecha (intensidad I50, duración de 100  $\mu$ s, frecuencia de 0,1 Hz) durante 60 minutos. Se mantuvo un nivel anestésico profundo durante toda la sesión de grabación utilizando dosis anestésicas suplementarias (aproximadamente cada 4 horas) para conseguir una actividad estable y confiable en CA1 (295).

Una vez finalizada la sesión de registro, se administró una dosis terminal de anestesia (uretano 2 g/kg y xilacina 10 mg/kg, por vía intraperitoneal) y se marcó la ubicación de las puntas de los electrodos de estimulación y registro haciendo pasar por ellas corriente continua suministrada por una fuente de corriente de precisión (Midgard, Stoelting, Wood Dale, EE.UU.). Se extrajo el cerebro del sujeto y se sumergió en paraformaldehído al 4% durante 3 días; a continuación, se obtuvieron cortes coronales de 100  $\mu$ m de grosor que abarcaban los lugares de estimulación y registro utilizando un vibratomo (1000 Plus, Vibratome, Bannockburn, EE.UU.). La posición de los electrodos y el trazo de difusión de la solución coloreada microinyectada se documentaron examinando los cortes con un estereoscopio

(SZX16, Olympus, Tokio, Japón) y tomando fotografías digitales (Cybershot DSCW7, Sony, Tokio, Japón) bajo retroiluminación oblicua (Figura 48 C).

#### **6.2.6. Preparación del vehículo y soluciones de B-Amiloide:**

Entre las muchas especies solubles de  $A\beta$ , se seleccionaron una forma corta  $A\beta_{25-35}$  y una larga  $A\beta_{1-40}$  por su cinética de agregación, neurotoxicidad y patogenicidad. El péptido  $A\beta_{1-40}$  conforma aproximadamente el 90% del contenido de AB en placas amiloides (296). El péptido  $A\beta_{25-35}$  se agrega más rápidamente y muestra una mayor neurotoxicidad (211,297). Los péptidos A25-35 y A1-40 se prepararon como se ha descrito previamente (271,271,291). Brevemente, los péptidos se disolvieron en solución salina normal al 0,9 % con azul de metileno al 0,5 % hasta alcanzar una concentración de 1,5-mM y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se descongelaron alícuotas y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h antes de los experimentos (298,299). La solución vehículo fue, solución salina normal al 0,9% con azul de metileno al 0,5%. Se utilizó azul de metileno para comprobar la difusión adecuada en la región CA1 del hipocampo de la solución inyectada, vehículo o péptidos (Figura 48 D).

#### **6.2.7. Microinyección intrahippocampal**

Una vez obtenido el registro basal, se utilizó una jeringa Hamilton conectada a través de un tubo 12-G para inyectar 2  $\mu\text{l}$  de la solución diseñada (vehículo,  $A\beta_{25-35}$  o  $A\beta_{1-40}$ ) a una velocidad de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  a través de la cánula del microelectrodo insertada en la región CA1 del hipocampo izquierdo. Las dosis de  $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$  (3 nM) y el volumen total de inyección (2  $\mu\text{L}$ ) se eligieron, de modo que el volumen no afectara el funcionamiento neuronal, de acuerdo con informes anteriores (300–303). Se dejaron tres minutos tras la microinyección para permitir la difusión y evitar fugas de la solución inyectada y, a continuación, se reiniciaron la estimulación y el registro

#### **6.2.8. Análisis de datos**

Para analizar los datos obtenidos se planificaron análisis de datos electrofisiológicos para caracterizar los efectos de ambas soluciones microinyectadas sobre las respuestas sinápticas basales de cCA3 a CA1, la plasticidad a largo plazo de cCA3 a CA1 y la actividad oscilatoria de CA1. Posteriormente, se analizaron las señales adquiridas luego de los eventos de estimulación, utilizando los métodos implementados en la interfaz BOARD-FTD-PACC, el cual permite llevar a cabo análisis en diferentes dominios, como se especificó en el capítulo

anterior. Se llevaron a cabo análisis estándar que han sido ampliamente estudiados, para confirmar la validez de los experimentos y de los métodos utilizados, tales como el estudio de la pendiente del primer componente de la fEPSP de cada estímulo, la cual permite determinar la presencia o ausencia de facilitación y así poder evaluar la LTP. Para los análisis en frecuencia preferimos el método de PSD relativa de Welch en las diferentes bandas de potencia ya descritas. El análisis en el dominio tiempo-frecuencia se realizó construyendo escalogramas para cada *trial*, utilizando la wavelet Morlet (35,304), estudiamos también los promedios de estos escalogramas de modo a tener resultados constantes en el tiempo. Finalmente definimos el PAC (144) usando el método de detección de picos (Figura 49), ya que la presencia de la banda lenta moduladora estudiada  $\theta$  no tiene una actividad constante a lo largo del registro. Para comparar el resultado del PAC, se obtuvieron los vectores promedios de la fase en la que modula la amplitud de frecuencias más altas.

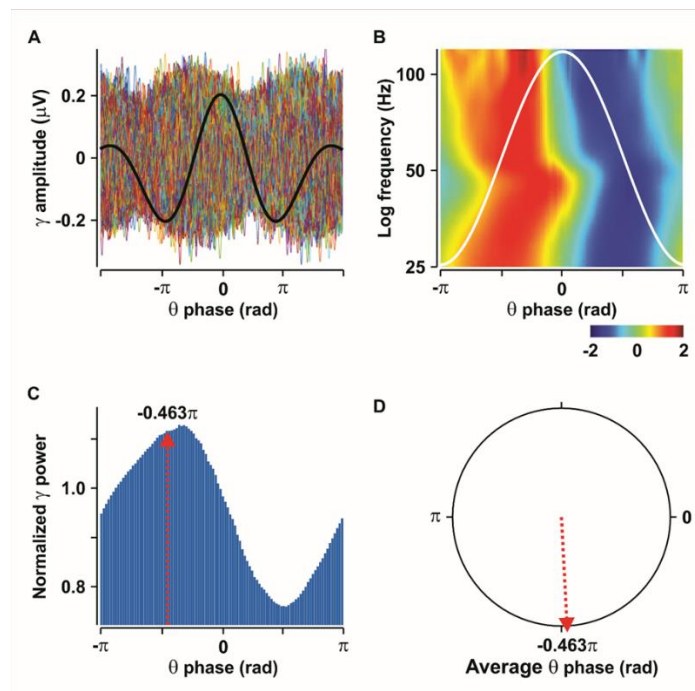


Figura 49.

*Proceso de análisis del acoplamiento fase-amplitud (PAC)  $\theta$ -  $\gamma$  (A) Se representa la LFP filtrada en las bandas  $\theta$  (trazo negro) y  $\gamma$  (trazos coloreados); el trazo  $\theta$  es la media de  $n$  ciclos  $\theta$ , alineados en torno a su amplitud máxima (reducida para ajustarse a la amplitud  $\gamma$ ); cada actividad  $\gamma$  concurrente con ciclo  $\theta$  se presenta en superposición utilizando la alineación antes mencionada. (B) Escalograma medio normalizado de la banda  $\gamma$  (escala de colores) en relación con la fase  $\theta$  (ilustrada como trazo blanco). (C) Promedio de la potencia espectral normalizada de la banda  $\gamma$  en función de la fase  $\theta$  (D) Vector medio de  $C$  indicando la fase dominante  $\theta$  -  $\gamma$  PAC.*

### 6.2.9. Estadística:

Utilizando una prueba Shapiro-Wilk, se comprobó que los datos de plasticidad a largo plazo y PSD pertenecen a una distribución normal. Los valores estadísticos se obtuvieron aplicando técnicas como ANOVA unidireccional o análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis, usando módulos de SigmaPlot 12.0, (Systat Software, Inc., San José, California, EE.UU.).

La variabilidad de las respuestas sinápticas cCA3-aCA1 de los grupos experimentales se compararon mediante la prueba de Levene (305).

Los ángulos vectoriales resultantes del PAC medio de los grupos experimentales se compararon utilizando la caja de herramientas MATLAB para estadística circular (306).

## 6.3. Resultados

### 6.3.1. $A\beta$ no alteró la eficiencia sináptica, pero indujo cambios en la variabilidad sináptica

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales durante el registro basal antes ( $H(2) = 0,153$ ,  $p = 0,797$ ,  $n=16$ ), o después de la inyección intrahipocampal ( $F(2,13) = 1,541$ ,  $p = 0,251$ ,  $n=16$ ). Sin embargo, la variabilidad de la pendiente fEPSP cambió significativamente tras la inyección intrahipocampal ( $F(2,461) = 64,898$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=16$ ); el análisis post hoc mostró que la microinyección  $A\beta_{1-40}$  aumentó significativamente la variabilidad sináptica cCA3-to-CA1 más que los otros tratamientos (control vs. A25-35:  $F(1,317) = 0,004$ ,  $p = 0,951$ ,  $n=11$ ; control vs a A1-40:  $F(1,287) = 71,932$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=10$ ; y  $A\beta_{1-40}$  vs.  $A\beta_{25-35}$ :  $F(1,318) = 86,351$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=11$ ) (Figura 50 A). La variabilidad aumentó progresivamente en los grupos control y  $A\beta_{25-35}$  después de ambas inyecciones (control:  $F(1,606) = 19,232$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=5$ ;  $A\beta_{25-35}$ :  $F(1,636) = 23,761$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=6$ ) y HFS (control:  $F(1,438) = 63,522$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=5$ ;  $A\beta_{25-35}$ :  $F(1,438) = 49,588$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=6$ ). Sin embargo, aunque la variabilidad del grupo  $A\beta_{1-40}$  aumentó sustancialmente tras la inyección ( $F(1,606) = 299,08$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=5$ ), no cambió tras la HFS ( $F(1,438) = 0,63$ ,  $p = 0,428$ ,  $n=5$ ).

### 6.3.2. $A\beta$ afectó la plasticidad sináptica a largo plazo

La estimulación de alta frecuencia indujo un aumento significativo de la pendiente fEPSP en sujetos inyectados con vehículo (de  $100 \pm 0,91\%$  a  $198,8 \pm 14\%$ ,  $H(2) = 9,5$ ,  $p = 0,009$ ,  $n=5$ ).

Por el contrario, tanto  $A\beta_{25-35}$  como  $A\beta_{1-40}$  redujeron el aumento de la pendiente fEPSP inducido por el HFS ( $A\beta_{25-35}$ : de  $100 \pm 1,29$  % a  $89,45 \pm 16$  %,  $F(2,17) = 0,504$ ,  $p = 0,614$ ,  $n=6$ ;  $A\beta_{1-40}$ : de  $100 \pm 1,84$  % a  $113,5 \pm 25$  %,  $F(2,17) = 0,938$ ,  $p = 0,418$   $n=5$ ; (Figura 50 B). De hecho, el cambio de la pendiente fEPSP tras la HFS fue significativamente diferente entre grupos ( $F(2,15) = 17,741$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=16$ ); el análisis post hoc (prueba de Tukey) mostró que los sujetos inyectados con vehículo mostraron un aumento de la pendiente fEPSP significativamente mayor que los inyectados con  $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$  (control vs a  $A\beta_{25-35}$ :  $Q = 8,146$ ;  $p < 0,001$ ,  $n=11$ ; control frente a  $A\beta_{1-40}$ :  $Q = 6,083$ ;  $p = 0,002$ ,  $n=10$ ), siendo estos últimos grupos no significativamente diferentes entre sí ( $Q = 1,792$ ;  $p = 0,437$ ,  $n=11$ ). Estos resultados muestran que la microinyección de A soluble deteriora la plasticidad sináptica a largo plazo cCA3-aCA1.

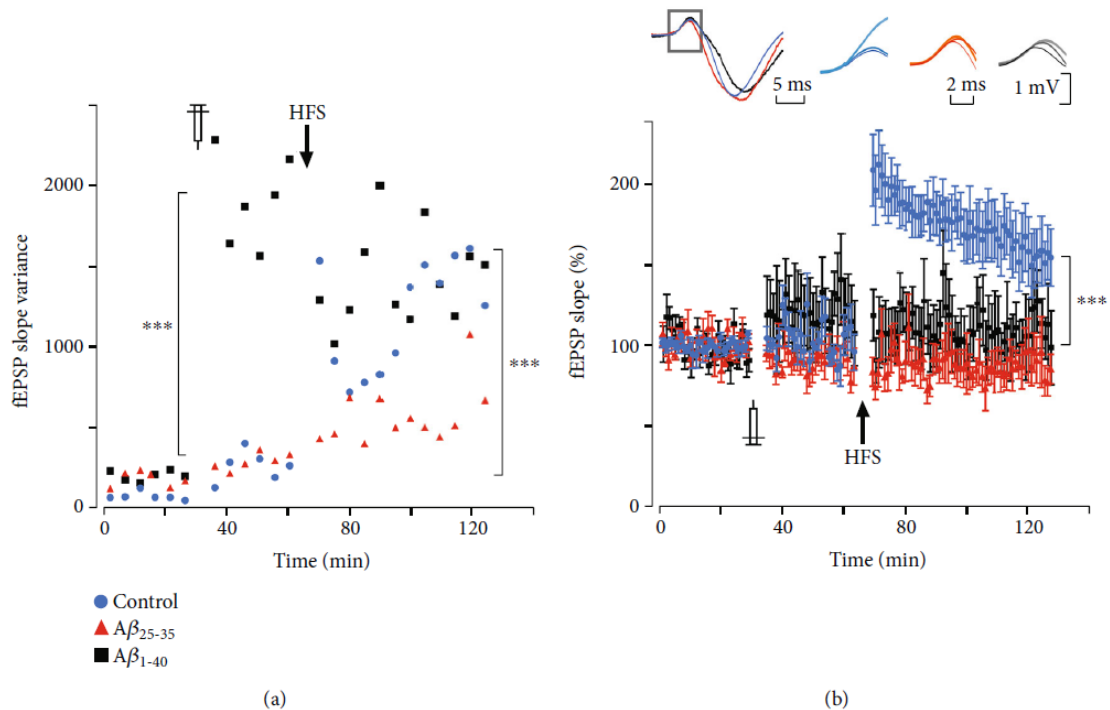


Figura 50.

Las inyecciones intrahipocampales de  $A\beta$  alteraron la variabilidad sináptica y deterioraron la LTP en la sinapsis cCA3-CA1. Evolución temporal de la variabilidad de la pendiente (a) y la magnitud (b) de la EPSP provocada por la estimulación de cCA3 en CA1 registrada a lo largo de tres etapas experimentales consecutivas, de izquierda a derecha: (1) 30 min antes de la inyección del péptido (línea base), (2) 30 min después de la inyección intrahipocampal, y (3) después de HFS (seis trenes de 1 s, 100 Hz, entregados cada 60 s). La variabilidad EPSP aumentó después de la inyección intrahipocampal, siendo significativamente mayor en el grupo  $A\beta_{1-40}$ . La HFS indujo una LTP significativa en los sujetos inyectados con vehículo, pero no en los inyectados con  $A\beta$ . En (a), cada punto representa 5 min de varianza de la pendiente; en (b), cada punto ilustra 2 min de media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Recuadro en (b): A la izquierda: promedio representativo de la fEPSP de CA1 de cada grupo experimental evocada por estímulos I50 administrados en CA3 contralateral (la región que representa el componente monosináptico está delimitada por un recuadro rectangular gris); derecha-tres conjuntos de trazas promedio (10 ensayos por promedio) del componente monosináptico del potencial de campo CA1 evocado por estímulos cCA3 obtenidos durante la línea de base (línea fina, color oscuro), tras la inyección intrahipocampal (línea intermedia, color intermedio) y tras la HFS (línea gruesa, color claro) para cada grupo experimental (control, azul;  $A\beta_{25-35}$ , rojo; y  $A\beta_{1-40}$ , negro). \*\*\*Significativas diferencias entre grupos ( $p < 0,001$ ). Los datos de cada grupo experimental se normalizaron respetando el valor medio obtenido durante los últimos 15 min basales.

### 6.3.3. $A\beta_{25-35}$ indujo un aumento en la densidad de poder espectral (PSD) relativo en las bandas $\gamma$ y HFO1

La inyección intrahipocampal de  $A\beta_{25-35}$  indujo aumentos significativos en la PSD relativa (Figura 51) en las bandas  $\gamma$  (Figura 51 A, columna izquierda,  $F(2,11) = 8.237, p = 0.007, n=17$ ) y HFO1 (Fig. 4B, columna izquierda,  $H(2) = 6.408, p = 0.029, n=17$ ), pero no en otras bandas. Ni la inyección de  $A\beta_{1-40}$  ni la de vehículo indujeron cambios significativos en la PSD relativa en ninguna banda (**Tabla 1**).

Banda de Frecuencia	Estadística (d.f.)	Valor	p
<b>d</b>	$H_{(2)}$	2.539	0.311
<b>q</b>	$F_{(2,11)}$	1.376	0.293
<b>a</b>	$F_{(2,11)}$	0.317	0.732
<b>b</b>	$H_{(2)}$	0.754	0.722
<b>g</b>	$F_{(2,11)}$	8.237	0.007
<b>HFO<sub>1</sub></b>	$H_{(2)}$	6.408	0.029
<b>HFO<sub>2</sub></b>	$H_{(2)}$	3.893	0.144

**Tabla 1** Efecto de la inyección sobre la PSD relativa: Resumen de los resultados de ANOVA o ANOVA sobre rangos, estadístico (F o H) y valores de p, para la comparación Inter grupos de la PSD relativa (normalizada con respecto a los valores basales) para cada banda de frecuencia después de inyección intrahipocampal de AB d.f., grados de libertad. Los resultados significativos se destacan en negrita.

En sujetos inyectados con  $A\beta_{25-35}$ , la HFS no indujo cambios adicionales en  $\gamma$  (Figura 51 A, columna derecha; 5 min:  $F(2,11) = 3,036, p = 0,089$ ; 30 min:  $H(2) = 1,96, p = 0,403$ ; 60 min:  $F(2,11) = 1.502, p = 0,265$ ), HFO1 (Figura 51 B, columna derecha; 5 min:  $F(2,11) = 0,063, p = 0,940$ ; 30 min:  $F(2,11) = 0,224, p = 0,803$ ; 60 min:  $F(2,11) = 0,341, p = 0,718$ ), o en cualquier

otra banda. La HFS no indujo cambios significativos en la PSD relativa en ninguna banda en los sujetos inyectados con vehículo o con  $A\beta_{1-40}$  (**Tabla 2**).

<b>Banda de Frecuencia</b>		<b>5 min post HFS</b>	<b>30 min post HFS</b>	<b>60 min post HFS</b>
<b>d</b>	Estadístico (d.f.)	$H_{(2)}$	$F_{(2,11)}$	$H_{(2)}$
	Valor	1.404	1.39	1.31
	p	0.545	0.289	0.569
<b>q</b>	Estadístico (d.f.)	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$	$H_{(2)}$
	Valor	0.6	1.989	3.284
	p	0.566	0.183	0.201
<b>a</b>	Estadístico (d.f.)	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$
	Valor	2.555	1.081	1.306
	p	0.123	0.373	0.31
<b>b</b>	Estadístico (d.f.)	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$
	Valor	0.396	0.361	0.44
	p	0.682	0.705	0.957
<b>g</b>	Estadístico (d.f.)	$F_{(2,11)}$	$H_{(2)}$	$F_{(2,11)}$
	Valor	3.036	1.96	1.502
	p	0.089	0.403	0.265
<b>HFO.</b>	Estadístico (d.f.)	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$	$F_{(2,11)}$
	Valor	0.0625	0.224	0.341

	p	0.94	0.803	0.718
<b>HFO<sub>2</sub></b>	Estadístico (d.f.)	F <sub>(2,11)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>
	Valor	0.696	0.0769	0.679
	p	0.519	0.927	0.527

**Tabla 2** Efecto del HFS sobre la PSD relativa: Resumen de los resultados del ANOVA o ANOVA sobre rangos, estadístico (F o H) y valores de p, para la comparación intergrupos de la PSD relativa (normalizada con respecto a los registros posteriores a la inyección) para cada banda de frecuencia tras el protocolo HFS. d.f., grados de libertad.

En resumen, sólo  $A\beta_{25-35}$  (que es la especie soluble más tóxica de  $A\beta$ ) indujo un aumento de la contribución energética en las bandas  $\gamma$  y HFO1, sin embargo, el HFS no modificó aún más tales cambios.

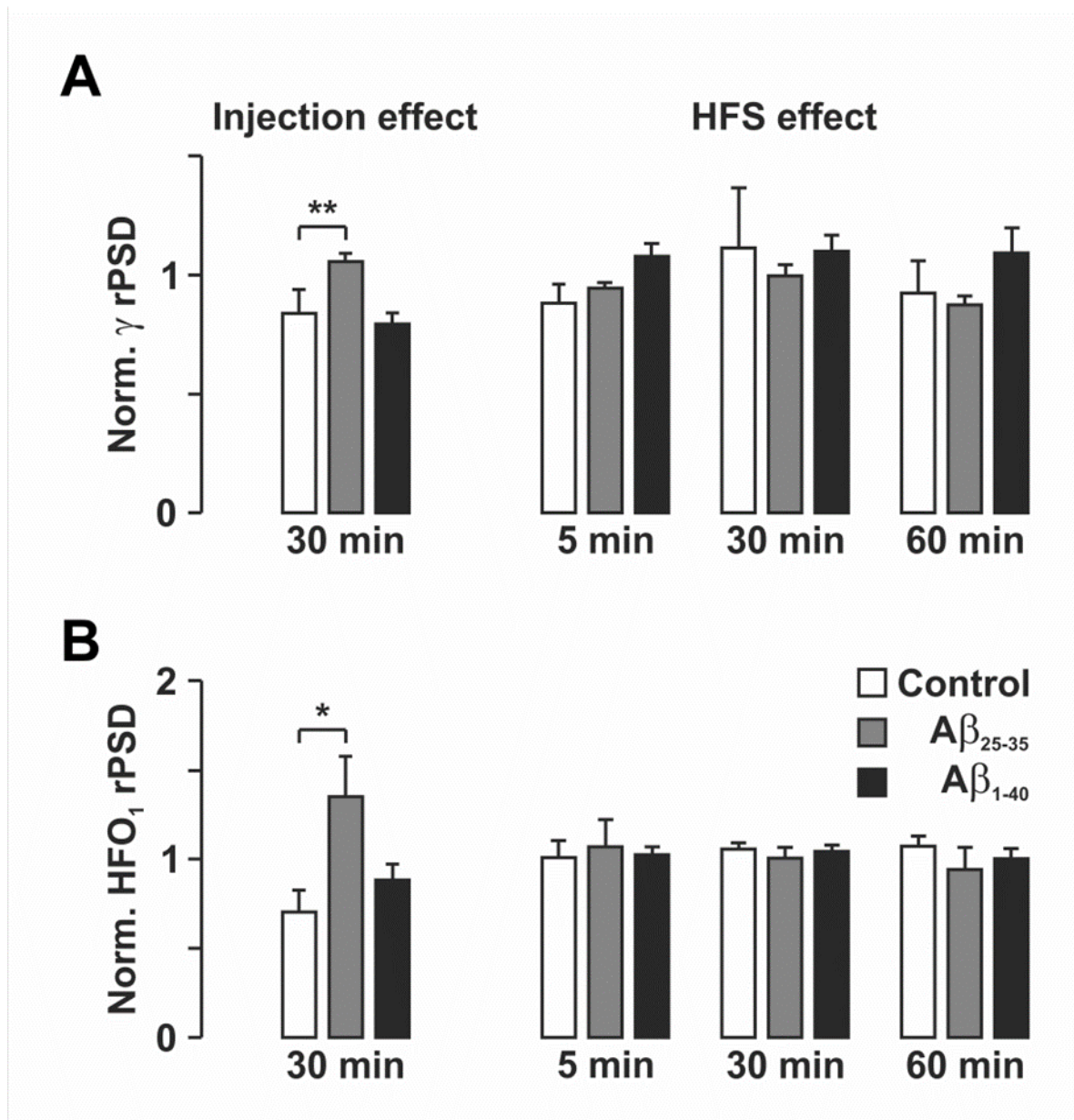


Figura 51.

La inyección del péptido, pero no el HFS, aumentó la rPSD en las bandas  $\gamma$  y HFO1. Diagramas de barras que ilustran la rPSD en las bandas (A) y HFO1 (B), normalizada con respecto a la rPSD en las mismas bandas durante el estado basal (panel izquierdo) o 15-30 min después de la inyección del péptido (panel derecho), mostrando el efecto de la inyección y del HFS, respectivamente. Abreviaturas: \*, diferencia significativa respecto al grupo de control durante la línea de base,  $p < 0,05$ ; \*\*, diferencia significativa respecto a cada grupo tras la inyección del péptido,  $p < 0,01$ .

### 6.3.4. La inyección de $A\beta$ alteró el acople $\theta$ $\gamma$ y afectó los cambios inducidos por la estimulación de alta frecuencia

El acoplamiento fase-amplitud (PAC) puede utilizarse para medir la modulación en una estructura, en este caso para determinar si la amplitud de  $\gamma$  estaba vinculada a la fase de  $\theta$  en el hipocampo. Se pueden utilizar diferentes enfoques para calcular el PAC, en este caso calculamos la potencia media de la frecuencia rápida  $\gamma$ , sobre la banda lenta moduladora  $\theta$  en ciclos individuales. Este método es especialmente útil cuando la banda moduladora no es constante a lo largo del experimento. La distribución de potencia se obtuvo promediando toda la banda, y su media da un valor único para la modulación entre el par de bandas de frecuencia ( $\theta$  y  $\gamma$ ) (Figura 49).

La inyección de  $A\beta_{1-40}$  indujo un desplazamiento significativo de la fase  $\theta$  moduladora de la amplitud  $\gamma$  ( $\sim 122^\circ$ ;  $F(1,8) = 37,220$ ,  $p < 0,001$ ); ni la inyección de vehículo ( $F(1,6) = 1,59$ ,  $p = 0,254$ ), ni la de  $A\beta_{25-35}$  ( $F(1,9) = 3,26$ ,  $p = 0,104$ ) indujeron desplazamientos significativos de dicha fase moduladora (Figura 52 A). Las comparaciones planificadas entre grupos mostraron que el desplazamiento de fase inducido por la inyección de  $A\beta_{1-40}$  fue significativamente mayor que el inducido por la inyección de vehículo ( $F(1,6) = 7,71$ ,  $p = 0,03$ ) y el inducido por la inyección de  $A\beta_{25-35}$  ( $F(1,9) = 4,76$ ,  $p = 0,05$ ); los desplazamientos de fase inducidos por la inyección de vehículo y  $A\beta_{25-35}$  no fueron significativamente diferentes entre sí ( $F(1,7) = 0,43$ ,  $p = 0,53$ ).

Tomando como referencia el desplazamiento de fase inducido por la inyección de cada grupo, se observó que la HFS indujo un desplazamiento de fase significativo ( $\sim 112-137^\circ$ ) en los sujetos inyectados con vehículo (Figura 52 B, flechas azules;  $F(3,16) = 4,47$ ,  $p = 0,002$ ); dicho desplazamiento de fase persistió hasta 1 h después de la HFS (5 min:  $F(1,4) = 9,25$ ,  $p = 0,038$ ; 30 min:  $F(1,4) = 7,07$ ,  $p = 0,05$ ; 60 min:  $F(1,4) = 13,11$ ,  $p = 0,022$ ). En los sujetos inyectados con  $A\beta_{1-40}$ , la HFS indujo un desplazamiento de fase menor ( $\sim 45-70^\circ$ ) que sólo alcanzó significación 60 min después ( $F(3,16) = 1,21$ ,  $p = 0,338$ ; 5 min:  $F(1,8) = 0,72$ ,  $p = 0,421$ , 30 min:  $F(1,8) = 0,82$ ,  $p = 0,392$ , 60 min:  $F(1,8) = 5,55$ ,  $p = 0,046$ ). En cambio, la HFS no indujo un desplazamiento de fase significativo en los animales inyectados con  $A\beta_{25-35}$  ( $F(3,16) = 1,03$ ,  $p = 0,4073$ ; 5 min:  $F(1,8) = 2,75$ ,  $p = 0,136$ ; 30 min:  $F(1,8) = 0,92$ ,  $p = 0,366$ ; 60 min:  $F(1,8) = 0,25$ ,  $p = 0,631$ ).

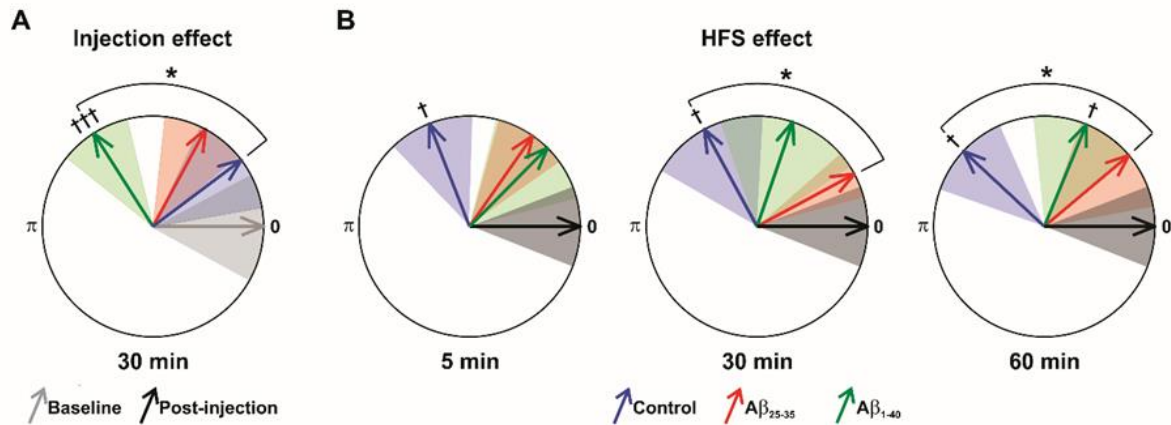


Figura 52.

La inyección de péptidos y el HFS desplazaron el vector de fase medio  $\theta - \gamma$  PAC. (A) Diagrama circular que ilustra el desplazamiento inducido por la microinyección intrahipocampal del vector de fase medio  $\theta - \gamma$  PAC para cada grupo con respecto al vector de referencia. (B) Diagramas circulares que ilustran la evolución temporal (a los 5, 30 y 60 min) del desplazamiento inducido por HFS del vector de fase medio  $\theta - \gamma$  PAC para cada grupo con respecto al vector de microinyección. Las flechas de colores indican los ángulos medios de los vectores (Control, azul;  $A\beta_{25-35}$ , rojo; y  $A\beta_{1-40}$ , verde); las áreas sombreadas de colores correspondientes ilustran el error estándar de los ángulos para cada grupo. Abreviaturas: diferencias significativas en relación con el vector de referencia, †,  $p < 0,05$ , ††,  $p < 0,001$ ; diferencias significativas entre grupos, \*,  $p < 0,05$ .

## 6.4. Conclusiones y discusión

En este trabajo observamos que, aunque la microinyección intrahipocampal de especies solubles de  $A\beta$  no cambia la transmisión basal, sí afecta significativamente otras propiedades de las sinapsis de cCA3 a CA1. El primer cambio observado es que el péptido  $A\beta_{1-40}$  incrementó significativamente la variabilidad sináptica basal en comparación con otros tratamientos, pero deterioró la variabilidad inducida por la estimulación de alta frecuencia. El segundo es que la inyección de  $A\beta_{25-35}$  aumentó significativamente la PSD relativa para las bandas  $\gamma$  y HFO1. El tercero es que ambos péptidos beta amiloide solubles ( $A\beta_{25-35}$  y  $A\beta_{1-40}$ ) deterioraron la LTP inducida por HFS. Finalmente, el cuarto es que la inyección de  $A\beta_{1-40}$  indujo un cambio significativo en la fase moduladora del acople  $\theta - \gamma$  a ( $\sim 122^\circ$ ) pero, al igual que lo hizo  $A\beta_{25-35}$ , afectó la ocurrencia de un cambio de fase inducido por HFS.

Estudiar el efecto de los péptidos  $A\beta$  aporta información sobre los estados tempranos de la EA. Diferentes estudios muestran que la presencia de  $A\beta$  soluble puede afectar la transmisión sináptica y la plasticidad, generando cambios en la densidad de las espinas dendríticas y,

eventualmente, en la poda sináptica (307–309). En nuestro trabajo, encontramos que la microinyección intrahipocampal de péptidos solubles de A $\beta$  en ratas anestesiadas afectó la variabilidad sináptica en cCA3-CA1 y afectó la plasticidad sináptica a largo plazo. Estos resultados confirman los observados en otros estudios (180,301).

La inyección intrahipocampal del vehículo alteró levemente la variabilidad de la pendiente de fEPSP, este efecto se ha observado previamente en preparaciones *in vivo* (310,311), posiblemente debido a un efecto mecánico y osmótico de la solución salina. Los efectos de azul de metileno pueden descartarse ya que solo se han reportado efectos neurotóxicos *in vitro* en concentraciones superiores a 100  $\mu$ M, (alrededor de diez veces nuestra preparación) (312,313). Otro efecto de esta molécula es que puede, luego de varios días de incubación, inhibir la oligomerización de A $\beta$  en una manera dosis-dependiente (en un rango entre 0,01 a 445  $\mu$ M) (314). En este caso, el tiempo de uso no superaba los 4 a 8 días necesarios para generar este efecto.

Varios estudios *in vivo* muestran que la presencia de diferentes fracciones de A $\beta$  no afecta la amplitud, ni la pendiente del potencial basal del hipocampo (300,311,315). Confirmamos estos hallazgos ya que la inyección de A $\beta_{1-40}$ , induce aumentos significativos en la variabilidad de las respuestas sinápticas de cCA3 a CA1 sin cambios significativos en la pendiente de fEPSP.

En términos de potencia, no encontramos cambios generados ni por la inyección intrahipocampal de A $\beta$  ni por el HFS en CA1 (**Tabla 3** y **Tabla 4**). Se observó que únicamente la presencia de A $\beta_{25-35}$  generó un aumento significativo de la potencia relativa de  $\gamma$  y HFO1.

Las ondas  $\gamma$  y las HFO1 se han relacionado con diferentes procesos cognitivos como la consolidación de la memoria y el aprendizaje, tanto en humanos como en animales (316–319), así como con otros procesos como la navegación (266,320), la memoria de trabajo (321) y la recuperación de la memoria (322). Las alteraciones en estas bandas, debido a la presencia de A $\beta$  estarían asociadas con una disfunción sináptica y afectación cognitiva (193,319,323,324).

En nuestro experimento observamos que tanto A $\beta_{25-35}$  como A $\beta_{1-40}$  afectan la LTP inducida por HFS en las sinapsis de cCA3 a CA1. Esta alteración ha sido ampliamente reportada y se ha establecido que la inestabilidad de la red hipocampal, determinada a partir del deterioro de LTP puede ser la base de deficiencias cognitivas sutiles observadas durante las primeras etapas de la EA.

Un resultado interesante, es que en el grupo control, la HFS desplazó la fase a la cual se realiza la modulación PAC, este cambio se mantuvo hasta por 60 minutos, Además de afectar la LTP inducida por HFS, tanto  $A\beta_{25-35}$  como  $A\beta_{1-40}$  bloquearon el cambio de fase, con el efecto de  $A\beta_{25-35}$  persistiendo por un mayor tiempo. La inyección intrahipocampal de  $A\beta_{1-40}$  también alteró la fase en la cual se realiza la modulación  $\theta - \gamma$  antes de la HFS. Se han reportado incrementos en el acoplamiento de  $\theta - \gamma$  después de LTP inducida por HFS, en ese caso, la inyección de  $A\beta_{1-42}$  afectó la LTP y disminuyó el acoplamiento  $\theta - \gamma$  (286). En un estudio clínico, la restauración de la modulación  $\theta - \gamma$  en la corteza temporal se asoció la mejora en el rendimiento de la memoria de trabajo en adultos mayores (325) y por ende, los resultados descritos pueden tener una aplicación clínica futura.

Los resultados observados en este trabajo sugieren que las alteraciones en la relación funcional entre las bandas  $\theta$  y  $\gamma$  están relacionadas con la disfunción de la plasticidad sináptica inducida por  $A\beta$  en un modelo de las primeras etapas de la EA. En este modelo, la presencia de  $A\beta$  soluble afecta la variabilidad y la plasticidad sináptica, estos cambios en la red neuronal podrían ser el origen de las deficiencias cognitivas características de esta etapa. Se podría considerar entonces las anomalías en la modulación  $\theta - \gamma$  aquí descritas, como un biomarcador temprano de la EA que podría presentarse mucho antes de que se encuentre neurodegeneración. La EA es un trastorno neurológico crónico y complejo que involucra diferentes mecanismos y por lo tanto, es importante estudiar el papel del acople  $\theta - \gamma$  para determinar plenamente su rol en esta patología.

Frequency band	Estadístico (d.f.)	Valor	p
<b>d</b>	$F_{(2,11)}$	0.62	0.557
<b>q</b>	$F_{(2,11)}$	2.02	0.179
<b>a</b>	$F_{(2,11)}$	1.28	0.317
<b>b</b>	$F_{(2,11)}$	2.16	0.162
<b>g</b>	$F_{(2,11)}$	1.58	0.25
<b>HFO<sub>1</sub></b>	$F_{(2,11)}$	1.06	0.378
<b>HFO<sub>2</sub></b>	$H_{(2)}$	1.274	0.562

**Tabla 3** Efecto de la inyección sobre la PSD: Resumen de los resultados del ANOVA o ANOVA sobre rangos, estadístico (F o H) y valores p, para la comparación intergrupos de la PSD (normalizada respecto a la línea base) para cada banda de frecuencia tras la inyección intrahipocampal de Ab.: d.f., grados de libertad.

<b>Frequency band</b>		<b>5 min after HFS</b>	<b>30 min after HFS</b>	<b>60 min after HFS</b>
<b>d</b>	Estadístico (d.f.)	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>
	Valor	0.811	1.547	2.833
	p	0.697	0.499	0.265
<b>q</b>	Estadístico (d.f.)	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>
	Valor	0.741	1.989	2.074
	p	0.727	0.4	0.381
<b>a</b>	Estadístico (d.f.)	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>
	Valor	1.684	0.495	0.741
	p	0.461	0.809	0.727
<b>b</b>	Estadístico (d.f.)	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>
	Valor	0.23	0.373	1.311
	p	0.903	0.852	0.309
<b>g</b>	Estadístico (d.f.)	H <sub>(2)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>
	Valor	4.84	0.534	1.736
	p	0.085	0.601	0.221
<b>HFO<sub>1</sub></b>	Estadístico (d.f.)	F <sub>(2,11)</sub>	H <sub>(2)</sub>	H <sub>(2)</sub>
	Valor	1.093	1.602	3.24
	p	0.369	0.483	0.214
<b>HFO<sub>2</sub></b>	Estadístico (d.f.)	F <sub>(2,11)</sub>	F <sub>(2,11)</sub>	H <sub>(2)</sub>

	Valor	1.747	0.209	2.888
	p	0.219	0.815	0.251

**Tabla 4.** Efecto del HFS sobre la PSD: Resumen de los resultados del ANOVA o ANOVA sobre rangos, estadístico (F o H) y valores de p, para la comparación intergrupos de la PSD relativa (normalizada con respecto a los registros posteriores a la inyección) para cada banda de frecuencia tras el protocolo HFS. Abreviaturas: d.f., grados de libertad.

## 7. Perspectivas de investigación a corto y mediano plazo

A partir de los estudios y herramientas desarrollados en este trabajo, las perspectivas de trabajos futuros se generan en diferentes direcciones. En un primer lugar, están los trabajos que se pueden desarrollar utilizando la interfaz. De hecho, la herramienta generada durante esta tesis se puede utilizar activamente en cualquier laboratorio de neurofisiología básica e incluso clínica. Hemos adelantado estudios de conexiones tálamo corticales in vivo, donde se encuentra modulación PAC entre diferentes subestructuras del tálamo y la corteza motora, al estimular las vibrisas de una rata anestesiada. Estas modulaciones se han detectado en ambas direcciones (tálamo-corteza y corteza-tálamo) y son muy sensibles a la definición de la banda moduladora. La habilidad de seleccionar los límites que nos ofrece la interfaz nos ha permitido obtener resultados interesantes. Estos estudios se van a continuar con los diferentes experimentos realizados en las diferentes líneas de investigación que se llevan en el laboratorio de neurofisiología de la Universidad Nacional y la Universidad del Rosario.

En segundo lugar, está el interés de aumentar el alcance de la interfaz. Por un lado, nos interesa generar un módulo que permita analizar el acople en amplitud-amplitud (AAC), y por otro lado implementar diferentes algoritmos de PAC que se han publicado recientemente. Adicionalmente, estamos desarrollando un sistema de detección de patrones a lo largo del registro, los cuales serán seleccionados por el investigador para mantener el carácter flexible y semiautomático de la interfaz. El hecho de poder seleccionar los patrones nos permite establecer correlaciones entre el patrón y una función cognitiva o funcional, en un sujeto anestesiado o que está realizando alguna tarea particular.

En tercer lugar, nos interesa profundizar en el estudio de las alteraciones de las modulaciones cerebrales usando el modelo implementado, pero incluyendo otros péptidos como el Beta Amiloide 1-42 en diferentes estados de agregación (oligomérica, fibrilar y monomérica), así como diferentes fármacos agonistas y antagonistas de receptores glutamatérgicos, gabaérgicos y colinérgicos.

Además, queremos evaluar si algunas moléculas y fitoterapeúticos con potencial neuroprotector, pueden revertir los cambios en la modulación en presencia de A $\beta$  o incluso en modelos transgénicos que presenten además taupatía. Tal como lo mencionamos anteriormente, la interfaz de análisis gráfico, así como la modulación de fase-amplitud para ondas lentas y rápidas, pueden ser un buen indicador de mecanismos de plasticidad sináptica subyacente a los mecanismos fisiológicos de memoria, que se podrían evaluar en otros modelos experimentales de disfunción cognitiva.

Por último, nos interesa usar las alteraciones que se encontraron en presencia de A $\beta$  para determinar si es posible usar estos resultados como un método de diagnóstico real, práctico y efectivo en la clínica. Sería necesario confirmar estas alteraciones en animales transgénicos, determinar si es posible medir las alteraciones en la modulación usando electrodos superficiales y hacer pruebas en humanos.

## 8. Bibliografía

1. Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Farías GA, Fuentes P, Navarrete LP. Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2019;16(6):518-28.
2. Late-Onset Alzheimer Disease - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410660/>
3. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19585947/>
4. A century of Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17082447/>
5. Biomarkers for preclinical Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25024325/>
6. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16405497/>
7. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27829687/>
8. Inter-network connectivity and amyloid-beta linked to cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: a longitudinal cohort study - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30153858/>
9. GABA and glutamate moderate beta-amyloid related functional connectivity in cognitively unimpaired old-aged adults - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927605/>
10. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 25 de octubre de 2002;298(5594):789-91.

11. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model - PubMed [Internet]. [citado 14 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22541439/>
12. Moreno H, Wu WE, Lee T, Brickman A, Mayeux R, Brown TR, et al. Imaging the Abeta-related neurotoxicity of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. octubre de 2007;64(10):1467-77.
13. Tudor M, Tudor L, Tudor KI. [Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]. *Acta Med Croatica*. 2005;59(4):307-13.
14. Churchland PS, Sejnowski TJ. Blending computational and experimental neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. noviembre de 2016;17(11):667-8.
15. Collura TF. History and evolution of electroencephalographic instruments and techniques. *J Clin Neurophysiol*. octubre de 1993;10(4):476-504.
16. Coenen A, Fine E, Zayachkivska O. Adolf Beck: a forgotten pioneer in electroencephalography. *J Hist Neurosci*. 2014;23(3):276-86.
17. İnce R, Adanır SS, Sevmez F. The inventor of electroencephalography (EEG): Hans Berger (1873-1941). *Childs Nerv Syst*. septiembre de 2021;37(9):2723-4.
18. Reif PS, Strzelczyk A, Rosenow F. The history of invasive EEG evaluation in epilepsy patients. *Seizure*. octubre de 2016;41:191-5.
19. Zayachkivska O. ADOLF BECK, CO-FOUNDER OF THE EEG AN ESSAY IN HONOUR OF HIS 150TH BIRTHDAY. 2013.
20. Siuly S, Li Y, Zhang Y. EEG Signal Analysis and Classification [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 15 de abril de 2023]. (Health Information Science). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-47653-7>
21. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34684482/>

22. Neurociencia - Dale, Purves: 9788491107620 - AbeBooks [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.abebooks.com/9788491107620/Neurociencia-Dale-Purves-8491107622/plp>
23. Obien MEJ, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front Neurosci*. 2014;8:423.
24. Rhythms of the Brain - Buzsaki, Gyorgy: 9780199828234 - IberLibro [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.iberlibro.com/9780199828234/Rhythms-Brain-Buzsaki-Gyorgy-0199828237/plp>
25. Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci*. abril de 2001;2(4):229-39.
26. Riddle J, McFerren A, Frohlich F. Causal role of cross-frequency coupling in distinct components of cognitive control. *Prog Neurobiol*. julio de 2021;202:102033.
27. Knyazev GG. EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. *Neurosci Biobehav Rev*. enero de 2012;36(1):677-95.
28. Ujma PP, Szalárdy O, Fabó D, Erőss L, Bódizs R. Thalamic activity during scalp slow waves in humans. *Neuroimage*. 15 de agosto de 2022;257:119325.
29. Artieda J, Alegre M, Valencia M, Urrestarazu E, Pérez-Alcázar M, Nicolás MJ, et al. Oscilaciones cerebrales: papel fisiopatológico y terapéutico en algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2009;32:45-60.
30. Cheng S, Butrus S, Tan L, Xu R, Sagireddy S, Trachtenberg JT, et al. Vision-dependent specification of cell types and function in the developing cortex. *Cell*. 20 de enero de 2022;185(2):311-327.e24.
31. Sridharan D, Knudsen EI. Gamma oscillations in the midbrain spatial attention network: linking circuits to function. *Curr Opin Neurobiol*. abril de 2015;31:189-98.
32. Gamma oscillations modulate working memory recall precision - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34223958/>

33. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038224/>
34. Reduced fronto-cortical brain connectivity during NREM sleep in Asperger syndrome: an EEG spectral and phase coherence study - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20434395/>
35. Le Van Quyen M, Bragin A. Analysis of dynamic brain oscillations: methodological advances. *Trends Neurosci.* julio de 2007;30(7):365-73.
36. Cross-Frequency Coupling in Cortical Processing of Speech - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36085847/>
37. Chu CJ, Leahy J, Pathmanathan J, Kramer MA, Cash SS. The maturation of cortical sleep rhythms and networks over early development. *Clin Neurophysiol.* julio de 2014;125(7):1360-70.
38. Gloor P, Ball G, Schaul N. Brain lesions that produce delta waves in the EEG. *Neurology.* abril de 1977;27(4):326-33.
39. Quantitative EEG in hospital encephalopathy: review and microstate analysis - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24084185/>
40. Child EEG (and maturation) - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31277843/>
41. The functional significance of delta oscillations in cognitive processing - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24367301/>
42. EEG delta activity: an indicator of attention to internal processing during performance of mental tasks - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8978441/>
43. Hauk O, Stenroos M, Treder M. EEG/MEG Source Estimation and Spatial Filtering: The Linear Toolkit. En: Supek S, Aine CJ, editores. *Magnetoencephalography: From Signals*

to Dynamic Cortical Networks [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 15 de abril de 2023]. p. 1-37. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62657-4\\_85-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62657-4_85-1)

44. Entrainment of neuronal oscillations as a mechanism of attentional selection - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18388295/>

45. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* noviembre de 1971;34(1):171-5.

46. O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus.* julio de 1993;3(3):317-30.

47. Information transfer between rhythmically coupled networks: reading the hippocampal phase code - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11705409/>

48. Theta coupling between V4 and prefrontal cortex predicts visual short-term memory performance - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22286175/>

49. Scheffer-Teixeira R, Tort AB. On cross-frequency phase-phase coupling between theta and gamma oscillations in the hippocampus. *Elife.* 7 de diciembre de 2016;5:e20515.

50. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19924214/>

51. Canolty RT, Edwards E, Dalal SS, Soltani M, Nagarajan SS, Kirsch HE, et al. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science.* 15 de septiembre de 2006;313(5793):1626-8.

52. Klimesch W.  $\alpha$ -band oscillations, attention, and controlled access to stored information. *Trends Cogn Sci.* diciembre de 2012;16(12):606-17.

53. The role of alpha oscillations in spatial attention: limited evidence for a suppression account - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30472541/>
54. Payne L, Guillory S, Sekuler R. Attention-modulated alpha-band oscillations protect against intrusion of irrelevant information. *J Cogn Neurosci*. septiembre de 2013;25(9):1463-76.
55. Ronconi L, Melcher D. The Role of Oscillatory Phase in Determining the Temporal Organization of Perception: Evidence from Sensory Entrainment. *J Neurosci*. 1 de noviembre de 2017;37(44):10636-44.
56. Haegens S, Luther L, Jensen O. Somatosensory anticipatory alpha activity increases to suppress distracting input. *J Cogn Neurosci*. marzo de 2012;24(3):677-85.
57. Gomez-Ramirez M, Kelly SP, Molholm S, Sehatpour P, Schwartz TH, Foxe JJ. Oscillatory sensory selection mechanisms during intersensory attention to rhythmic auditory and visual inputs: a human electrocorticographic investigation. *J Neurosci*. 14 de diciembre de 2011;31(50):18556-67.
58. Spaak E, Bonnefond M, Maier A, Leopold DA, Jensen O. Layer-specific entrainment of  $\gamma$ -band neural activity by the  $\alpha$  rhythm in monkey visual cortex. *Curr Biol*. 18 de diciembre de 2012;22(24):2313-8.
59. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev*. abril de 1999;29(2-3):169-95.
60. The functional significance of theta and upper alpha oscillations - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15850157/>
61. Borghini G, Candini M, Filannino C, Hussain M, Walsh V, Romei V, et al. Alpha Oscillations Are Causally Linked to Inhibitory Abilities in Ageing. *J Neurosci*. 2 de mayo de 2018;38(18):4418-29.
62. Oscillatory interactions between sensorimotor cortex and the periphery - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18339546/>

63. Distinct Modulations in Sensorimotor Postmovement and Foreperiod  $\beta$ -Band Activities Related to Error Saliency Processing and Sensorimotor Adaptation - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26377464/>
64. Beta oscillations in the monkey sensorimotor network reflect somatosensory decision making - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670296/>
65. Spike-Gamma Phase Relationship in the Visual Cortex - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35667158/>
66. Colgin LL, Moser EI. Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology (Bethesda)*. octubre de 2010;25(5):319-29.
67. Early gamma oscillations - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23872391/>
68. Bergmann TO, Born J. Phase-Amplitude Coupling: A General Mechanism for Memory Processing and Synaptic Plasticity? *Neuron*. 3 de enero de 2018;97(1):10-3.
69. Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20664082/>
70. Speed and Oscillations: Medial Septum Integration of Attention and Navigation - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979196/>
71. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7845584/>
72. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*. 31 de enero de 2002;33(3):325-40.
73. Self-generated theta oscillations in the hippocampus - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19881503/>

74. Lopes da Silva FH, Vos JE, Mooibroek J, Van Rotterdam A. Relative contributions of intracortical and thalamo-cortical processes in the generation of alpha rhythms, revealed by partial coherence analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. diciembre de 1980;50(5-6):449-56.
75. Bollimunta A, Chen Y, Schroeder CE, Ding M. Neuronal mechanisms of cortical alpha oscillations in awake-behaving macaques. *J Neurosci*. 1 de octubre de 2008;28(40):9976-88.
76. Bollimunta A, Mo J, Schroeder CE, Ding M. Neuronal mechanisms and attentional modulation of corticothalamic  $\alpha$  oscillations. *J Neurosci*. 30 de marzo de 2011;31(13):4935-43.
77. Hughes SW, Crunelli V. Thalamic mechanisms of EEG alpha rhythms and their pathological implications. *Neuroscientist*. agosto de 2005;11(4):357-72.
78. Llinás R, Jahnsen H. Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature*. 3 de junio de 1982;297(5865):406-8.
79. Thalamic model of awake alpha oscillations and implications for stimulus processing - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23054840/>
80. Temporal framing of thalamic relay-mode firing by phasic inhibition during the alpha rhythm - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19755110/>
81. Terman D, Bose A, Kopell N. Functional reorganization in thalamocortical networks: transition between spindling and delta sleep rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 de diciembre de 1996;93(26):15417-22.
82. A model for 8-10 Hz spindling in interconnected thalamic relay and reticularis neurons - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8312485/>
83. Attentional stimulus selection through selective synchronization between monkey visual areas - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958827/>

84. Beta-band oscillations play an essential role in motor-auditory interactions - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31639252/>
85. Ray S, Maunsell JHR. Differences in gamma frequencies across visual cortex restrict their possible use in computation. *Neuron*. 9 de septiembre de 2010;67(5):885-96.
86. A functional gamma-band defined by stimulus-dependent synchronization in area 18 of awake behaving cats - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12764113/>
87. Distinguishing mechanisms of gamma frequency oscillations in human current source signals using a computational model of a laminar neocortical network - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385958/>
88. Are different rhythms good for different functions? - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21103019/>
89. Human Brain Oscillations: From Physiological Mechanisms to Analysis and Cognition | SpringerLink [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-33045-2\\_17](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-33045-2_17)
90. Tiesinga P, Sejnowski TJ. Cortical enlightenment: are attentional gamma oscillations driven by ING or PING? *Neuron*. 24 de septiembre de 2009;63(6):727-32.
91. Schlingloff D, Káli S, Freund TF, Hájos N, Gulyás AI. Mechanisms of Sharp Wave Initiation and Ripple Generation. *J Neurosci*. 20 de agosto de 2014;34(34):11385-98.
92. Jefferys JGR, Menendez de la Prida L, Wendling F, Bragin A, Avoli M, Timofeev I, et al. Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog Neurobiol*. septiembre de 2012;98(3):250-64.
93. Alturki FA, AlSharabi K, Abdurraqueeb AM, Aljalal M. EEG Signal Analysis for Diagnosing Neurological Disorders Using Discrete Wavelet Transform and Intelligent Techniques. *Sensors*. enero de 2020;20(9):2505.
94. Normal and pathological oscillatory communication in the brain - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15803160/>

95. Brain oscillations in neuropsychiatric disease - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24174901/>
96. Jiruska P, de Curtis M, Jefferys JGR, Schevon CA, Schiff SJ, Schindler K. Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses. *J Physiol*. 15 de febrero de 2013;591(4):787-97.
97. Probing cortical excitability using cross-frequency coupling in intracranial EEG recordings: a new method for seizure prediction - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22254636/>
98. Oswal A, Brown P, Litvak V. Synchronized neural oscillations and the pathophysiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. diciembre de 2013;26(6):662-70.
99. Phase-Dependent Suppression of Beta Oscillations in Parkinson's Disease Patients - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30552179/>
100. Yakubov B, Das S, Zomorodi R, Blumberger DM, Enticott PG, Kirkovski M, et al. Cross-frequency coupling in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. julio de 2022;138:104690.
101. Functional changes in brain oscillations in dementia: a review - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35724724/>
102. Jafari Z, Kolb BE, Mohajerani MH. Neural oscillations and brain stimulation in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. noviembre de 2020;194:101878.
103. Early-stage attenuation of phase-amplitude coupling in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a transgenic rat model of Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28777881/>
104. Gauthier-Umaña C, Valderrama M, Múnera A, Nava-Mesa MO. BOARD-FTD-PACC: a graphical user interface for the synaptic and cross-frequency analysis derived from neural signals. *Brain Inform*. 8 de mayo de 2023;10(1):12.

105. Analyzing Neural Time Series Data - - COHEN, MIKE X. - Imosver [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: [https://www.imosver.com/es/libro/analyzing-neural-time-series-data\\_ARC0059714](https://www.imosver.com/es/libro/analyzing-neural-time-series-data_ARC0059714)
106. Electroencephalogram signatures of loss and recovery of consciousness from propofol - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23487781/>
107. Cognitive neurophysiology: Event-related potentials - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31277875/>
108. Biasiucci A, Franceschiello B, Murray MM. Electroencephalography. *Curr Biol.* 4 de febrero de 2019;29(3):R80-5.
109. Cross frequency coupling in next generation inhibitory neural mass models - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491891/>
110. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15102499/>
111. Martínez-Cancino R, Delorme A, Kreutz-Delgado K, Makeig S. Computing Phase Amplitude Coupling in EEGLAB: PACTools. En: 2020 IEEE 20th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE). 2020. p. 387-94.
112. Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen JM. FieldTrip: Open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput Intell Neurosci.* 2011;2011:156869.
113. Brainstorm: a user-friendly application for MEG/EEG analysis - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21584256/>
114. Gramfort A, Luessi M, Larson E, Engemann DA, Strohmeier D, Brodbeck C, et al. MNE software for processing MEG and EEG data. *Neuroimage.* 1 de febrero de 2014;86:446-60.

115. Combrisson E, Nest T, Brovelli A, Ince RAA, Soto JLP, Guillot A, et al. Tensorpac: An open-source Python toolbox for tensor-based phase-amplitude coupling measurement in electrophysiological brain signals. *PLoS Comput Biol.* octubre de 2020;16(10):e1008302.
116. NeuroMatic: An Integrated Open-Source Software Toolkit for Acquisition, Analysis and Simulation of Electrophysiological Data - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29670519/>
117. Minhee Analysis Package: an integrated software package for detection and management of spontaneous synaptic events - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34496933/>
118. Investigation of an automatic sleep stage classification by means of multiscorer hypnogram - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20644896/>
119. Idiopathic generalized epilepsies: Analysis of 101 patients - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36030098/>
120. Toker D, Pappas I, Lendner JD, Frohlich J, Mateos DM, Muthukumaraswamy S, et al. Consciousness is supported by near-critical slow cortical electrodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de febrero de 2022;119(7):e2024455119.
121. Urrestarazu E, Iriarte J. [Mathematical analyses in the study of electroencephalographic signals]. *Rev Neurol.* 1 de octubre de 2005;41(7):423-34.
122. López-Pájaro LF, Ruiz-Antorán B, Marín-Serrano E, Cazorla-Calleja R, Iglesias-Escalera G, Lara-Herguedas J, et al. [Descriptive analysis of the electroencephalogram in Angelman syndrome]. *Rev Neurol.* 16 de enero de 2021;72(2):51-60.
123. Galambos R, Sheatz GC. An electroencephalograph study of classical conditioning. *Am J Physiol.* julio de 1962;203:173-84.
124. Visor Redalyc - Computación, análisis e interpretación de señales eléctricas del cerebro humano en el dominio del tiempo: 90 años de Electrofisiología Cognitiva [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/483/4832571006/movil/>

125. Joseph Fourier, Théorie analytique de la chaleur (1822) [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/288475733\\_Joseph\\_Fourier\\_Theorie\\_analytique\\_de\\_la\\_chaleur\\_1822](https://www.researchgate.net/publication/288475733_Joseph_Fourier_Theorie_analytique_de_la_chaleur_1822)
126. Signals and Systems - Oppenheim, Alan; Willsky, Alan; Nawab, S.: 9780138147570 - AbeBooks [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.abebooks.com/9780138147570/Signals-Systems-Oppenheim-Alan-Willsky-0138147574/plp>
127. AMS :: Mathematics of Computation [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.ams.org/journals/mcom/1965-19-090/S0025-5718-1965-0178586-1/>
128. Quantitative analysis of high-frequency oscillations (80-500 Hz) recorded in human epileptic hippocampus and entorhinal cortex - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12364503/>
129. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms | IEEE Journals & Magazine | IEEE Xplore [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/1161901>
130. Sheikh S at A, Majoka AZ, Rehman KU, Razzaq N, Zaidi T. Nonparametric Spectral Estimation Technique to Estimate Dominant Frequency for Atrial Fibrillation Detection. Journal of Signal and Information Processing. 13 de noviembre de 2015;6(4):266-76.
131. Power spectral density and coherence analysis of Alzheimer's EEG - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25972978/>
132. Niso G, Tadel F, Bock E, Cousineau M, Santos A, Baillet S. Brainstorm Pipeline Analysis of Resting-State Data From the Open MEG Archive. Front Neurosci. 2019;13:284.
133. The natural background levels of 50/60 Hz radio noise | IEEE Journals & Magazine | IEEE Xplore [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/155849>

134. Sampling, data transmission, and the Nyquist rate | IEEE Journals & Magazine | IEEE Xplore [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/1447892>
135. Comparison of Hilbert transform and wavelet methods for the analysis of neuronal synchrony - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11595276/>
136. Ng MC, Jing J, Westover MB. A Primer on EEG Spectrograms. *J Clin Neurophysiol.* 1 de marzo de 2022;39(3):177-83.
137. Akin M. Comparison of Wavelet Transform and FFT Methods in the Analysis of EEG Signals. *Journal of Medical Systems.* 1 de junio de 2002;26(3):241-7.
138. A Wavelet Tour of Signal Processing - 3rd Edition [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/a-wavelet-tour-of-signal-processing/mallat/978-0-12-374370-1>
139. Applied Sciences | Free Full-Text | Identification and Representation of Multi-Pulse Near-Fault Strong Ground Motion Using Adaptive Wavelet Transform [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/2/259>
140. A better way to define and describe Morlet wavelets for time-frequency analysis - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31145982/>
141. Time–frequency analysis of nonstationary fusion plasma signals: A comparison between the Choi–Williams distribution and wavelets: *Review of Scientific Instruments: Vol 75, No 10* [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1787573?journalCode=rsi>
142. Canolty RT, Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn Sci.* noviembre de 2010;14(11):506-15.
143. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci.* febrero de 2010;11(2):114-26.

144. Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20463205/>
145. Gamma Power Is Phase-Locked to Posterior Alpha Activity | PLOS ONE [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003990>
146. Ahn S, Rubchinsky LL. Potential Mechanisms and Functions of Intermittent Neural Synchronization. *Frontiers in Computational Neuroscience* [Internet]. 2017 [citado 15 de abril de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncom.2017.00044>
147. Frontiers | Rhythmic Memory Consolidation in the Hippocampus [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2022.885684/full>
148. Mechanisms of Gamma Oscillations | Annual Review of Neuroscience [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>
149. Aru J, Aru J, Priesemann V, Wibral M, Lana L, Pipa G, et al. Untangling cross-frequency coupling in neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*. 1 de abril de 2015;31:51-61.
150. Acute Effects of Two Different Species of Amyloid- $\beta$  on Oscillatory Activity and Synaptic Plasticity in the Commissural CA3-CA1 Circuit of the Hippocampus [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/np/2020/8869526/>
151. Boashash B, Azemi G, O'Toole JM. Time-Frequency Processing of Nonstationary Signals: Advanced TFD Design to Aid Diagnosis with Highlights from Medical Applications. *IEEE Signal Processing Magazine*. noviembre de 2013;30(6):108-19.
152. Boashash B, Ouelha S. Automatic signal abnormality detection using time-frequency features and machine learning: A newborn EEG seizure case study. *Knowledge-Based Systems*. 15 de agosto de 2016;106:38-50.

153. Applied Sciences | Free Full-Text | Tonic Cold Pain Detection Using Choi–Williams Time-Frequency Distribution Analysis of EEG Signals: A Feasibility Study [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/16/3433>
154. Time-frequency analysis of myoelectric signals during dynamic contractions: a comparative study | IEEE Journals & Magazine | IEEE Xplore [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/821766>
155. Jurkiewicz GJ, Hunt MJ, Żygierewicz J. Addressing Pitfalls in Phase-Amplitude Coupling Analysis with an Extended Modulation Index Toolbox. *Neuroinform.* 1 de abril de 2021;19(2):319-45.
156. Dastgheyb RM, Yoo SW, Haughey NJ. MEAnalyzer – a Spike Train Analysis Tool for Multi Electrode Arrays. *Neuroinform.* 1 de enero de 2020;18(1):163-79.
157. Frontiers | ERPLAB: an open-source toolbox for the analysis of event-related potentials [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2014.00213/full>
158. ERPWAVELAB: A toolbox for multi-channel analysis of time–frequency transformed event related potentials - ScienceDirect [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016502700600567X?via%3Dihub>
159. Peyk P, De Cesarei A, Junghöfer M. ElectroMagnetoEncephalography Software: Overview and Integration with Other EEG/MEG Toolboxes. *Computational Intelligence and Neuroscience.* 15 de marzo de 2011;2011:e861705.
160. PyEEG: An Open Source Python Module for EEG/MEG Feature Extraction [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/cin/2011/406391/>
161. Navarrete M, Alvarado-Rojas C, Quyen MLV, Valderrama M. RIPPLELAB: A Comprehensive Application for the Detection, Analysis and Classification of High Frequency Oscillations in Electroencephalographic Signals. *PLOS ONE.* 24 de junio de 2016;11(6):e0158276.

162. Multitaper estimates of phase-amplitude coupling - IOPscience [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/ac1deb>
163. Frontiers | Quantification of Phase-Amplitude Coupling in Neuronal Oscillations: Comparison of Phase-Locking Value, Mean Vector Length, Modulation Index, and Generalized-Linear-Modeling-Cross-Frequency-Coupling [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00573/full>
164. Fuentes P. Alzheimer's disease: A historical note. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. noviembre de 2003;41:9-12.
165. Vishal S, Sourabh A, Harkirat S. Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *J Med Biogr*. febrero de 2011;19(1):32-3.
166. Tellechea P, Pujol N, Esteve-Belloch P, Echeveste B, García-Eulate MR, Arbizu J, et al. Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurologia (Engl Ed)*. mayo de 2018;33(4):244-53.
167. Late onset Alzheimer's disease in older people - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21103401/>
168. Environmental risk factors for dementia: a systematic review - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27729011/>
169. Distinctive effects of executive dysfunction and loss of learning/memory abilities on resting-state brain activity - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35236888/>
170. Apostolova LG. Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. abril de 2016;22(2 Dementia):419-34.
171. Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. diciembre de 2013;15(4):445-54.
172. Implicit and explicit memory for spatial information in Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16088143/>

173. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* mayo de 2011;7(3):280-92.
174. Saied I, Bashri MSR, Arslan T, Smith C, Chandran S. Dielectric Measurements of Brain Tissues with Alzheimer's Disease Pathology in the Microwave Region. En: 2019 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA). 2019. p. 1-6.
175. Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30068225/>
176. Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11929987/>
177. Jeremic D, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Ageing Res Rev.* diciembre de 2021;72:101496.
178. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature.* 15 de octubre de 2009;461(7266):916-22.
179. Leuzy A, Heurling K, Ashton NJ, Schöll M, Zimmer ER. In vivo Detection of Alzheimer's Disease. *Yale J Biol Med.* septiembre de 2018;91(3):291-300.
180. Palop JJ, Mucke L. Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin? *Neuromolecular Med.* marzo de 2010;12(1):48-55.
181. Nava-Mesa MO, Jiménez-Díaz L, Yajeya J, Navarro-Lopez JD. GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:167.
182. Alzheimer's Disease therapeutics: current and future therapies - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26933835/>

183. Caselli RJ, Beach TG, Knopman DS, Graff-Radford NR. Alzheimer Disease: Scientific Breakthroughs and Translational Challenges. *Mayo Clin Proc.* junio de 2017;92(6):978-94.
184. The Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Is an Effector Molecule of Metaplasticity - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28168961/>
185. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10188929/>
186. Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 26 de octubre de 2022;23(21):12924.
187. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* mayo de 2003;70(1):1-32.
188. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35) - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11403592/>
189. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol.* 15 de agosto de 2006;575(Pt 1):5-10.
190. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1566067/>
191. APP processing in Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21214928/>
192. Dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr Med Chem.* 2018;25(26):3141-59.
193. Gutiérrez-Lerma AI, Ordaz B, Peña-Ortega F. Amyloid Beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro. *Int J Pept.* 2013;2013:328140.

194. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. julio de 1994;13(1):45-53.
195. Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*. 1 de diciembre de 2006;143(2):461-75.
196. Bordji K, Becerril-Ortega J, Buisson A. Synapses, NMDA receptor activity and neuronal A $\beta$  production in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2011;22(3):285-94.
197. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA, Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. diciembre de 2018;19(12):755-73.
198. Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*. julio de 2010;13(7):812-8.
199. Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*. 2002;115(1):201-11.
200. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044677/>
201. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*. junio de 2000;130(2-3):184-208.
202. Sultana R, Butterfield DA. Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide. *Mol Biosyst*. enero de 2008;4(1):36-41.
203. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 21 de febrero de 1997;275(5303):1132-6.

204. Marsh J, Alifragis P. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: the effects of amyloid beta on synaptic vesicle dynamics as a novel target for therapeutic intervention. *Neural Regen Res.* abril de 2018;13(4):616-23.
205. Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29297151/>
206. Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17368908/>
207. A $\beta$  Oligomer Elimination Restores Cognition in Transgenic Alzheimer's Mice with Full-blown Pathology - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30003517/>
208. Amyloid Beta Alters Prefrontal-dependent Functions Along with its Excitability and Synaptic Plasticity in Male Rats - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35839923/>
209. Russell CL, Semerdjieva S, Empson RM, Austen BM, Beesley PW, Alifragis P. Amyloid- $\beta$  acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2. *PLoS One.* 2012;7(8):e43201.
210. Van Hooren RWE, Riphagen JM, Jacobs HIL, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Inter-network connectivity and amyloid-beta linked to cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: a longitudinal cohort study. *Alzheimers Res Ther.* 28 de agosto de 2018;10(1):88.
211. Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci.* febrero de 2010;11(1):54-67.
212. Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* enero de 1995;64(1):253-65.

213. I K, K M, T K. Drastic neuronal loss in vivo by beta-amyloid racemized at Ser(26) residue: conversion of non-toxic [D-Ser(26)]beta-amyloid 1-40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience* [Internet]. 2001 [citado 15 de abril de 2023];104(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11457586/>
214. Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RDE, Voskresenskaya NI, et al. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18(2):165-71.
215. Korotzer AR, Whittmore ER, Cotman CW. Differential regulation by beta-amyloid peptides of intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration in cultured rat microglia. *Eur J Pharmacol*. 16 de enero de 1995;288(2):125-30.
216. Hiruma H, Katakura T, Takahashi S, Ichikawa T, Kawakami T. Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Neurosci*. 1 de octubre de 2003;23(26):8967-77.
217. Rönicke R, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reymann KG. Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*. 18 de septiembre de 2008;3(9):e3236.
218. Bello-Medina P, González-Franco D, Medina A. El hipocampo: historia, estructura y función. 5 de julio de 2018;5.
219. Bir SC, Ambekar S, Kukreja S, Nanda A. Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery. *J Neurosurg*. abril de 2015;122(4):971-5.
220. *The Hippocampus Book (Hardcover)* [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.loot.co.za/product/per-andersen-the-hippocampus-book/khvr-436-g9a0>
221. Chauhan P, Jethwa K, Rathawa A, Chauhan G, Mehra S. *The Anatomy of the Hippocampus*. En: Pluta R, editor. *Cerebral Ischemia* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021 [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK575732/>

222. Dendritic development of newly generated neurons in the adult brain - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239443/>
223. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18270515/>
224. Interneurons of the hippocampus - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8915675/>
225. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus - Ishizuka - 1995 - Journal of Comparative Neurology - Wiley Online Library [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.903620103>
226. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization - ScienceDirect [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/095943889390214J?via%3Dihub>
227. Long-term potentiation and memory - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715912/>
228. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. febrero de 1957;20(1):11-21.
229. Memory dysfunctions - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32977899/>
230. Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. marzo de 1998;20(3):445-68.
231. Memory function and the hippocampus - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24777130/>
232. [Learning and memory] - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11333395/>

233. Nicolás B, Sala-Padró J, Cucurell D, Santurino M, Falip M, Fuentemilla L. Theta rhythm supports hippocampus-dependent integrative encoding in schematic/semantic memory networks. *Neuroimage*. 1 de febrero de 2021;226:117558.
234. Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*. febrero de 2013;16(2):130-8.
235. Aly M, Turk-Browne NB. Attention Stabilizes Representations in the Human Hippocampus. *Cereb Cortex*. febrero de 2016;26(2):783-96.
236. Treder MS, Charest I, Michelmann S, Martín-Buro MC, Roux F, Carceller-Benito F, et al. The hippocampus as the switchboard between perception and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de diciembre de 2021;118(50):e2114171118.
237. Muzzio IA, Kentros C, Kandel E. What is remembered? Role of attention on the encoding and retrieval of hippocampal representations. *J Physiol*. 15 de junio de 2009;587(Pt 12):2837-54.
238. Lockmann ALV, Laplagne DA, Tort ABL. Olfactory bulb drives respiration-coupled beta oscillations in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. octubre de 2018;48(8):2663-73.
239. Oscillatory patterns in hippocampus under light and deep isoflurane anesthesia closely mirror prominent brain states in awake animals - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190054/>
240. Hippocampal population activity during the small-amplitude irregular activity state in the rat - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11850464/>
241. Lega B, Burke J, Jacobs J, Kahana MJ. Slow-Theta-to-Gamma Phase-Amplitude Coupling in Human Hippocampus Supports the Formation of New Episodic Memories. *Cereb Cortex*. enero de 2016;26(1):268-78.
242. Xu X, Zheng C, Zhang T. Reduction in LFP cross-frequency coupling between theta and gamma rhythms associated with impaired STP and LTP in a rat model of brain ischemia. *Front Comput Neurosci*. 2013;7:27.

243. Axmacher N, Mormann F, Fernández G, Elger CE, Fell J. Memory formation by neuronal synchronization. *Brain Res Rev.* 30 de agosto de 2006;52(1):170-82.
244. Wang DX, Schmitt K, Seger S, Davila CE, Lega BC. Cross-regional phase amplitude coupling supports the encoding of episodic memories. *Hippocampus.* mayo de 2021;31(5):481-92.
245. Jacobs J. Hippocampal theta oscillations are slower in humans than in rodents: implications for models of spatial navigation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5 de febrero de 2014;369(1635):20130304.
246. Gu Z, Yakel JL. Cholinergic Regulation of Hippocampal Theta Rhythm. *Biomedicines.* 23 de marzo de 2022;10(4):745.
247. Stepan J, Dine J, Fenzl T, Polta SA, von Wolff G, Wotjak CT, et al. Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP. *Front Neural Circuits.* 2012;6:64.
248. Kocsis B, Martínez-Bellver S, Fiáth R, Domonkos A, Sviatkó K, Schlingloff D, et al. Huygens synchronization of medial septal pacemaker neurons generates hippocampal theta oscillation. *Cell Rep.* 2 de agosto de 2022;40(5):111149.
249. López-Madrona VJ, Canals S. Functional Interactions between Entorhinal Cortical Pathways Modulate Theta Activity in the Hippocampus. *Biology (Basel).* 21 de julio de 2021;10(8):692.
250. Bland BH, Konopacki J, Dyck R. Heterogeneity among hippocampal pyramidal neurons revealed by their relation to theta-band oscillation and synchrony. *Exp Neurol.* octubre de 2005;195(2):458-74.
251. Qasim SE, Fried I, Jacobs J. Phase precession in the human hippocampus and entorhinal cortex. *Cell.* 10 de junio de 2021;184(12):3242-3255.e10.
252. Hölscher C, Anwyl R, Rowan MJ. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can Be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J Neurosci.* 15 de agosto de 1997;17(16):6470-7.

253. Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. *J Neurosci*. 17 de diciembre de 2003;23(37):11725-31.
254. Jarosiewicz B, Skaggs WE. Level of arousal during the small irregular activity state in the rat hippocampal EEG. *J Neurophysiol*. junio de 2004;91(6):2649-57.
255. Chrobak JJ, Buzsáki G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J Neurosci*. 1 de mayo de 1996;16(9):3056-66.
256. Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G. Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron*. julio de 1998;21(1):179-89.
257. Buzsáki G. Two-stage model of memory trace formation: a role for «noisy» brain states. *Neuroscience*. 1989;31(3):551-70.
258. Siapas AG, Wilson MA. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron*. noviembre de 1998;21(5):1123-8.
259. Pickenhain L, Klingberg F. Hippocampal slow wave activity as a correlate of basic behavioral mechanisms in the rat. *Prog Brain Res*. 1967;27:218-27.
260. Whishaw IQ, Vanderwolf CH. Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiol Behav*. abril de 1971;6(4):391-7.
261. Miyawaki H, Billeh YN, Diba K. Low Activity Microstates During Sleep. *Sleep*. 1 de junio de 2017;40(6):zsx066.
262. Hippocampal place cells are not controlled by visual input during the small irregular activity state in the rat - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15163700/>
263. Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*. 23 de enero de 2003;37(2):311-22.

264. Iwasaki S, Sasaki T, Ikegaya Y. Hippocampal beta oscillations predict mouse object-location associative memory performance. *Hippocampus*. mayo de 2021;31(5):503-11.
265. Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci*. enero de 1995;15(1 Pt 1):47-60.
266. Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*. octubre de 1983;287(2):139-71.
267. Stumpf C. THE FAST COMPONENT IN THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RABBIT'S HIPPOCAMPUS. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. abril de 1965;18:477-86.
268. Lisman JE, Jensen O. The  $\theta$ - $\gamma$  neural code. *Neuron*. 20 de marzo de 2013;77(6):1002-16.
269. Alvarez XA, Miguel-Hidalgo JJ, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Intrahippocampal injections of the beta-amyloid 1-28 fragment induces behavioral deficits in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. septiembre de 1997;19(7):471-9.
270. Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol*. 15 de septiembre de 2003;551(Pt 3):927-43.
271. Nava-Mesa MO, Jiménez-Díaz L, Yajeya J, Navarro-Lopez JD. Amyloid- $\beta$  induces synaptic dysfunction through G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in the fimbria-CA3 hippocampal synapse. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:117.
272. Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FEN, Bannerman DM, et al. Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron*. 15 de febrero de 2007;53(4):591-604.
273. Jensen O, Colgin LL. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends Cogn Sci*. julio de 2007;11(7):267-9.

274. Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CMA, Wiener SI. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn Sci.* julio de 2011;15(7):310-8.
275. Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci.* 25 de enero de 2006;26(4):1077-87.
276. Gruart A, Delgado-García JM. Activity-dependent changes of the hippocampal CA3-CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice. *Genes Brain Behav.* junio de 2007;6 Suppl 1:24-31.
277. Muñoz-Cabrera JM, Sandoval-Hernández AG, Niño A, Báez T, Bustos-Rangel A, Cardona-Gómez GP, et al. Bexarotene therapy ameliorates behavioral deficits and induces functional and molecular changes in very-old Triple Transgenic Mice model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223578.
278. Bikbaev A, Manahan-Vaughan D. Relationship of hippocampal theta and gamma oscillations to potentiation of synaptic transmission. *Front Neurosci.* julio de 2008;2(1):56-63.
279. Bikbaev A, Manahan-Vaughan D. Metabotropic glutamate receptor, mGlu5, regulates hippocampal synaptic plasticity and is required for tetanisation-triggered changes in theta and gamma oscillations. *Neuropharmacology.* 15 de marzo de 2017;115:20-9.
280. Habib D, Tsui CKY, Rosen LG, Dringenberg HC. Occlusion of low-frequency-induced, heterosynaptic long-term potentiation in the rat hippocampus in vivo following spatial training. *Cereb Cortex.* noviembre de 2014;24(11):3090-6.
281. Jutras MJ, Fries P, Buffalo EA. Oscillatory activity in the monkey hippocampus during visual exploration and memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 de agosto de 2013;110(32):13144-9.
282. Peña-Ortega F. Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction. *J Neurodegener Dis.* 2013;2013:657470.
283. Nimmrich V, Draguhn A, Axmacher N. Neuronal Network Oscillations in Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Med.* septiembre de 2015;17(3):270-84.

284. Wang J, Fang Y, Wang X, Yang H, Yu X, Wang H. Enhanced Gamma Activity and Cross-Frequency Interaction of Resting-State Electroencephalographic Oscillations in Patients with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:243.
285. Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23773058/>
286. Kalweit AN, Yang H, Colitti-Klausnitzer J, Fülöp L, Bozsó Z, Penke B, et al. Acute intracerebral treatment with amyloid-beta (1-42) alters the profile of neuronal oscillations that accompany LTP induction and results in impaired LTP in freely behaving rats. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:103.
287. Sánchez-Rodríguez I, Temprano-Carazo S, Nájera A, Djebari S, Yajeya J, Gruart A, et al. Activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (Kir3/GirK) channels rescues hippocampal functions in a mouse model of early amyloid- $\beta$  pathology. *Sci Rep.* 7 de noviembre de 2017;7(1):14658.
288. Kalweit AN, Amanpour-Gharaei B, Colitti-Klausnitzer J, Manahan-Vaughan D. Changes in Neuronal Oscillations Accompany the Loss of Hippocampal LTP that Occurs in an Animal Model of Psychosis. *Front Behav Neurosci.* 2017;11:36.
289. Santos-Torres J, Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Yajeya J. Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta-peptide in the medial septum. *J Neurosci Res.* 15 de febrero de 2007;85(3):634-48.
290. Wang Y, Zhou TH, Zhi Z, Barakat A, Hlatky L, Querfurth H. Multiple effects of  $\beta$ -amyloid on single excitatory synaptic connections in the PFC. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:129.
291. Ashenafi S, Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Yajeya J. Beta-Amyloid peptide25-35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala «in vitro». *Neurobiol Aging.* abril de 2005;26(4):419-28.
292. Sánchez-Rodríguez I, Djebari S, Temprano-Carazo S, Vega-Avelaira D, Jiménez-Herrera R, Iborra-Lázaro G, et al. Hippocampal long-term synaptic depression and memory deficits induced in early amyloidopathy are prevented by enhancing G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel activity. *J Neurochem.* mayo de 2020;153(3):362-76.

293. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines - Kilkenny - 2010 - British Journal of Pharmacology - Wiley Online Library [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>
294. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (with CD-ROM) [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://norecopa.no/textbase/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates-with-cd-rom>
295. The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12494316/>
296. Morgan C, Colombres M, Nuñez MT, Inestrosa NC. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* diciembre de 2004;74(6):323-49.
297. Millucci L, Raggiaschi R, Franceschini D, Terstappen G, Santucci A. Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A $\beta$  (25–35) peptide. *J Biosci.* 1 de junio de 2009;34(2):293-303.
298. Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, et al. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus.* enero de 2010;20(1):78-96.
299. Leão RN, Colom LV, Borgius L, Kiehn O, Fisahn A. Medial septal dysfunction by A $\beta$ -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons. *Neurobiol Aging.* septiembre de 2012;33(9):2046-61.
300. Schmid AW, Lynch MA, Herron CE. The effects of IL-1 receptor antagonist on beta amyloid mediated depression of LTP in the rat CA1 in vivo. *Hippocampus.* julio de 2009;19(7):670-6.
301. Goryacheva AV, Kruglov SV, Pshennikova MG, Smirin BV, Malyshev IY, Barskov IV, et al. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain. *Nitric Oxide.* 15 de diciembre de 2010;23(4):289-99.

302. Hajipour S, Sarkaki A, Farbood Y, Eidi A, Mortazavi P, Valizadeh Z. Effect of Gallic Acid on Dementia Type of Alzheimer Disease in Rats: Electrophysiological and Histological Studies. *Basic Clin Neurosci.* abril de 2016;7(2):97-106.
303. Neurodegenerative changes induced by injection of  $\beta$ -amyloid peptide fragment (25-35) in hippocampus are associated with NGF-signalling activation [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://vestnik.rsmu.press/archive/2016/1/2/content?lang=en>
304. Walencykowska M, Kawalec A, Krenc K. An Application of Analytic Wavelet Transform and Convolutional Neural Network for Radar Intrapulse Modulation Recognition. *Sensors (Basel).* 10 de febrero de 2023;23(4):1986.
305. Levenetest - File Exchange - MATLAB Central [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3375-levenetest>
306. Circular Statistics Toolbox (Directional Statistics) - File Exchange - MATLAB Central [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/10676-circular-statistics-toolbox-directional-statistics>
307. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron.* 7 de diciembre de 2006;52(5):831-43.
308. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 14 de marzo de 2007;27(11):2866-75.
309. Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci.* febrero de 2010;13(2):190-6.
310. Thompson KJ, Mata ML, Orfila JE, Barea-Rodriguez EJ, Martinez JL. Metabotropic glutamate receptor antagonist AIDA blocks induction of mossy fiber-CA3 LTP in vivo. *J Neurophysiol.* mayo de 2005;93(5):2668-73.

311. Schmid AW, Freir DB, Herron CE. Inhibition of LTP in vivo by beta-amyloid peptide in different conformational states. *Brain Res.* 4 de marzo de 2008;1197:135-42.
312. Vutskits L, Briner A, Klauser P, Gascon E, Dayer AG, Kiss JZ, et al. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. *Anesthesiology.* abril de 2008;108(4):684-92.
313. Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med Res Rev.* enero de 2011;31(1):93-117.
314. Necula M, Breydo L, Milton S, Kayed R, van der Veer WE, Tone P, et al. Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry.* 31 de julio de 2007;46(30):8850-60.
315. Freir DB, Costello DA, Herron CE. A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil. *J Neurophysiol.* junio de 2003;89(6):3061-9.
316. Axmacher N, Elger CE, Fell J. Ripples in the medial temporal lobe are relevant for human memory consolidation. *Brain.* julio de 2008;131(Pt 7):1806-17.
317. Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci.* octubre de 2009;12(10):1222-3.
318. Ramadan W, Eschenko O, Sara SJ. Hippocampal sharp wave/ripples during sleep for consolidation of associative memory. *PLoS One.* 20 de agosto de 2009;4(8):e6697.
319. Girardeau G, Zugaro M. Hippocampal ripples and memory consolidation. *Curr Opin Neurobiol.* junio de 2011;21(3):452-9.
320. Kemere C, Carr MF, Karlsson MP, Frank LM. Rapid and continuous modulation of hippocampal network state during exploration of new places. *PLoS One.* 2013;8(9):e73114.
321. Yamamoto J, Suh J, Takeuchi D, Tonegawa S. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell.* 8 de mayo de 2014;157(4):845-57.

322. Carr MF, Karlsson MP, Frank LM. Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay. *Neuron*. 23 de agosto de 2012;75(4):700-13.
323. Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roullot E, Bellessort B, et al. Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci*. 18 de agosto de 2010;30(33):10991-1003.
324. Peña-Ortega F, Bernal-Pedraza R. Amyloid Beta Peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *Int J Pept*. 2012;2012:236289.
325. Working memory revived in older adults by synchronizing rhythmic brain circuits - PubMed [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962628/>

RESEARCH

Open Access



# BOARD-FTD-PACC: a graphical user interface for the synaptic and cross-frequency analysis derived from neural signals

Cécile Gauthier-Umaña<sup>1,2</sup>, Mario Valderrama<sup>3</sup>, Alejandro Múnera<sup>4</sup> and Mauricio O. Nava-Mesa<sup>1\*</sup> 

## Abstract

In order to understand the link between brain functional states and behavioral/cognitive processes, the information carried in neural oscillations can be retrieved using different analytic techniques. Processing these different bio-signals is a complex, time-consuming, and often non-automatized process that requires customization, due to the type of signal acquired, acquisition method implemented, and the objectives of each individual research group. To this end, a new graphical user interface (GUI), named BOARD-FTD-PACC, was developed and designed to facilitate the visualization, quantification, and analysis of neurophysiological recordings. BOARD-FTD-PACC provides different and customizable tools that facilitate the task of analyzing post-synaptic activity and complex neural oscillatory data, mainly cross-frequency analysis. It is a flexible and user-friendly software that can be used by a wide range of users to extract valuable information from neurophysiological signals such as phase–amplitude coupling and relative power spectral density, among others. BOARD-FTD-PACC allows researchers to select, in the same open-source GUI, different approaches and techniques that will help promote a better understanding of synaptic and oscillatory activity in specific brain structures with or without stimulation.

**Keywords** Cross-frequency analysis, Synaptic analysis, Event-related potentials, Phase–amplitude coupling, Phase coherence

## 1 Introduction

Starting with the first electroencephalographic (EEG) recordings by Hans Berger [1], brain activity, in different oscillation bands, has been associated with

cognitive processes. Since then, advances in neurophysiological techniques, acquisition methods, and signal processing (i.e., computational capability improvements) have yielded major insights into the function of specific brain structures and their relation with behavior and cognitive processes [2]. For instance, theta, alpha, and gamma band interactions in the neocortex and hippocampus are linked with memory processes [3], while beta oscillations have been related to sensory-motor activity [4].

Interactions between brain oscillators can be estimated through different methods. In this sense, cross-frequency coupling (CFC) analysis characterizes the interaction between oscillations across different frequency bands; different types of CFC have been described, including phase-to-phase (PPC), amplitude-to-amplitude (AAC), and phase-to-amplitude (PAC). In this work, we focused

\*Correspondence:

Mauricio O. Nava-Mesa  
mauricio.nava@urosario.edu.co

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Neurociencias (NeURos), Centro de Neurociencias Neurovitae-UR, Instituto de Medicina Traslacional (IMT), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Department of Systems Engineering, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup> Department of Biomedical Engineering, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia

<sup>4</sup> Behavioral Neurophysiology Laboratory, Physiological Sciences Department, School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

on two types of coupling: phase coherence (PC) [5] and PAC. There are different methods for measuring PAC: envelope-to-signal correlation [6], phase-locked measurement [7], modulation index [8], general linear model measurement [9], the amplitude of the power spectral density (PSD) [10], Kullback–Leibler-based modulation index [11] and event-related phase–amplitude coupling [12]. Each method has different advantages and limitations and should be chosen according to the data acquired and the specific experiment performed. In the case of PC, relations between two signals can be observed by their instantaneous phase difference [13]. These moments of coherence reveal an effective interaction between different areas of the brain [14] and a flexible communication structure [15]. This mechanism has been linked with several functions, such as memory [16] and attention [17].

Analysis of neurophysiological recordings may require different methodological approaches with diverse complexity levels, ranging from amplitude and latency quantification in single-cell records to the analysis of coordinated network activity of several hundred thousand active neurons (large-scale brain networks). Implementing advanced analytical procedures requires proficient management of complex mathematical methods and programming skills, which are not mastered by many neuroscientists or clinicians; it could therefore be profitable to offer them a user-friendly software application subserving such analytical methods. Although there are, in fact, some available applications and tools to analyze neural signals, some of them have been designed for particular purposes, and, therefore, they can be not easily customizable, expensive, not available for the general public or too complicated for general use. The following are some of the many other programs that have been developed for cross-frequency analysis, and which take different approaches. EEGLab [18] is a very complete and wide-ranging MATLAB toolbox oriented to scalp EEG signals, developed for event-related potential (ERP) and independent component analysis (ICA). EEGLab has a toolbox, event-related PACTools [19], that allows the use of several PAC methods. In addition to EEGLab, other software like Fieldtrip [20], Brainstorm [21], MNE [22] and Tensorpac [23], are able to estimate PC, PAC and other types of time–frequency analysis. However, some of them require advanced programming abilities, non-include a graphical interface, not allow automatic segmentation or implement only one method of PAC estimation. On the other hand, there are a lot of programs for analyzing synaptic activity such as Neuromatic [24], MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, US), Minhee Analysis Package [25], Easy Electrophysiology v2.3 (Easy Electrophysiology Ltd., UK), pClamp 11 (Molecular Devices)

and WCP Strathclyde Electrophysiology Software, which focus on detecting and quantifying post-synaptic events, action potential analysis and filtering, among many other functions. Few of them have tools for power spectral analysis such as Fast Fourier Transform (FFT) or Power Spectral Density (PSD), and none have specific tools for cross-frequency analysis.

For that reason, we developed BOARD-FTD-PACC (Brain Oscillations Analysis and Resourceful Display in Frequency and Time Domains Plus Phase Amplitude Coupling and Coherence) using MATLAB (The Mathworks, Inc.), integrating several analytical procedures in a single and adjustable interface to offer a tool for neurophysiological analysis of diverse intracellular and extracellular recordings including synaptic and large-scale networks analysis, that is accessible, user-friendly, practical in diverse experimental setups, and reliable. At difference of most cross-frequency analyzing programs, BOARD-FTD-PACC may detect and analyze post-synaptic events and also, includes three methods for PAC quantification: Mean Vector Length Modulation Index, Kullback–Leibler Modulation Index and Phase-Locking Value. In addition, the huge variability in experimental procedures makes it difficult to have an analysis software that can fit many different recording conditions such as electrode location and number, stimulation protocols, time window selection and trial averaging. The present software interface provides both numerical and graphical outputs from different analytical methods, allowing the user to display them either time- (average) or phase-locked (cross-frequency coupling). BOARD-FTD-PACC is of particular use in assisting researchers in cross-frequency analysis, reducing the time required to perform such analyses in different experimental settings. In the present work, we will show some examples of recordings derived from *in vivo* experiments in the thalamus, cortex, and hippocampus, illustrating the use of the BOARD-FTD-PACC tool for their analysis in time-, frequency- and time–frequency domains.

## 2 Methods

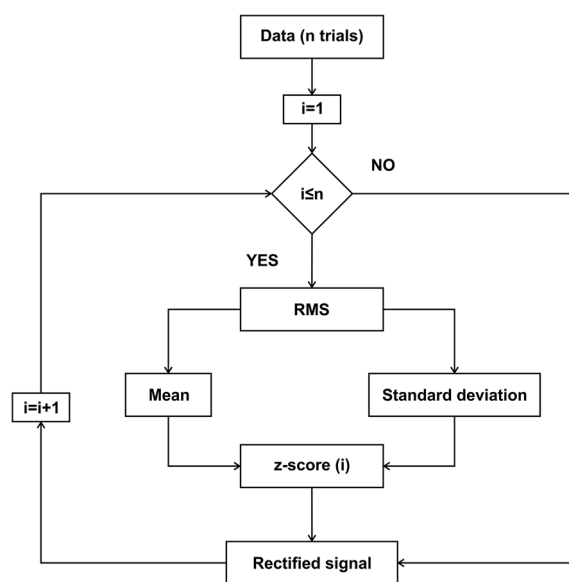
Experimental data analysis often entails finding a suitable best-fit technique to extract significant information and present it in an intuitive and straightforward way. Due to the complex nature of neural signals, it has been necessary to pick up and customize a range of analytical techniques developed in mathematics, engineering, and data science over recent decades. Since there is a need for different tools for the visualization and analysis of neural signals in a research laboratory applying countless experimental setups, as well as variations in the recording duration, stimulation, and conditions of

the subjects, we have selected and optimized a set of different analytical and visualization tools.

BOARD-FTD-PACC is a software application developed for the analysis of neural oscillations using MATLAB's *App Designer*, a high-level computing environment and programming language widely used in neuroscience. Considering that MATLAB offers several advantages over other languages, that software was designed to work with linear data structures, such as the matrices used in this instance, and it is a higher-level language that provides design tools that allow apps and interfaces to be designed and used in a very intuitive way. BOARD-FTD-PACC was designed to be adaptable and intuitive, aimed at users with diverse computational backgrounds. It is intended as a semi-automatic tool, in which the users can adjust parameters such as time and frequency limits, or trial selection, according to the experimental design and analytical requirements, in order to obtain a more robust analysis. This software enables the use of different techniques to extract more information hidden in regional brain oscillations. Since the code is written exclusively in MATLAB, no external functions or libraries are required. The toolbox can be used on OS X, Linux, and Windows architectures, and installed as a MATLAB app. The output of this software is mainly independent graphs that can be saved and manipulated individually without losing previous analyses. Electrical signals produced by a large group of neurons can be analyzed in the time and frequency domains.

### 2.1 Time domain

In the time domain, some methods include (a) measuring the amplitude and latency of neurophysiological activity, (b) averaging trials, used to calculate event-related potentials (ERP), and (c) z-score visualization of the rectified signal. One of the first methods developed in the time domain was averaging, which made it possible to summarize neurophysiological recordings, even before digital computers were available [26], improving the signal-to-noise ratio [27]. Stimuli-triggered averaging of electrical activity can detect time-locked event-related responses (a time-domain graph shows how a signal changes within a selected period) with precision and accuracy. To characterize the relative changes of the mean power of the electrical activity, BOARD-FTD-PACC calculates the root mean square (RMS) of the signal and normalizes it over the mean of the raw signal using the z-score (Fig. 1) [27]. Time-locked activity can also be filtered in a single frequency band, making it possible to identify transient power changes and remove unwanted noise [28].



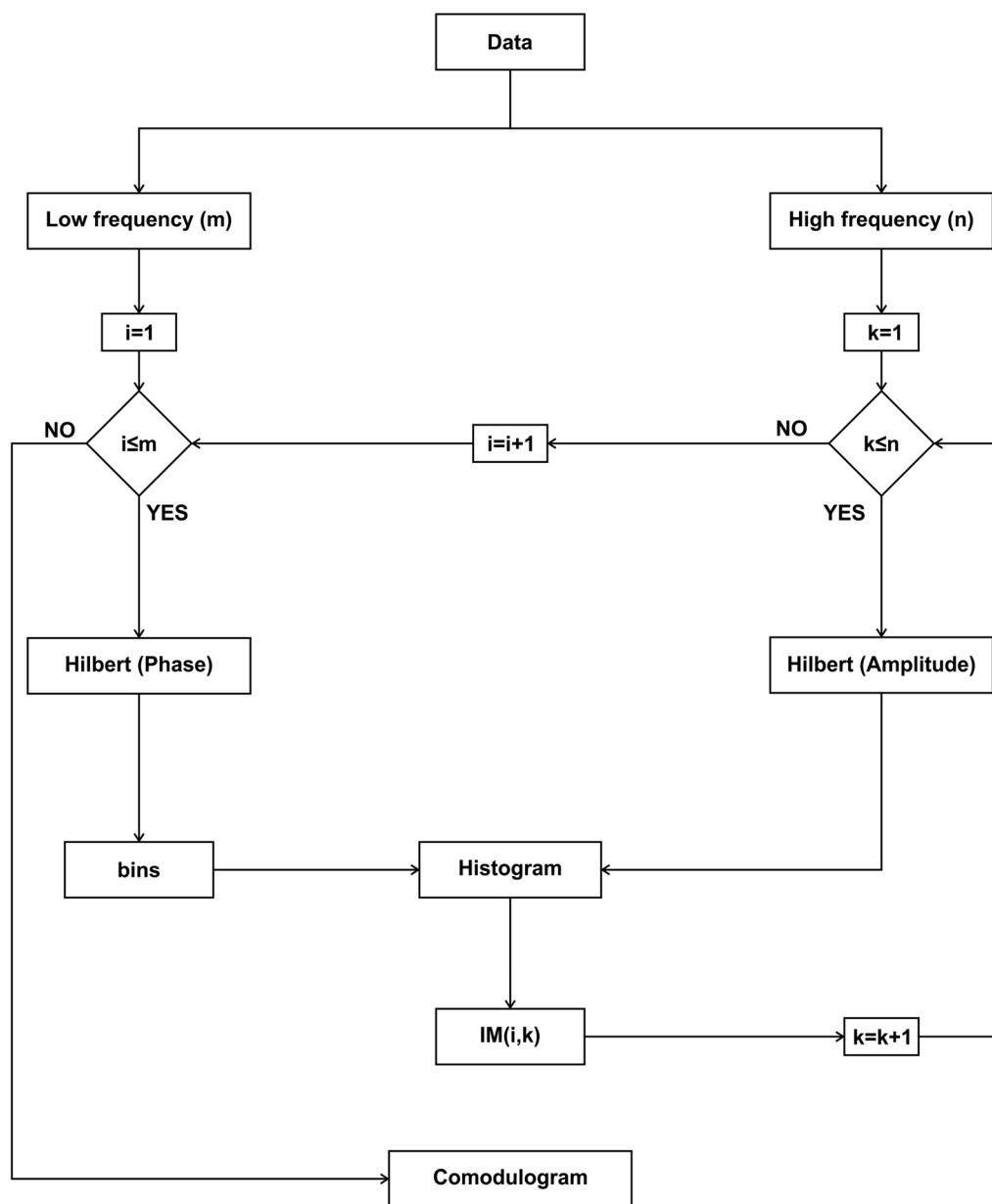
**Fig. 1** Algorithm flowchart for the implemented RMS z-score method. This method gives the neural activity relative to the mean of the signal, for every trial, as a positive number

### 2.2 Frequency domain

The Fourier transform (Ft) calculates the spectral power of every frequency from raw or filtered analog time series [29]. For discrete time series, like digitized neurophysiological recordings, it has been necessary to develop other methods based on Ft, like: (a) fast Fourier transform (FFT) [30], which analyzes discrete and limited signals; (b) Power Spectral Density (PSD), a method that estimates the distribution of power into frequency components of a signal and corrects the influence of noise [31]; and (c) relative PSD [32], which determines the percentage of energy in a specific frequency band. Such analyses rely on the presumption of stationarity, which makes them blind to dynamic changes in the power spectrum [33]. Since brain activity is temporally variable, it does not fit the stationarity criteria, thus the above-mentioned methods have limited sensitivity to transient activity changes in neural signals.

### 2.3 Time–frequency domain

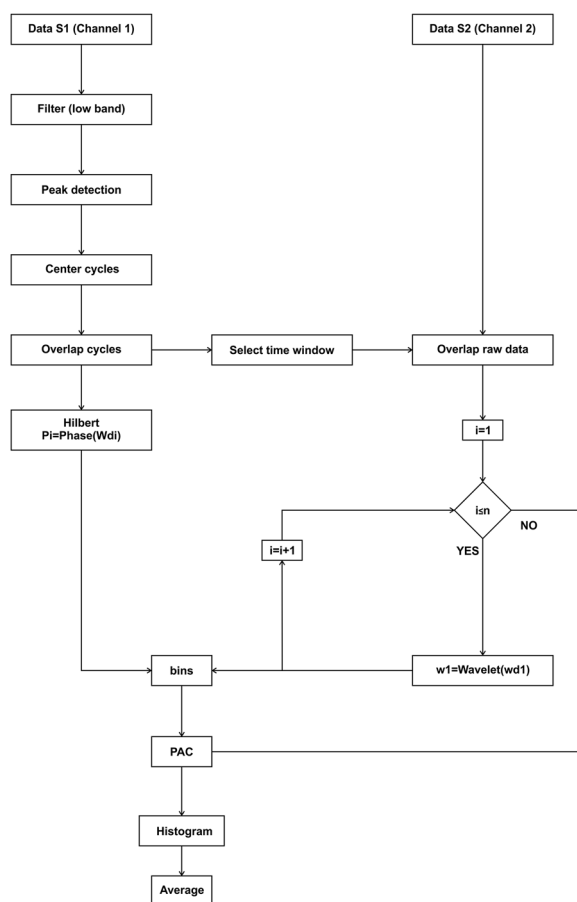
Time–frequency domain-based analyses are aimed to detect temporal variations of spectral power in different frequency bands to solve the limitations of pure frequency domain methods. A first approach was to iteratively calculate FFT over successively shorter time windows (with or without overlapping between them) and stack them to construct a three-dimensional display (spectrogram). However, such window size limits spectrogram time or frequency sensitivity and biases the results [34]. In 1984, Morlet and Grossman used wavelets



**Fig. 2** Algorithm flowchart for the implemented PAC (comodulogram) method. The steps for calculating this phase–amplitude plot can be followed for a single channel or for the interaction of two channels, by choosing the inputs as a single or two separate channels

to produce a time–frequency analysis with adjustable time windows using the number of cycles in a wavelet of a particular frequency (scalogram) [35, 36]. Within the different types of wavelets, the Morlet method is the Gaussian model of a sine wave with better results in the context of EEG signal analysis [37]. Other methods such as Choi–Williams distribution (CWD), base their analysis on the use of kernels, generally exponential functions

instead of sinusoidal functions. Although it can present good results, it needs parameter adjustment to reduce artifacts, as well as to avoid aliasing. In addition, the signals analyzed by CWD must be short and it has a high computational cost [38]. The most flexible method that has a good compromise between resolution, computational cost and flexibility is the Morlet wavelet, and for that reason was implemented in BOARD-FTD-PACC.



**Fig. 3** Algorithm flowchart for the implemented PAC (cycle detection) method. This method can be used to measure the modulation in a single channel or for the interaction of two channels

### 2.4 Phase analysis

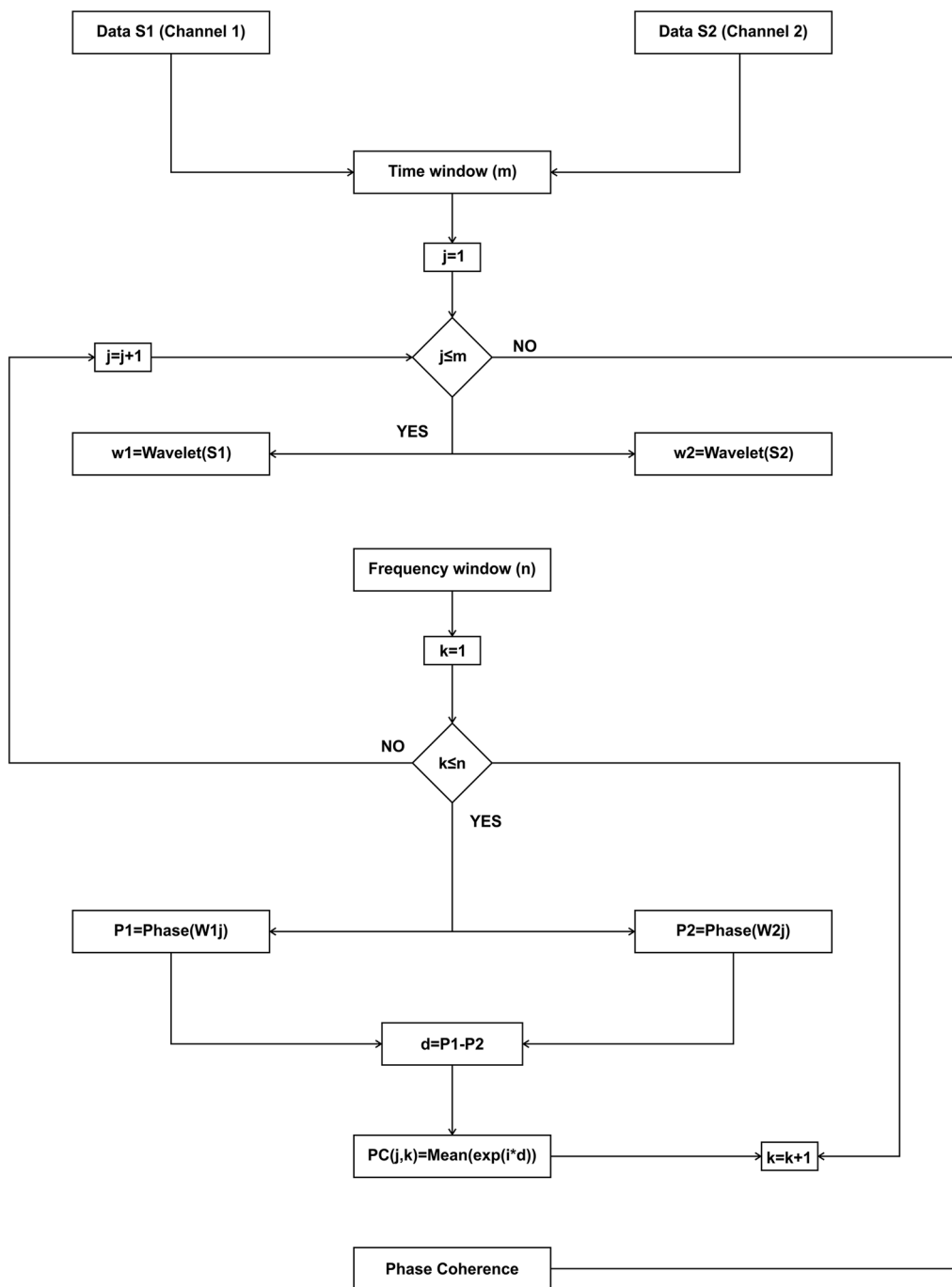
PAC can be used to measure modulation locally or between two brain regions, and different approaches can be used to calculate it:

1. Comodulogram-based modulation index [11] (Fig. 2). For this method, two frequency bands are selected: a narrow and low-frequency modulating band ( $f_p$ ), and a broad and high-frequency modulated band ( $f_A$ ). For each combination of these frequency windows, we determine the modulation index (MI) of that pair of frequencies. At the end, a comodulogram is plotted with the MI for each combination. The raw signal  $x(t)$  is filtered in two frequency ranges ( $f_p$  and  $f_A$ ), obtaining  $x_{f_p}(t)$  and  $x_{f_A}(t)$ . The phases  $\phi_{f_p}(t)$  of  $x_{f_p}(t)$ , as well as the amplitude  $A_{f_A}(t)$  of  $x_{f_A}(t)$ , are calculated using the Hilbert transform. The phases  $\phi_{f_p}(t)$  are binned and a composite phase–amplitude time series ( $\phi_{f_p}, A_{f_A}$ ) is calculated to obtain the mean

amplitude distribution over phase bins. The MI is obtained by normalizing the average for every pair of frequency windows. These steps are repeated for each of the  $m$  low-frequency windows and the  $n$  fast-frequency windows and are represented in a  $n$  by  $m$  comodulogram (Fig. 2).

2. Average high-frequency power over the modulating low band [39], is a variation of the previous method. Only one modulating band is analyzed, so the phases  $\phi_{f_p}(t)$  are calculated and binned. For the faster-modulated band, time–frequency analysis is performed using a Morlet wavelet transform,  $TF_{f_A}$ . We now have a composite phase–amplitude time series ( $\phi_{f_p}, TF_{f_A}$ ) that allows us to obtain the mean power per phase bin. The average of the entire band can be calculated to obtain the power distribution and its mean gives a single value for the pair of frequency bands. This method can be also used for every trial that is being analyzed and averaged to get a general idea of the recording.
3. Average high-frequency power over the modulating low band cycles (Fig. 3). This method is especially useful when the modulating band oscillations are not continuously present across the experiment. To analyze the modulating band, after filtering, a peak detection algorithm is used to determine the local minimum of the wave; then, a time window is selected for each low-frequency band cycle  $wd(j)$ , and the phases  $\phi_{f_p}(t)$  are calculated and binned. A wavelet transform  $TF_{f_A}(j)$  is calculated for each corresponding time window of the raw modulated band. A phase–power time series ( $\phi_{f_p}, TF_{f_A}$ ) allows us to obtain the mean power per phase bin. The power distribution is obtained by averaging the entire modulated band power for each modulating band phase, giving a single amplitude value for each phase bin.

PC: For phase coherence, which can only be determined between channel pairs, the same phase approach is used (Fig. 4). PC displays temporal information of phase synchrony between separated brain areas, which is indirect evidence of their functional interaction [40]. For this analysis, several time windows are selected and, in every one, Morlet wavelet transform is applied to each channel ( $W_1(j)$ ), then a frequency window is selected to obtain each channel phase ( $P_1(j)$  and  $P_2(j)$ ) from the wavelet output. For every time–frequency epoch, the difference between the two phases was calculated ( $d = P_1(j) - P_2(j)$ ) and used to define the phase-coherence value  $PC(j, k) = mean(e^{id})$ .



**Fig. 4** Algorithm flowchart for the implemented PPC method. For each channel (S1 and S2),  $m$  windows of time are determined, and the Morlet wavelet transform is calculated for each window in both channels. For each time window,  $n$  frequency windows are determined, and their phases are calculated. The difference between the two phases is measured for every time–frequency epoch and this is used to calculate the phase-coherence value, which is represented in an  $n$  by  $m$  matrix

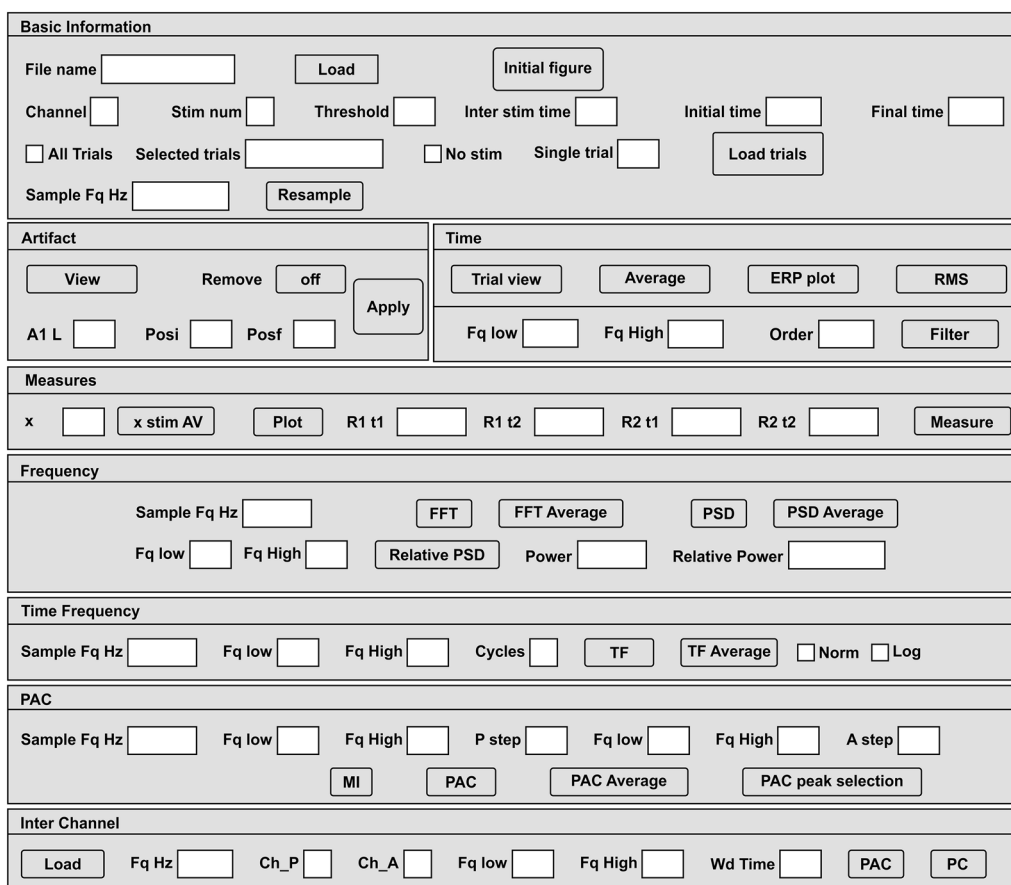


Fig. 5 General overview of the BOARD-FTD-PACC interface

Representative intracranial recordings integrated with the flowcharts and analytic methods of figures 1-4 are included as Additional file 1 (Fig. S1–S4). Finally, an overview of the BOARD-FTD-PACC interface is presented in Fig. 5.

### 3 Results

#### 3.1 Software overview

The following examples were derived from simultaneous in vivo recordings in the thalamus and cortex of anesthetized rats.

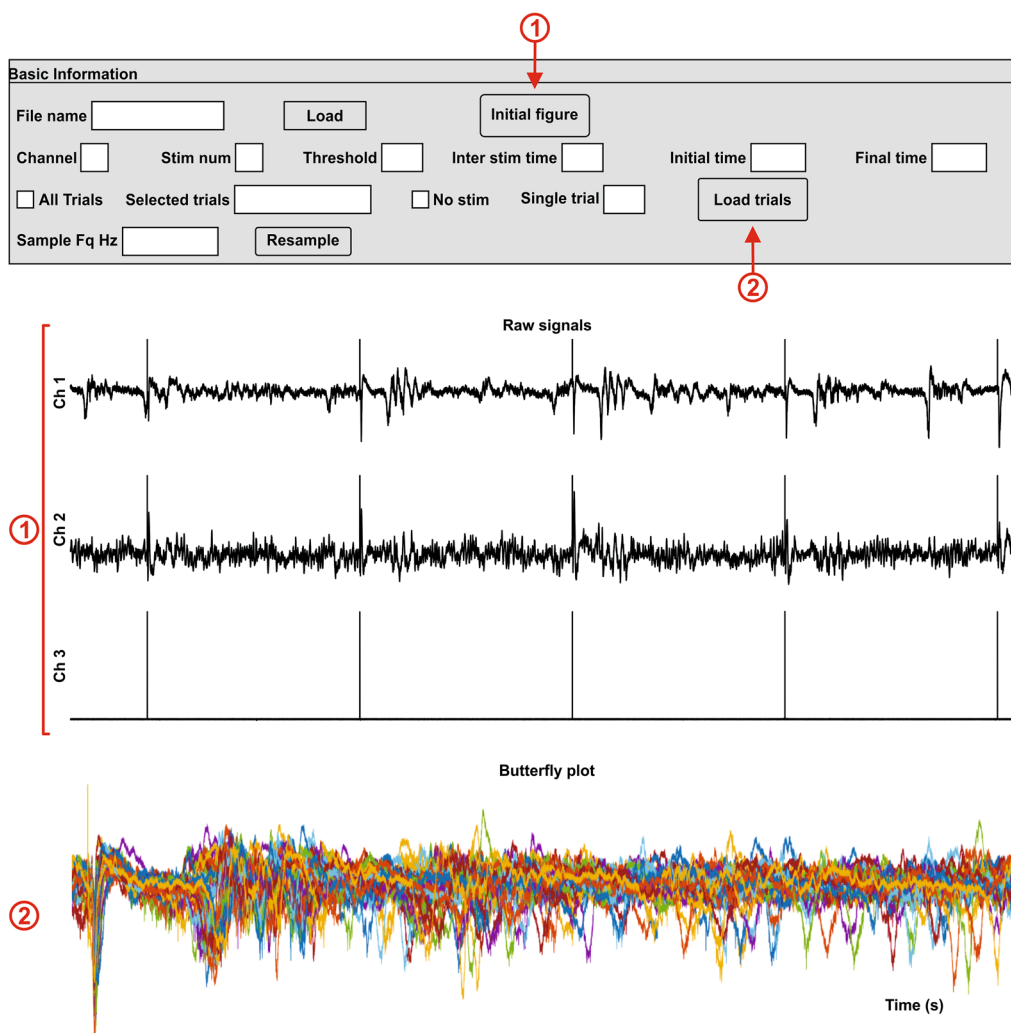
##### 3.1.1 Initial setup

The aim of this work was to present a platform for the analysis of electrophysiological signals recorded in different experimental configurations that include different setups, with anesthetized or free-moving subjects, in chronic or acute experimental conditions, with or without neural stimulation. To illustrate the different applications, we present the images produced as examples that came from intracranial in vivo recordings from an anesthetized rat. Users start using the

interface by opening the file BOARD\_FTD\_PACC.mlapp using MATLAB. This file opens a general window which displays the different tools and analyses that can be used. It is important to know the name of the file and the structure of the experiment since they are necessary when defining the parameters that allow the analysis to be carried out correctly. One of the strengths of BOARD-FTD-PACC is that it is a semi-automatic tool, designed to be used by someone who knows the experiment as well as the acquisition conditions. Using this interface, they can adjust the analysis conditions to their experiment accurately and not leave such decisions up to a fully automatic program. Once such parameters are set, the analysis will be automatic.

##### 3.1.2 Data preprocessing

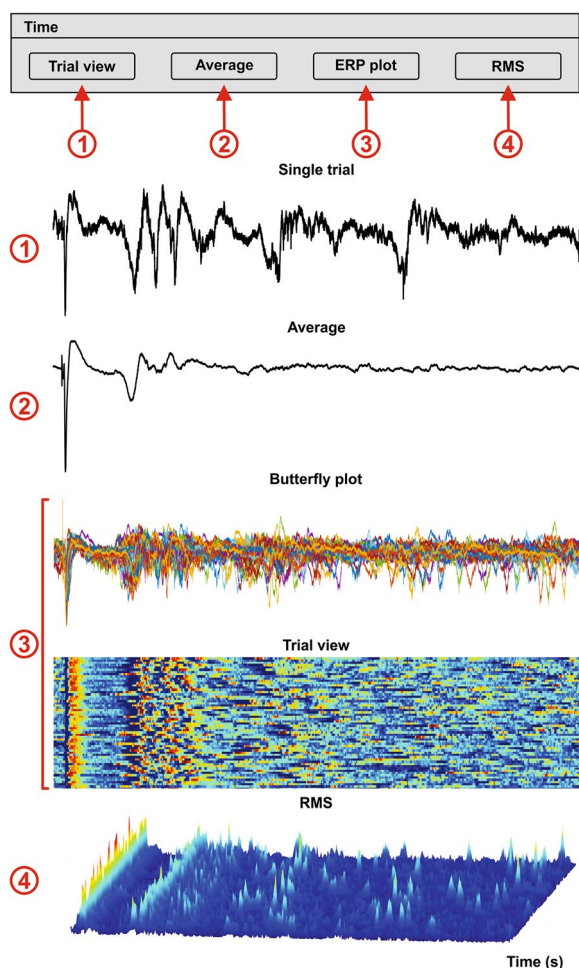
BOARD-FTD-PACC loads digitized signals stored in axon binary file (.abf) format and the European data format (.edf). To load a file, its name must be typed in the File name box (Fig. 6), and then the Load button must be clicked (`f_LoadSignal`).



**Fig. 6** Initial setup. This section allows the user to open the signal to be analyzed in axon binary format (.abf) and displays an initial figure of the raw signal of every channel. The user can select the experiment and analysis conditions by selecting the channel, determining if the recording has stimulation (stim) or not and its number (Stim num), giving the separation or time between two stimuli (Inter stim time), and setting the amplitude (Threshold) to define trials. The user also chooses the time window (Initial and Final Time), sampling frequency (Fq) in Hertz (Hz), and trials used for the analysis. This section displays the raw signal ① and the trials selected by the user ②

By clicking the Initial figure (*f\_Plot\_Ch*) button (Fig. 6①), a window showing the raw signal of every channel in the file is displayed (Fig. 6①). Then, the user can select the signal to be analyzed by typing its number in the Channel box. Whenever stimulation has been used in the experiment, the channel containing this signal must be typed in the Stim num box, and interstimulus interval (in seconds) must be typed in the Inter stim time box. If the stimulation channel is a waveform one, minimal stimulation amplitude (in mV) can be typed in the corresponding Threshold box. Then, time window limits must be set by typing values in the Initial time (since stimulus time is set as zero, initial time can either

be negative or positive, Fig. 6②) and Final time boxes. The user can now select how to display the successive time windows: if all trials are to be overlaid, a tick has to be typed in the All trials box; if selected trials are to be displayed, their numbers must be listed in the Selected trials box. If no stimulation was used in the experiment, the user can tick the No Stim box, and the signal will be displayed as it was during the experiment. Whenever it is necessary, the user can downsample the signal, by typing the desired sampling frequency in the Sample Fq Hz box. Once all these parameters have been chosen, the user saves them by pressing the button Load trials



**Fig. 7** Time domain analysis. The user can display a single trial ① the average ②, an ERP window ③ that consists of the butterfly plot and a representation of every trial, and finally the z-score of the RMS of every trial ④

(`f_Select_Trials`), which displays the selected time windows.

### 3.1.3 Time

For the time domain, five analyses are available: single trial (`f_plot_single`), average (`f_Average`), ERP plot (`f_Butterfly`), RMS (`f_RMS_zscore`) and signal measures (such as slope and latency) (`f_Measure_Slope`). Single-trial activity displays a figure with the raw signal for the selected trial in the basic information panel (Fig. 7①). The average shows time-locked activity in the recording (Fig. 7②). The ERP plot displays a figure with two plots: the activity from every trial overlaid in the same figure; as well as every trial activity in a matrix

( $m \times n$ ), where  $m$  is time,  $n$  is each trial, and the amplitude is given by color (Fig. 7③). The z-score of the RMS presents the activity relative to the mean, representing a measure of the number of standard deviations that each point of the signal is away from the mean. The final figure gives a notion of the relative activity for every trial (Fig. 7④).

Measures of the slope and latency of any intervals, determined by the user, can be calculated in single trials or in averages, while the number of trials selected for the average is determined by the user ( $x$ ), then plotted (plot) and finally measured (Measure). For instance, we used it to analyze excitatory post-synaptic potential slopes (EPSPs) in experiments of synaptic plasticity induction (long-term potentiation/LTP). Slope measures are also used to characterize stimuli responses and spontaneous activity. EPSPs are calculated using the maximum derivative value in the time window chosen by the user, and they have the ability to customize the initial and final point for the measurements, and extend this to the different trials, allowing the user to get a very specific response, without unwanted components of the response, and without spending hours selecting each point individually.

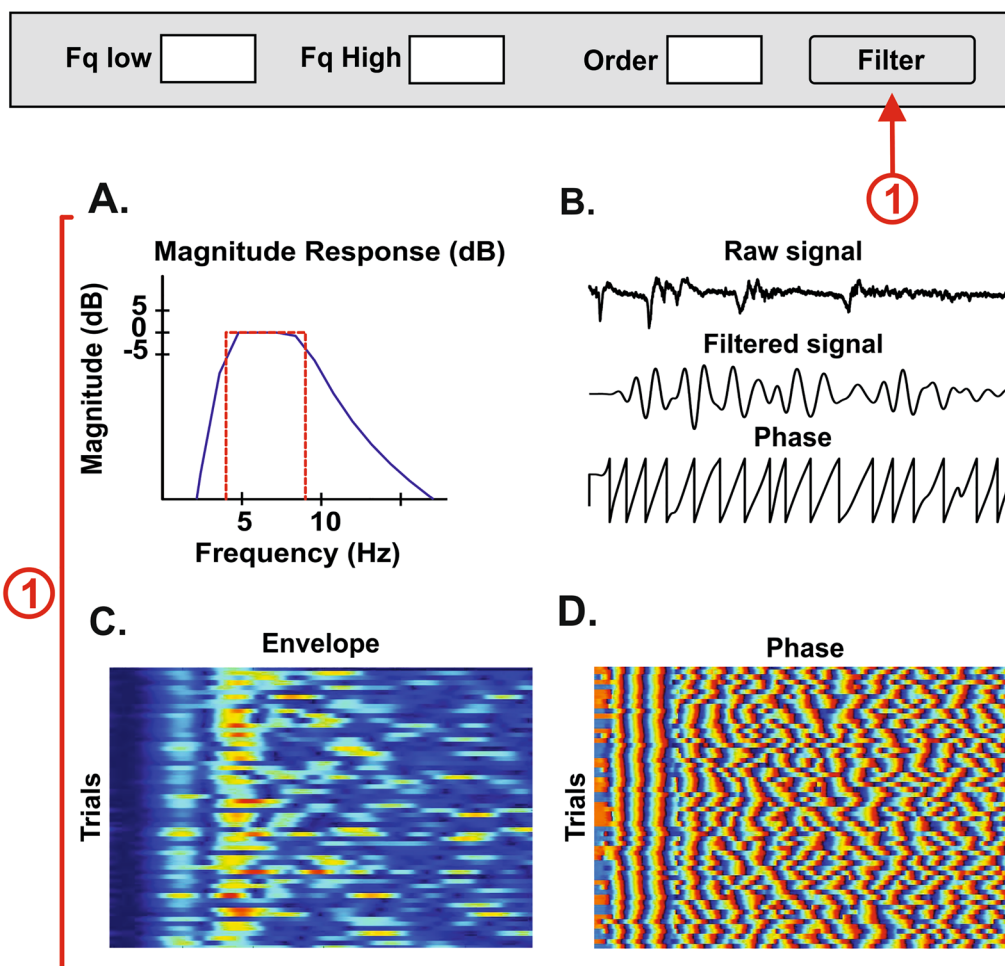
### 3.1.4 Frequency domain and filtering

Displaying the activity in a defined frequency band allows us to see how it varies over time; to this end we use an adjustable Butterworth bandpass filter (ISBN-10: 0138147574). BOARD-FTD-PACC allows the user to choose the frequency limits for the Butterworth bandpass filter and its order (`f_Filter_order_manual`).

This section calculates the frequency response to verify the effectiveness of the filter. It opens several windows, including one that displays the original signal as well as the filtered signal and the phase for the selected trial, and another that shows the envelope and phase for every trial (Fig. 8①).

### 3.1.5 Frequency domain and power

FFT allows us to know the main frequency components of the recorded data so that we can explore further the behavior around those specific bands. Another technique that gives information about the frequency content is the power spectral density (PSD), which displays the distribution of power into frequency components. In this case, we use the Welch method. These techniques give the information for the entire time window for which we do the analysis, treating the data as stationary, even though the brain is a highly dynamic system.



**Fig. 8** Filter. The user can determine the limits of the bandpass Butterworth filter—the low frequency limit (Fq low) and high frequency limit (Fq High)—as well as the order. BOARD-FTD-PACC displays: **A** the frequency response of the transfer function for the implemented filter (blue) vs the ideal filter (red); **B** a figure displaying the raw signal (top), the filtered signal (middle) and phase (bottom) for a selected single trial; **C** the envelope for every trial; and **D** the phase for every trial

BOARD-FTD-PACC allows users to display the FFT (Fig. 9①) ( $f\_FFT$ ) and PSD (Fig. 9③) ( $f\_PSD$ ) of a single trial and also the average FFT of every selected trial (Fig. 9②) ( $f\_FFT\_average$ ) as well as the average PSD (Fig. 9④) ( $f\_PSD\_Average$ ).

It calculates the PSD and relative PSD of a band determined by the user. This step allows us to determine the frequency bands that are to be explored with the time–frequency and cross-frequency coupling methods.

### 3.1.6 Time–frequency domain

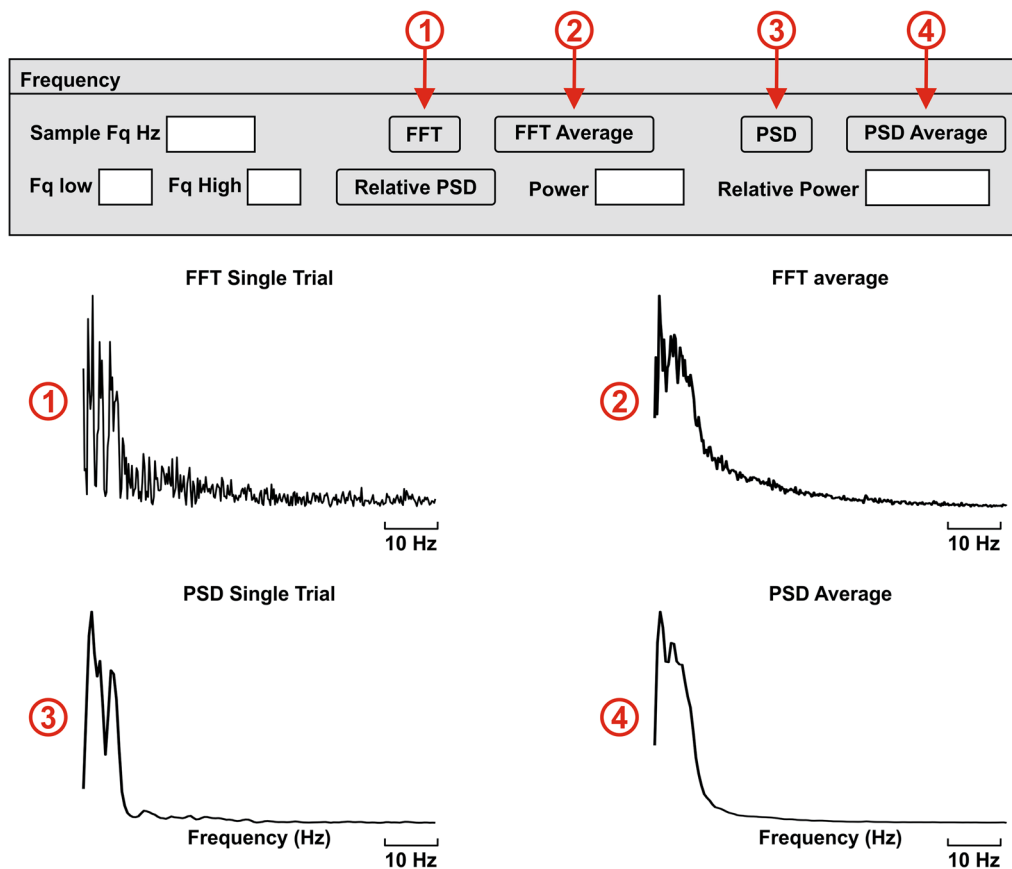
Wavelet analysis is one of the most powerful time–frequency analyses that can be done to visualize the changes of spectral power over time. There are different wavelets that meet these requirements, but we use the Morlet function.

BOARD-FTD-PACC allows the user to choose the frequency limits for the calculation of the time–frequency transform using the Morlet wavelet for a single trial (Fig. 10①) ( $f\_tf$ ), as well as the average (Fig. 10②) ( $f\_tf\_average$ ). Being an adaptable software, normalization (Fig. 10③) and logarithmic scale (Fig. 10④) are options to adjust to the variations of different recordings.

### 3.1.7 Cross-frequency coupling

There are different types of cross-frequency coupling. In this GUI we focused on two: phase–amplitude (PAC) and phase-to-phase (PPC) coupling.

The main goal of this software was to calculate the frequency coupling. It allows the user to choose the different frequency windows and limits as well as the modulating channel. Different types of recordings



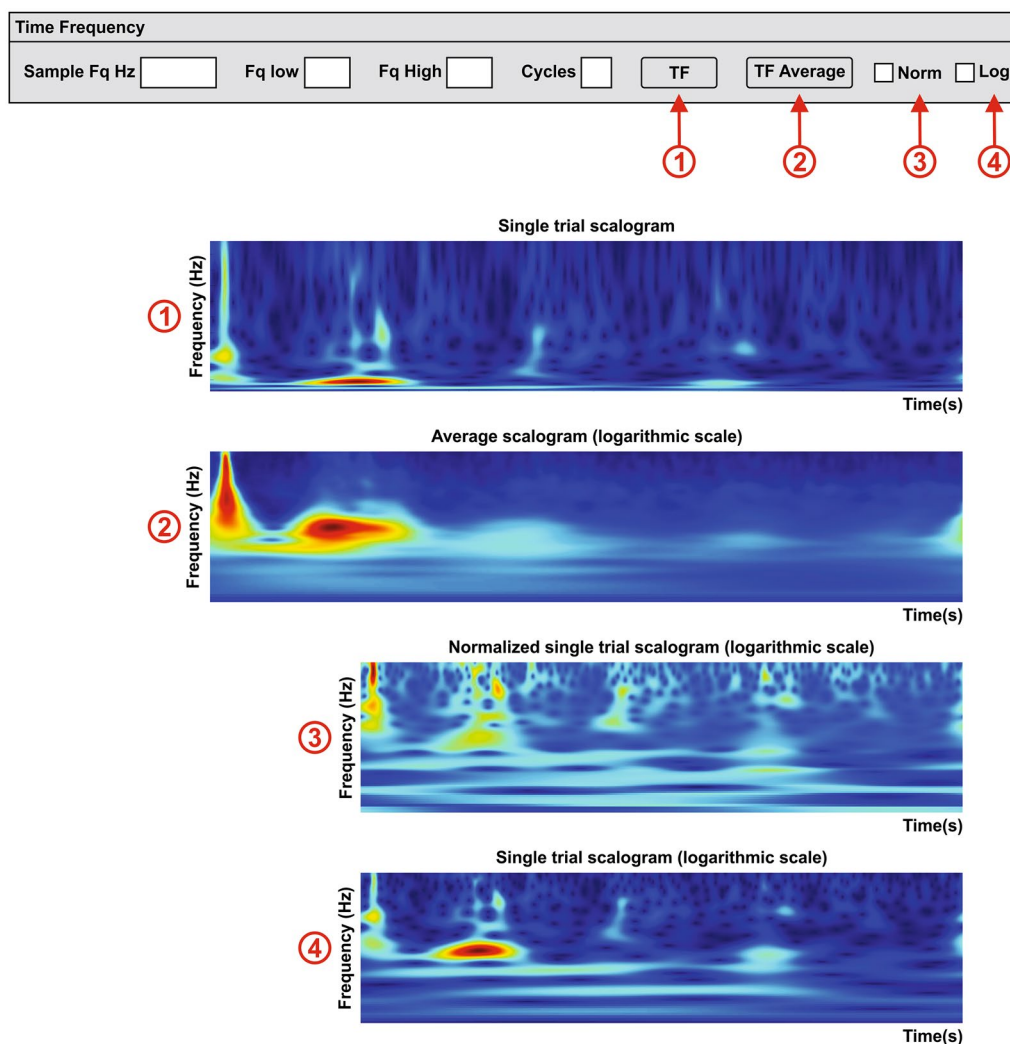
**Fig. 9** Frequency domain. This section displays the FFT of a single trial ①, and the FFT average of all selected trials ②, as well as the PSD of the single trial ③, and the average PSD ④. The PSD and relative PSD of any band are calculated by the software, while the frequency limits (Fq low to Fq high) are determined by the user. In order to accelerate the calculations, the signal can be resampled to a desired lower sample rate (sample frequency (Fq) in Hertz (Hz))

demand different types of methods. For a single-channel approach, a first exploration can be done with a comodulogram (Fig. 11①) (`f_PAC_sing`), since this method works best with continuous or medium-length signals. For longer signals, the high-frequency power over the modulating low band method can be used for the average of various trials or to display the result for a single trial (Fig. 11②) (`f_Phase_PAC`) and the average over the entire recording (Fig. 11③) (`f_Phase_PAC_Average`). For recordings where the presence of the modulating frequency is not constant, the average high-frequency power over the modulating low band cycles method is highly recommended (Fig. 11④) (`f_Phase_PAC_Pdetect`).

In order to determine the interaction between two areas of the brain, the PAC can be calculated using the average high-frequency power over the modulating low band cycles method (Fig. 12①) (`f_Phase_PAC_Pdetect_inter`), and the phase coherence method (`f_Phase_coherence`).

## 4 Discussion

In the present work, a new tool is presented for neurophysiological signal processing derived from recordings in different setups, whose strength is its ability to adapt. BOARD-FTD-PACC is designed to analyze either single-channel data (temporal, frequency anchored in time, frequency, and modulation) or interactions between two channels (coherence and modulation), but leaves the parameter setting to the researcher so that they can control the scope of the analysis, as well as including a rapid system for graphical representation and several types of analysis in the frequency and time domains. It was intended as a user-friendly semi-automatic tool, to be used by researchers with or without computer science and mathematical backgrounds, and it enables the display of information extracted from different analyses made of neurophysiological recordings obtained through

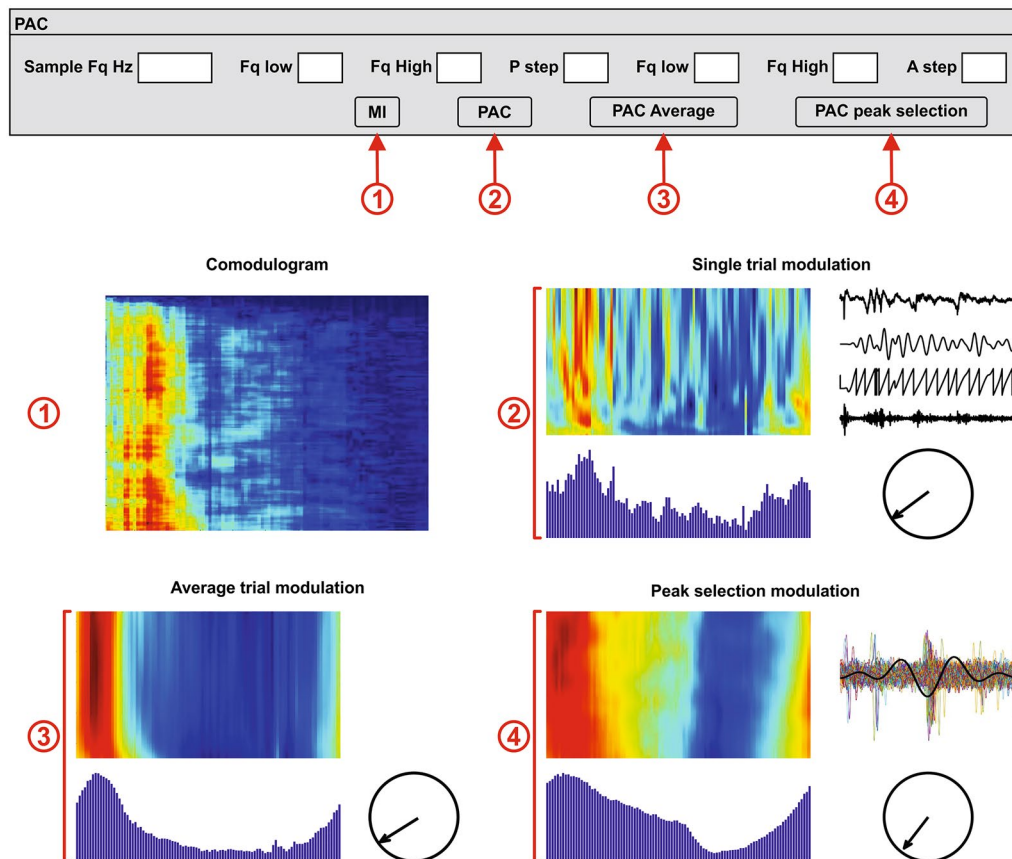


**Fig. 10** Time–frequency domain. This section displays time–frequency wavelet transform (scalogram) in the frequency limits (Fq low to Fq high) using a determined cycle number, determined by the user. It includes the time frequency (TF) of a single trial ① and the average ②. To better visualize the results, the user can choose the normalization (Norm) option ③ and/or a logarithmic (Log) scale ④. In order to accelerate the calculations, the signal can be resampled to a desired lower sample rate (sample frequency (Fq) in Hertz (Hz))

widely variable experimental designs. Several analytic techniques in different time and/or frequency domains were implemented, such as average, ERP display, z-score, filtering, FFT, PSD, wavelet analysis, and PPC. Such techniques are suitable to be applied one or two channels at a time, and are easily adjustable according to the type of experiments performed in a neurophysiology laboratory. Another main feature is the control the users have over the analytic procedure, regarding parameter selection and choice of temporal limits, thereby allowing a full understanding of the results and their context.

Rhythmic variations in brain field potentials in different frequency bands depend on multi-level and cross-modulating interactions between local and/or distributed

oscillators [41, 42]. Such interactions may be physiological mechanisms for neural computations and inter-areal communication [43]. In fact, low-frequency rhythms (e.g., theta) engage larger brain areas and modulate spatially localized fast (e.g., gamma) oscillations [44, 45], a mechanism that is relevant to encoding and retrieving memory traces through theta-to-gamma coupling [43, 46, 47]. We presented some examples where BOARD-FTD-PACC software may represent in the same graphical interface the relationship between oscillatory activity, modulation between frequency bands and synaptic activity across the time. In order to obtain high-resolution time–frequency representations of the neurophysiological signals, spectral analysis techniques

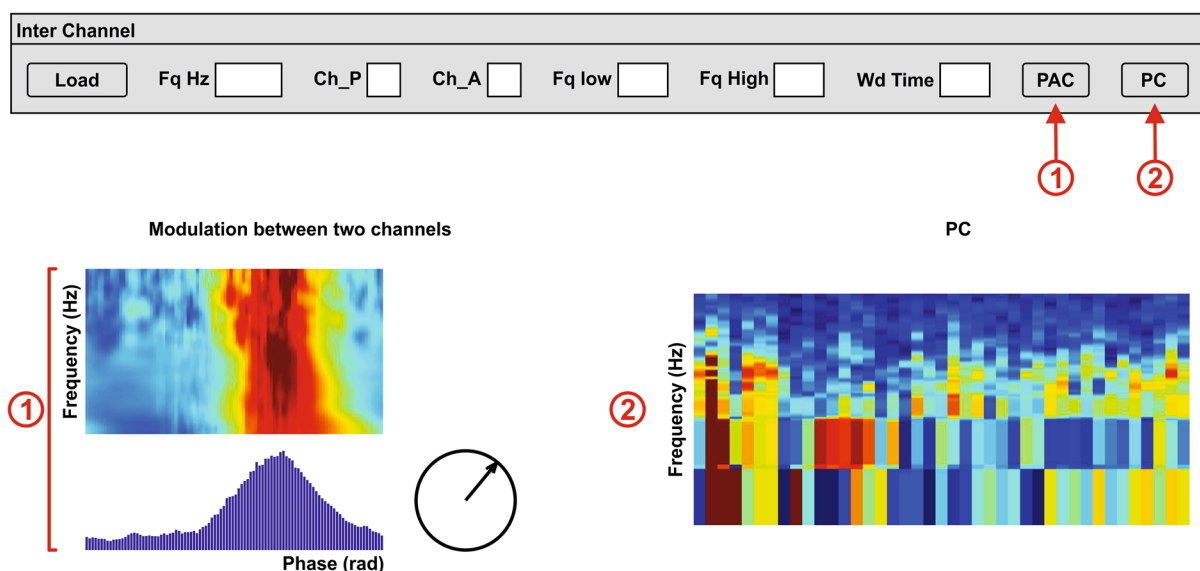


**Fig. 11** Phase–amplitude coupling of a single channel. The user can determine the high and low-frequency bands (Fq Low and Fq High), as well as the frequency windows, P step for the slow modulating frequency (phase) and A step for the fast-modulated frequency (amplitude). This section displays the comodulogram ①, the PAC of a single channel, which can be calculated for a single trial ②, and the average PAC for every trial ③, using the average high-frequency power over the modulating low band method, and of the entire recording ④ using the average high-frequency power over the modulating low band cycles method. In order to accelerate the calculations, the signal can be resampled to a desired lower sample rate [sample frequency (Fq) in Hertz (Hz)]

(i.e., FFT) are usually incorporated in a fixed time window. Since frequency bands and time windows may vary across an experiment, the wavelet transform was implemented in BOARD-FTD-PACC to determine a scalogram over the spectrogram. With the Morlet method a window size varies according to the frequency changes, improving the resolution of the graphical representation [33]. In comparison with Wavelet transform, quadratic time–frequency distribution methods (i.e., Choi–Williams distribution—CWD) are constant to time and frequency shifts [48, 49], and therefore, it has been considered more precise for EEG-based detection [50]. However, myoelectric signals during dynamic activity are better estimated by the continuous wavelet transform in comparison with the short-time Fourier transform, the Wigner–Ville distribution and the CWD [51]. Further studies should assess those analytic methods or combination of methods to be implemented according to the circuit studied, their physiological function, specific

oscillatory characteristics, stationary Vs nonstationary neural signals and the its dynamics in a specific cognitive performance.

As we mentioned before, some other programs like EEGLab [18], Extended Modulation Index toolbox [52], MEAnalyser [53], ERPLab [54], ERPWAVELAB [55], Brainstorm [21] and FieldTrip [20], as well as libraries and tool boxes such as EMEGS [56] or PyEEG [57], have been developed for similar proposes but without an integrated interface for synaptic, power spectral and cross-frequency analysis. Other software like ERP-wavelab [55] focuses on multichannel time–frequency analysis of EEG and magnetoencephalography (MEG) event-related activity, but its analytical range is limited due to its emphasis on inter-channel interactions. RIP-LELAB [58] was designed exclusively for the detection, analysis, and classification of high-frequency oscillations (HFO). ERPLab [54], a tool integrated with EEGLab, was



**Fig. 12** Cross-frequency coupling between two channels. This section displays the interaction between two channels. The user determines the sample rate (Fq Hz), the modulating channel (Ch\_P) and the modulated channel (Ch\_A), as well as the frequency limits (Fq low to Fq high) and the time window for the phase coherence analysis (Wd Time). The interface calculates the PAC using the peak selection method (Fig. 3) ①, and the single-phase coherence (PC) ②. In order to accelerate the calculations, the signal can be resampled to a desired lower sample rate [sample frequency (Fq) in Hertz (Hz)]

designed specifically to analyze ERPs, showing the activity in all the electrodes simultaneously, and making it possible to localize the source of every ERP component; it analyzes the relation between many channels instead of performing different analyses on each individual channel. MEAnalyser is a tool focus on spike train analysis with the advantage of include statistical and functional connectivity analysis, as well as graphical user interface [53].

BOARD-FTD-PACC uses three different methods for PAC analysis to obtain a better numeric estimation. In order to discriminate spurious from authentic PAC, recently was developed a tool for PAC detection based on the measure of extended MI [52]. According to the same authors, that tool has some problems in the automatic assignment of coupling origins and also, the extended MI was designed only for analysis of augmentations. In addition, that tool is focused only in PAC detection at the difference of BOARD-FTD-PACC, which also includes PC and PSD analysis. In a recent development, a non-parametric multitaper estimator of PAC was proposed to solve some pitfalls in cross-frequency statistical analysis [59].

When analyzing neurophysiological signals, the experimenter faces the option of using an interface, which generally makes decisions such as defining thresholds automatically, but analyzes the signals more easily and efficiently. These programs generally do not allow the user to define parameters that vary widely between

different experimental designs, and which can be easily defined visually, such as analysis times, thresholds, selection of components within the same response, number of stimuli, or even the method that they want to use for the same type of analysis. Another option, if the experimenter is proficient in programming and mathematical analysis, is that they can develop programs that fit only their signals, but they must repeat this process each time different approaches are used. It is also very common that the experimenter does not know how to program the methods adjusted to their experiment, which can push them to carry out measurements manually so as not to lose control of their analysis. This third option has a high cost in time and energy, which limits the number of analyses that can be performed, leading to loss of information.

Most of the available toolboxes receive data exclusively in a specific format and do not adapt to different experimental data structures, such as changes in stimuli number or interstimulus interval. By contrast, BOARD-FTD-PACC allows the study of recordings while taking in account such variations. It is designed specifically for researchers that want to implement different methods in a specific and unique way. Although published works [11, 60] using some of the methods implemented here include the code required, its specific implementation for a given experimental setup requires some degree of computational and/or

mathematical expertise, which makes it extremely difficult for non-expert users to include them in their studies. The approach of BOARD-FTD-PACC is to leave the decisions of the analysis parameters to the researcher, who can introduce the specific experimental setup. For instance, DC levels can be removed to eliminate DC-related errors, artifacts can be removed manually, times and trials to be analyzed can be selected, band filtering cutoff frequencies can be manually adjusted and the sample rate can be varied according to analytical requirements. This approach is an advantage as well as a limitation: the user must know and understand the structure of the experiment or else the settings will not make sense and the interface will not produce adequate results. BOARD-FTD-PACC incorporates a wide variety of analyses, which the user must be familiar with in order to understand the results provided, and to determine the correct settings. We hope it will increase the information obtained from neural activity and encourage researchers of different backgrounds to test different methods and analytical approaches that they might not have considered before.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40708-023-00191-x>.

**Additional file 1:** Figure S1. Algorithm flowchart for the implemented RMS z-score method. This method gives the activity relative to the mean of the signal, for every trial, as a positive number. To illustrate this method, we used an intracranial in vivo recording of an anesthetized rat that is being electrically stimulated every 3 seconds. For each trial,  $i$ , which initiates with a stimulus, the root mean square is calculated, then the mean and the standard deviation are obtained in order to determine the z-score value. These steps are repeated for each of the  $n$  trials, and then represented in a 3D image. Figure S2. Algorithm flowchart for the implemented PACmethod. The steps for calculating this phase–amplitude plot can be followed for a single channel or for the interaction of two channels, by choosing the inputs as a single or two separate channels. In this case to illustrate the method, we used an artificial modulated signal to show a pure modulation. For every low-frequency band,  $i$ , the signal is filtered, and the Hilbert transform is used to determine the phase. For every fast-frequency window,  $k$ , the signal is filtered, and the Hilbert transform is used to determine the amplitude. A composite phase–amplitude time series is calculated to obtain the mean amplitude distribution over phase bins, and the MI is obtained by normalizing the average for every pair of frequency windows. These steps are repeated for each of the  $m$  low-frequency windows and the  $n$  high-frequency windows, and are represented in an  $n$  by  $m$  comodulogram. Figure S3. Algorithm flowchart for the implemented PACmethod. This method can be used to measure the modulation in a single channel or for the interaction of two channels. The signals are obtained in this case from two different channels of an intracranial in vivo recording of an anesthetized rat. The modulating signal from a chosen channel is filtered in a single modulating band; a peak detection algorithm is used to determine the local minima and maxima in the band range. Local minima and maxima are used to determine the duration of the cycles, thus determining several time windows for which the wavelet transform of the raw modulated data is calculated for the modulated channel. Using the Hilbert transform, the phase of the modulating cycles is determined to obtain the mean power in the modulated band over phase bins. The power is the average of the entire modulated band, and

an average composite phase–amplitude time series calculated. Figure S4. Algorithm flowchart for the implemented PPC method. For each channel and motor cortex,  $m$  windows of time are determined, and the Morlet wavelet transform is calculated for each window in both channels [ and ]. For each time window,  $n$  frequency windows are determined, and their phases are calculated. The difference between the two phases [ ] is measured for every time–frequency epoch and this is used to calculate the phase-coherence value using the formula , which is represented in an  $n$  by  $m$  matrix.

## Acknowledgements

We thank Tim Hiley for editing a draft of this manuscript. This work was supported by Universidad del Rosario and Universidad Nacional de Colombia.

## Author contributions

CG, AM and MN contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by CG, AM and MN. Software developing were performed by CG and MV. The first draft of the manuscript was written by CG, AM and MN and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

Open Access funding provided by Colombia Consortium. Not applicable.

## Availability of data and materials

The present open-source software can be found in the Github Repository at [https://github.com/gucecile/BOARD\\_FTD\\_PACC](https://github.com/gucecile/BOARD_FTD_PACC). This also contains the following files derived from in vivo hippocampus recordings for testing: 17,223,000.abf (recording without stimulation), 17,308,005.abf (with a single stimulus 1.5 mA) and 17,308,009.abf (with a double stimulation 1 mA, interval of 0.1 s).

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

All procedures performed on living animals were performed in conformance with Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines, following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, National Institutes of Health) and fulfilling the Colombian regulation (Law 84/1989 and Resolution 8430/1993). In addition, every experimental design and all procedures were approved by the Universidad Nacional de Colombia Ethics Committee.

### Competing interests

Authors declare that there is no competing of interest regarding the publication of this article.

Received: 19 December 2022 Accepted: 1 April 2023

Published online: 08 May 2023

## References

1. Tudor M, Tudor L, Tudor KI (2005) Hans Berger (1873–1941)—the history of electroencephalography. *Acta Med Croatica* 59:307–313
2. Churchland PS, Sejnowski TJ (2016) Blending computational and experimental neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17:667–668. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.114>
3. Köster M, Martens U, Gruber T (2019) Memory entrainment by visually evoked theta-gamma coupling. *Neuroimage* 188:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.12.002>
4. Lalo E, Gilbertson T, Doyle L et al (2007) Phasic increases in cortical beta activity are associated with alterations in sensory processing in the human. *Exp Brain Res* 177:137–145. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0655-8>
5. Osipova D, Hermes D, Jensen O (2008) Gamma power is phase-locked to posterior alpha activity. *PLoS ONE* 3:e3990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003990>

6. Bruns A, Eckhorn R (2004) Task-related coupling from high- to low-frequency signals among visual cortical areas in human subdural recordings. *Int J Psychophysiol* 51:97–116. <https://doi.org/10.1016/j.jpsycho.2003.07.001>
7. Vanhatalo S, Palva JM, Holmes MD et al (2004) Infraslow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5053–5057. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305375101>
8. Canolty RT, Edwards E, Dalal SS et al (2006) High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science* 313:1626–1628. <https://doi.org/10.1126/science.1128115>
9. Penny WD, Duzel E, Miller KJ, Ojemann JG (2008) Testing for nested oscillation. *J Neurosci Methods* 174:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.06.035>
10. Samaha J, Cohen MX (2022) Power spectrum slope confounds estimation of instantaneous oscillatory frequency. *Neuroimage* 250:118929. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.118929>
11. Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *J Neurophysiol* 104:1195–1210. <https://doi.org/10.1152/jn.00106.2010>
12. Voytek B, D'Esposito M, Crone N, Knight RT (2013) A method for event-related phase/amplitude coupling. *Neuroimage* 64:416–424. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.09.023>
13. Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci* 2:229–239. <https://doi.org/10.1038/35067550>
14. Palva JM, Palva S, Kaila K (2005) Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *J Neurosci* 25:3962–3972. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4250-04.2005>
15. Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* 9:474–480. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.08.011>
16. Siegel M, Warden MR, Miller EK (2009) Phase-dependent neuronal coding of objects in short-term memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21341–21346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908193106>
17. Gregoriou GG, Gotts SJ, Zhou H, Desimone R (2009) High-frequency, long-range coupling between prefrontal and visual cortex during attention. *Science* 324:1207–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1171402>
18. Delorme A, Makeig S (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *J Neurosci Methods* 134:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.10.009>
19. Martinez-Cancino R, Delorme A, Kreutz-Delgado K, Makeig S (2020) Computing Phase Amplitude Coupling in EEGLAB: PACTools. In: 2020 IEEE 20th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE). IEEE, Cincinnati, pp 387–394
20. Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen J-M (2011) FieldTrip: Open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput Intell Neurosci* 2011:156869. <https://doi.org/10.1155/2011/156869>
21. Tadel F, Baillet S, Mosher J, Schoffelen J-M (2011) Brainstorm: a user-friendly application for MEG/EEG analysis. *Comput Intell Neurosci* 2011:879716. <https://doi.org/10.1155/2011/879716>
22. Gramfort A, Luessi M, Larson E et al (2014) MNE software for processing MEG and EEG data. *Neuroimage* 86:446–460
23. Combrisson E, Nest T, Brovelli A et al (2020) Tensorpac: an open-source Python toolbox for tensor-based phase-amplitude coupling measurement in electrophysiological brain signals. *PLoS Comput Biol* 16:e1008302
24. Rothman JS, Silver RA (2018) NeuroMatic: an integrated open-source software toolkit for acquisition, analysis and simulation of electrophysiological data. *Front Neuroinform* 12:14
25. Kim YG, Shin JJ, Kim SJ (2021) Minhee analysis package: an integrated software package for detection and management of spontaneous synaptic events. *Mol Brain* 14:1–17
26. Makeig S, Debener S, Onton J, Delorme A (2004) Mining event-related brain dynamics. *Trends Cogn Sci* 8:204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2004.03.008>
27. Väisänen O, Malmivuo J (2009) Improving the SNR of EEG generated by deep sources with weighted multielectrode leads. *J Physiol Paris* 103:306–314. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2009.07.003>
28. Cong F, Ristaniemi T, Lyytinen H (2015) Advanced signal processing on brain event-related potentials: filtering erps in time, frequency and space domains sequentially and simultaneously. World Scientific, Singapore
29. Oppenheim AV, Willsky AS, Nawab SH (1997) Signals and systems, 2nd edn. Prentice Hall, Upper Saddle River
30. Cooley JW, Tukey JW (1965) An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math Comp* 19:297–301. <https://doi.org/10.1090/S0025-5718-1965-0178586-1>
31. Sheikh SA, Majoka AZ, Rehman KU et al (2015) Nonparametric spectral estimation technique to estimate dominant frequency for atrial fibrillation detection. *JSIP* 06:266–276. <https://doi.org/10.4236/jsip.2015.64025>
32. Wang R, Wang J, Yu H et al (2015) Power spectral density and coherence analysis of Alzheimer's EEG. *Cogn Neurodyn* 9:291–304. <https://doi.org/10.1007/s11571-014-9325-x>
33. Cohen MX (2014) Analyzing neural time series data: theory and practice. The MIT Press, Cambridge
34. Akin M (2002) Comparison of wavelet transform and FFT methods in the analysis of EEG signals. *J Med Syst* 26:241–247. <https://doi.org/10.1023/a:1015075101937>
35. Akujuobi CM (2022) Wavelets and wavelet transform systems and their applications: a digital signal processing approach. Springer International Publishing, Cham
36. Mallat SG (2009) A wavelet tour of signal processing: the sparse way, 3rd edn. Elsevier/Academic Press, Amsterdam
37. Cohen MX (2019) A better way to define and describe Morlet wavelets for time-frequency analysis. *Neuroimage* 199:81–86
38. Figueiredo A, Nave M, EFDA-JET contributors (2004) Time-frequency analysis of nonstationary fusion plasma signals: a comparison between the Choi-Williams distribution and wavelets. *Rev Sci Instrum* 75:4268–4270
39. Belluscio MA, Mizuseki K, Schmidt R et al (2012) Cross-frequency phase-phase coupling between theta and gamma oscillations in the hippocampus. *J Neurosci* 32:423–435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4122-11.2012>
40. Hyafil A, Giraud A-L, Fontolan L, Gutkin B (2015) Neural cross-frequency coupling: connecting architectures, mechanisms, and functions. *Trends Neurosci* 38:725–740. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.09.001>
41. Le Van QM, Bragin A (2007) Analysis of dynamic brain oscillations: methodological advances. *Trends Neurosci* 30:365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.006>
42. Nokia MS, Penttonen M (2022) Rhythmic Memory Consolidation in the Hippocampus. *Front Neural Circuits* 16:885684. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.885684>
43. Aru J, Aru J, Priesemann V et al (2015) Untangling cross-frequency coupling in neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 31:51–61. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.08.002>
44. Buzsáki G, Wang X-J (2012) Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35:203–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>
45. Canolty RT, Knight RT (2010) The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn Sci* 14:506–515. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.09.001>
46. Colgin LL, Moser EI (2010) Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology (Bethesda)* 25:319–329. <https://doi.org/10.1152/physiol.00021.2010>
47. Gauthier-Umaña C, Muñoz-Cabrera J, Valderrama M et al (2020) Acute effects of two different species of amyloid- $\beta$  on oscillatory activity and synaptic plasticity in the commissural CA3-CA1 circuit of the hippocampus. *Neural Plast* 2020:8869526. <https://doi.org/10.1155/2020/8869526>
48. Boashash B, Azemi G, O'Toole JM (2013) Time-frequency processing of nonstationary signals: advanced TFD design to aid diagnosis with highlights from medical applications. *IEEE Signal Process Mag* 30:108–119
49. Boashash B, Ouelha S (2016) Automatic signal abnormality detection using time-frequency features and machine learning: a newborn EEG seizure case study. *Knowl-Based Syst* 106:38–50
50. Alazrai R, Al-Rawi S, Alwanni H, Daoud MI (2019) Tonic cold pain detection using Choi-Williams time-frequency distribution analysis of EEG signals: a feasibility study. *Appl Sci* 9:3433

51. Karlsson S, Yu J, Akay M (2000) Time-frequency analysis of myoelectric signals during dynamic contractions: a comparative study. *IEEE Trans Biomed Eng* 47:228–238
52. Jurkiewicz GJ, Hunt MJ, Żygierewicz J (2021) Addressing pitfalls in phase-amplitude coupling analysis with an extended modulation index toolbox. *Neuroinformatics* 19:319–345. <https://doi.org/10.1007/s12021-020-09487-3>
53. Dastgheyb RM, Yoo S-W, Haughey NJ (2020) MEAnalyzer—a spike train analysis tool for multi electrode arrays. *Neuroinformatics* 18:163–179. <https://doi.org/10.1007/s12021-019-09431-0>
54. Lopez-Calderon J, Luck SJ (2014) ERPLAB: an open-source toolbox for the analysis of event-related potentials. *Front Hum Neurosci* 8:213. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00213>
55. Mørup M, Hansen LK, Arnfred SM (2007) ERPWAVELAB a toolbox for multi-channel analysis of time-frequency transformed event related potentials. *J Neurosci Methods* 161:361–368. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.008>
56. Peyk P, De Cesarei A, Junghöfer M (2011) ElectroMagnetoEncephalography software: overview and integration with other EEG/MEG toolboxes. *Comput Intell Neurosci* 2011:861705. <https://doi.org/10.1155/2011/861705>
57. Bao FS, Liu X, Zhang C (2011) PyEEG: an open source Python module for EEG/MEG feature extraction. *Comput Intell Neurosci* 2011:406391. <https://doi.org/10.1155/2011/406391>
58. Navarrete M, Alvarado-Rojas C, Le Quyen Van M, Valderrama M (2016) RIPPLELAB: a comprehensive application for the detection, analysis and classification of high frequency oscillations in electroencephalographic signals. *PLoS ONE* 11:e0158276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158276>
59. Lepage KQ, Fleming CN, Witcher M, Vijayan S (2021) Multitaper estimates of phase-amplitude coupling. *J Neural Eng*. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac1deb>
60. Hülsemann MJ, Naumann E, Rasch B (2019) Quantification of phase-amplitude coupling in neuronal oscillations: comparison of phase-locking value, mean vector length, modulation index, and generalized-linear-modeling-cross-frequency-coupling. *Front Neurosci* 13:573. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00573>

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:**

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ▶ [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---

## Research Article

# Acute Effects of Two Different Species of Amyloid- $\beta$ on Oscillatory Activity and Synaptic Plasticity in the Commissural CA3-CA1 Circuit of the Hippocampus

Cécile Gauthier-Umaña <sup>1</sup>, Jonathan Muñoz-Cabrera <sup>2</sup>, Mario Valderrama <sup>3</sup>,  
Alejandro Múnera,<sup>2</sup> and Mauricio O. Nava-Mesa <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neuroscience Research Group (NEUROS), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Behavioral Neurophysiology Laboratory, Physiological Sciences Department, School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Correspondence should be addressed to Mauricio O. Nava-Mesa; monavam@usal.es

Received 23 April 2020; Revised 4 December 2020; Accepted 8 December 2020; Published 19 December 2020

Academic Editor: Javier M rquez Ruiz

Copyright © 2020 Cécile Gauthier-Umaña et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Recent evidence indicates that soluble amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) species induce imbalances in excitatory and inhibitory transmission, resulting in neural network functional impairment and cognitive deficits during early stages of Alzheimer's disease (AD). To evaluate the *in vivo* effects of two soluble  $A\beta$  species ( $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$ ) on commissural CA3-to-CA1 (cCA3-to-CA1) synaptic transmission and plasticity, and CA1 oscillatory activity, we used acute intrahippocampal microinjections in adult anaesthetized male Wistar rats. Soluble  $A\beta$  microinjection increased cCA3-to-CA1 synaptic variability without significant changes in synaptic efficiency. High-frequency CA3 stimulation was rendered inefficient by soluble  $A\beta$  intrahippocampal injection to induce long-term potentiation and to enhance synaptic variability in CA1, contrasting with what was observed in vehicle-injected subjects. Although soluble  $A\beta$  microinjection significantly increased the relative power of  $\gamma$ -band and ripple oscillations and significantly shifted the average vector of  $\theta$ -to- $\gamma$  phase-amplitude coupling (PAC) in CA1, it prevented  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC shift induced by high-frequency CA3 stimulation, opposite to what was observed in vehicle-injected animals. These results provide further evidence that soluble  $A\beta$  species induce synaptic dysfunction causing abnormal synaptic variability, impaired long-term plasticity, and deviant oscillatory activity, leading to network activity derailment in the hippocampus.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common type of dementia and progressive neurodegenerative disorder worldwide, is characterized by selective neuronal loss, and two histopathological features in *postmortem* tissue are extracellular amyloid plaques composed of amyloid beta peptide ( $A\beta$ ) and intracellular neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein [1]. Recent evidence indicates that soluble forms of  $A\beta$  induce glutamatergic, cholinergic, and GABAergic imbalance, resulting in functional impairment

of neural networks during early AD stages [2–5]. In fact,  $A\beta$ -induced synaptic dysfunction precedes selective neuronal degeneration and may explain memory impairment during early AD stages and mild cognitive impairment, a prodromal stage of AD [6, 7]. Although therapies based on modulation of GABAergic neurotransmission have been proposed for AD [8], current symptomatic therapies include cholinesterase inhibitors and NMDA antagonists only [9]. New  $A\beta$ -targeted immunotherapies have been tested in several clinical trials but without a clear clinical benefit [10]; therefore, no course-modifying treatment has been

developed to date because of a lack of understanding of the fundamental mechanisms underlying AD, as well as the physiological role of amyloid peptides.

Senile plaques in AD patients and animal models consist of  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  ( $A\beta_{1-42}$  mainly in the core of early plaques and  $A\beta_{1-40}$  in vascular amyloid deposits) [11, 12]. It has been suggested that short  $A\beta$  fragments, such as  $A\beta_{25-35}$ , constitute the biologically active forms of  $A\beta$  and are thus responsible for the neurotoxic properties of  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  [13].  $A\beta_{25-35}$  may be expressed in AD brains [14–16] possibly from enzymatic cleavage of  $A\beta_{1-40}$  [15, 16]. Several studies indicate similar effects in the brain of either short or long forms of  $A\beta$  [13–15]. However,  $A\beta_{25-35}$  produces more acute toxic effects than  $A\beta_{1-42}$  because of its higher solubility [17], and it also has different effects on synaptic plasticity and intracellular pathophysiological mechanisms compared with  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  [18–20].

The hippocampus and entorhinal cortex are peculiarly susceptible to deleterious  $A\beta$  effects during early AD stages [21]. Hippocampal plasticity, necessary for learning and memory processes, is tuned by  $\theta$  activity, which depends on acetylcholine release from the medial septum [2]. Moreover, the septum and hippocampus are reciprocally interconnected and functionally coupled through GABAergic and glutamatergic connections to form the septohippocampal system [2, 22]. Each of these neurotransmitters contributes to hippocampal rhythmicity [23]. Moreover,  $\theta$  and  $\gamma$  activities are associated through inhibitory synapses between GABAergic parvalbumin interneurons and pyramidal neurons [24]. Such oscillatory activity, including phase-to-amplitude coupling of  $\theta$  and  $\gamma$  activity, is necessary for adequately encoding and storing information in the cortex and hippocampus [25–27]. *In vivo* studies have shown the relevance of the CA3-CA1 synapse in associative learning and memory processing [28, 29] and its implications in AD through animal models [30]. In a very recent study, the electrophysiological activity of the CA3-CA1 region in humans was correlated with memory tasks (i.e., delayed match-to-sample) and it resembles synaptic hippocampal responses observed in rodents in the same areas [31]. Therefore, studies based on animal models may provide physiological information that could be applied in specific regions of clinical relevance in the human brain.

There are tight correlations among long-term potentiation (LTP) mechanisms,  $\theta$ - $\gamma$  oscillations, and hippocampal-dependent memories [32–34]. Event-locked oscillatory activity in hippocampal formation and hippocampus-related structures is necessary for learning and long-term memory processes, as well as for declarative and spatial memory functions, which are impaired in early stages of AD [3, 34, 35]. Accumulating evidence indicates that  $A\beta$  affects  $\theta$ ,  $\delta$ , and  $\gamma$  bands in different preclinical models of AD [3, 36]. Similarly, EEG recordings in AD patients show pathological changes of network oscillations in a wide range of frequencies (i.e.,  $\alpha/\theta$  ratio,  $\gamma$  coherence,  $\theta$  and  $\delta$  synchronization) [37, 38]. Studies using an animal model of AD (transgenic CRND8 mice) indicate that alterations in  $\theta$ - $\gamma$  cross-frequency coupling might be used as an early biomarker of AD [39]. In another study, acute LTP impairment by  $A\beta_{1-42}$  was related to alterations in oscillatory activity in  $\theta$ - $\gamma$  coupling at perforant

path-dentate gyrus synapses [40]. Various studies have reported that changes in the spectral power of brain oscillations are related to LTP induction and expression [32, 33, 41, 42] and have shown a relationship between changes in single-synapse and network oscillation activity. Therefore,  $A\beta$ -induced LTP impairment might be associated with oscillatory activity changes in brain structures affected during initial stages of AD.

Several aggregated  $A\beta$  forms and configurations may explain variable effects during AD progression. Considering the huge differences between experimental models (*in vivo* vs. *in vitro*), time of exposure to  $A\beta$  (acute vs. chronic), and differences in  $A\beta$  aggregation states (monomeric, oligomeric, and fibrillary), the reported  $A\beta$  effects on neuronal activity have been divergent in terms of excitability, active and passive membrane properties, network activity, and neural plasticity [22, 43–47]. Despite the large number of studies, little is known about the effects of diverse soluble  $A\beta$  forms on oscillatory activity, excitability, or synaptic plasticity [47, 48]. The aim of the present study was, therefore, to evaluate  $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$  effects on hippocampal oscillations (power spectral density and phase-amplitude coupling) and basal transmission, variability, and long-term plasticity in cCA3-to-CA1 synapses. We found that LTP impairment induced by acute administration of soluble  $A\beta$  ( $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{25-35}$ ) is associated with abnormal synaptic variability and increased power of  $\gamma$ -band and ripple network oscillations and derailed  $\theta$ -to- $\gamma$  phase-to-amplitude coupling in CA1. Such  $A\beta$ -induced disruption in synaptic plasticity and network activity may underlie abnormalities in information processing and memory encoding.

## 2. Material and Methods

**2.1. Ethical Statement.** All procedures performed on living animals were performed in conformance with Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines [49], following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, National Institutes of Health) and fulfilling the Colombian regulation (Law 84/1989 and Resolution 8430/1993). In addition, every experimental design and all procedures were approved by the Universidad del Rosario Ethics Committee.

**2.2. Animals.** Seventeen 16-20-week-old male Wistar rats, weighing  $300 \pm 30$  g, were used as experimental subjects. Experimental animals were supplied by the Universidad Nacional de Colombia animal facilities. Animals were housed in a sound-attenuated room in polycarbonate cages, in groups of four, under controlled environmental conditions:  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  temperature,  $50 \pm 10\%$  relative humidity, and 12 h light/dark cycle (lights on from 07:00 to 19:00). Animals had food and water available *ad libitum*. Experiments were performed in the morning. Special care was taken to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Sample size was calculated according to the following formula [50]: sample size =  $2SD^2(Z^{\alpha/2} + Z^\beta)^2/d^2$ , where  $SD = 6.85$ ,  $Z^{\alpha/2} = 1.96$  with  $\alpha = 0.05$ ,  $Z^\beta = 0.84$  with  $\beta = 0.2$ .

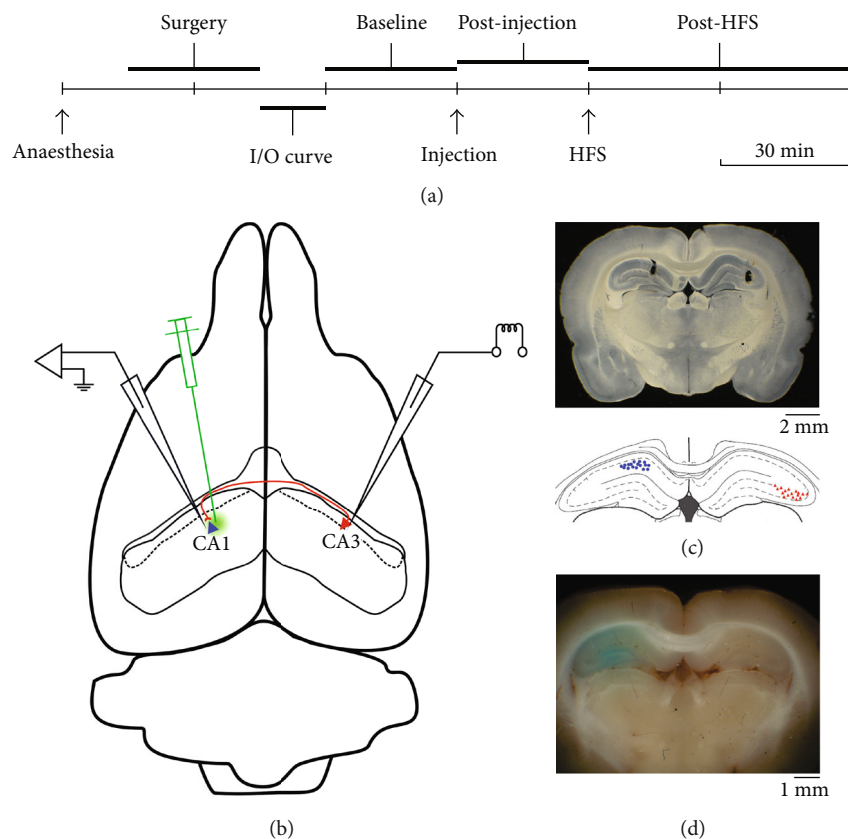


FIGURE 1: Experimental timeline and preparation. (a) Timeline indicating the experimental procedures during a recording session. (b) Diagram of a rat brain illustrating microelectrode cannula (for local field potential recording and microinjection in left CA1) and stimulating electrode (in right CA3) locations. (c) Panoramic photograph of an obliquely illuminated coronal brain slice containing representative electrolytic lesions made by passing current through recording (left) and stimulating (right) electrodes (upper panel), paired to a corresponding coronal diagram of the hippocampus (extracted and modified from the bregma: -3.6 mm diagram of Paxinos' rat brain atlas), summarizing recording (left, blue circles) and stimulating (right, red triangles) electrode placement in each experimental subject. (d) Panoramic photograph of a brain block containing methylene blue-coloured left hippocampus, attesting adequate diffusion of the injected solution.

Statistical power = 80%, and  $d = 14$ . The minimum sample number per group was 5.

**2.3. Experimental Design and Timeline.** Animals were randomly assigned to any of three groups: (1) control group ( $n=6$ ), receiving vehicle microinjection; (2)  $A\beta_{25-35}$  group ( $n=6$ ), receiving  $A\beta_{25-35}$  peptide microinjection; and (3)  $A\beta_{1-40}$  group ( $n=5$ ), receiving  $A\beta_{1-40}$  peptide microinjection.

In brief, each experiment proceeded as follows: (1) under general anaesthesia, recording and stimulation electrodes were stereotactically inserted in CA1 and contralateral CA3; (2) once stable responses were obtained, the input/output relationship was established; (3) 30 min baseline recording was done to characterize basal synaptic efficiency; (4) the designed solution was microinjected in CA1; (5) the microinjected solution's effect on synaptic transmission was characterized by recording synaptic responses for 30 min after microinjection; (6) high-frequency tetanic stimulation was done to induce long-term plasticity; and (7) the effect of high-frequency stimulation (HFS) on synaptic efficiency was characterized by recording synaptic responses for 60 min after HFS (Figure 1(a)).

**2.4. Surgery.** Under general anaesthesia induced with 1.5 g/kg of 25% urethane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 10 mg/kg of xylazine (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) (intraperitoneal injection), the subject was placed in a rat stereotaxic frame (SR-6R, Narishige Inc., Tokyo, Japan). Nociceptive responses (tail prick and paw withdrawal reflex) were evaluated during the experiment. In case of slight motor response, an additional injection of urethane at 50% of the initial dose was administered. The respiratory and cardiac rates were monitored during the whole experiment, and a heating blanket was used to avoid hypothermia. Because we were interested in evaluating  $A\beta$  effects on NMDA-dependent synaptic plasticity, we chose urethane as the anaesthetic agent, taking into account that it has been reported to have no significant effects on NMDA-type glutamate receptors when given in intermediate doses [51, 52]; however, anaesthetic doses of urethane depress or even abolish 7-12 Hz atropine-resistant theta activity [53], but left 4-7 Hz atropine-sensitive theta oscillations unaltered. Longitudinal fronto-occipital incision, followed by connective and muscle tissue dissection, was used to expose the skull. Two holes were drilled in parietal bones: one for inserting a

recording electrode aimed at left CA1 (stereotaxic coordinates from the bregma: AP = -3.8 mm, L = 2.5 mm, left) and one for inserting a stimulating electrode aimed at right CA3 (stereotaxic coordinates from the bregma: AP = -3.8 mm, L = 3.7 mm, right) [54]. In order to reduce variability between subjects, we always use the same electrode configuration. The dura mater was cut and removed through the holes in order to allow electrode insertion (Figure 1(b)).

**2.5. In Vivo Extracellular Electrophysiology.** A microelectrode cannula (a 5 M $\Omega$  impedance enamel-coated wire attached to a 25-G needle), for local field potential (LFP) recording and microinjection, was inserted 2.5 mm from the pial surface, through the skull hole for left CA1 (vide supra for stereotaxic coordinates), using a hydraulic micromanipulator (SM-25C, Narishige Inc., Tokyo, Japan). A stimulating concentric bipolar electrode was lowered 3.5 mm from the pial surface, through the skull hole for right CA3 (vide supra for stereotaxic coordinates), using a micromanipulator (SM-25A, Narishige Inc., Tokyo, Japan). A silver electrode was placed in neck musculature as a reference.

CA1 field activity was magnified (100x) using an AC-coupled preamplifier (NEX-1, Biomedical Engineering, New York, USA). The preamplified signal was then band-pass filtered (0.1 Hz and 10 kHz cut-off frequencies) and further amplified at 20x (yielding 2000x total gain). This conditioned signal was digitized using an analogue-to-digital converter (DigiData 1200, Molecular Devices, San José, USA) with 10 kHz sampling frequency and stored for offline analysis using commercial (Clampfit, Molecular Devices, San José, USA) and purpose-designed software.

CA3 was stimulated by applying 100  $\mu$ s monophasic square pulses, delivered at 0.33 Hz frequency, using a stimulus isolation unit (Isolator-11, Molecular Devices, San José, USA), controlled by a pulse generator (9514 Plus, Quantum Composers, Bozeman, USA). Stimulus intensity (100-400  $\mu$ A) was adjusted so as to obtain stable and reliable CA1 field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP). The depth of the stimulating and recording electrodes from the pial surface was finely adjusted so as to obtain short latency fEPSP, with a waveform characteristic of CA1 stratum pyramidale.

Once a stable CA1 fEPSP was achieved, threshold stimulus intensity was established by decreasing the intensity to one-half the previous one until the fEPSP failure rate was equal to or higher than 50% (characteristically 50 to 200  $\mu$ A). Stimulus intensity was then successively doubled until fEPSP response saturation was attained (characteristically 4 to 8 times the threshold intensity). Then, the stimulus intensity required to obtain ~50% of maximal response ( $I_{50}$ ) was selected to evaluate short- and long-term plasticity from then on. Basal synaptic activity was characterized by recording CA3 stimulation-evoked fEPSP in CA1 ( $I_{50}$  intensity, 100  $\mu$ s duration, and 0.1 Hz frequency) for 30 min. Intra-hippocampal microinjection effect on basal synaptic activity was characterized by recording such fEPSP for 30 min after microinjection. Long-term potentiation at cCA3-to-CA1 synapses was induced by delivering six trains (1 s length, 100 Hz frequency) at 60 s intertrain intervals (HFS). HFS

effect on cCA3-to-CA1 synaptic efficiency was studied by recording left CA1 response to right CA3 stimulation ( $I_{50}$  intensity, 100  $\mu$ s duration, and 0.1 Hz frequency) for 60 min. Deep anaesthetic level was maintained throughout the whole recording session using supplementary anaesthetic doses (about every 4 hours) to attain stable and reliable activity in CA1 [55].

Once the recording session ended, a terminal dose of anaesthesia (urethane 2 g/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneal) was given and the location of stimulating and recording electrode tips was marked by passing continuous current through them delivered by a precision current source (Midgard, Stoelting, Wood Dale, USA). The subject's brain was removed and submerged in 4% paraformaldehyde for 3 days; then, 100  $\mu$ m thick coronal slices encompassing stimulating and recording sites were obtained using a vibratome (1000 Plus, Vibratome, Bannockburn, USA). The electrodes' position and diffusion trace of microinjection coloured solution were documented by examining the slices with a stereoscope (SZX16, Olympus, Tokyo, Japan) and taking digital photographs (Cybershot DSCW7, Sony, Tokyo, Japan) under oblique back-illumination (Figure 1(c)).

**2.6. Preparation of Vehicle and A $\beta$  Peptide Solutions.** Among many soluble A $\beta$  species, A $\beta_{25-35}$  and A $\beta_{1-40}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were chosen for the present work on the basis of their aggregation kinetics, neurotoxicity, and pathogenicity. On the one hand, postmortem examination of AD patients' brains yielded that A $\beta_{1-40}$  accounts for approximately 90% of total A $\beta$  peptide in senile plaques [56]. On the other hand, A $\beta_{25-35}$  aggregates more rapidly and displays more neurotoxicity than A $\beta_{1-40}$  [13, 57]. A $\beta_{25-35}$  and A $\beta_{1-40}$  peptides were prepared as previously described [22, 43, 45]. Briefly, peptides were dissolved in 0.9% normal saline solution with 0.5% methylene blue to 1.5 mM concentration and stored at -20°C. Aliquots were defrosted and incubated at 37°C for 24 h before experiments [58, 59]. The vehicle solution was therefore 0.9% normal saline with 0.5% methylene blue. Methylene blue was used to attest adequate diffusion in the hippocampal CA1 region of either vehicle or A $\beta$  peptides (Figure 1(d)).

**2.7. Intra-hippocampal Microinjection.** Once a baseline recording was obtained, a Hamilton syringe connected through 12-G tubing was used to inject 2  $\mu$ L of the designed solution (either vehicle, A $\beta_{25-35}$ , or A $\beta_{1-40}$ ) at a 1  $\mu$ L/min rate through the microelectrode cannula inserted in the left hippocampal CA1 region. A $\beta_{25-35}$  and A $\beta_{1-40}$  dose (3 nM) and total injection volume (2  $\mu$ L) were chosen according to previous reports [60-63]. Stimulation and recording were restarted three minutes after microinjection in order to allow diffusion and prevent leakage of injected solution.

**2.8. Data Analysis.** Electrophysiological data analyses were planned to characterize the effects of both microinjected solutions on basal cCA3-to-CA1 synaptic responses, cCA3-to-CA1 long-term plasticity, and CA1 oscillatory activity. To do so, recordings were divided into 5 min windows around stimulation events and analysed in time, frequency,

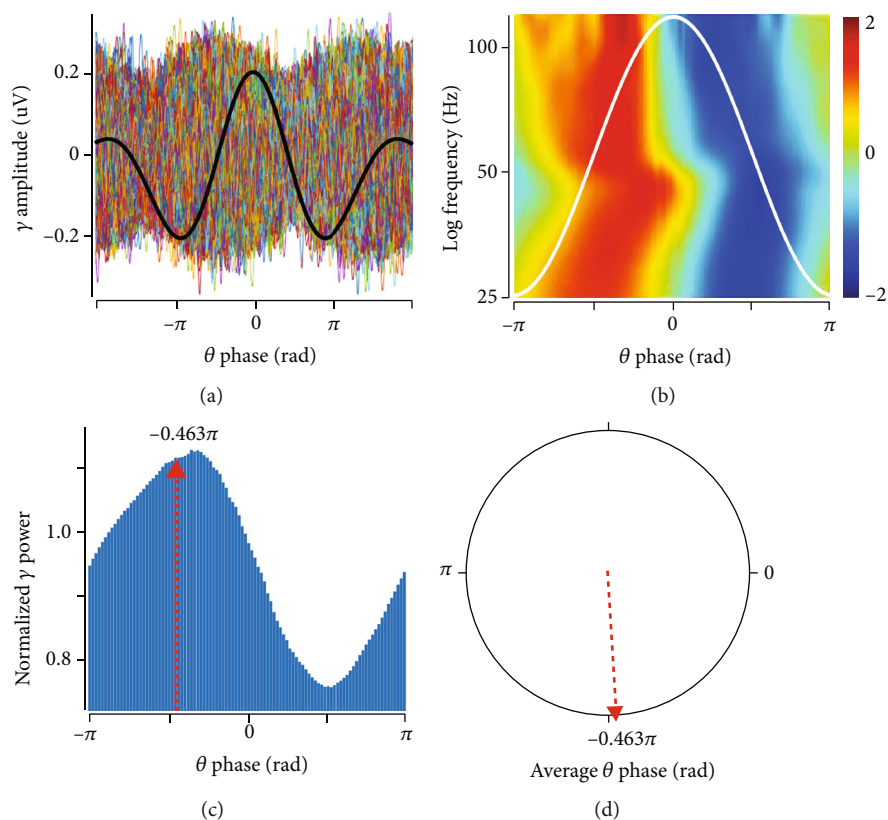


FIGURE 2:  $\theta$ -to- $\gamma$  phase-amplitude coupling (PAC) analysis process. (a) Filtered LFP in  $\theta$  (black trace) and  $\gamma$  bands (coloured traces) are represented;  $\theta$  trace is the average of  $n$  theta cycles, aligned around their maximum amplitude (downscaled to fit  $\gamma$  amplitude); each  $\theta$  cycle-concurrent  $\gamma$  activity is presented in superposition using the abovementioned alignment. (b) Average normalized  $\gamma$  band scalogram (colour scale) relative to the  $\theta$  phase (illustrated as a white trace). (c) Normalized  $\gamma$  band spectral power average as a function of the  $\theta$  phase. (d) Average vector of (c) indicating dominant-phase  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC.

and time-frequency domains. Time domain analysis was related to fEPSP first component slope measurement. Frequency domain analysis was focused on calculating relative power spectral density (rPSD) in  $\delta$  (0.5-3.9 Hz),  $\theta$  (4-7.9 Hz),  $\alpha$  (8-11.9 Hz),  $\beta$  (12-24.9 Hz),  $\gamma$  (25-120 Hz), HFO<sub>1</sub> (121-250 Hz), and HFO<sub>2</sub> (250-500 Hz) bands, using Welch's method. Time-frequency domain analysis was done by building scalograms for each window, using the Morse wavelet decomposition [64, 65]; then,  $\gamma$  band scalogram averages were triggered by each  $\theta$  cycle time window to determine phase-amplitude coupling (PAC) [66] (Figure 2). Detailed information about mathematical data processing, which was done using self-written scripts using MATLAB R2017a® (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA), can be found in Supplementary Materials (available here).

**2.9. Statistics.** According to data distribution normality, determined using the Shapiro-Wilk test, long-term plasticity and PSD data from experimental groups were compared using either one-way ANOVA or Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by rank modules of SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc., San José, California, USA). Variability of cCA3-to-CA1 synaptic responses from experimental groups was compared using Levene's test [67]. The resulting angle from the average PAC vector in the experimental

groups was compared using the MATLAB toolbox for circular statistics [68].

### 3. Results

**3.1.  $A\beta$  Did Not Alter Synaptic Efficiency but Induced Changes in Synaptic Variability.** No significant difference was found between the experimental groups during baseline recording before ( $H_{(2)} = 0.153$ ,  $p = 0.797$ ,  $n = 16$ ) or after intrahippocampal injection ( $F_{(2,13)} = 1.541$ ,  $p = 0.251$ ,  $n = 16$ : Figure 3(a)). However, fEPSP slope variability significantly changed after intrahippocampal injection ( $F_{(2,461)} = 64.898$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 16$ ); *post hoc* analysis showed that  $A\beta_{1-40}$  microinjection significantly increased cCA3-to-CA1 synaptic variability more than the other treatments (control vs.  $A\beta_{25-35}$ :  $F_{(1,317)} = 0.004$ ,  $p = 0.951$ ,  $n = 11$ ; control vs.  $A\beta_{1-40}$ :  $F_{(1,287)} = 71.932$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ; and  $A\beta_{1-40}$  vs.  $A\beta_{25-35}$ :  $F_{(1,318)} = 86.351$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 11$ ). Variability progressively increased in control and  $A\beta_{25-35}$  groups after both injection (control:  $F_{(1,606)} = 19.232$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ;  $A\beta_{25-35}$ :  $F_{(1,636)} = 23.761$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ) and HFS (control:  $F_{(1,438)} = 63.522$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 5$ ;  $A\beta_{25-35}$ :  $F_{(1,438)} = 49.588$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ). By contrast, even though variability in the  $A\beta_{1-40}$  group increased substantially after being injected

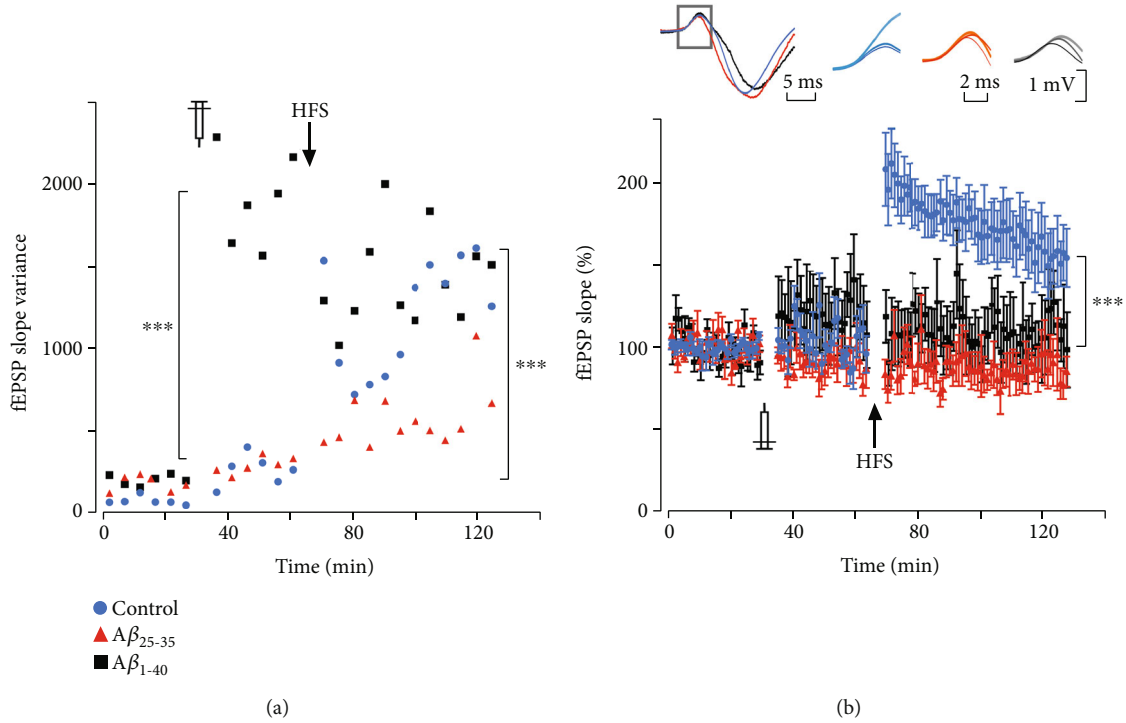


FIGURE 3: Intrahippocampal  $A\beta$  injections altered synaptic variability and impaired LTP in cCA3-to-CA1 synapse. Temporal evolution of slope variability (a) and magnitude (b) of cCA3 stimulation-evoked EPSP in CA1 recorded along three consecutive experimental stages, from left to right: (1) 30 min before peptide injection (baseline), (2) 30 min after intrahippocampal injection, and (3) after HFS (six 1 s, 100 Hz trains, delivered every 60 s). EPSP variability increased after intrahippocampal injection, being significantly higher in the  $A\beta_{1-40}$  group. HFS induced significant LTP in vehicle-injected subjects but not in  $A\beta$ -injected ones. In (a), each dot represents 5 min variance of slope; in (b), each dot illustrates 2 min mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Inset in (b): left—representative whole CA1 fEPSP average from each experimental group evoked by  $I_{50}$  stimuli delivered in contralateral CA3 (the region representing the monosynaptic component is outlined by a gray rectangular box); right—three sets of average traces (10 trials per average) of the monosynaptic component of cCA3 stimulation-evoked CA1 field potential obtained during baseline (thin line, dark colour), after intrahippocampal injection (intermediate line, intermediate colour), and after HFS (thick line, light colour) for each experimental group (control, blue;  $A\beta_{25-35}$ , red; and  $A\beta_{1-40}$ , black). \*\*\*Significant differences between groups ( $p < 0.001$ ). Data from each experimental group were normalized respecting the average value obtained during the last 15 min of baseline.

( $F_{(1,606)} = 299.08$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 5$ ), it did not change after HFS ( $F_{(1,438)} = 0.63$ ,  $p = 0.428$ ,  $n = 5$ ).

**3.2.  $A\beta$  Impaired Long-Term Synaptic Plasticity.** HFS induced significant fEPSP slope increase in vehicle-injected subjects (from  $100 \pm 0.91\%$  to  $198.8 \pm 14\%$ ,  $H_{(2)} = 9.5$ ,  $p = 0.009$ ,  $n = 5$ ). By contrast, both  $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$  impaired such HFS-induced fEPSP slope increase ( $A\beta_{25-35}$ : from  $100 \pm 1.29\%$  to  $89.45 \pm 16\%$ ,  $F_{(2,17)} = 0.504$ ,  $p = 0.614$ ,  $n = 6$ ;  $A\beta_{1-40}$ : from  $100 \pm 1.84\%$  to  $113.5 \pm 25\%$ ,  $F_{(2,17)} = 0.938$ ,  $p = 0.418$ ,  $n = 5$ ; Figure 3(b)). Indeed, fEPSP slope change after HFS was significantly different between groups ( $F_{(2,15)} = 17.741$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 16$ ); *post hoc* analysis (Tukey's test) showed that vehicle-injected subjects displayed fEPSP slope increase significantly greater than  $A\beta_{25-35}$ - and  $A\beta_{1-40}$ -injected ones (control vs.  $A\beta_{25-35}$ :  $Q = 8.146$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 11$ ; control vs.  $A\beta_{1-40}$ :  $Q = 6.083$ ,  $p = 0.002$ ,  $n = 10$ ), while these later groups were not significantly different to each other ( $Q = 1.792$ ,  $p = 0.437$ ,  $n = 11$ ). These results show that soluble  $A\beta$  microinjection impairs cCA3-to-CA1 long-term synaptic plasticity.

**3.3.  $A\beta_{25-35}$  Induced Increase in  $\gamma$  and HFO<sub>1</sub> Band Relative PSD.** Intrahippocampal injection of  $A\beta_{25-35}$  induced significant increases in relative PSD (Figure 4) in  $\gamma$  (Figure 4(a), left column,  $F_{(2,11)} = 8.237$ ,  $p = 0.007$ ,  $n = 17$ ) and HFO<sub>1</sub> (Figure 4(b), left column,  $H_{(2)} = 6.408$ ,  $p = 0.029$ ,  $n = 17$ ) bands, but not in other bands. Neither  $A\beta_{1-40}$  nor vehicle injection induced significant changes in relative PSD in any band (Suppl. Table 1). In  $A\beta_{25-35}$ -injected subjects, HFS did not induce additional changes in  $\gamma$  (Figure 4(a), right column; 5 min:  $F_{(2,11)} = 3.036$ ,  $p = 0.089$ ; 30 min:  $H_{(2)} = 1.96$ ,  $p = 0.403$ ; and 60 min:  $F_{(2,11)} = 1.502$ ,  $p = 0.265$ ), HFO<sub>1</sub> (Figure 4(b), right column; 5 min:  $F_{(2,11)} = 0.063$ ,  $p = 0.940$ ; 30 min:  $F_{(2,11)} = 0.224$ ,  $p = 0.803$ ; and 60 min:  $F_{(2,11)} = 0.341$ ,  $p = 0.718$ ), or any other band. HFS did not induce significant changes in relative PSD in any band in vehicle- or  $A\beta_{1-40}$ -injected subjects (Suppl. Table 2). In summary, only  $A\beta_{25-35}$ , which is the more toxic soluble species of  $A\beta$ , induced increased energy contribution in gamma and HFO<sub>1</sub> bands, but HFS did not further modify such changes.

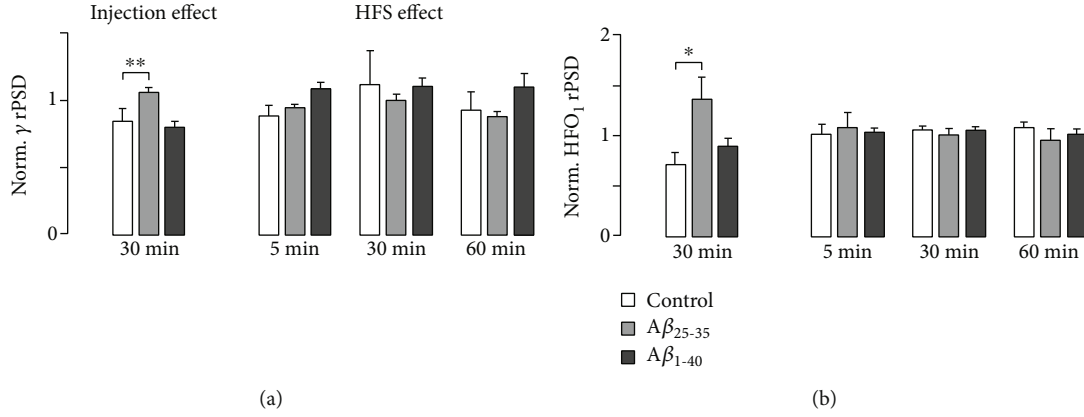


FIGURE 4: Peptide injection but not HFS increased rPSD in  $\gamma$  and HFO1 bands. Bar diagrams illustrating rPSD in  $\gamma$  (a) and HFO1 (b) bands. The left panel shows the effect of peptide or vehicle, 30 min after injection, normalized respecting baseline rPSD in the same bands. The right panel shows the effect of HFS normalized regarding rPSD calculated after injection in the same bands. Bars and whiskers represent each group's mean + SEM. \*Significant difference respecting the control group during baseline ( $p < 0.05$ ); \*\*significant difference respecting each group after peptide injection ( $p < 0.01$ ).

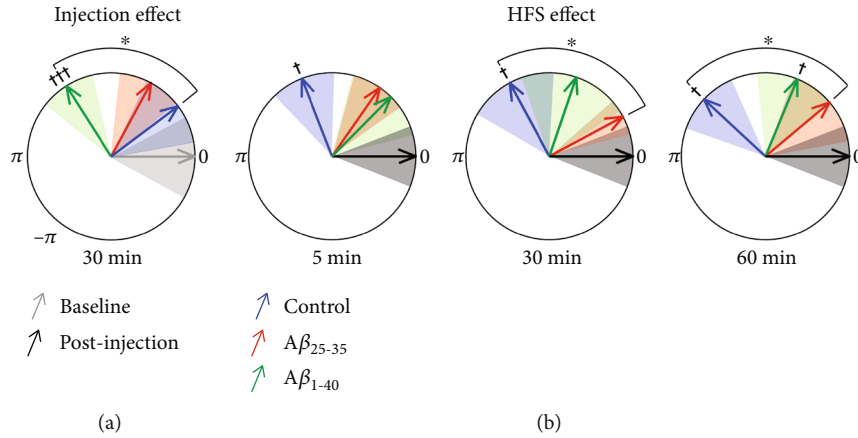


FIGURE 5: Peptide injection and HFS shifted the  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC average phase vector. (a) Circular diagram illustrating the intrahippocampal microinjection-induced shift of the  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC average phase vector for each group respecting the baseline vector. (b) Circular diagrams illustrating the time evolution (at 5, 30, and 60 min) of HFS-induced shift of the  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC average phase vector for each group respecting the microinjection vector. Coloured arrows indicate average vector angles (control, blue;  $A\beta_{25-35}$ , red; and  $A\beta_{1-40}$ , green); correspondingly coloured shaded areas illustrate the standard error of angles for each group. Significant differences relative to the reference vector ( $^\dagger p < 0.05$ ,  $^\dagger\dagger p < 0.001$ ); significant differences between groups ( $^* p < 0.05$ ).

**3.4.  $A\beta$  Injection Shifted  $\theta$ - $\gamma$  Phase-Amplitude Coupling but Impaired HFS-Induced Shift.** To determine if the  $\gamma$  amplitude was linked to the  $\theta$  phase at the hippocampus, different approaches can be used to calculate PAC. In this case, we calculated the average high-frequency  $\gamma$  power over the modulating low band in  $\theta$  individual cycles. This method is especially useful when the modulating band is not constant over the length of the experiment. The power distribution was obtained by averaging the entire band, and this average gives a single value for the modulation between the pairs of frequency bands ( $\gamma$ - $\theta$ ) (for details, see Figure 2 and Supplementary Materials).

$A\beta_{1-40}$  injection induced a significant  $\gamma$  amplitude-modulating  $\theta$  phase shift ( $\sim 122^\circ$ ;  $F_{(1,8)} = 37.220$ ,  $p < 0.001$ ); neither vehicle ( $F_{(1,6)} = 1.59$ ,  $p = 0.254$ ) nor  $A\beta_{25-35}$  ( $F_{(1,9)} = 3.26$ ,  $p = 0.104$ ) injection induced significant shifts

in such modulating phase (Figure 5(a)). Planned intergroup comparisons showed that the  $A\beta_{1-40}$  injection-induced phase shift was significantly greater than vehicle injection-induced ( $F_{(1,6)} = 7.71$ ,  $p = 0.03$ ) and  $A\beta_{25-35}$  injection-induced ( $F_{(1,9)} = 4.76$ ,  $p = 0.05$ ) phase shifts; vehicle and  $A\beta_{25-35}$  injection-induced phase shifts were not significantly different to each other ( $F_{(1,7)} = 0.43$ ,  $p = 0.53$ ).

Taking each group injection-induced phase shift as a reference, it was found that HFS induced a significant phase shift ( $\sim 112$ - $137^\circ$ ) in vehicle-injected subjects (Figure 5(b), blue arrows;  $F_{(3,16)} = 4.47$ ,  $p = 0.002$ ); this phase shift persisted for up to 1 h after HFS (5 min:  $F_{(1,4)} = 9.25$ ,  $p = 0.038$ ; 30 min:  $F_{(1,4)} = 7.07$ ,  $p = 0.05$ ; and 60 min:  $F_{(1,4)} = 13.11$ ,  $p = 0.022$ ). In  $A\beta_{1-40}$ -injected subjects, HFS induced a smaller phase shift ( $\sim 45$ - $70^\circ$ ) that reached significance only 60 min

later ( $F_{(3,16)} = 1.21, p = 0.338$ ; 5 min:  $F_{(1,8)} = 0.72, p = 0.421$ ; 30 min:  $F_{(1,8)} = 0.82, p = 0.392$ ; and 60 min:  $F_{(1,8)} = 5.55, p = 0.046$ ). By contrast, HFS did not induce a significant phase shift in  $A\beta_{25-35}$ -injected animals ( $F_{(3,16)} = 1.03, p = 0.4073$ ; 5 min:  $F_{(1,8)} = 2.75, p = 0.136$ ; 30 min:  $F_{(1,8)} = 0.92, p = 0.366$ ; and 60 min:  $F_{(1,8)} = 0.25, p = 0.631$ ).

#### 4. Discussion

This experiment's main findings were that, even though intrahippocampal microinjection of soluble species of  $A\beta$  did not change basal transmission, it significantly affected several other properties of cCA3-to-CA1 synapses: (1)  $A\beta_{1-40}$  enhanced basal synaptic variability significantly more than other treatments did but impaired HFS-induced variability increase; (2)  $A\beta_{25-35}$  injection significantly increased gamma and HFO1 band relative PSD; (3) both soluble amyloid beta peptides ( $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$ ) impaired HFS-induced LTP; and (4)  $A\beta_{1-40}$  injection induced a significant  $\gamma$  amplitude-modulating  $\theta$  phase shift ( $\sim 122^\circ$ ) but, as  $A\beta_{25-35}$  did, impaired the occurrence of a HFS-induced phase shift.

$A\beta$  peptides have been repeatedly highlighted as crucial AD pathogenetic initiators. Although the underlying mechanism is not yet fully understood, some studies have indicated that  $A\beta$  can impair synaptic transmission and plasticity, leading to changes in spine density and, eventually, synaptic pruning [69–71]. We have found that intrahippocampal microinjection of soluble  $A\beta$  in anaesthetized rats affected cCA3-CA1 synapse variability and impaired long-term synaptic plasticity. Overall, such results concur with those of other studies, which have shown that high  $A\beta$  oligomer concentration interferes with synaptic efficiency and plasticity [61, 62, 72]. There is a mild increase in fEPSP slope variability after intrahippocampal injection of the vehicle. A similar effect has been observed in other types of *in vivo* preparations [73, 74], possibly due to a mechanical and osmotic effect of the saline solution. Another possibility of that change may involve methylene blue; however, the toxic effects of this molecule *in vitro* have been reported at concentrations higher than 100  $\mu\text{M}$  (around ten times our preparation) [75, 76]. Methylene blue might inhibit  $A\beta$  oligomerization in a dose-dependent manner (ranging from 0.01 to 445  $\mu\text{M}$ ), but that effect is observed only after several days of incubation (4 to 8 days) [77]. We found that injection of  $A\beta_{1-40}$ , but not  $A\beta_{25-35}$ , induces significant increases in variability in cCA3-to-CA1 synaptic responses without significant changes in fEPSP slope. In agreement with our results, several *in vivo* studies found that the injection of different amyloid species did not affect hippocampal baseline synaptic potential amplitude or slope [60, 74, 78]. Synaptic variability is determined, among many factors, by presynaptic axonal noise, as well as release probability fluctuations [79]. On the one hand,  $A\beta_{1-42}$  has been found to induce spike widening, which would increase synaptic release due to increased calcium influx into presynaptic boutons [80];  $A\beta_{25-35}$  has also been reported to produce spike broadening, but using doses one order of magnitude higher than the one used in our experiment [81]. On the other hand,  $A\beta_{1-42}$  oligomers depress release probability

at CA3-CA1 synapses [82]; moreover, glutamatergic synaptic transmission could be either enhanced or reduced by  $A\beta_{1-40}$ , depending on its concentration and the specific pyramidal cell type affected [44]. Such opposing mechanisms could explain the observed  $A\beta_{1-40}$ -induced synaptic variability increase, without significant changes in average fEPSP slope. It is plausible that the  $A\beta_{25-35}$  concentration we used was not enough to induce significant changes in synaptic variability (however, it did affect other synaptic and network properties).

Although neither  $A\beta$ -intra-hippocampal injection nor HFS induced significant CA1 global power spectrum changes (Suppl. Tables 3 and 4), specific frequency band rPSD computation evidenced that injection with  $A\beta_{25-35}$ , but not  $A\beta_{1-40}$  nor HFS, induced a significant  $\gamma$  and HFO<sub>1</sub> relative power increase. Transient (about 100 s) increases in  $\gamma$  and  $\theta$  spectral power have been recorded in freely behaving adult rats' hippocampus immediately after LTP induction [32]. In the present experiment, such early PSD changes in control subjects were not detected given the 5 min window in our PSD analysis algorithm, which was not designed to detect short-lived changes.

Both  $\gamma$  oscillations and ripples (140–200 Hz) in the CA1 hippocampal region depend critically on the fast-spiking activity of parvalbumin- (PV-) expressing basket cells [83].  $A\beta$  oligomers have been shown to directly interact with receptor tyrosine-protein kinase erbB-4, increasing its phosphorylation state [84]; erbB-4 activation increases PV interneuron-dependent oscillatory activity [85]. PV interneurons' increased activity, which has been described during early stages of AD models in association with subtle cognitive deficits [86, 87], seems to represent an initial adaptive response to  $A\beta$  oligomer deposition, which is followed later by PV interneuron dysfunction and more severe cognitive deficits [7, 88]. It is plausible that  $A\beta_{25-35}$  has more affinity than  $A\beta_{1-40}$  for erbB-4.

It has been found that  $\gamma$  band (25–120 Hz) activity increases in close association with locomotor behaviour [89, 90], working memory [91], and memory replay [92]. Hippocampal oscillations at frequencies higher than 100 Hz, also known as ripples (140–200 Hz), have been described to have several implications in cognitive processes [93]. In fact, ripples have been associated with learning and memory consolidation in humans and animals [94–97]. The observed soluble  $A\beta$  species-induced modifications in  $\gamma$  band and ripple oscillations in neural circuits are, therefore, associated with synaptic dysfunction and cognitive impairments [47, 98–100].

Both  $A\beta$  species used in our experiment ( $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$ ) impaired HFS-induced LTP in cCA3-to-CA1 synapses. This deleterious effect has been extensively reported, and many possible underlying mechanisms have been identified; among them, those pointing towards excitatory/inhibitory imbalance are relevant to our findings.  $A\beta$ -induced calcium dyshomeostasis underlies distorted synaptic transmission, plasticity, and oscillatory activity in the brain. However, depending on exposure time, brain region, oligomer type, and receptor subunits involved, soluble amyloid has been reported not only to inhibit calcium

influx through NMDA receptors in cultured hippocampal [101] or cortical neurons [102] but also to increase NMDA-mediated calcium influx in mouse brains *in vivo* [103]. In addition, deleterious effects of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{1-40}$  on NMDA function and LTP are reverted by a specific GLUN2B receptor antagonist [104]. Acute *in vivo* and *ex vivo*  $A\beta_{1-42}$  administration deteriorates GABA<sub>B</sub>-mediated inhibitory transmission in CA3-to-CA1 synapses and impairs HFS-induced LTP of excitatory [48] as well as inhibitory potentials [105], and such effects are reverted by pharmacological activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (GirK) channels.  $A\beta_{25-35}$  has been found to act *ex vivo* as a GirK channel antagonist in CA3 pyramidal neurons [22].  $A\beta$ -induced malfunction of NMDA and GirK channel conductance in pyramidal neurons might contribute, along with PV interneuron dysfunction, to hippocampal network instability, manifested through LTP impairment and aberrant rhythm generation, which may underlie subtle cognitive derailments observed during early AD stages.

Intrahippocampal injection of  $A\beta_{1-40}$  significantly shifted the resulting angle from the average  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC vector. In vehicle-injected subjects, HFS induced a significant phase shift of the average  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC vector persisting up to 60 min. Besides impairing HFS-induced LTP, both  $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{1-40}$  blocked the phase shift of the average  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC vector, with the  $A\beta_{25-35}$  effect persisting longer. Increases in  $\theta$ -to- $\gamma$  coupling have been described in freely behaving rats after HFS-induced LTP; in that experiment, acute  $A\beta_{1-42}$  treatment not only impaired LTP but also diminished  $\theta$ -to- $\gamma$  coupling [40].  $\theta$ -nested  $\gamma$  oscillations in CA1 depend on out-of-phase firing sequences of PV interneurons, pyramidal cells, somatostatin-positive (SST) neurons, and CA3-activated feedforward inhibitory interneurons during population  $\theta$  oscillations, eventually opening windows for synaptic plasticity during specific  $\theta$  phases [106]. Perisomatic inhibition by PV interneurons, associated with temporal silencing of feedforward inhibition acted by SST interneurons, allows calcium spike-associated plasticity; conversely, dendritic inhibition by feedforward interneurons prevents calcium spikes but facilitates pyramidal neuron output [106, 107]. Phase synchronization of firing in such a network depends on the relative contribution of PV ( $\gamma$  band) and SST ( $\theta$  band) interneurons [108]; therefore,  $\theta$ -to- $\gamma$  coupling phase shift represents specific variations in such contributions. The observed  $A\beta$  injection-induced phase shift, as well as the impairment of HFS-induced phase shifts, may be due to its effect on PV interneurons [84, 85, 106] and on SST interneurons [108]. There may also be pyramidal cell contribution to such network dysfunction; in fact,  $A\beta_{25-35}$  reduces GABA<sub>B</sub>-dependent GirK channel activity in pyramidal neurons [22]; this may enhance excitatory pyramidal cell influence on PV and SST interneurons, which would further destabilize the network. Interestingly, in a recent clinical study, restoration of temporal cortex  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC was associated with working memory performance improvement in older adults [109].

## 5. Conclusions

The present study results indicate that changes in the functional relationships between  $\theta$ ,  $\gamma$ , and ripple oscillatory network activity in the hippocampus are highly correlated with amyloid-induced synaptic plasticity dysfunction in a model of early amyloid- $\beta$  pathology (similar to what has been reported in early AD stages). Taken together, these results show that intrahippocampal microinjection of soluble forms of  $A\beta$  affects synaptic variability and plasticity and modifies neural processing and network activity, changes that might underlie cognitive deficits observed in early AD models.  $A\beta$ -induced derailment of the tight functional relationship in hippocampal circuits between  $\theta$  oscillation (controlled by SST interneurons as well as by medial septum and entorhinal cortex inputs) and  $\gamma$  activity (controlled by PV interneurons) implies a dysregulation of the crosstalk of cholinergic, glutamatergic, and GABAergic systems during early AD stages, leading to impaired information processing and encoding. Therefore, the abnormality in  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC hereby described is worth evaluating as a putative early biomarker of  $A\beta$ -induced synaptic dysfunction in AD, long before neurodegeneration is established.

AD is a chronic and complex neurological disorder that involves several mechanisms (i.e., neuroinflammation and oxidative stress) additional to amyloid pathology. For that reason, it is important to start considering the role of  $\theta$ -to- $\gamma$  PAC in behavioural models of AD that involve tauopathy and selective chronic neurodegeneration, as well as to test it in further clinical trials through noninvasive electrophysiological methods in patients with mild cognitive impairment and major neurocognitive disorder.

## Data Availability

Additional data set can be sent by request. Detailed information of methods and results are included in Supplementary Materials.

## Disclosure

A preliminary version of this work was presented as a poster in the Joint Meeting of International Brain Research Organization & Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Authors' Contributions

Mauricio O. Nava-Mesa and Alejandro Múnica contributed equally to this work.

## Acknowledgments

We thank Jeremy Allen, PhD, from Edanz Group (<http://www.edanzediting.com/ac>) and Tim Hiley for editing a draft of this manuscript. This work was supported by the

Colombian Science and Technology Institute (COLCIENCIAS, project code: 122265840550, CT-160-2015), Universidad del Rosario, and Universidad Nacional de Colombia.

## Supplementary Materials

This section includes supplementary methods and supplementary data (Supplementary Tables 1–4). (*Supplementary Materials*)

## References

- [1] M. Goedert and M. G. Spillantini, "A century of Alzheimer's disease," *Science*, vol. 314, no. 5800, pp. 777–781, 2006.
- [2] L. V. Colom, "Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 96, no. 3, pp. 609–623, 2006.
- [3] J. J. Palop and L. Mucke, "Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 17, no. 12, pp. 777–792, 2016.
- [4] R. W. Van Hooren, J. M. Riphagen, H. I. Jacobs, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, "Inter-network connectivity and amyloid-beta linked to cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: a longitudinal cohort study," *Alzheimer's Research & Therapy*, vol. 10, no. 1, p. 88, 2018.
- [5] F. C. Quevenco, S. J. Schreiner, M. G. Preti et al., "GABA and glutamate moderate beta-amyloid related functional connectivity in cognitively unimpaired old-aged adults," *NeuroImage: Clinical*, vol. 22, article 101776, 2019.
- [6] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure," *Science*, vol. 298, no. 5594, pp. 789–791, 2002.
- [7] L. Verret, E. O. Mann, G. B. Hang et al., "Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model," *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 708–721, 2012.
- [8] M. O. Nava-Mesa, L. Jiménez-Díaz, J. Yajeya, and J. D. Navarro-Lopez, "GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, p. 167, 2014.
- [9] L.-B. Gao, X.-F. Yu, Q. Chen, and D. Zhou, "Alzheimer's disease therapeutics: current and future therapies," *Minerva Medica*, vol. 107, no. 2, pp. 108–113, 2016.
- [10] R. J. Caselli, T. G. Beach, D. S. Knopman, and N. R. Graff-Radford, "Alzheimer disease: scientific breakthroughs and translational challenges," *Presented at the Mayo Clinic Proceedings*, vol. 92, no. 6, pp. 978–994, 2017.
- [11] T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara, "Visualization of A $\beta$ 42 (43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42 (43)," *Neuron*, vol. 13, no. 1, pp. 45–53, 1994.
- [12] A. Guntert, H. Döbeli, and B. Bohrmann, "High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain," *Neuroscience*, vol. 143, no. 2, pp. 461–475, 2006.
- [13] L. Millucci, L. Ghezzi, G. Bernardini, and A. Santucci, "Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25–35," *Current Protein and Peptide Science*, vol. 11, no. 1, pp. 54–67, 2010.
- [14] C. J. Pike, A. J. Walencewicz-Wasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe, and C. W. Cotman, "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity," *Journal of Neurochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 253–265, 1995.
- [15] I. Kaneko, K. Morimoto, and T. Kubo, "Drastic neuronal loss in vivo by  $\beta$ -amyloid racemized at Ser 26 residue: conversion of non-toxic [D-Ser 26]  $\beta$ -amyloid 1–40 to toxic and proteinase-resistant fragments," *Neuroscience*, vol. 104, no. 4, pp. 1003–1011, 2001.
- [16] M. Gruden, T. Davudova, M. Mališauskas et al., "Autoimmune responses to amyloid structures of A $\beta$ <sub>(25–35)</sub> peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease," *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 18, no. 2, pp. 165–171, 2004.
- [17] S. Varadarajan, J. Kanski, M. Aksenova, C. Lauderback, and D. A. Butterfield, "Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$  (1–42) and A $\beta$  (25–35)," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, no. 24, pp. 5625–5631, 2001.
- [18] A. R. Korotzer, E. R. Whittemore, and C. W. Cotman, "Differential regulation by  $\beta$ -amyloid peptides of intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration in cultured rat microglia," *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, vol. 288, no. 2, pp. 125–130, 1995.
- [19] H. Hiruma, T. Katakura, S. Takahashi, T. Ichikawa, and T. Kawakami, "Glutamate and amyloid  $\beta$ -protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms," *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 26, pp. 8967–8977, 2003.
- [20] R. Röncke, A. Klemm, J. Meinhardt, U. H. Schröder, M. Fändrich, and K. G. Reymann, "A $\beta$  mediated diminution of MTT reduction—an artefact of single cell culture?," *PLoS One*, vol. 3, no. 9, article e3236, 2008.
- [21] H. Moreno, W. E. Wu, T. Lee et al., "Imaging the A $\beta$ -related neurotoxicity of Alzheimer disease," *Archives of Neurology*, vol. 64, no. 10, pp. 1467–1477, 2007.
- [22] M. O. Nava-Mesa, L. Jiménez-Díaz, J. Yajeya, and J. D. Navarro-Lopez, "Amyloid- $\beta$  induces synaptic dysfunction through G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in the fimbria-CA3 hippocampal synapse," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 7, p. 117, 2013.
- [23] F. Sotty, M. Danik, F. Manseau, F. Laplante, R. Quirion, and S. Williams, "Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity," *The Journal of Physiology*, vol. 551, no. 3, pp. 927–943, 2009.
- [24] E. C. Fuchs, A. R. Zivkovic, M. O. Cunningham et al., "Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior," *Neuron*, vol. 53, no. 4, pp. 591–604, 2007.
- [25] G. Buzsáki and A. Draguhn, "Neuronal oscillations in cortical networks," *Science*, vol. 304, no. 5679, pp. 1926–1929, 2004.
- [26] O. Jensen and L. L. Colgin, "Cross-frequency coupling between neuronal oscillations," *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 11, no. 7, pp. 267–269, 2007.
- [27] F. P. Battaglia, K. Benchenane, A. Sirota, C. M. Pennartz, and S. I. Wiener, "The hippocampus: hub of brain network communication for memory," *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 15, no. 7, pp. 310–318, 2011.

- [28] A. Gruart, M. D. Muñoz, and J. M. Delgado-García, "Involvement of the CA3–CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 4, pp. 1077–1087, 2006.
- [29] A. Gruart and J. M. Delgado-García, "Activity-dependent changes of the hippocampal CA3–CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice," *Genes, Brain and Behavior*, vol. 6, no. s1, pp. 24–31, 2007.
- [30] J. M. Muñoz-Cabrera, A. G. Sandoval-Hernández, A. Niño et al., "Bexarotene therapy ameliorates behavioral deficits and induces functional and molecular changes in very-old triple transgenic mice model of Alzheimer's disease," *PLoS One*, vol. 14, no. 10, article e0223578, 2019.
- [31] R. T. Wicks, M. R. Witcher, D. E. Couture et al., "Hippocampal CA1 and CA3 neural recording in the human brain: validation of depth electrode placement through high-resolution imaging and electrophysiology," *Neurosurgical Focus*, vol. 49, no. 1, article E5, 2020.
- [32] A. Bikbaev and D. Manahan-Vaughan, "Relationship of hippocampal theta and gamma oscillations to potentiation of synaptic transmission," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 2, no. 1, pp. 56–63, 2008.
- [33] A. Bikbaev and D. Manahan-Vaughan, "Metabotropic glutamate receptor, mGlu5, regulates hippocampal synaptic plasticity and is required for tetanisation-triggered changes in theta and gamma oscillations," *Neuropharmacology*, vol. 115, pp. 20–29, 2017.
- [34] D. Habib, C. K. Tsui, L. G. Rosen, and H. C. Dringenberg, "Occlusion of low-frequency-induced, heterosynaptic long-term potentiation in the rat hippocampus in vivo following spatial training," *Cerebral Cortex*, vol. 24, no. 11, pp. 3090–3096, 2014.
- [35] M. J. Jutras, P. Fries, and E. A. Buffalo, "Oscillatory activity in the monkey hippocampus during visual exploration and memory formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 32, pp. 13144–13149, 2013.
- [36] F. Peña-Ortega, "Amyloid beta-protein and neural network dysfunction," *Journal of Neurodegenerative Diseases*, vol. 2013, Article ID 657470, 8 pages, 2013.
- [37] V. Nimrich, A. Draguhn, and N. Axmacher, "Neuronal network oscillations in neurodegenerative diseases," *Neuromolecular Medicine*, vol. 17, no. 3, pp. 270–284, 2015.
- [38] J. Wang, Y. Fang, X. Wang, H. Yang, X. Yu, and H. Wang, "Enhanced gamma activity and cross-frequency interaction of resting-state electroencephalographic oscillations in patients with Alzheimer's disease," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 9, p. 243, 2017.
- [39] R. Goutagny, N. Gu, C. Cavanagh et al., "Alterations in hippocampal network oscillations and theta–gamma coupling arise before A $\beta$  overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease," *European Journal of Neuroscience*, vol. 37, no. 12, pp. 1896–1902, 2013.
- [40] A. N. Kalweit, H. Yang, J. Colitti-Klausnitzer et al., "Acute intracerebral treatment with amyloid-beta (1–42) alters the profile of neuronal oscillations that accompany LTP induction and results in impaired LTP in freely behaving rats," *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 9, p. 103, 2015.
- [41] I. Sánchez-Rodríguez, S. Temprano-Carazo, A. Nájera et al., "Activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (Kir 3/Gir K) channels rescues hippocampal functions in a mouse model of early amyloid- $\beta$  pathology," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [42] A. N. Kalweit, B. Amanpour-Gharaei, J. Colitti-Klausnitzer, and D. Manahan-Vaughan, "Changes in neuronal oscillations accompany the loss of hippocampal LTP that occurs in an animal model of psychosis," *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 11, p. 36, 2017.
- [43] J. Santos-Torres, A. Fuente, J. M. Criado, A. S. Riobos, M. Heredia, and J. Yajeya, "Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid  $\beta$ -peptide in the medial septum," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 85, no. 3, pp. 634–648, 2007.
- [44] Y. Wang, T. H. Zhou, Z. Zhi, A. Barakat, L. Hlatky, and H. Querfurth, "Multiple effects of  $\beta$ -amyloid on single excitatory synaptic connections in the PFC," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 7, p. 129, 2013.
- [45] S. Ashenafi, A. Fuente, J. Criado, A. Riobos, M. Heredia, and J. Yajeya, " $\beta$ -Amyloid peptide 25–35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala 'in vitro,'" *Neurobiology of Aging*, vol. 26, no. 4, pp. 419–428, 2005.
- [46] J. J. Palop and L. Mucke, "Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks," *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 7, pp. 812–818, 2010.
- [47] A. I. Gutiérrez-Lerma, B. Ordaz, and F. Peña-Ortega, "Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro," *International Journal of Peptides*, vol. 2013, Article ID 328140, 11 pages, 2013.
- [48] I. Sánchez-Rodríguez, S. Djebari, S. Temprano-Carazo et al., "Hippocampal long-term synaptic depression and memory deficits induced in early amyloidopathy are prevented by enhancing G-protein-gated inwardly-rectifying potassium channel activity," *Journal of Neurochemistry*, vol. 153, no. 3, pp. 362–376, 2020.
- [49] C. Kilkenny, W. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, and D. G. Altman, "Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines," *British Journal of Pharmacology*, vol. 160, no. 7, pp. 1577–1579, 2010.
- [50] J. Charan and N. Kantharia, "How to calculate sample size in animal studies?," *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, vol. 4, no. 4, pp. 303–306, 2013.
- [51] K. Hara and R. A. Harris, "The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 94, no. 2, pp. 313–318, 2002.
- [52] M. P. Sceniak and M. B. Mac Iver, "Cellular actions of urethane on rat visual cortical neurons in vitro," *Journal of Neurophysiology*, vol. 95, no. 6, pp. 3865–3874, 2006.
- [53] R. Kramis, C. H. Vanderwolf, and B. H. Bland, "Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital," *Experimental Neurology*, vol. 49, no. 1, pp. 58–85, 1975.
- [54] G. Paxinos and C. Watson, *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*, Academic, New York, NY, USA, 1998.
- [55] S. Zandieh, R. Hopf, H. Redl, and M. G. Schlag, "The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat," *Spinal Cord*, vol. 41, no. 1, pp. 16–22, 2003.
- [56] C. Morgan, M. Colombres, M. T. Nuñez, and N. C. Inestrosa, "Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease," *Progress in Neurobiology*, vol. 74, no. 6, pp. 323–349, 2004.

- [57] L. Millucci, R. Raggiaschi, D. Franceschini, G. Terstappen, and A. Santucci, "Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A $\beta$  (25–35) peptide," *Journal of Biosciences*, vol. 34, no. 2, pp. 293–303, 2009.
- [58] F. Peña, B. Ordaz, H. Balleza-Tapia et al., "Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase," *Hippocampus*, vol. 20, no. 1, pp. 78–96, 2010.
- [59] R. N. Leão, L. V. Colom, L. Borgius, O. Kiehn, and A. Fisahn, "Medial septal dysfunction by A $\beta$ -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons," *Neurobiology of Aging*, vol. 33, no. 9, pp. 2046–2061, 2012.
- [60] A. W. Schmid, M. A. Lynch, and C. E. Herron, "The effects of IL-1 receptor antagonist on beta amyloid mediated depression of LTP in the rat CA1 in vivo," *Hippocampus*, vol. 19, no. 7, pp. 670–676, 2009.
- [61] A. V. Goryacheva, S. V. Kruglov, M. G. Pshennikova et al., "Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain," *Nitric Oxide*, vol. 23, no. 4, pp. 289–299, 2010.
- [62] S. Hajipour, A. Sarkaki, Y. Farbood, A. Eidi, P. Mortazavi, and Z. Valizadeh, "Effect of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies," *Basic and Clinical Neuroscience*, vol. 7, no. 2, pp. 97–106, 2016.
- [63] M. Y. Stepanichev, A. Ivanov, N. Lazareva, and N. Gulyaeva, "Neurodegenerative changes induced by injection of  $\beta$ -amyloid peptide fragment (25–35) in hippocampus are associated with NGF-signalling activation," *Bulletin of Russian State Medical University*, vol. 1, no. 1, 2016.
- [64] M. Le Van Quyen and A. Bragin, "Analysis of dynamic brain oscillations: methodological advances," *Trends in Neurosciences*, vol. 30, no. 7, pp. 365–373, 2007.
- [65] J. M. Lilly and S. C. Olhede, "Generalized Morse wavelets as a superfamily of analytic wavelets," *IEEE Transactions on Signal Processing*, vol. 60, no. 11, pp. 6036–6041, 2012.
- [66] A. B. Tort, R. Komorowski, H. Eichenbaum, and N. Kopell, "Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies," *Journal of Neurophysiology*, vol. 104, no. 2, pp. 1195–1210, 2010.
- [67] A. Trujillo-Ortiz and R. Hernandez-Walls, *Levene test: Levene's test for homogeneity of variances*, 2003, <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3375-levenetest> MATLAB Central File Exchange.
- [68] P. Berens, "Circ Stat: a MATLAB toolbox for circular statistics," *Journal of Statistical Software*, vol. 31, no. 10, pp. 1–21, 2009.
- [69] H. Hsieh, J. Boehm, C. Sato et al., "AMPA removal underlies A $\beta$ -induced synaptic depression and dendritic spine loss," *Neuron*, vol. 52, no. 5, pp. 831–843, 2006.
- [70] G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, and B. L. Sabatini, "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway," *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 11, pp. 2866–2875, 2007.
- [71] W. Wei, L. N. Nguyen, H. W. Kessels, H. Hagiwara, S. Sisodia, and R. Malinow, "Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity," *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 2, pp. 190–196, 2010.
- [72] J. J. Palop and L. Mucke, "Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin?," *Neuromolecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 48–55, 2010.
- [73] K. J. Thompson, M. L. Mata, J. E. Orfila, E. J. Barea-Rodriguez, and J. L. Martinez Jr., "Metabotropic glutamate receptor antagonist AIDA blocks induction of mossy fiber-CA3 LTP in vivo," *Journal of Neurophysiology*, vol. 93, no. 5, pp. 2668–2673, 2005.
- [74] A. W. Schmid, D. B. Freir, and C. E. Herron, "Inhibition of LTP in vivo by beta-amyloid peptide in different conformational states," *Brain Research*, vol. 1197, pp. 135–142, 2008.
- [75] L. Vutskits, A. Briner, P. Klauser et al., "Adverse effects of methylene blue on the central nervous system," *Anesthesiology*, vol. 108, no. 4, pp. 684–692, 2008.
- [76] M. Oz, D. E. Lorke, M. Hasan, and G. A. Petroianu, "Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system," *Medicinal Research Reviews*, vol. 31, no. 1, pp. 93–117, 2011.
- [77] M. Necula, L. Breydo, S. Milton et al., "Methylene blue inhibits amyloid A $\beta$  oligomerization by promoting fibrillization," *Biochemistry*, vol. 46, no. 30, pp. 8850–8860, 2007.
- [78] D. B. Freir, D. A. Costello, and C. E. Herron, "A $\beta$ 25–35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil," *Journal of Neurophysiology*, vol. 89, no. 6, pp. 3061–3069, 2003.
- [79] A. Neishabouri and A. A. Faisal, "Axonal noise as a source of synaptic variability," *PLoS Computational Biology*, vol. 10, no. 5, p. e1003615, 2014.
- [80] F. Scala, S. Fusco, C. Ripoli et al., "Intraneuronal A $\beta$  accumulation induces hippocampal neuron hyperexcitability through A-type K<sup>+</sup> current inhibition mediated by activation of caspases and GSK-3," *Neurobiology of Aging*, vol. 36, no. 2, pp. 886–900, 2015.
- [81] H. Yin, H. Wang, H. Zhang, N. Gao, T. Zhang, and Z. Yang, "Resveratrol attenuates A $\beta$ -induced early hippocampal neuron excitability impairment via recovery of function of potassium channels," *Neurotoxicity Research*, vol. 32, no. 3, pp. 311–324, 2017.
- [82] Y. He, M. Wei, Y. Wu et al., "Amyloid  $\beta$  oligomers suppress excitatory transmitter release via presynaptic depletion of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate," *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, pp. 1–18, 2019.
- [83] D. Schlingloff, S. Káli, T. F. Freund, N. Hájos, and A. I. Gulyás, "Mechanisms of sharp wave initiation and ripple generation," *Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 34, pp. 11385–11398, 2014.
- [84] H. Zhang, L. Zhang, D. Zhou et al., "Ablating ErbB4 in PV neurons attenuates synaptic and cognitive deficits in an animal model of Alzheimer's disease," *Neurobiology of Disease*, vol. 106, pp. 171–180, 2017.
- [85] R. H. Andersson, A. Johnston, P. A. Herman et al., "Neuregulin and dopamine modulation of hippocampal gamma oscillations is dependent on dopamine D4 receptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 32, pp. 13118–13123, 2012.
- [86] S. Hijazi, T. S. Heistek, P. Scheltens et al., "Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease," *Molecular Psychiatry*, vol. 25, no. 12, pp. 3380–3398, 2020.
- [87] J.-O. Hollnagel, S. Elzoheiry, K. Gorgas et al., "Early alterations in hippocampal perisomatic GABAergic synapses

- and network oscillations in a mouse model of Alzheimer's disease amyloidosis," *PLoS One*, vol. 14, no. 1, article e0209228, 2019.
- [88] E. Verdaguer, S. Brox, D. Petrov et al., "Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis," *Experimental Gerontology*, vol. 69, pp. 176–188, 2015.
- [89] G. Buzsáki and C. H. Vanderwolf, "Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat," *Brain Research Reviews*, vol. 6, no. 2, pp. 139–171, 1983.
- [90] C. Kemere, M. F. Carr, M. P. Karlsson, and L. M. Frank, "Rapid and continuous modulation of hippocampal network state during exploration of new places," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e73114, 2013.
- [91] J. Yamamoto, J. Suh, D. Takeuchi, and S. Tonegawa, "Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations," *Cell*, vol. 157, no. 4, pp. 845–857, 2014.
- [92] M. F. Carr, M. P. Karlsson, and L. M. Frank, "Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay," *Neuron*, vol. 75, no. 4, pp. 700–713, 2012.
- [93] M. T. Kucewicz, J. Cimbalnik, J. Y. Matsumoto et al., "High frequency oscillations are associated with cognitive processing in human recognition memory," *Brain*, vol. 137, no. 8, pp. 2231–2244, 2014.
- [94] N. Axmacher, C. E. Elger, and J. Fell, "Ripples in the medial temporal lobe are relevant for human memory consolidation," *Brain*, vol. 131, no. 7, pp. 1806–1817, 2008.
- [95] G. Girardeau, K. Benchenane, S. I. Wiener, G. Buzsáki, and M. B. Zugaro, "Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory," *Nature Neuroscience*, vol. 12, no. 10, pp. 1222–1223, 2009.
- [96] W. Ramadan, O. Eschenko, and S. J. Sara, "Hippocampal sharp wave/ripples during sleep for consolidation of associative memory," *PLoS One*, vol. 4, no. 8, article e6697, 2009.
- [97] G. Girardeau and M. Zugaro, "Hippocampal ripples and memory consolidation," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 21, no. 3, pp. 452–459, 2011.
- [98] J. E. Driver, C. Racca, M. O. Cunningham et al., "Impairment of hippocampal gamma ( $\gamma$ )-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP)," *European Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 5, pp. 1280–1288, 2007.
- [99] V. Villette, F. Poindessous-Jazat, A. Simon et al., "Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated oscillations after hippocampal amyloid-pathology in the rat," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 33, pp. 10991–11003, 2010.
- [100] F. Peña-Ortega and R. Bernal-Pedraza, "Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations," *International Journal of Peptides*, vol. 2012, Article ID 236289, 8 pages, 2012.
- [101] D. Gavello, C. Calorio, C. Franchino et al., "Early alterations of hippocampal neuronal firing induced by Abeta 42," *Cerebral Cortex*, vol. 28, no. 2, pp. 433–446, 2018.
- [102] I. Ferreira, L. Bajouco, S. Mota, Y. Auberson, C. Oliveira, and A. Rego, "Amyloid beta peptide 1–42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures," *Cell Calcium*, vol. 51, no. 2, pp. 95–106, 2012.
- [103] M. Arbel-Ornath, E. Hudry, J. R. Boivin et al., "Soluble oligomeric amyloid- $\beta$  induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, 2017.
- [104] G. Rammes, F. Seeser, K. Mattusch et al., "The NMDA receptor antagonist radiprodil reverses the synaptotoxic effects of different amyloid-beta ( $A\beta$ ) species on long-term potentiation (LTP)," *Neuropharmacology*, vol. 140, pp. 184–192, 2018.
- [105] I. Sánchez-Rodríguez, A. Gruart, J. M. Delgado-García, L. Jiménez-Díaz, and J. D. Navarro-López, "Role of GIRK channels in long-term potentiation of synaptic inhibition in an in vivo mouse model of early amyloid- $\beta$  pathology," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 5, article 1168, 2019.
- [106] K. Park, J. Lee, H. J. Jang, B. A. Richards, M. M. Kohl, and J. Kwag, "Optogenetic activation of parvalbumin and somatostatin interneurons selectively restores theta-nested gamma oscillations and oscillation-induced spike timing-dependent long-term potentiation impaired by amyloid  $\beta$  oligomers," *BMC Biology*, vol. 18, no. 1, p. 7, 2020.
- [107] B. P. Graham and E. Spera, "On phasic inhibition during hippocampal theta," *Network: Computation in Neural Systems*, vol. 25, no. 1–2, pp. 3–19, 2014.
- [108] H. Chung, K. Park, H. J. Jang, M. M. Kohl, and J. Kwag, "Dissociation of somatostatin and parvalbumin interneurons circuit dysfunctions underlying hippocampal theta and gamma oscillations impaired by amyloid  $\beta$  oligomers in vivo," *Brain Structure and Function*, vol. 225, no. 3, pp. 935–954, 2020.
- [109] R. M. Reinhart and J. A. Nguyen, "Working memory revived in older adults by synchronizing rhythmic brain circuits," *Nature Neuroscience*, vol. 22, no. 5, pp. 820–827, 2019.