

CONTROL CORTICAL DE LA ACTIVIDAD ESTRIATAL

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Fernando Kasanetz

Director de tesis: Dr. Mario Gustavo Murer

Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales, Departamento
de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Buenos Aires

Buenos Aires, Diciembre de 2005.

CONTROL CORTICAL DE LA ACTIVIDAD ESTRIATAL

Miembros del jurado

Dra. Lidia Szczupack, FCEN, UBA

Dr. Pedro Maldonado, Universidad de Chile

Dr. Daniel Calvo, FCEN, UBA

CONTROL CORTICAL DE LA ACTIVIDAD ESTRIATAL

Resumen

El estriado es un núcleo clave dentro del bucle que comprende a la corteza cerebral, a los ganglios de la base y al tálamo. Recibe una masiva inervación, proveniente de casi todas las regiones corticales y del tálamo, que exhibe una delicada organización topográfica. El fruto del procesamiento intra-estriatal es luego transferido al resto de las estructuras que comprenden los ganglios de la base. El potencial de membrana de las neuronas estriatales de proyección (NEMs) registradas in vivo alterna entre dos estados subumbrales preferidos, un estado DOWN (eDOWN) muy polarizado y un estado UP (eUP) cercano al umbral de disparo de potenciales de acción. Dado que las NEMs sólo disparan potenciales de acción cuando alcanzan los eUP, estos eventos son vistos como una ventana de oportunidad para la transferencia de información a través del estriado. La transición al eUP de las NEMs depende de la entrada cortical, y además la oscilación periódica entre estados está dirigida por una actividad lenta sincronizada entre poblaciones de neuronas corticales, típica del sueño lento y de la anestesia, como lo delata la alta correlación entre el potencial de membrana de las NEMs y el electrocorticograma (ECoG). En el presente trabajo se pretende investigar con profundidad el control que la actividad cortical ejerce sobre el potencial de membrana de las NEMs. En primer lugar, se estudió de qué manera impactan en el potencial de membrana de las NEMs las propiedades dinámicas de la actividad de los circuitos corticales, como ser las transiciones entre estados sincronizados y desincronizados, repentinas perturbaciones de la fase de oscilación o episodios de actividad sincrónica a frecuencias altas. Finalmente se analizó en qué medida la fina organización anatómica del sistema córtico-estriatal se expresa en las modulaciones del potencial de membrana de las NEMs. De manera general, los resultados de este trabajo establecen un estricto control cortical sobre las modulaciones de baja frecuencia del potencial de membrana de las NEMs. Más precisamente, los eUP están precisamente alineados en los dominios temporal y espacial con la actividad de ensambles de neuronas corticales. De esta manera, los eUP pueden considerarse representaciones subumbrales de la activación de ensambles de neuronas corticales. Entonces, el disparo de un potencial de acción por una NEM reflejaría un proceso de extracción de información relevante embebida en la señal general originada en ese ensamble cortical.

Palabras clave: sistema córtico-estriatal, neuronas espinosas medianas, estado de activación cortical, potencial de membrana, estado UP

CORTICAL CONTROL OF STRIATAL ACTIVITY

Abstract

The striatum is a key structure of the cortico-basal ganglia-thalamic loop. It receives massive inputs coming from almost the whole cerebral cortex and thalamus, and sends information back to the cortex via other basal ganglia nuclei and thalamus. The membrane potential of striatal projection neurons (MSNs) alternates between two preferred values, a polarized DOWN state and a depolarized UP state during which MSNs remain close to action potential threshold. Because MSNs can only fire action potentials during UP states, the UP state has been perceived as an enabling event that allows the translation of incoming information into action potential firing. It has long been known that transitions to the UP state are induced by cortical input. More recently, it has been reported that the rhythmic nature of MSNs alternation between UP and DOWN states is driven by oscillatory activity in cortical ensembles, as is evident in the high degree of correlation between striatal membrane potential fluctuations and slow wave activity recorded in the electrocorticogram. In the present work we report the fine control exerted by cortical activity on the membrane potential of MSNs. First, we characterized the impact of dynamically changing patterns of cortical activity, like transitions between synchronized and desynchronized activity states, perturbations of the phase of ongoing cortical oscillations and episodes of high frequency cortical oscillatory synchronization, on the MSN membrane potential. Second, we studied how the spatial organization of corticostriatal connections is represented in the subthreshold behavior of MSNs located in different striatal territories. The results of our work demonstrate that cortical activity exerts a strict control of the low frequency modulations of the MSN membrane potential. More specifically, the MSN UP states are precisely aligned in the time and space domains to episodes of persistent activity in cortical ensembles. This way, MSN UP states can be considered subthreshold representations of an active state in a cortical ensemble. Therefore, action potential firing by a MSN may reflect the extraction of relevant information embedded within a more general signal arising from this cortical ensemble.

Key words: corticostriatal system, medium spiny neurons, cortical activated state, membrane potential, up state

Agradecimientos

Al director de la tesis, Gustavo Murer

A Luis Riquelme

A Patricio O`Donnell

A Kuei

A Juan, Mariano, Gregorio y Camila

A Germán, Witek y todos los amigos que coseché en Albany

A mi familia y mis amigos

Para Ceci

Organización del trabajo

A. INTRODUCCION

1. *Consideraciones generales*
 - El Cerebro en movimiento
 - Registrando neuronas *in vivo*.
 - Extrayendo información de la actividad espontánea
2. *Organización anatómico - funcional del Estriado*
 - El estriado forma parte de un bucle que incluye a la corteza, a los Ganglios de la Base (GB) y al tálamo
 - El estriado participa en una variedad de funciones
 - Circuitos neuronales paralelos caracterizan el bucle corteza – GB
 - El estriado se compone de una mayoría de neuronas de proyección y una pequeña cantidad de interneuronas.
 - La distribución de las NEMs en el estriado no es homogénea
 - El estriado transfiere información a los núcleos de salida a través de dos caminos
3. *Organización sináptica del Estriado*
 - Las espinas dendríticas de las NEMs son un sitio de convergencia para las aferencias excitatorias y moduladoras.
 - La organización topográfica de las proyecciones córtico – estriatales sustenta el ordenamiento paralelo.
 - Segregación e integración en los circuitos del bucle corteza – GB - tálamo
 - El patrón de arborización axonal de las proyecciones córtico-estriatales determina que cada NEM dentro de un dominio funcional represente un arreglo de conectividad único
 - Las NEMs establecen una gran cantidad de contactos sinápticos colaterales intra - estriatales.
4. *Fisiología de las Neuronas Espinosas Medianas estriatales*
 - El Vm de las NEMs alterna entre un valor de reposo muy negativo y otro cercano al umbral de disparo.

- La interacción entre propiedades intrínsecas de las NEMs y sus aferencias excitatorias determinaría el curso temporal de los eUP
- Los eUP constituirían ventanas de oportunidad para el disparo de potenciales de acción ante señales aferentes específicas por las NEM

5. *La actividad eléctrica del cerebro es dinámica*

- El patrón de activación cortical predice el estado conductual
- La actividad persistente se observa en muchas estructuras y puede tener diversos mecanismos

B. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I. ¿Son las fluctuaciones estereotipadas entre eUP y eDOWN el único patrón de actividad subumbral que pueden mostrar las NEMs? ¿Cuál será el comportamiento del Vm de las neuronas estriatales durante los episodios de desincronización de la actividad cortical?

II. ¿La respuesta compleja que las NEMs exhiben luego de estimular la corteza cerebral es un reflejo de perturbaciones de fase impuestas sobre la actividad cortical? ¿Es imprescindible un bombardeo sináptico córtico-estriatal constante para sostener a las NEMs en un eUP?

III. ¿Existe una correlación entre la actividad de alta frecuencia del ECoG y las modulaciones de alta frecuencia que se observan en los estados despolarizados de las NEMs?

IV. ¿En qué medida están las transiciones entre eDOWN y eUP de una NEM dirigidas por las aferencias provenientes de territorios neocorticales particulares?

C. METODOLOGÍA

1. *Cuidado y preparación de los animales*

2. *Registros intracelulares de neuronas estriatales*
 - Procedimientos para el registro intracelular de neuronas estriatales
 - Caracterización electrofisiológica de las NEMs
3. *Registro de los electrocorticogramas (ECoG)*
4. *Registro de la actividad multiunitaria cortical*
5. *Protocolos de estimulación eléctrica en el sistema nervioso central*
6. *Análisis de señales electrofisiológicas*
7. *Consideraciones particulares*

D. PRIMER CAPÍTULO: CARACTERÍSTICAS TEMPORALES DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD CORTICAL Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS NEMs.

1. *La desincronización cortical interrumpe la alternancia de estados del Vm de las NEMs.*
2. *El apagado de la actividad persistente cortical detiene los eUP estriatales y produce perturbaciones de fase en la actividad persistente córtico - estriatal.*
3. *Episodios transitorios de correlación a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y la actividad registrada en el ECoG*

E. SEGUNDO CAPÍTULO: CARACTERÍSTICAS ESPACIALES DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD CORTICAL Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS NEMs.

F. CONCLUSIONES GENERALES

G. REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN

1. Consideraciones generales

El cerebro en movimiento

Existen muchas maneras de acercarse al estudio del sistema nervioso central. Seguramente la elección de la metodología a utilizar dependerá de la pregunta que se quiera resolver. No es trivial esa elección, un experimento inadecuado nos llevará irremediablemente a conclusiones erradas, además de a malgastar esfuerzos y recursos. Probablemente una comprensión global y cabal de cómo un organismo hace una representación interna del mundo que lo rodea, predice, contrasta y ejecuta en función de esa representación, requiera de la capacidad que tengamos de integrar conocimientos provenientes de áreas tan diversas como la neuroanatomía, neuroquímica, neurobiología molecular y celular, neurofisiología, neurobiología comportamental, etc.

Reduzcamos esta discusión al campo de la electrofisiología del cerebro de los mamíferos. Supongamos que nos interesa entender las bases celulares del procesamiento de información que ocurre en una estructura determinada del cerebro. Comprender cómo las neuronas se comportan durante procesos sensorio-motores o cognitivos, cómo modifican su actividad a lo largo del ciclo de sueño-vigilia o en los diversos estados de alerta, o cómo responden a cambios de actividad en estructuras relacionadas, requiere sin lugar a dudas de la experimentación con preparaciones que conserven la integridad de los circuitos involucrados.

Este tipo de preparación, que se consigue trabajando *in vivo*, es para quien escribe particularmente fascinante. El potencial de membrana de una neurona y sus potenciales de acción están muy lejos de ser fenómenos estereotipados. Al observar “en línea” una sesión de registro electrofisiológico *in vivo* apreciamos el fantástico dinamismo que caracteriza al sistema nervioso central.

Registrando neuronas in vivo

Dentro de las técnicas de electrofisiología *in vivo* existen enfoques complementarios (Figura A.1). Se puede registrar la actividad de una neurona desde el exterior celular, midiendo el cambio de potencial eléctrico como consecuencia del disparo de potenciales de acción (*Humphrey y Schmidt, 1990*), o de manera intracelular registrando el potencial de membrana con sus correspondientes disparos de potenciales de acción. Por supuesto que los registros intracelulares ofrecen más información, ya que las modulaciones del potencial de membrana son el resultado de la integración que la neurona hace de la actividad sináptica aferente a partir de sus propiedades pasivas y activas. Como producto de esa integración se producirá o no el disparo de potenciales de acción. En cambio a través de los registros extracelulares sólo se obtiene información de la “salida” de la neurona sin conocer cómo fue el proceso de integración. Pero no todo lo que brilla es oro, los registros intracelulares *in vivo* son técnicamente difíciles de realizar. Dada su inestabilidad, requieren de una preparación en que el animal esté inmovilizado, por lo que comúnmente se utilizan sujetos anestesiados. Además, no es frecuente tener éxito en el intento de registrar intracelularmente dos neuronas o más simultáneamente. Entre las ventajas que ofrecen los registros extracelulares se puede enumerar algunas: son factibles de realizar en animales ejecutando tareas conductuales, es posible registrar simultáneamente el disparo de potenciales de acción de más de una neurona (a veces hasta decenas de ellas), y se puede acceder a estructuras que, por razones anatómicas, son poco proclives al registro intracelular.

En complemento de estas técnicas que toman información de la actividad individual de las neuronas, existe otro tipo de registro llamado actividad de campo local. Las características de este tipo de aproximación hacen que se obtenga información acerca de la actividad promedio de una población de neuronas en un volumen determinado alrededor del electrodo. La actividad de campo está establecida por las modulaciones del potencial de membrana de esa población neuronal, y es consecuencia de los potenciales sinápticos y corrientes intrínsecas (*Pedley y Traub, 1990*). Cuando este tipo de registro se realiza colocando electrodos en la superficie cortical se lo llama

electroencefalograma (EEG). Como veremos más adelante, este tipo de actividad suele presentar patrones rítmicos y depende de la arquitectura neuronal de la estructura que se registra. Es necesario conocer las bases celulares de dicha actividad oscilatoria para desentrañar su significado funcional.

Extrayendo información de la actividad espontánea

El objetivo final de este trabajo es aportar a nuestra comprensión de cómo está representada la actividad cortical a nivel de neuronas únicas del estriado, el principal núcleo de entrada de los Ganglios de la Base. Estudiando la correlación entre la actividad de redes de neuronas corticales y de neuronas estriatales aisladas, trataremos de comprender, al menos parcialmente, la computación que se lleva a cabo en la transmisión córtico-estriatal.

En relación con lo antedicho es adecuado hacer algunos comentarios sobre un asunto interesante. Esta tesis pretende estudiar la influencia que la corteza cerebral ejerce sobre las variaciones del potencial de membrana de las neuronas estriatales en animales bajo estado de anestesia. Aquí cabría la siguiente pregunta: ¿qué podemos aprender acerca de la función de un núcleo típicamente asociado a tareas motoras, en un individuo inmóvil, anestesiado? La respuesta estará asociada al significado que le demos a la actividad espontánea. En el pasado, el sistema nervioso ha sido considerado una red de elementos (neuronas) complejamente relacionados, que es llamado a la acción por el mundo exterior, y donde el comportamiento es el resultado de una respuesta ante estímulos sensoriales. En este caso, la actividad cerebral no evocada, es decir no asociada a ningún estímulo externo particular, será considerada simplemente “ruido” que no contiene información alguna (para revisión de estos conceptos ver *Llinás, 2001; Llinás y col, 1998; Engel y col, 2001; Varela y col, 2001*). Esta visión ha sido reemplazada en los últimos tiempos por teorías que postulan al cerebro como un generador de representaciones internas. Estas representaciones son actividad eléctrica intrínsecamente generada a partir de las propiedades de las neuronas y de la capacidad de los circuitos neuronales de oscilar coherentemente aun en ausencia de estímulos externos. La representación interna le otorga al cerebro capacidad predictiva, y a

diferencia del caso anterior, no es dirigida sino modificada por la estimulación sensorial. De esta manera, la predicción (estado interno) es cotejada con la realidad (información sensorial) y modificada en consecuencia (*Llinás, 1988; Llinás y col, 1998; Steriade, 2000; Engel y col, 2001; Varela y col, 2001*). En este contexto, la actividad internamente generada adquiere una dimensión superior a la de “ruido”. Hoy existe evidencia de que la actividad espontánea es un fiel reflejo de la arquitectura funcional de los circuitos neuronales (*Tsodyks y col, 1999; Kenet y col, 2003*), determina cuán receptivo está el cerebro a los estímulos externos, e influye en la calidad de la percepción que de ellos se haga (*Steriade, 2000*). Como veremos más adelante, la organización temporal y espacial de los estados de activación internos estará influenciada por factores diversos como las fases del ciclo sueño-vigilia, la atención o la anestesia misma. En resumen, intentaremos demostrar que a partir de la actividad registrada en un animal anestesiado se puede extraer información acerca de la organización funcional de los circuitos córtico-estriatales y de las posibles bases celulares subyacentes al procesamiento de información en el estriado.

Antes de fundamentar la opción de las aproximaciones utilizadas para responder nuestra pregunta, debemos conocer claramente cuáles son las características ya conocidas de las estructuras involucradas, desde su composición y conexionado hasta su fisiología y fisiopatología. Lo que sigue es una breve revisión acerca de estos puntos, con el único objetivo de ayudar a comprender mejor las generalidades y particularidades del problema en que se enmarca este trabajo.

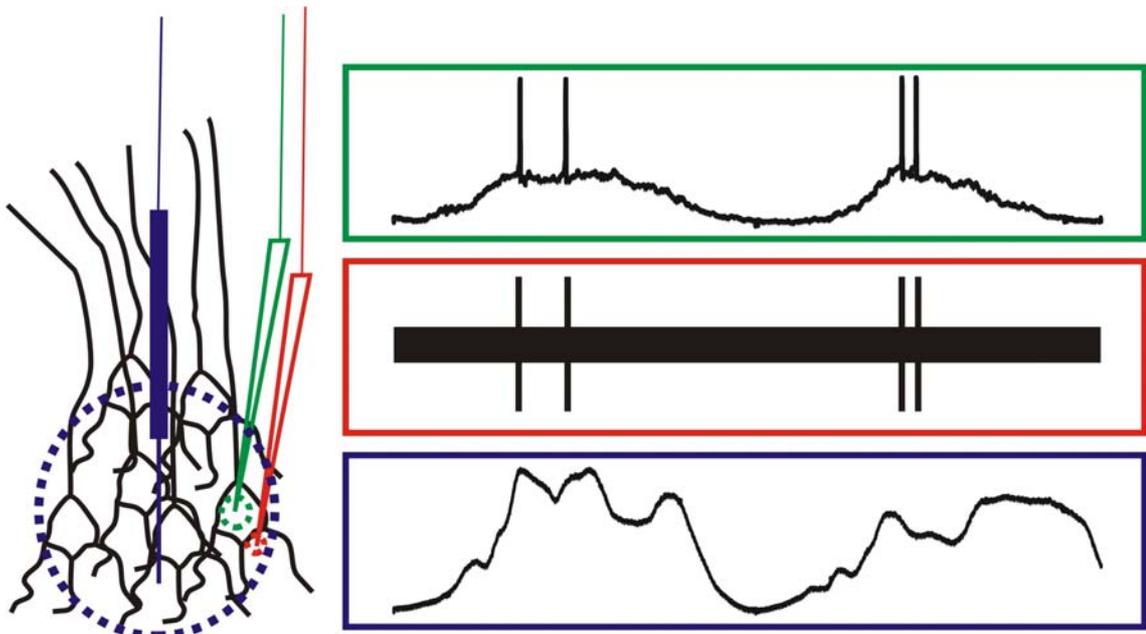


Figura A.1 Diferentes acercamientos electrofisiológicos para el estudio del sistema nervioso in vivo. Los registros intracelulares dan información de los fenómenos sub y supraumbrales que ocurren en una célula única (electrodo y recuadro verde). La actividad unitaria también puede registrarse desde el exterior celular, observándose el disparo de PA (electrodo y recuadro rojo). La actividad poblacional puede medirse como potencial de campo local, con un electrodo de menor resistencia. En este caso se pierde información de fenómenos muy rápidos como son los PA (electrodo y recuadro azul).

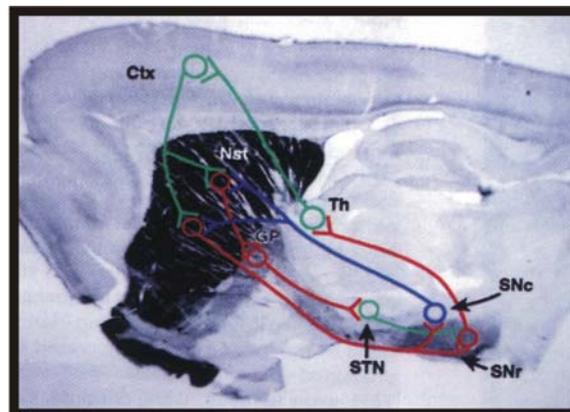


Figura A2. Componentes del bucle corteza GB tálamo corteza. Microfotografía sagital del cerebro de la rata donde se observa al núcleo estriado (st) y su relación con la corteza cerebral (ctx), el tálamo (th) y el resto de los núcleos que componen los GB. GP: Globo Pálido; STN: Núcleo Subtalámico; SNc: Sustancia Negra pars compacta; SNr: Sustancia Negra pars reticulada. Las líneas verdes representan conexiones glutamatérgicas, las rojas GABAérgicas y la azul dopaminérgica.

2. Organización anatómico - funcional del estriado

El estriado forma parte de un bucle que incluye a la corteza cerebral, los Ganglios de la Base y el tálamo

El estriado es la estructura principal de los Ganglios de la Base (GB), término que refiere a una serie de núcleos subcorticales que se encuentran en el prosencéfalo y mesencéfalo de los mamíferos, reptiles y aves. Desde una perspectiva funcional, se puede incluir dentro de los GB, además del núcleo estriado (núcleos caudado y putamen, separados por la cápsula interna en los primates), a los núcleos accumbens, tubérculo olfatorio, globo pálido, pálido ventral, sustancia negra, área tegmental ventral y subtalámico (para revisiones ver *Bolam y col, 2000; Wilson, 2003*), (Figura A.2).

Los GB fueron identificados en el siglo XVII e inicialmente fueron conocidos en forma conjunta como Cuerpo Estriado, debido al entramado de fibras corticales y tallo-cerebrales que los inervan. Adquirieron especial interés debido al rol central que les otorga su disposición anatómica, situándolos como destinatarios de los sistemas de fibras ascendentes y descendentes. Por esta razón fueron considerados como las estructuras responsables de recibir información sensorial y ejecutar los planes motores.

Sin embargo, el sostenido avance en la comprensión de la organización histológica de la corteza cerebral y de su relación con funciones cerebrales superiores corrió a los GB del centro de la atención. Fue recién a comienzos del siglo XX cuando se identificó a los GB como miembros del sistema motor extrapiramidal, y recibieron nuevamente gran interés debido a los trastornos motores asociados a lesiones en los núcleos que los componen. Dicho interés se incrementó en los últimos 50 años a partir de la identificación del rol de neurotransmisor de la dopamina (DA) y del hecho que una disminución de los niveles de DA en el estriado estaría asociada a la sintomatología de la enfermedad de Parkinson (*Hornykiewicz, 1966; Carlsson y col, 1958; Carlsson, 2002*).

Hoy en día es claro que los GB forman parte de un bucle corteza – GB – tálamo – corteza. La corteza cerebral proyecta al estriado (núcleo de entrada),

luego la información es procesada dentro de los circuitos de los GB, y finalmente el bucle se cierra a través de proyecciones que se originan en los núcleos de salida (la Sustancia Negra pars reticulata (SNpr) y el sector interno del Globo Pálido (GPi)) y terminan en estructuras talámicas que están recíprocamente conectadas con la corteza (*Bolam y col, 2000*), (Figura A.3).

El estriado participa en una gran variedad de funciones

Los constantes avances en las técnicas de investigación en los últimos 30 años han mejorado mucho nuestra comprensión de la organización anatómico-funcional de los GB. Estos hallazgos y los que se producen día a día, lejos de esclarecer el papel que el estriado en particular, y los GB en general, juegan en el sistema nervioso, ponen de manifiesto el grado de complejidad que éste alcanza.

El estriado ha dejado de ser una estructura solamente relacionada con funciones motoras. Las neuronas estriatales suelen incrementar su frecuencia de disparo durante alguna de las etapas que componen la realización de una secuencia motora (*DeLong, 1973; Cruchter y DeLong, 1984a, 1984b; Alexander y DeLong, 1985a, b; Romo y col, 1992; Jeager y col, 1995*). En la mayoría de los casos se ha visto que la actividad estriatal se parece a la actividad registrada en distintas zonas de la corteza cerebral. Algunas neuronas se mostraron comprometidas con los aspectos más complejos y abstractos de la tarea, asemejándose a la actividad del área motora suplementaria de la corteza (SMA), mientras que otras los hicieron con la ejecución o con el control momento a momento del movimiento, relacionándose estrechamente con la actividad de las áreas motora primaria o premotora de la corteza.

A pesar de esta estrecha relación entre actividad estriatal y tareas motoras, el rol de las neuronas estriatales parecería ser más complejo. En monos entrenados, la actividad de las neuronas estriatales suele ser distinta según las características de la prueba. La respuesta es diferente si el movimiento es inducido por estimulación sensorial que si es internamente generado (*Schultz y Romo, 1988*), o si es guiado visualmente o por la memoria (*Hikosaka y col, 1989*). Otras neuronas responden en relación a la expectativa por obtener una recompensa (*Hollerman y col., 1998; Tremblay y col., 1998; Watanabe y col., 2003*), y

otras predicen su aparición (*Lauwereyns y col., 2002a,b*). En ratas, la actividad desordenada de grandes grupos de neuronas estriatales ampliamente distribuidas se modifica progresivamente durante el entrenamiento en un laberinto hasta que finalmente se estabiliza de modo que la mayor parte de las neuronas “señala” el comienzo o el fin del procedimiento conductual (hábito) adquirido (*Jog y col, 1999; Barnes y col, 2005*).

La complejidad que muestra la actividad del estriado sugiere que estaría codificando información de manera “dependiente del contexto”, reflejando los mecanismos por los cuales la atención o la motivación acceden finalmente a la acción motora.

Sumado a estas, otras evidencias involucran a los GB en el procesamiento y modulación de información sensorial (*Belforte y col., 2001; Brown y col, 1997*), de la motivación (*Wise, 2002; Baunez y col., 2002*), de la atención y de la cognición (*Knowlton y col, 1996; Hikosaka et al., 2000; Nieoullon, 2002; Packard y Cahill, 2001; Packard y Knowlton, 2002*). Además, si bien las patologías asociadas a los GB (enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, síndrome de Tourette, entre otros) presentan principalmente signos motores, también pueden producir alteraciones de tipo cognitivo (*Albin y col., 1989; Graybiel, 1998; Owen, 2004; Bosboom y col, 2004*). También se ha propuesto un rol para los GB en la adicción a drogas de abuso (*Koob y Nestler, 1997; Everitt y Wolf, 2002; Wise, 2002; Phillips y col., 2003; Baunez y col., 2005*) y en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (*O'Donnell y Grace, 1998; Grace, 2000; Benes, 2000; Winterer y Weinberger, 2004*).

Circuitos neuronales paralelos caracterizan al bucle corteza – GB - tálamo

Casi la totalidad de las áreas corticales extienden proyecciones sobre el estriado, y de esta manera los GB son incorporados a diversos circuitos neuronales que procesan información de diferentes modalidades. Esto explica en parte la gran variedad de funciones en que están involucrados. Sin embargo, para entender la manera en que esta información se procesa, debemos tener en cuenta la arquitectura funcional del sistema. El bucle corteza – GB – tálamo – corteza se puede descomponer en varios circuitos neuronales paralelos sobre la base del conexionado anatómico.

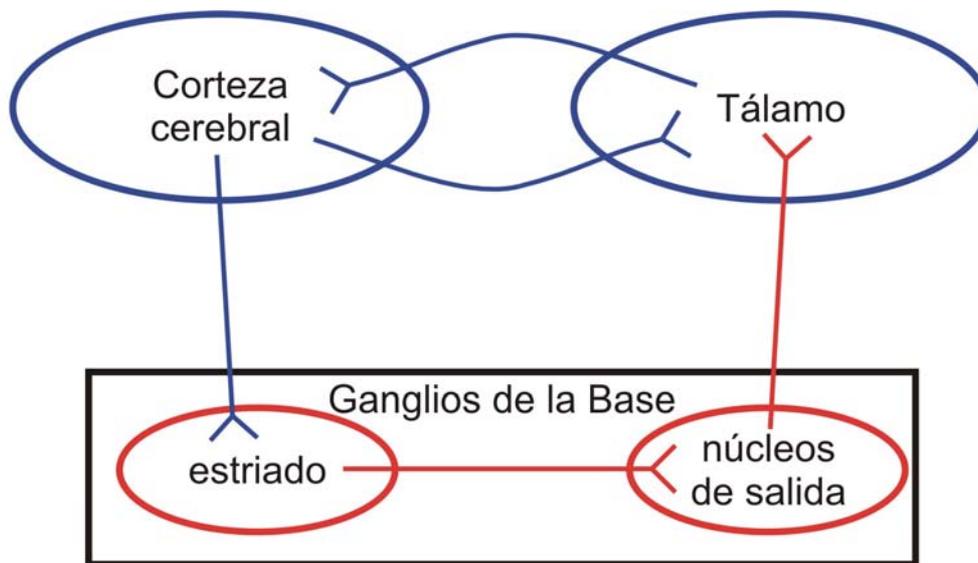


Figura A.3 Esquema de la organización general del bucle Corteza-GB-Tálamo-Corteza. La corteza cerebral extiende proyecciones excitatorias (azules) sobre el estriado, núcleo de entrada de los GB. Luego del procesamiento que pueda ocurrir en los circuitos que ligan a los núcleos de los GB entre sí (no esquematizados en esta figura, ver más adelante), las sinapsis inhibitorias que se originan en los núcleos de salida contactan al tálamo cerrando el bucle

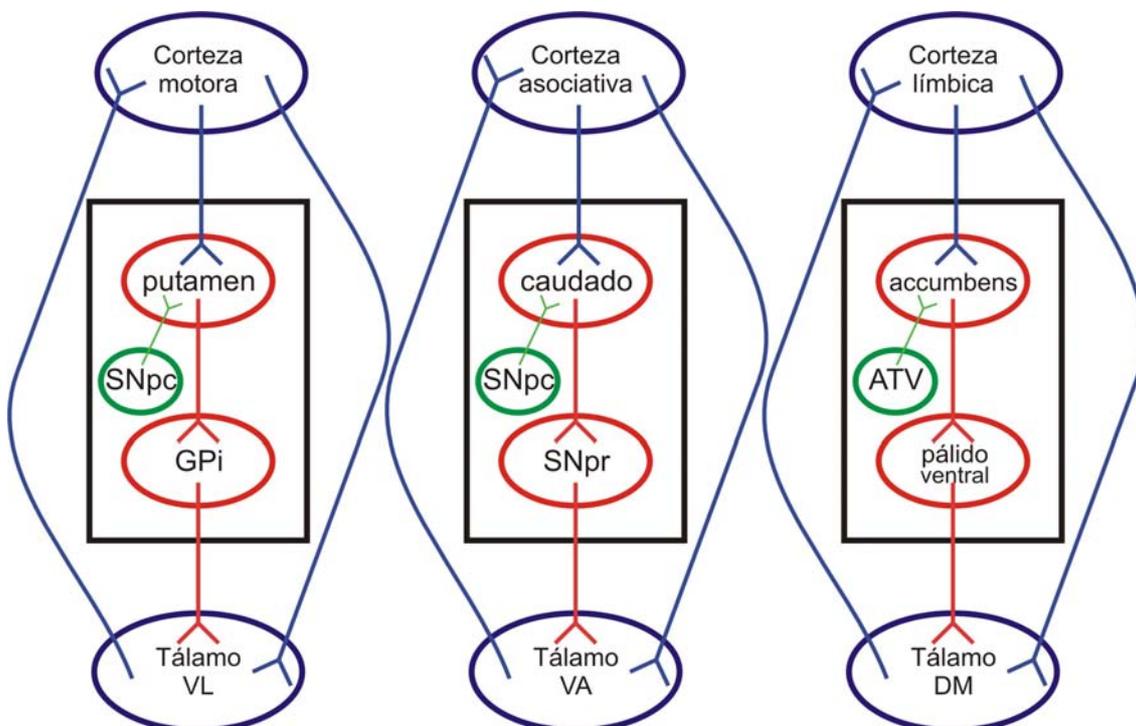


Figura A.4 Principales circuitos paralelos en el bucle Corteza-GB-Tálamo-Corteza. El bucle que incluye a la corteza, al tálamo y a los GB se caracteriza por presentar una organización en circuitos paralelos. Entre estos se reconocen a tres principales: el motor, el cognitivo y el límbico. Comparten el mismo patrón de organización pero cada uno involucra estructuras diferentes.

Clásicamente se pueden describir tres circuitos, uno sensorio-motor, otro cognitivo, y por último uno límbico (Figura A.4). El primero tiene origen en las cortezas sensorio-motoras, ingresa a los GB a través del Putamen (región lateral a la cápsula interna del estriado de los primates) y proyecta mediante el GPi a la región ventral lateral del Tálamo. El circuito cognitivo está compuesto por las cortezas asociativas, el núcleo Caudado (región medial a la cápsula interna en el estriado de los primates) y la SNpr. Estos dos primeros caminos están modulados por la DA proveniente de la Sustancia Negra pars compacta (SNpc), y en conjunto conforman los circuitos dorsales de los GB. El último circuito, el ventral, se inicia en las cortezas límbicas y pre-límbicas que proyectan al núcleo accumbens (región más ventral del estriado), e involucran al GP ventral y al Tálamo dorsal medial. En este caso, la DA es provista por neuronas del área tegmental ventral, región mesencefálica que se ubica medial a la SNpc (Alexander y Cruchter, 1990; Haber, 2003).

Basados en estudios más detallados, se ha propuesto que cada uno de estos circuitos podría subdividirse en múltiples vías, constituyendo a los GB en un conjunto de muchas rutas que se mantienen segregadas a lo largo de las estructuras que componen los ejes. Este tipo de organización establecería la naturaleza “en paralelo” de las computaciones realizadas por los GB, donde cada canal procesaría distintos tipos de información (Alexander y Crutchter, 1990; Alexander y col, 1990).

El estriado se compone de una mayoría de neuronas de proyección y una pequeña cantidad de interneuronas

La inmensa mayoría de las neuronas estriatales (más del 90%) son del tipo espinosas medianas (NEMs). Los axones de las NEMs salen del estriado conformando las proyecciones estriato-palidales y estriato-nigrales. Entre las NEMs se podrían distinguir tres grupos, según el destino de sus proyecciones y sus propiedades bioquímicas: i) las que proyectan al sector externo del Globo Pálido (GPe) y se caracterizan por expresar GABA, encefalina y preferentemente receptores dopaminérgicos de la subfamilia D2; ii) las que proyectan al GPi y la SNpr y expresan GABA, dinorfina, sustancia P y preferentemente receptores dopaminérgicos de la subfamilia D1; iii) las que

proyectan a la SNpc, que expresan GABA, dinorfina, sustancia P y receptores dopaminérgicos tipo D1 (*Gerfen y Young, 1988; Gerfen y col, 1990; Albin y col, 1989; Smith y col, 1998; Bolam y col, 2000*). Como veremos, esta división de las NEM en subclases es debatida en la actualidad (Figura A.5).

Además de las NEMs, el estriado presenta varios tipos de interneuronas (*Kawaguchi 1993,1997; Kawaguchi y col, 1995; Tepper y Bolam, 2004*),

i) neuronas gigantes colinérgicas no espinosas. Son las responsables de la altísima cantidad de acetilcolina que se encuentra en el estriado. Estas interneuronas disparan potenciales de acción de manera tónica, pero una corriente hiperpolarizante desencadenada después de cada potencial de acción hace que su tasa de disparo no sea elevada. Recientemente se ha demostrado que estas neuronas son capaces de responder *in vivo* a un estímulo eléctrico cortical con un potencial monosináptico con menor latencia que las NEMs, lo cual las coloca en una posición privilegiada para modular la transmisión córtico-estriatal. En experimentos realizados en primates se observó que estas neuronas son sensibles a eventos motivacionales, como la llegada de una recompensa. De esta manera, serían las responsables de la señal colinérgica estriatal, propuesta como un factor importante para los procesos de aprendizaje que involucran a los GB.

ii) neuronas GABAérgicas no espinosas que expresan parvalbúmina. Son también conocidas como las interneuronas de rápido disparo de potenciales de acción (*fast spiking interneurons*). Reciben una gran cantidad de contactos sinápticos provenientes de la corteza y del tálamo, y sus axones conforman arborizaciones colaterales muy densas. Responden de manera vigorosa a la estimulación cortical y serían las principales responsables de la inhibición anterógrada de la actividad de las NEMs. Es más, recientemente se reportó que la actividad de estas interneuronas puede controlar la temporalidad del disparo de potenciales de acción de las NEMs (*Koos y Tepper, 1999*).

iii) neuronas no espinosas que contienen somatostatina / óxido nítrico sintetasa (NOS). Poseen un árbol dendrítico de menor envergadura que el resto de las neuronas estriatales, pero presentan axones colaterales muy extendidos. El umbral de activación es bajo y exhiben potenciales de acción resistentes al bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina. Existen evidencias

que hacen suponer que podrían liberar GABA y neuropéptido Y, además de somatostatina y óxido nítrico.

El estriado muestra inhomogeneidades citoarquitectónicas cuyo significado funcional es poco conocido

En base a la tinción con marcadores neuroquímicos es posible distinguir dos compartimentos estriatales: parches pobres en la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y de alta densidad de receptores μ opioides, y una extensa matriz rica en AChE, calbindina y fibras inmunoreactivas para somatostatina (Graybiel y Ragsdale, 1978; Goldman Rakic, 1982; Gerfen y col., 1985; Gerfen, 1992). Las NEMs que proyectan a los dos segmentos del GP y a la SNpr se hallan en la matriz, mientras que las se encuentran en los parches proyectan a la SNpc o al GPe (Gerfen, 1984; Graybiel y Chesselet, 1984; Gerfen, 1992, pero ver también Wu y col, 2000; Levesque y Parent, 2005), (Figura A.5).

Tanto el árbol dendrítico de las NEMs y sus colaterales axonales como el arreglo de las proyecciones córtico-estriatales respetan este tipo de organización. Por un lado, las regiones neocorticales inervarían preferentemente focos neuronales en la matriz, de tamaño similar a los parches, llamados matrisomas. Esto estaría dado por neuronas de la parte más superficial de la capa V cortical. En cambio, los parches recibirían aferencias principalmente de las cortezas pre-límbicas a través de neuronas de la capa V profunda y de estructuras límbicas como el complejo amigdalino (Donoghue y Herkenham, 1986; Goldman Rakic, 1982; Gerfen, 1989; Gerfen, 1992). Por otro lado, las dendritas y los colaterales axonales de las NEMs no atraviesan el límite entre parches y matriz, por lo que esas células son influidas e influyen sólo a componentes de su mismo compartimiento (Kawaguchi y col., 1989, 1990; Walker y col, 1993). No está claro que las prolongaciones de las NEMs respeten los límites de los matrisomas, sin embargo.

Desde este punto de vista, matrisomas y parches podrían representar un arreglo estriatal en microdominios funcionales, donde existe una alta conectividad dentro de cada microdominio pero muy baja entre compartimentos. A pesar de esto, las caracterizaciones realizadas han fallado

en demostrar diferencias en las propiedades electrofisiológicas entre las NEMs de los distintos compartimientos (*Kawaguchi y col, 1989*). En el presente trabajo no se distinguirá a las NEMs según el compartimiento en que se localicen.

El estriado transfiere información a los núcleos de salida a través de dos caminos

El resultado del procesamiento de la información cortical que se lleve a cabo dentro del estriado será transferido por las neuronas de proyección estriatales (las NEMs) a dos estructuras, el Globo Pálido y la Sustancia Negra (*Smith y col, 1998; Bolam, 2000*). En base al conexionado, se ha postulado que existen dos caminos para ligar al estriado con la SNpr y el GPi (*Albin y col, 1989; DeLong, 1990*). El primer circuito, llamado vía directa, se compone de una conexión monosináptica inhibitoria entre el estriado y la SNpr o el GPi. El segundo circuito, la vía indirecta, utiliza conexiones intermedias a través del GPe y del Núcleo Subtalámico (NST). A partir de los signos de las conexiones sinápticas, la activación del estriado resultará en una inhibición de los núcleos de salida a través de la vía directa o en una facilitación mediada por la vía indirecta (Figura A.6). Las neuronas de proyección de la SNpr y del GPi son inhibitorias y disparan potenciales de acción de manera sostenida, manteniendo un tono inhibitorio sobre los núcleos talámicos a los que proyectan. Por lo tanto, si hablamos de funciones motoras, se postula que la activación de la vía directa será facilitatoria del movimiento por una desinhibición de los circuitos talamo-corticales, mientras que la vía indirecta se opondrá al movimiento favoreciendo la inhibición talámica (*Albin y col, 1989; DeLong, 1990; Mink, 1996; Hikosaka et al., 2000*). Estos circuitos son modulados por la proyección dopaminérgica nigro-estriatal. Se ha propuesto además que la DA actúa de manera diferencial según las neuronas estriatales estén involucradas en la vía directa o indirecta. Las primeras expresan preferentemente receptores D1 y su actividad sería favorecida por la DA, mientras que las segundas exponen receptores de la familia D2 y serían inhibidas por la DA. Como resultado, la liberación de DA favorecería la iniciación del movimiento corriendo el balance de la actividad en favor de la vía directa (Figura A.6).

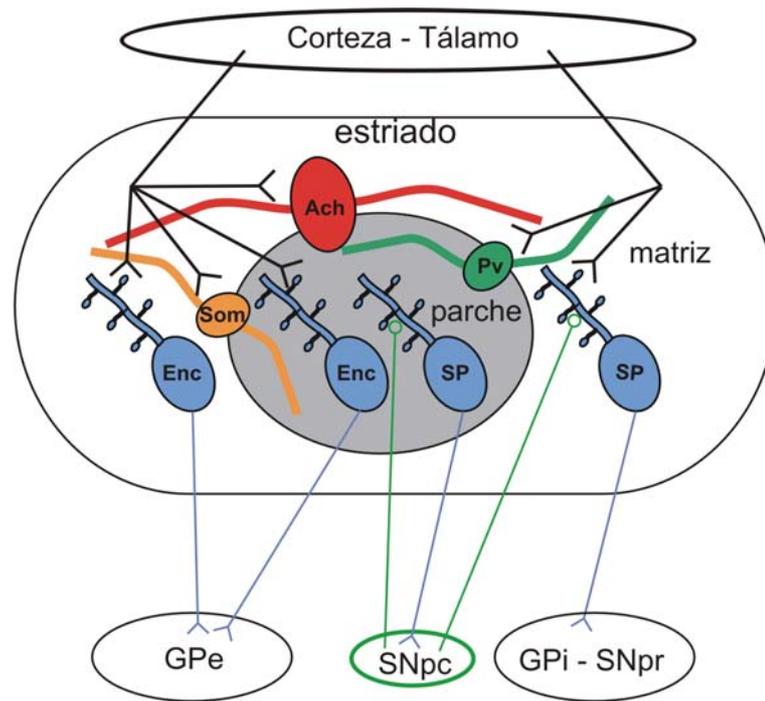


Figura A.5 Componentes neuronales del estriado. El estriado se compone de neuronas de proyección y de interneuronas. Las primeras son heterogéneas, están las que además de GABA expresan Encefalina (Enc) y pueden localizarse en las matrices o en los parches y proyectan al sector externo del Globo Pálido (GPe). Otras expresan Sustancia P (SP) y se encuentran en los parches y proyectan a la Sustancia Negra pars compacta (SNpc). Las que expresan SP y se hallan en las matrices extienden sus eferencias al sector interno del Globo Pálido (Gpi) y a la pars reticulada de la Sustancia Negra (SNpr). Sin embargo esta clasificación de las NEMs está en discusión (ver texto). Entre las interneuronas están las gigantes colinérgicas (Ach) y las GABAérgicas que expresan parvalbúmina (Pv) y las que liberan óxido nítrico y poseen somatostatina (som). Las aferencias glutamatérgicas corticales y dopaminérgicas de la SNpc convergen en las espinas dendríticas de las NEMs.

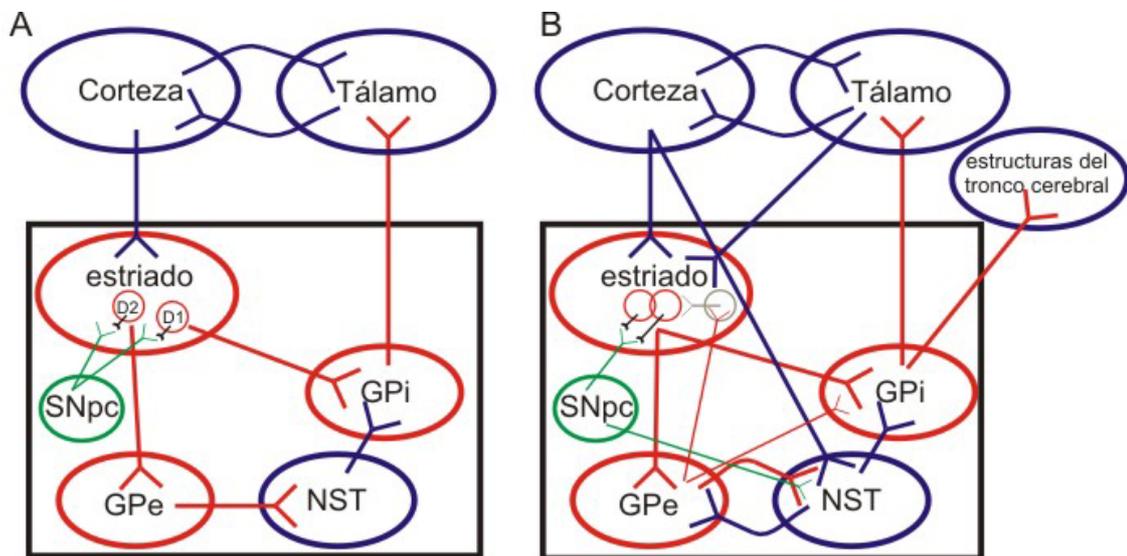


Figura A.6 Organización anatómico-funcional de los GB. A. Modelo clásico de organización de los circuitos que componen el bucle cortezaGBtálamo-corteza. El estriado transfiere información cortical a los núcleos de salida de los GB de manera directa o a través de una vía indirecta que incluye al GPe y al NST. La dopamina nigroestriatal regula diferencialmente estos dos caminos. B. La complejidad del sistema córtico-GB-tálamo-cortical se pone de manifiesto al incluir en el esquema las conexiones anatómicas de las que hay evidencia. Además existen controversias en cuanto a la segregación funcional de los receptores dopaminérgicos en diferentes subtipos de NEMs. Ver texto para más detalles.

La utilidad pedagógica de este modelo es apreciable, sin embargo la acumulación de nuevas evidencias le agregan mayor complejidad y lo contradicen en algunos aspectos (*para revisión de esto ver Bar - Gad y Bergman, 2001*), (Figura A.6). En cuanto a lo que es relevante para este trabajo, diversos reportes señalan que la mayoría de las NEM puede establecer contactos sinápticos en los tres blancos principales del estriado, el GPi, el GPe y la SNpr (*Wu y col, 2000; Levesque y Parent, 2005*). Además, la evidencia respecto de la segregación funcional de las subfamilias de receptores dopaminérgicos en las neuronas estriatales es contradictoria. Tanto a nivel de la inmunoreactividad de la proteína, como de la expresión del RNA mensajero, algunos trabajos reportaron una estricta segregación de los tipos de receptores (*Gerfen y col, 1990; Le Moine y col, 1991; Le Moine y Bloch, 1995; Hersch y col, 1995*) y otros mostraron cierto grado de co-localización celular, que además sería funcional y podría tener un alto impacto en la actividad de las neuronas estriatales (*Surmeier y col, 1992, 1996; Aizman y col, 2000*). Por otro lado, el efecto de la estimulación dopaminérgica sobre la transmisión córtico-estriatal es fuente de un intenso debate. Se han demostrado efectos de los agonistas dopaminérgicos selectivos para cada subtipo de receptor sobre la transmisión glutamatérgica en el estriado (*Cepeda y col, 1993, 1998; Flores Hernández y col, 2002*) y sobre corrientes voltaje dependientes de las neuronas estriatales (*Surmeier y col, 1995; Pacheco-Cano y col, 1996; Hernández López y col, 1997, 2000; Nicola y col, 2002; Waszczack y col, 2000*). Sin embargo, no se ha podido establecer claramente cómo influye la liberación de dopamina en la actividad de las neuronas estriatales *in vivo* (*Inase y col, 1997; Gonon, 1997; Boraud y col, 2002, West y Grace, 2002*).

Dado el gran número de interrogantes que quedan sin resolver respecto a esos puntos, no es de extrañar que no existan hoy reportes que diferencien funcionalmente a las neuronas estriatales según el blanco de sus proyecciones. Es por esto que, en este trabajo, que examinará con cierto detalle el control que la corteza cerebral ejerce sobre el potencial de membrana de las neuronas estriatales, no diferenciaremos a estas últimas según sus proyecciones a través de las vías directa o indirecta.

3. Organización sináptica del Estriado

Las espinas dendríticas de las NEMs son un sitio de integración donde convergen todos los tipos de aferencias que recibe el estriado.

Una imagen macroscópica de un corte coronal del estriado nos habla a las claras del rol central que ocupa este núcleo. Es una estructura que se caracteriza por ser atravesada por un gran número de paquetes axonales que provienen de otras regiones y hacen sinapsis en el estriado mismo. Las fibras se originan principalmente en la corteza cerebral, el tálamo y la SNpc. Las aferencias corticales y talámicas establecen sinapsis glutamatérgicas, mientras que los axones nigro-estriatales son liberadores de DA.

Estudios de microscopía electrónica demostraron la manera en que se establecen los contactos sinápticos en las espinas dendríticas de las NEMs. Sobre la zona apical de las dendritas se encuentran las sinapsis asimétricas, típicamente atribuidas a los terminales glutamatérgicos (*Somogyi y col, 1981; Frotscher y col, 1981; Bouyer y col, 1984; Bolam y col, 2000*). Mientras tanto, los axones con tinción positiva para la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), marcadora de neuronas catecolaminérgicas, establecen contactos sobre el cuello de las espinas. Este tipo de organización de los contactos sinápticos le otorga un rol central a la transmisión dopaminérgica (fuente catecolaminérgica principal del estriado) en la modulación de la transferencia córtico y tálamo – estriatal (*Bouyer y col, 1984; Freund y col, 1984; Bolam y col, 2000*). Además, la dopamina podría actuar sobre receptores “extrasinápticos” una vez que difundió fuera de la hendidura sináptica (*Gonon y col, 2000*). Otros contactos sinápticos, como ser los colinérgicos que se originan en las interneuronas gigantes, o GABAérgicos provenientes de otras interneuronas o de colaterales de NEMs vecinas, también se posicionan en el cuello de las dendritas (*Bolam y col, 2000*).

La organización topográfica de las proyecciones córtico - estriatales sustenta la idea de procesamiento en paralelo

La organización anatómica de las proyecciones córtico–estriatales es quizás la principal evidencia sobre la que se construyó la visión de que los GB

procesan información en paralelo. Numerosos trabajos han colaborado en conformar un cuadro, bastante aceptado hoy en día, que revela 3 características básicas del conexionado córtico-estriatal: a) casi la totalidad de las regiones corticales proyectan axones hacia el estriado, b) las distintas modalidades corticales (sensorio-motoras, asociativas, límbicas, etc.) permanecen segregadas en el eje dorsolateral – ventromedial del territorio estriatal, y c) regiones corticales diferentes con representación somatotópica similar convergen en el estriado (Kunzle 1975; Kunzle, 1977; Graybiel y Ragsdale, 1979; Selemon y Goldman-Rakic, 1985; Donoghue y Herkenham, 1986; McGeorge y Faull, 1987, 1989; Flaherty y Graybiel, 1991, 1993, 1994; Wright y col., 2001; Hoffer y Alloway, 2001; Cheatwood y col., 2003; Haber, 2003; Groenewegen y col., 1987). Este tipo de organización se conserva a lo largo del eje longitudinal (anteroposterior) del estriado (Figura A.7).

También existe, aunque en mucha menor medida, evidencia funcional sobre procesamiento en paralelo (DeLong y col, 1985; Alexander y DeLong, 1985; Kimura y col, 1996; Nambu y col, 2002; Wiesendanger y col, 2004). Como ejemplo, Alexander y DeLong (1985b) reportaron una organización somatotópica en la respuesta neuronal estriatal a la contracción muscular. A partir de registros electrofisiológicos en monos encontraron que neuronas adyacentes en el estriado respondieron al movimiento de una misma parte del cuerpo. De la misma manera, la estimulación eléctrica de una pequeña región estriatal produjo una contracción muscular específica, que además coincidió con la parte del cuerpo que indujo una respuesta neuronal en esa región. De esta manera, en la misma región del estriado dorsolateral coincidirán los axones de neuronas de las regiones corticales motoras y sensoriales que representan la misma parte del cuerpo. Por su lado, las proyecciones provenientes de cortezas asociativas terminarán en una zona dorsomedial y las límbicas en una ventromedial del estriado. Así, en el estriado se puede reconocer una segregación grosera de proyecciones corticales en grandes distritos anatómicos, dentro de los cuales existe una convergencia de proyecciones provenientes de zonas con funciones estrechamente ligadas en microdominios que podrían identificarse morfológicamente como los parches y matrisomas.

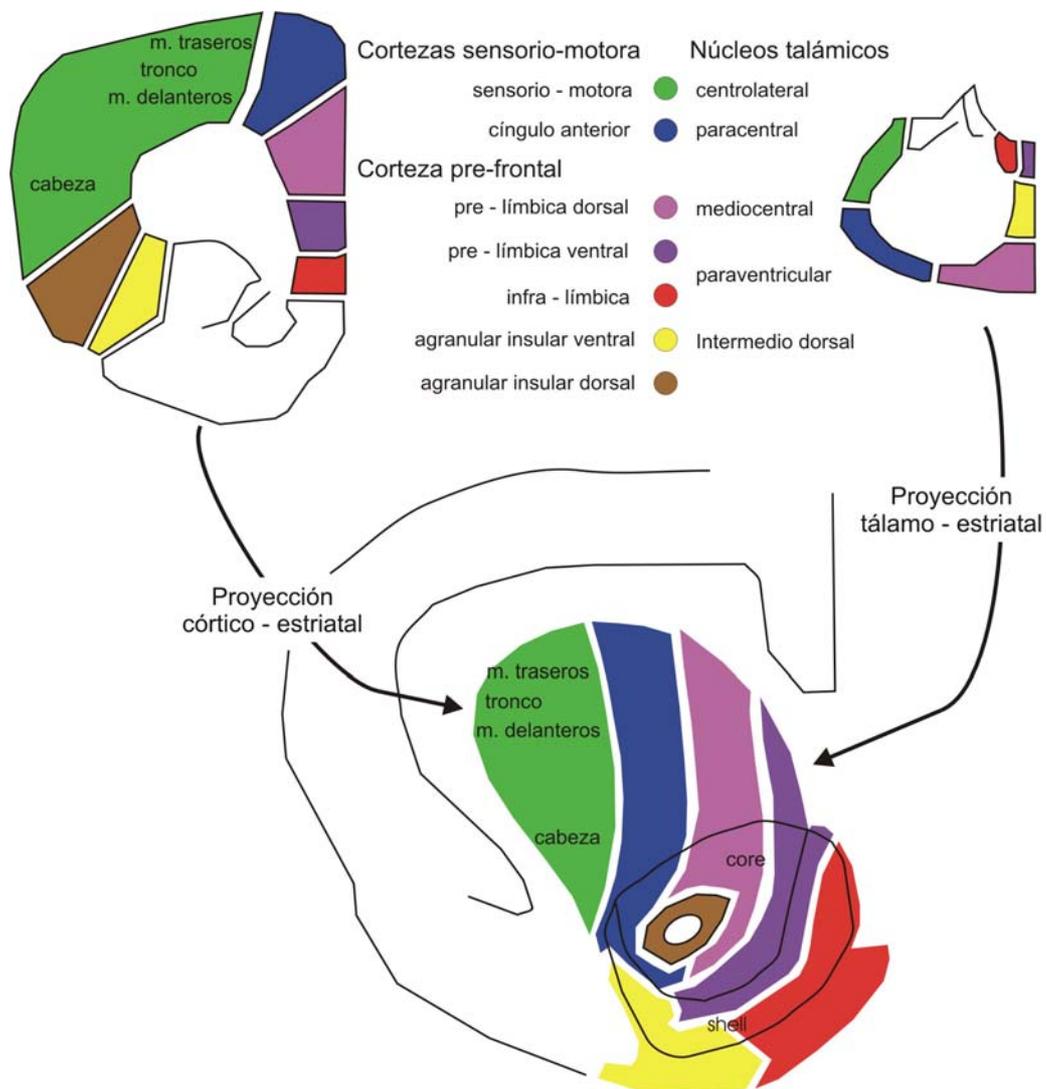


Figura A.7 Organización topográfica de las conexiones córtico-estriatales. Las aferencias corticales y talámicas del estriado se distribuyen en el eje dorsolateral - ventromedial. Las estructuras relacionadas con funciones motoras y sensoriales convergen en el territorio dorsolateral del estriado. Esas regiones corticales (sensorio-motoras, corteza del cíngulo anterior) y talámicas (centrolateral, paracentral) suelen estar además interconectadas. Luego, las proyecciones de la corteza pre-frontal (pre-límbica, infralímbica, agranular insular) y del tálamo mediocentral, paraventricular e intermedio-dorsal finalizan en los territorios más ventrales y mediales del estriado. Esta organización se mantiene a lo largo del eje antero-posterior del estriado. Modificado de Voorn y col, 2004.

Diversos mecanismos podrían promover segregación e integración de información entre los circuitos del bucle corteza – GB - tálamo

¿Cuál sería la finalidad de una organización estrictamente paralela a lo largo del bucle corteza – GB – tálamo – corteza? Un esquema de esa simplicidad situaría a los GB solamente como estaciones de relevo de la información cortical, quizás cumpliendo un rol de filtro para luego alimentar neuronas no córtico-estriatales en la misma región cortical de la que reciben información. Otra posibilidad es que existan mecanismos que degraden la estricta segregación dentro del circuito y permitan que haya integración de la información en las estructuras de los GB.

Diversos mecanismos podrían atenuar la segregación a nivel del estriado:

- Los trabajos que demuestran una segregación anatómica de las proyecciones corticales, fallan en señalar límites precisos entre los territorios estriatales invadidos por las diferentes regiones de la corteza. Además, esos territorios suelen presentar superposiciones y hasta interdigitaciones de las terminaciones provenientes de diferentes cortezas (*Haber, 2003*).
- En los estudios funcionales se puede observar que, si bien la minoría, una proporción no despreciable de neuronas estriatales respondieron con disparos de potenciales de acción a la activación de más de una región cortical (*Nambu y col., 2002; Kimura y col., 1996*). La convergencia funcional podría ser mucho mayor si se estudiaran fenómenos subumbrales.
- Los árboles dendríticos de las neuronas estriatales, sobre todo los de las interneuronas, son muy extensos y pueden invadir territorios vecinos, y así ser contactados por aferencias de más de una modalidad. Lo mismo puede decirse de las ramificaciones axonales de las interneuronas y de los colaterales axonales de las NEMs.
- Las neuronas del GPe, una de las regiones invadidas por el estriado, proyectan de vuelta al estriado, donde contactan interneuronas cuyos árboles axonales se extienden ampliamente y pueden influir sobre

grandes regiones estriatales (*Bolam y col, 2000*). Así, las proyecciones que salen de una localización estriatal específica pueden retornar indirectamente a una zona vecina.

Además de los datos anatómicos que sugieren fuertes procesos de integración a nivel estriatal, existe evidencia funcional que indica que neuronas en vastas regiones estriatales son moduladas durante las mismas conductas. En primates, neuronas distribuidas ampliamente en el núcleo Caudado son reclutadas durante tareas motoras simples (*Romo y Schultz, 1992*). En ratas, el aprendizaje de una tarea simple en un laberinto recluta neuronas a lo largo de todo el estriado (*Jog y col, 1999; Barnes y col, 2005*).

Los mecanismos de integración podrían involucrar otros niveles del bucle corteza – GB –tálamo – corteza. Por ejemplo, los extensos árboles dendríticos de las neuronas palidales se orientan en ángulo recto al paso de los axones estriatales, posibilitando que confluyan en ellos proyecciones de diversas regiones estriatales (*Percheron y col, 1984*). Otros autores proponen que el nivel de integración podría estar en las proyecciones de las salidas de los GB. En un modelo que llamaron de bucles abiertos interconectados (*Joel y Weiner, 1994*), los circuitos permanecerían segregados a lo largo de los núcleos de los GB, pero en una región cortical podrían converger las salidas de más de un bucle. Esto haría que la información de un circuito llegara a otra región cortical además de la que dio origen a ese bucle. Y finalmente, las proyecciones nigro-estriatales fueron llamadas a jugar un rol en la integración de los canales paralelos en forma de espirales ascendentes (*Haber, 2003*). Esto se basa en evidencias anatómicas que demuestran que existe una interconexión estriado – SNpc - estriado que no es recíprocamente cerrada. Es decir, los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc no se dirigen a la región estriatal que las inerva, sino que lo hacen a una región adyacente ubicada dorsolateral a ésta (*Haber y col, 2000*). De esta forma, la información podría fluir de tal manera que los dominios ventromediales (es decir cognitivos o límbicos) influyan sobre los dorsolaterales (sensorio-motores).

Como está visto, el problema de la segregación y la integración de información en el estriado (y de manera general en los GB) no es un tema cerrado. Es muy importante determinar cuál es el real grado de separación o

superposición *funcional* de los canales paralelos de procesamiento para comprender mejor el rol que juegan los GB. Además, no es descabellado pensar que una anormal degradación de los procesos de segregación / integración esté involucrada en fisiopatología de enfermedades que involucran a los GB, como la enfermedad de Parkinson y el síndrome de hiperactividad con déficit de la atención.

El patrón de arborización axonal de las proyecciones córtico-estriatales determina que cada NEM dentro de un microdominio funcional represente un arreglo de conectividad único

Es interesante analizar en detalle el patrón de conectividad de los axones córtico-estriatales. Si se inyecta un marcador anterógrado en una pequeña región de la neocorteza se observarán varios focos de inervación en el estriado, correspondientes a distintos matrisomas (*Flaherty y Graybiel, 1991,1993*). Estos focos no representan una divergencia de las proyecciones córtico-estriatales, sino más bien el patrón de arborización axonal de las neuronas corticales (*Cowan y Wilson, 1994*). Se han descrito dos formas posibles principales de arborización (*Kincaid y col., 1998*). La primera, en focos discontinuos, corresponde a terminaciones axonales que se ramifican en forma discreta y circunscriben sus contactos sinápticos dentro de los límites de los parches y tal vez de los matrisomas. La segunda se ramifica de manera extendida, es decir que los árboles axonales establecen contactos sinápticos a lo largo del territorio estriatal que atraviesan. Sin embargo la separación de las ramas es tal que una NEM no es contactada por más de una rama de una misma neurona cortical. El punto interesante es que, en cualquier caso, la densidad de contactos sinápticos que establece cada neurona córtico-estriatal es muy baja, de manera que se produce una inervación no homogénea de las NEMs (*Kincaid y col., 1998; Wilson, 2000*). Para que quede más claro, el axón de una neurona cortical realiza aproximadamente 40 contactos sinápticos en el volumen dendrítico de una NEM (~400 μm de radio, que coincide con el tamaño de un microdominio). Teniendo en cuenta que ese volumen es ocupado por alrededor de 2500 NEMs, y que cada una de ellas recibe unas 8000 sinapsis corticales, llegamos

a la conclusión que una neurona cortical contacta a lo sumo el 1.6% de las NEMs de un microdominio, y que una NEM recibe a lo sumo el 0.5% de sus sinapsis de una misma neurona cortical. Kincaid y col. (1998) calcularon la proporción de aferencias comunes que podrían tener dos NEMs vecinas a partir de distintas reglas de conectividad y concluyeron que es un valor insignificante cualquiera sea la regla utilizada. Es decir que las NEMs de un microdominio tienen muy pocas aferencias en común, y cada NEM recibe muy pocos contactos sinápticos de una misma célula.

Entonces, microdominios estriatales serían dirigidos por regiones funcionales relacionadas de la corteza cerebral, pero la sinaptología córtico-estriatal determinaría que la actividad individual de las NEMs represente un arreglo de conectividad único. Soportando este modelo de organización, neuronas vecinas en el estriado incrementan su tasa de disparo de potenciales de acción en respuesta al movimiento de la misma parte del cuerpo (Alexander y DeLong, 1985a). Sin embargo, existe una alta variabilidad entre los disparos de potenciales de acción de NEMs adyacentes registradas simultáneamente a pesar de estar comprometidas en la misma tarea (Jaeger y col., 1985, Raz y col, 1996).

Las NEMs establecen una gran cantidad de contactos sinápticos colaterales intra-estriatales

Los axones de las NEMs, además de proyectarse fuera del núcleo, establecen una gran cantidad de contactos sinápticos intra-estriatales, la mayoría de los cuales son sobre otras NEMs (Wilson y Groves, 1980; Ribak y col, 1979). Este es un hecho largamente probado mediante técnicas histológicas, y es la base del concepto de inhibición lateral en el estriado, el cual ha sido y es un punto central en los modelos de procesamiento de información en el estriado (Redgrave y col, 1999; Wickens y Oorschot, 2000; Bar - Gad y col, 2003). Si bien por mucho tiempo no fue posible demostrar la funcionalidad de dichas conexiones sinápticas (Jaeger y col., 1994), en los últimos años varios trabajos han demostrado que el disparo de potenciales de acción en una NEM puede evocar potenciales sinápticos en una NEM vecina (Czubayko y col., 2002; Tunstall y col., 2002; Taverna y col., 2004).

Dada la magnitud pequeña de los potenciales sinápticos evocados observados en esos trabajos, se ha puesto en duda la relevancia funcional de la conexión entre las NEMs, sobre todo cuando se las compara con el fuerte efecto inhibitorio que ejercen algunas de las interneuronas estriatales sobre las NEMs (Koos y col., 2004; Tepper y col., 2004; Wilson, 2000). De todas formas, la discusión respecto de este punto no está cerrada, y volveremos sobre ella cuando comentemos las propiedades del Vm de las NEMs.

4. Fisiología de las Neuronas Espinosas Medianas Estriatales

El Vm de las neuronas estriatales alterna entre un valor de reposo muy negativo y otro cercano al umbral de disparo

Una de las características principales de las NEMs es su bajísima tasa espontánea de disparo de potenciales de acción, la cual puede ir desde 0 (neuronas silentes por muchos minutos) hasta unos pocos Hz. Luego, suelen incrementar su frecuencia de disparo como respuesta a algún evento conductual, generalmente relacionado con la planificación, preparación o ejecución de un movimiento (DeLong, 1973; Cruchter y DeLong, 1984a, 1984b; Alexander y DeLong, 1985a, b; Romo y col., 1992; Jaeger y col., 1995).

Cuando se las registra *in vivo*, las NEMs suelen presentar un Vm muy polarizado, cercano al potencial de equilibrio del potasio, conocido como estado DOWN (eDOWN), que es ocasionalmente interrumpido por robustas despolarizaciones. Durante esas interrupciones del eDOWN, el Vm de las NEMs se estabiliza en un valor subumbral llamado estado UP (eUP), durante el cual la neurona esporádicamente dispara potenciales de acción (y nunca lo hace durante los eDOWN) (Wilson y Groves, 1981; Wilson, 1993; O'Donnell y Grace, 1995; Tseng y col., 2001; Mahon y col., 2001), (Figura A.8). Los eUP duran varios cientos de milisegundos, y está largamente probado que son inducidos por la actividad de aferencias excitatorias. En ausencia de entradas sinápticas activas, como ocurre en las preparaciones *in vitro* agudas, el Vm de las NEMs

permanece cerca del potencial de equilibrio del potasio debido a una corriente de potasio que muestra rectificación (*potassium inwardly rectifying current, IKir*) (Nisenbaum y Wilson, 1995; Wilson y Kawaguchi, 1996), (Figura A.8). Algo similar ocurre cuando las NEMs son privadas de sus principales entradas excitatorias corticales *in vivo* (Wilson, 1993; O'Donnell y Grace, 1995).

La interacción entre propiedades intrínsecas de las NEMs y sus aferencias excitatorias determinaría el curso temporal de los eUP

Si bien en ausencia de entradas excitatorias no se han observado eUP, no es clara la manera en que dichas entradas interactúan con las corrientes intrínsecas de las NEMs para despolarizar la neurona (Figura A.8). Bennet y Wilson (2000) han postulado el siguiente mecanismo. Durante los eDOWN, dominados por la *Ikir*, la resistencia de entrada de la neurona es relativamente baja, y consecuentemente la estructura electrotónica de las NEMs es extendida. Bajo estas circunstancias, las entradas sinápticas débiles (pocas en número o no correlacionadas temporalmente) tendrán poco impacto sobre el Vm. Por el contrario, una actividad aferente fuerte (numerosa y temporalmente correlacionada) producirá una despolarización suficiente que ocasionará la inactivación voltaje dependiente de las *Ikir*, con el consecuente aumento de la resistencia de entrada. Esto originará un “colapso electrotónico” del árbol dendrítico, donde entradas sinápticas débiles o poco correlacionadas tendrán más influencia sobre el Vm (resistencia más alta) y donde las sinapsis distales tendrán mayor impacto sobre el Vm en el soma (debido al acortamiento de la distancia electrotónica). Estos factores ocasionarán una abrupta y rápida despolarización, resultando en una transición desde el eDOWN al eUP. Si las NEMs no tuvieran otras corrientes intrínsecas, el bombardeo sináptico al que son sometidas por las aferencias corticales y talámicas llevaría el Vm hasta el potencial de reversión de los potenciales sinápticos, probablemente destruyendo la célula. Sin embargo, los eUP presentan un nivel de despolarización que es determinado por el balance entre esas entradas excitatorias y el efecto hiperpolarizante de dos conductancias de potasio que muestran rectificación hacia afuera (*potassium outwardly rectifying current*), una de cinética lenta (I_{AS}) y otra que no se inactiva (*non-inactivating potassium*

current) (Surmeier y col., 1991; Nisenbaum y col., 1994; Wilson y Kawaguchi, 1996). Estas corrientes se oponen a la despolarización mediante un efecto hiperpolarizante directo, pero además disminuyen la resistencia de entrada, produciendo la extensión electrotónica de las dendritas. Así, la eficacia de las aferencias excitatorias más distales se ve disminuida. Las NEMs además poseen otras corrientes (de potasio, de sodio y de calcio) activas durante los eUP, que influyen principalmente en las características temporales de los disparos de potenciales de acción (Bargas y col., 1989; Hernández-Lopez y col., 1997; Nicola y col., 2000). Hay quienes postulan que estas corrientes además ayudarían a sostener los eUP durante cierta ventana de tiempo, de modo que las NEM poseerían cierta capacidad de bi-estabilidad intrínseca. Además le atribuyen un rol importante a la DA en este sentido, ya que en rodajas de cerebro la DA ha demostrado poseer capacidad moduladora sobre esas corrientes (Hernández López y col., 1997; Nicola y col., 2000). Otros, como Bennet y Wilson, suponen que una vez que cesa el bombardeo aferente, las corrientes hiperpolarizantes llevarían el V_m hacia el potencial de equilibrio del potasio. A un determinado nivel de polarización se inactivarían las corrientes voltaje-dependientes activas en el rango del eUP, y el control lo retomarían las *I_{kir}*.

La posibilidad de que las NEMs puedan influir sobre sus vecinas a través de colaterales axonales puede tener consecuencias interesantes en relación a los eUP (Figura A.8). Por un lado, cuando el V_m de una NEM está en un valor de reposo (eDOWN), las sinapsis aferentes GABAérgicas son despolarizantes. Así, el disparo de potenciales de acción de una NEM podría facilitar la transición al eUP de sus vecinas, “activándose” en conjunto todo el dominio (Plenz, 2003). Por otro lado, cuando el V_m está cercano al umbral de disparo de potenciales de acción, la entrada GABAérgica se hace hiperpolarizante, pudiendo resultar en una inhibición o al menos un retardo en el disparo de potenciales de acción (Plenz, 2003).

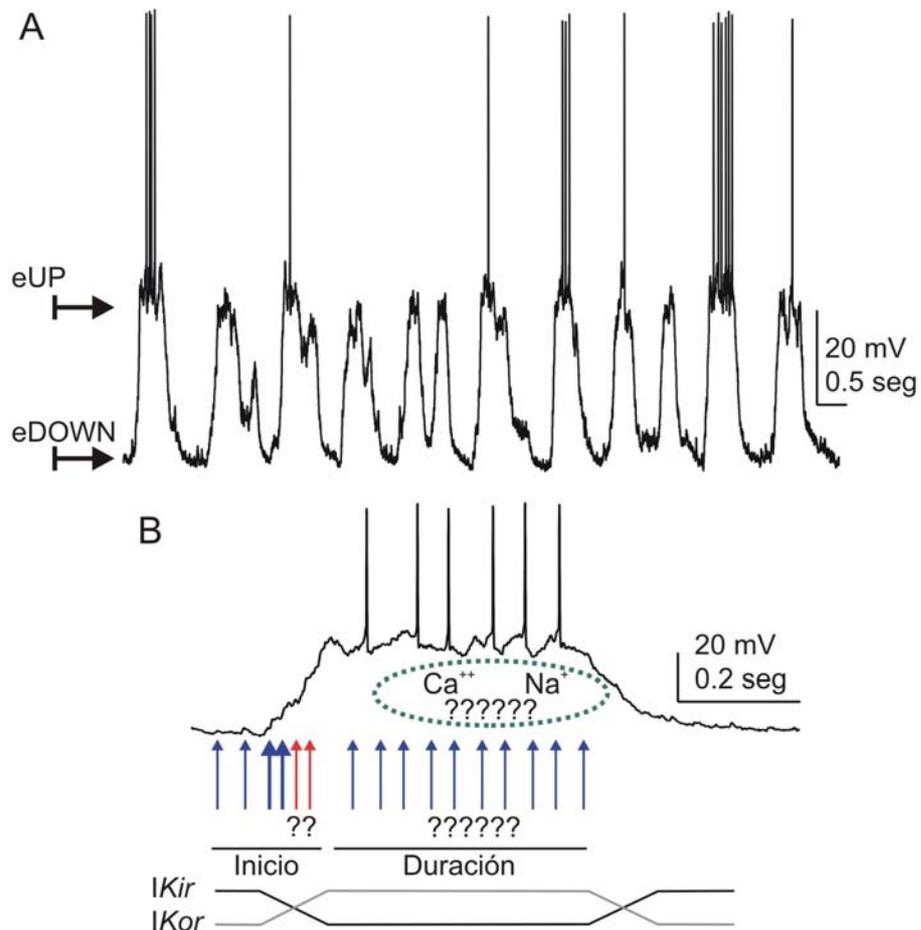


Figura A.8 EL Vm de las NEMs alterna entre un estados DOWN y uno UP. A. Segmento de registro intracelular de una NEM donde se observa claramente que el Vm alterna rítmicamente entre un estado muy polarizado (eDOWN) y otro más cercano al umbral de disparo de PA (eUP). Nótese que la neurona dispara PA solamente cuando se encuentra en un eUP, y que no lo hace en todas las oportunidades pasa a ese estado. **B.** Las entradas excitatorias corticales son ineficientes para inducir transiciones al eUP cuando llegan de manera asincrónica (flechas azules finas). La actividad sináptica cortical altamente correlacionada es necesaria para que las NEMs pasen del eDOWN al eUP (flechas azules gruesas). Los contactos colaterales GABAérgicos de otras NEMs podrían contribuir a la transición (flechas rojas). No es claro el mecanismo por el cual el Vm se sostiene en el eUP. Las corrientes de sodio y de calcio que se activan en el eUP podrían contribuir a sostenerlo, pero no hay evidencias de que sean necesarias y suficientes. El bombardeo sináptico cortical continuo también jugaría un rol en determinar la duración de los eUP. Durante el estado polarizado el valor del Vm está dado por la activación de corrientes de potasio que rectifican hacia adentro (*I_{Kir}*), mientras que en los eUP esas corrientes se inactivan y predominan las de potasio que rectifican hacia afuera (*I_{Kor}*).

Los eUP constituirían ventanas de oportunidad para el disparo de potenciales de acción ante señales aferentes específicas por las NEMs

El eUP es considerado un estado “habilitador” para la transferencia de información a través del estriado, dado que las NEMs solamente disparan potenciales de acción cuando se encuentran en un eUP. Es decir que podríamos apreciar a los eUP como un correlato celular subumbral de que el estriado está “listo” para trabajar (*ready to fire condition*). Sin embargo, como el V_m en el eUP se estabiliza algunos milivoltios por debajo del umbral de disparo de potenciales de acción, se requeriría algún efecto adicional de las sinapsis córtico–estriatales para que las NEMs disparen. Para intentar comprender mejor la importancia funcional de los eUP, O’Donnell y Grace (1995) elaboraron una serie de experimentos inteligentes y a la vez delicados. Registrando intracelularmente *in vivo* NEMs del núcleo accumbens, los autores observaron que sus eUP dependían fundamentalmente de la activación de las aferencias hipocampales, la inervación excitatoria principal del núcleo accumbens. La estimulación eléctrica del fornix induce eUP, mientras que la lesión del fornix resulta en un eDOWN permanente. Por otro lado, advirtieron que las NEMs sólo responden con el disparo de potenciales de acción a la estimulación de la corteza pre–frontal cuando ésta acaece en un eUP. O’Donnell y Grace postularon que la transferencia de información a través del núcleo accumbens se produce por un mecanismo de 2 pasos: las aferencias hipocampales inducen el eUP en conjuntos particulares de NEMs, habilitando un canal estriatal de procesamiento capaz de responder a una entrada sináptica pre–frontal de características “específicas” que ocasionará la despolarización adicional necesaria para que esas NEMs alcancen el umbral de disparo.

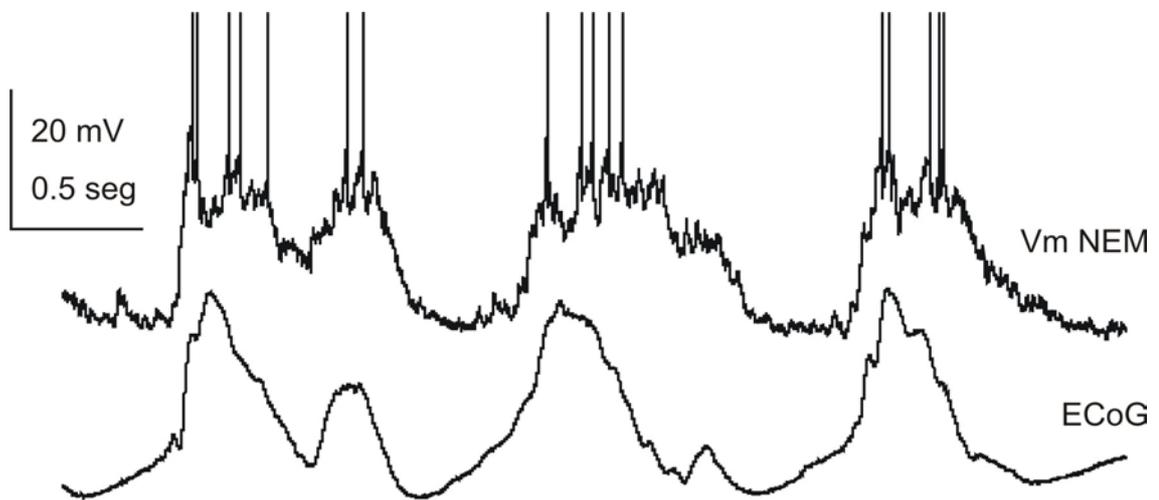


Figura A.9 Las transiciones de estados de las NEMs están acopladas a la actividad rítmica lenta del ECoG. Registro simultáneo del Vm de una neurona estriatal y el ECoG de la corteza frontal. Existe una clara correlación entre la actividad de ~ 1 Hz de ambas señales.

¿Cuál será la naturaleza de los eUP en el estriado dorsal? Las aferencias excitatorias sobre las NEMs del estriado dorsolateral son fundamentalmente neocorticales (sensoriomotrices), y no hipocampales. Claramente debe jugar un rol importante en la dinámica de las transiciones entre eDOWN y eUP la neocorteza, ya que las NEMs de animales decorticados permanecen en eDOWN (*Wilson, 1993*). El conexionado de tipo disperso de las neuronas córtico-estriatales, y las propiedades intrínsecas de las NEMs, hacen suponer que para que ocurra la transición de un eDOWN a un eUP se requiere la contribución de al menos algunas centenas de sinapsis córtico-estriatales. De acuerdo con esto, en los últimos años se ha reportado que la transición de estados de las NEMs correlaciona fuertemente con la actividad poblacional registrada en la aferencia principal, siendo la corteza frontal para las neuronas del estriado dorsolateral (*Mahon y col., 2001; Tseng y col., 2001*) (Figura A.9), y el hipocampo para las del núcleo accumbens (*Goto y O'Donnell, 2001a*). Estos trabajos, al igual que la gran mayoría de los estudios donde se registraron NEMs *in vivo*, fueron hechos en animales anestesiados, donde la actividad cortical suele estar condicionada por el estado de anestesia. Bajo estas condiciones, la actividad de campo cortical o electrocorticograma (ECoG), es dominada por una actividad oscilatoria de onda lenta (~1 Hz), que refleja transiciones sincrónicas entre eUP y eDOWN de las neuronas corticales que le dan origen (*Steriade y col., 1993b; Amzica y Steriade, 1995; Steriade, 2000*). Los eUP en el estriado ocurren concomitantemente con la fase de la onda lenta cortical que refleja los eUP corticales. Además, al igual que las NEMs, las neuronas corticales solamente disparan potenciales de acción en el eUP. En conjunto, esto indicaría que las fluctuaciones del Vm de las NEMs reflejan una alternancia entre estados activos (eUP) y estados silentes (eDOWN) de actividad cortical.

Aquí llegamos entonces a un punto de especial interés para este trabajo. A partir de lo expuesto en el último párrafo, la actividad subumbral estriatal podría representar la arquitectura funcional de las proyecciones córtico-estriatales. Es decir que, aunque se lo registre en un animal anestesiado, el Vm de una NEM nos daría información precisa del estado de activación de la región cortical que la inerva, y nos permitiría estudiar la dinámica temporal y la funcionalidad de la

organización espacial de la transmisión de información entre la corteza cerebral y el estriado.

Es por todo esto que en el laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales encontramos particularmente interesante la aproximación que ofrecen los registros simultáneos de la actividad de campo cortical y el potencial de membrana de las neuronas estriatales para estudiar asociaciones funcionales entre esas estructuras. Sin embargo, antes de pasar a enumerar los objetivos generales de este trabajo, es necesario familiarizarnos un poco con diversos patrones de actividad que pueden observarse en los circuitos tálamo - corticales, incluyendo su significación en el ciclo sueño vigilia y en estados conductuales.

5. La actividad eléctrica del cerebro es dinámica

El patrón de activación cortical predice el estado conductual

La actividad eléctrica de la corteza cerebral refleja los diferentes estados conductuales que se suceden a lo largo del ciclo de sueño – vigilia. A partir de registros de EEG, aunque también midiendo la actividad de campo local, se han identificado diversos patrones de actividad rítmica cerebral (*Steriade y col, 1990; Steriade, 2000; Gervasoni y col, 2004*). En principio, podríamos agruparlos en dos estados extremos de activación cortical, uno sincronizado y otro desincronizado.

Estado cortical sincronizado. El estado de sincronización cortical refiere a una actividad de onda lenta típicamente observada durante el sueño lento o en animales anestesiados (*Steriade y col, 1990; Amzica y Steriade, 1995; Steriade, 2000; Mahon y col., 2001; Tseng y col., 2001, Gervasoni y col, 2004*) y suele abarcar extensos territorios corticales y talámicos (*Amzica y Steriade, 1995; Steriade, 2000; Massimini y col., 2004; Gervasoni y col., 2004*). El correlato intracelular del ritmo lento es una transición del potencial de membrana de las neuronas corticales entre eUP y eDOWN (*Steriade y col., 1993; Stern y col., 1997; Steriade, 2000; Lewis y O'Donnell, 2000; Mahon y col., 2001*). Además, diversos trabajos demostraron

que ese ritmo lento es iniciado, sostenido y finalizado por la misma corteza cerebral, a través de la combinación de corrientes intrínsecas de las neuronas e interacciones sinápticas recurrentes en los circuitos locales (Timofeev y col., 2000; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Shu y col., 2003). Las neuronas talámicas son reclutadas por esta actividad cortical, y las interacciones tálamo-corticales y córtico-corticales contribuyen a sostener la oscilación lenta y a sincronizarla a través de extensos territorios corticales. La oscilación lenta gobierna la aparición, propagación y sincronización de otros ritmos, como es el caso de los husos de sueño. Los “husos” son una actividad oscilatoria de entre 7 y 14 Hz, de origen talámico, y su aparición en el EEG suele ser la referencia que delimita la transición entre el estado despierto y el dormido. El mecanismo celular que subyace a los husos está bien estudiado, e involucra la aparición de una actividad rítmica en las neuronas del núcleo reticular del tálamo cuando, en el sueño lento, cesa la actividad de las neuronas de la formación reticular del tallo cerebral (Steriade y col, 1990; Steriade, 2000). Cuando el tálamo es desconectado de la corteza cerebral, los husos aparecen con retardos de fase en los diferentes núcleos talámicos, mientras que en el cerebro intacto se los puede observar montados sobre las ondas lentas simultáneamente a lo largo de extensas regiones de la corteza cerebral y el tálamo. Por esto, la onda lenta es vista como un evento que recluta y sincroniza ritmos de mayor frecuencia (Steriade, 2000; Amzica y Steriade, 2002).

Estado cortical desincronizado. Cuando desaparecen la oscilación lenta y los husos de sueño, el estado de activación cortical pasa a ser “desincronizado”. Esto ocurre durante la vigilia y durante el sueño REM, y puede ser inducido transitoriamente en animales anestesiados estimulando la formación reticular (Moruzzi y Magoun, 1949; Steriade 2000). El término desincronización se utiliza para describir a un EEG que presenta fluctuaciones de baja amplitud y alta frecuencia. Esto no quiere decir de ninguna manera que carezca o alterne con episodios de actividad oscilatoria. Durante la vigilia tranquila el EEG muestra ritmos sincrónicos en el rango de frecuencias de 8-12 Hz, conocido como ritmo alfa. Suele expresarse cuando

los ojos están cerrados, y desaparecer cuando se abren. Si bien ha sido bastante estudiado, las bases celulares de este ritmo son poco conocidas. Otros ritmos caracterizan el EEG de un individuo cuando realiza tareas cognitivas o sensorio-motoras complejas (*Steriade, 2000*). Entre ellos, el ritmo theta (dependiendo de la especie animal en que se lo registre, puede extenderse desde 3 a 12 Hz), aparece robustamente en el hipocampo, generalmente asociado a actividades locomotoras complejas (llamadas subjetivamente voluntarias, preparatorias, orientadoras o exploratorias), pero también a procesos mnésicos (para una completa revisión del ritmo theta ver *Buzsaki, 2002*). El ritmo theta también fue observado en la neocorteza, pero no es clara la relación que tiene con la actividad hipocampal. Tampoco es claro el mecanismo que genera esta oscilación, pero se sabe que involucra al hipocampo y a algunas de sus aferencias moduladoras (*Buzsaki, 2002*). Finalmente, oscilaciones rápidas en el rango de frecuencias beta (15 – 35 Hz) o gamma (35 – 80 Hz) fueron encontradas en el EEG en muchas estructuras corticales y subcorticales bajo circunstancias relacionadas con procesos mentales complejos como la atención, la percepción visual y auditiva, y el procesamiento del lenguaje (*Llinás y Paré, 1991; Pulvermuller y col, 1997*). Por otro lado, se observó que el disparo de potenciales de acción de manera oscilatoria a alta frecuencia entre neuronas corticales espacialmente segregadas refleja las propiedades globales de un estímulo visual (*Gray y col, 1989; Singer y Gray, 1995*). En conjunto, estos hechos llevaron a proponer que las funciones superiores del cerebro se fundamentan en la activación de ensambles de neuronas distribuidas espacio – temporalmente, y que las oscilaciones cerebrales servirían, entre otras cosas, para optimizar el reclutamiento de los ensambles (*Llinás y Paré, 1991; Singer y Gray, 1995; Pulvermuller y col, 1997; Engel y col, 2001; Gray 1999; Varela y col, 2001; Buzsaki y Draguhn, 2004*).

En resumen, la actividad cortical espontánea es altamente dinámica y refleja fielmente el estado conductual de los individuos. Es por esto que, sin lugar a dudas, debe ser un factor a tener siempre presente al momento de evaluar la actividad de las neuronas estriatales. Es importante destacar que

los distintos estados oscilatorios de actividad de la corteza cerebral se presentan en animales anestesiados (*Steriade, 2000*), hecho que ha permitido analizar sus bases a nivel celular y de funcionamiento de redes neuronales, y la transferencia de ritmos entre estructuras cerebrales diversas.

La actividad persistente se observa en muchas estructuras y puede tener diversos mecanismos

Además de interiorizarnos en la naturaleza oscilatoria de la actividad cerebral, es interesante que nos detengamos un poco en el concepto de actividad persistente. Este término suele utilizarse para hacer referencia a un cambio sostenido en la tasa de disparo de potenciales de acción de una neurona o conjunto de neuronas que perdura más allá del efecto directo de una aferencia o estímulo. Este tipo de actividad duradera ha sido observada en muchos organismos y en diversas regiones del cerebro, y se considera que puede ser un mecanismo de memoria de corto término y de acumulación de información sensorial y motora. Como una prueba de esto, se observó actividad persistente en la corteza cerebral (*Goldman Rakic, 1995; Romo y col, 1999*) y en los GB (*Hikosaka y col, 1989; Schultz y col, 2003*) de monos sometidos a una tarea que requirió de la retención por un corto tiempo de la información dada por un estímulo sensorial. Actividad sostenida también se observó en el tálamo, en el cerebelo (*Loewenstein y col, 2005*), en el colículo superior, en el tallo cerebral y en la médula espinal (*para revisión ver Major y Tank, 2004*). Esta clase de actividad además puede ser generada independientemente de la existencia de estímulos y la actividad de aferencias. De hecho, se observa actividad persistente en los circuitos córtico-talámicos durante las diferentes etapas del sueño (*Steriade, 2000*).

El mecanismo por el cual este tipo de actividad se genera y se mantiene no está totalmente esclarecido, aunque se sabe que depende de las interacciones sinápticas locales, la acción de neuromoduladores y las propiedades intrínsecas de las neuronas. En algunas regiones prevalecerían las interacciones sinápticas de los circuitos, mientras que en otras tendrían más

importancia las corrientes intrínsecas de las células (Wang, 2001; Major y Tank, 2004; McCormick, 2005).

Los eUP de las neuronas corticales han sido muy estudiados con el objetivo de determinar la naturaleza de la actividad persistente. Esto se debe a que esas neuronas sólo disparan potenciales de acción durante esos estados, y a que los eUP son en sí mismos actividad persistente subumbral, que puede ocurrir aun en ausencia de actividad de las aferencias extracorticales. De hecho, la actividad persistente de la neocorteza se manifiesta espontáneamente en trozos de corteza completamente aislados de todas sus aferencias *in vitro*. Se ha observado que esa actividad es sostenida por un balance entre acciones sinápticas excitatorias e inhibitorias recurrentes (Sanchez-Vives y McCormick, 2000), y es promovida por la dopamina y otros neuromoduladores (Egorov y col, 2002; Tseng y O'Donnell, 2005). En este sentido, la actividad persistente cortical podría sustentar la actividad persistente subumbral (eUP) encontrada en el estriado, ya que no se observan eUP en el estriado cuando la corteza no está activa. Por lo tanto resultará interesante estudiar cuáles son los atributos de la actividad cortical que influyen sobre las propiedades espaciales y temporales de los eUP estriatales.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Del análisis realizado en la Introducción podemos concluir que las robustas fluctuaciones subumbrales de las NEMs reflejan en alguna medida la actividad de poblaciones de neuronas corticales. Al momento de comenzar este trabajo, no se había establecido de qué manera impactan distintos patrones temporo-espaciales de actividad neocortical sobre los eventos subumbrales de las NEMs. Los registros de actividad de poblaciones de neuronas corticales, ya sea realizados con macroelectrodos (ECoG) o con múltiples microelectrodos (actividad multi-unitaria) simultáneos con el registro del Vm de una NEM, fueron elegidos como herramienta para analizar la naturaleza dinámica de la comunicación córtico-estriatal.

Los objetivos que se describen a continuación están divididos en dos partes. En la primera (objetivos I-III) analizaremos cómo influye la dinámica temporal de la actividad cortical sobre las modulaciones del Vm de las NEMs. En la segunda parte (objetivo IV) estudiaremos la organización funcional espacial de la comunicación córtico-estriatal.

Objetivos e Hipótesis Específicos

I. ¿Son las fluctuaciones estereotipadas entre eUP y eDOWN el único patrón de actividad subumbral que pueden mostrar las NEMs? ¿Cuál será el comportamiento del Vm de las neuronas estriatales durante los episodios de desincronización de la actividad cortical?

Las transiciones entre eDOWN y eUP de las NEMs están correlacionadas con la actividad oscilatoria lenta de campo cortical. Su naturaleza oscilante y periódica obedece a las características del ECoG bajo las condiciones de registro. Es sabido que la actividad oscilatoria de onda lenta cortical suele observarse durante el sueño lento y los estados de anestesia general, y que se presenta de manera sincrónica a lo largo de extensos territorios corticales (*Steriade y col., 1993; Amzica y Steriade, 1995; Steriade, 2000*). Si las transiciones estereotipadas entre eUP y eDOWN en neuronas estriatales representan un

patrón de activación cortical que se observa en el sueño lento o la anestesia, deberían interrumpirse cuando el ECoG despliega fluctuaciones de baja amplitud y alta frecuencia, como las observadas durante procesos cognitivos y sensorio-motrices. En la parte I del primer capítulo exploraremos esta cuestión estudiando cómo impacta en el Vm de las NEMs la ocurrencia de episodios espontáneos o inducidos de desincronización cortical en una rata anestesiada. Presumimos que la actividad neuronal tónica que subyace a los episodios de desincronización del potencial de campo local cortical debería mantener despolarizado el Vm de las NEMs evitando que se alcance el eDOWN.

II. ¿La respuesta compleja que las NEMs exhiben luego de estimular la corteza cerebral es un reflejo de perturbaciones de fase impuestas sobre la actividad cortical? ¿Es imprescindible un bombardeo sináptico córtico-estriatal constante para sostener a las NEMs en un eUP?

Estudios *in vitro* muestran que la estimulación local con un pulso único de corriente puede silenciar transitoriamente la actividad de ensambles de neuronas corticales (*Shu y col, 2003*). Un evento de estimulación cortical similar evoca, *in vivo*, un potencial sináptico excitatorio en las NEMs seguido de una respuesta tardía constituida de por una secuencia hiperpolarización–despolarización asociada temporalmente de manera muy fuerte con el estímulo. La respuesta tardía se asemeja mucho a las transiciones entre eDOWN y eUP que ocurren espontáneamente (*Wilson y col, 1981; Tseng y col, 2001*). En este trabajo proponemos que existe una estrecha relación temporal entre el apagado y subsiguiente reencendido de los ensambles corticales y el patrón de respuesta tardía de las NEMs. Además, la semejanza entre la respuesta tardía y las transiciones espontáneas entre eDOWN y eUP sugiere que la estimulación cortical produciría una recomposición de la fase de la oscilación espontánea del Vm de las NEMs. Perturbaciones de fase de este tipo son propuestas como un mecanismo fundamental en la codificación de información por parte de extensas redes de neuronas corticales (*Makeig y col, 2002*). Como las NEMs no disparan potenciales de acción fuera de los eUP, si las transiciones entre eDOWN y eUP en neuronas estriatales no pudieran acompañar perturbaciones de fase de ritmos corticales, la transmisión córtico-

estriatal de información podría resultar comprometida. En la segunda parte del Primer Capítulo se estudiará la relación entre la respuesta compleja de las NEMs a la estimulación cortical y la habilidad de dicho estímulo para apagar la actividad persistente de la corteza cerebral *in vivo*. Esto posibilitará analizar además, si las NEMs son capaces de sostener eUP cuando la actividad cortical ha sido silenciada.

III. ¿Existe una correlación entre la actividad de alta frecuencia del ECoG y las modulaciones de alta frecuencia que se observan en los estados despolarizados de las NEMs?

Las NEMs presentan una muy baja probabilidad de disparo de potenciales de acción aun en los eUP. Stern y col. (1998) reportaron que todos los pares de NEMs que registraron en ratas anestesiadas oscilaron entre eUP y eDOWN de forma sincronizada y casi sin diferencia de fase, aunque lo mismo no sucedió con la temporalidad de sus potenciales de acción. Esto sugiere que una señal específica, adicional al barrido sináptico excitatorio que lleva a las NEMs al eUP, debe ser necesaria para inducir a las NEMs a disparar potenciales de acción. Las NEMs podrían ser exquisitamente sensibles a patrones témporo-espaciales específicos de actividad cortical y ser reclutadas transitoriamente por grupos de neuronas corticales en patrones de actividad oscilatoria sincrónica de alta frecuencia. En la tercera parte del Primer Capítulo se evaluará la posibilidad de que las modulaciones de alta frecuencia que se observan en los eUP de las NEMs reflejen una actividad sincrónica cortical de ese tipo.

IV. ¿En qué medida están las transiciones entre eDOWN y eUP de una NEM dirigidas por las aferencias provenientes de territorios neocorticales particulares?

Como las proyecciones córtico-estriales respetan cierta organización topográfica, podría esperarse que una NEM entre en el eUP siguiendo a la activación de una población de neuronas ubicada en territorios corticales particulares. Goto y O'Donnell (2001) demostraron que los eUP de las NEMs de la región medial del núcleo accumbens muestran una mejor correlación con las variaciones del potencial de campo del hipocampo ventral que los de las

NEMs ubicadas en otras regiones del accumbens. Esto sugiere que existe cierto grado de organización funcional espacial en el sistema de proyección hipocampo-accumbens. Sin embargo, no existe evidencia funcional que demuestre la existencia de canales espacialmente segregados de transferencia de actividad neocortical en la forma de fenómenos subumbrales hacia el estriado dorsal. En el segundo Capítulo de este trabajo se evaluará este punto analizando la organización espacial de la relación entre las modulaciones del Vm de las NEMs y la actividad poblacional de diferentes regiones de la corteza cerebral.

METODOLOGÍA

Cuidado y preparación de los animales

Los experimentos descritos en esta tesis fueron realizados en ratas macho Sprague–Dawley adultas mantenidas hasta el momento del experimento en un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas, con comida y agua disponible *ad libitum*. El día del experimento, las ratas fueron anestesiadas con uretano (1.2g / kg, diluido en solución fisiológica, intraperitoneal), tratadas con anestésico local (durocaína) en el cuero cabelludo y en las zonas de fijación, y montadas en un marco estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). La temperatura rectal del animal fue mantenida entre 36 – 37° C mediante una manta térmica servocontrolada (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá). A lo largo de los experimentos se administraron dosis adicionales de uretano (típicamente 0.3–0.4g / kg, subcutáneo, cada 3–4 horas) con el objetivo de conservar un nivel estable de anestesia, que fue evaluado a través de los registros electrocorticográficos y mediante el reflejo de retirada de los miembros traseros.

Una vez finalizados los registros electrofisiológicos, se administró a los animales una dosis letal de uretano, y posteriormente se los perfundió intracardíacamente con solución fisiológica fría, seguida de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salina (PBS) 0.1 M. Luego, se extrajo el cerebro, se lo incubó toda la noche en el mismo agente fijante, y luego en una solución de PBS 0.1 M con 15% de sucrosa por un período de 24–48 horas. Las estructuras de interés fueron cortadas en rodajas de 40µm de espesor con un micrótopo de congelación, para luego ser sometidas al tratamiento que corresponda (ver más adelante).

Registros intracelulares de neuronas estriatales

Procedimientos para el registro intracelular de neuronas estriatales

Los registros intracelulares se obtuvieron de tres territorios estriatales diferentes (ver Figura E.2) según las siguientes coordenadas estereotáxicas

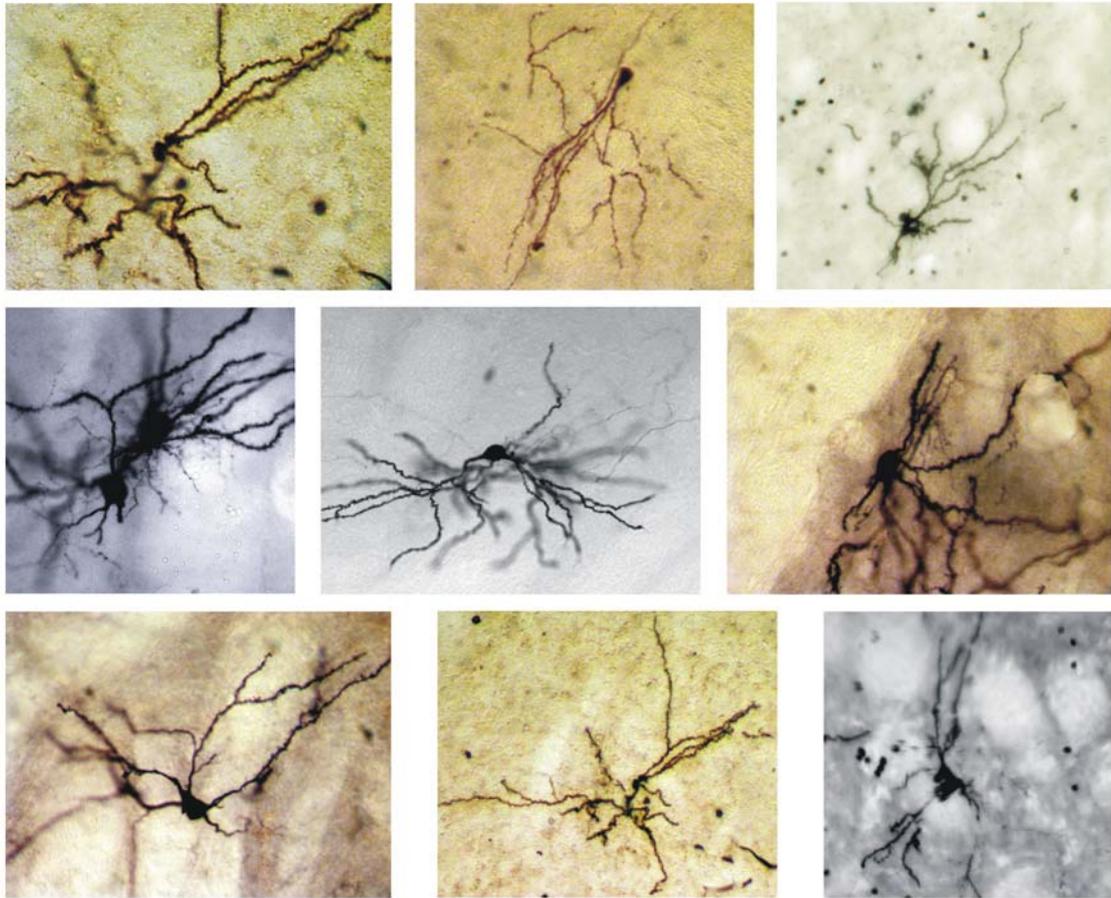
(AP =antero–posterior relativo al bregma; L =lateral respecto a la línea media; P =profundidad desde la superficie cortical; *Paxinos y Watson, 1997*):

- Región dorsolateral rostral: AP: +0.5–+1mm; L: 3–4mm; P: 3–5mm.
- Región ventromedial rostral: AP: +0.2– -0.2mm; L: 2–2.5mm; P: 3–5mm.
- Región dorsocaudal: AP: -1.4– -2mm; L: 4–5mm; P: 3–5mm.

Se utilizaron microelectrodos de vidrio de borosilicato rellenos con acetato de potasio 2M y 2% de Neurobiotina (RBI, Natick, MA, USA), fabricados con un *Puller* horizontal (Model P-97, Sutter Instruments Co., USA). La señal fue enviada a un amplificador (Axoclamp 2B, Axon Instruments, Union City, CA, USA o IR-283, Neurodata, Delaware Water Gap, PA, USA), digitalizado a 10kHz (Digidata 1322A, Axon Instruments) y almacenado en una computadora personal.

Para realizar los registros intracelulares de neuronas estriatales se siguió el siguiente procedimiento. Una vez que la punta del microelectrodo estuvo apoyada en la superficie cortical, se compensó la diferencia de potencial respecto de la referencia, la resistencia del microelectrodo (que fue de entre 60 y 130 M Ω , medida a través del pasaje de pulsos despolarizantes) y su capacitancia. Luego el microelectrodo se desplazó lentamente en sentido perpendicular a través de la corteza cerebral con un micromanipulador hidráulico. Al alcanzarse la profundidad del estriado se dejó estabilizar la preparación por quince minutos. En ese momento comenzaron los intentos de empalar una neurona estriatal, avanzando muy lentamente y pulsando periódicamente el botón de booz (esto produce una transitoria modificación de la capacitancia de la punta del microelectrodo, lo que ocasiona una pequeña vibración que facilitaría la penetración de la célula por el electrodo). Cuando una neurona es empalada se observa una caída abrupta del potencial registrado y en ese momento se compensa el potencial de fuga de la célula (debido al traspaso del electrodo por la membrana) aplicando corriente hiperpolarizante por la punta del electrodo. Luego, lentamente se retiró completamente la corriente y cuando el registro se mostró estable comenzó el protocolo del experimento.

A



B

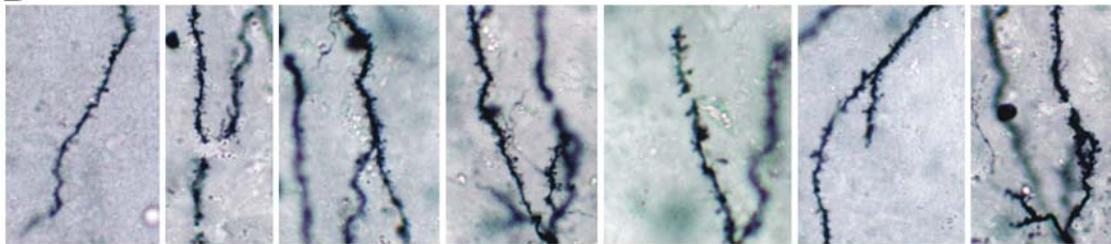


Figura C.1 Morfología de las Neuronas espinosas medianas estriatales. Microfotografías de NEMs marcadas con neurobiotina y reveladas con un cromógeno. En todos los casos se puede identificar claramente el soma de tamaño mediano y las dendritas cubiertas de numerosas espinas. **B** Magnificación de las dendritas para observar más claramente las espinas.

Una vez finalizado el protocolo previsto, se intentó marcar la neurona registrada inyectándole Neurobiotina mediante pulsos cuadrados de corriente positiva (200ms de duración, 2Hz, y de amplitud suficiente como para inducir a la célula a disparar algunos potenciales de acción en cada pulso, típicamente 0.5nA). Luego de extraer el cerebro y procesarlo según se describió anteriormente, se incubaron secciones coronales del estriado de 40 μ m de grosor con un complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (Vector Labs), y utilizando la diaminobenzidina como cromógeno se reveló la presencia de la neurona registrada (*Kita y Armstrong, 1991; Tseng y col., 2001*). Mediante este procedimiento se consigue distinguir claramente el soma, las dendritas proximales y la presencia o no de espinas dendríticas (Figura C.1).

Caracterización electrofisiológica de las NEMs

Las señales intracelulares fueron consideradas de buena calidad técnica, y por lo tanto factibles de ser incorporadas para el análisis, cuando alcanzaron de manera estable por más de 5 minutos los siguientes estándares: Vm de reposo menor a -70mV, potencial de acción de amplitud mayor a 40mV y resistencia de entrada mayor a 25M Ω (*Tseng y col, 2001*).

Dado que la resistencia de entrada (Re) de las NEMs depende del estado del Vm (eDOWN o eUP), se la calculó aplicando pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante (I) durante los eDOWN (típicamente de -0.2 nA) y determinando la amplitud del cambio de Vm (Δ Vm) inducido entre 80 y 90ms después del inicio del pulso. Así, Δ Vm / I =Re.

La amplitud de los potenciales de acción se calculó como la diferencia entre el valor del Vm al pico del PA menos el umbral de disparo. Por su lado, el umbral se determinó como el valor del Vm cuando la despolarización abrupta que precede al potencial de acción alcanza una pendiente mayor o igual a 4mV / ms (*Wickens y Wilson, 1998; Tseng y col, 2001*).

Se estudió la distribución de valores de Vm de las NEMs mediante histogramas. Si el Vm presenta transiciones entre eDOWN y eUP, el histograma muestra una distribución bimodal, donde la moda de cada pico

corresponde a los valores de Vm típicos para cada estado (ver Figuras D.2, D.4) (*Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern y col, 1997; Tseng y col, 2001*). En ocasiones los registros produjeron histogramas unimodales, y en ese caso la moda del único pico fue considerada como el valor de Vm típico de ese registro.

La tasa de disparo de potenciales de acción de las NEMs se calculó en una ventana temporal de entre 30 y 90 segundos. Una neurona fue considerada silente cuando su tasa de disparo fue menor a uno cada 30 segundos.

Registro de los electrocorticogramas (ECoG)

Se utilizaron electrodos concéntricos bipolares (SNE-100, Better Hospital Equipment, New York, USA) para obtener registros diferenciales de la actividad de campo (ECoG) de las siguientes regiones corticales (Figura D.1):

- Corteza motora primaria: AP: +3.5mm; L: 2.5mm; P: 2.5mm.
- Corteza sensorial de las vibrisas: AP: -2.8mm; L: 6.5mm; P: 2mm.
- Corteza límbica: AP: +3.5mm; L: 0.5mm; P: 4mm.

Los ECoG fueron filtrados analógicamente entre 0.1–300Hz, amplificados (ER-98, NeuroData; Lab1, AKONIK, Argentina), digitalizados a 10kHz (DigiData 1322A, Axon Instruments) y almacenados en una computadora personal.

La localización anatómica de los electrodos de registro de ECoG se determinó por medio de una tinción de Nissl de las secciones histológicas correspondientes (Figura D.1).

Registro de la actividad multi-unitaria cortical

En algunos experimentos se obtuvieron registros de unidades aisladas o multi-unidades de la corteza cerebral. Para esto se utilizó una estructura de cuatro hileras con cuatro canales cada una (200 micrones de separación vertical entre contactos y 200 micrones de separación horizontal entre las hileras; modelo 4x4_4mm200, The University of Michigan, Center for Neural

Communication Technology, USA). La estructura se orientó en el plano coronal con un ángulo lateral de 20° y se posicionó ~0.5mm posterior al sitio de registro del ECoG de la corteza motora. Las señales fueron filtradas (0.3-3kHz), amplificadas y digitalizadas a 10kHz (DigiData 1200, Axon Instruments) y almacenados en una computadora personal.

Estimulación eléctrica de estructuras centrales

La estimulación eléctrica es una técnica muy utilizada para inducir la activación de estructuras del sistema nervioso central. Con este fin, en algunos experimentos de esta tesis se utilizaron electrodos conformados por dos cables de tungsteno de 50 μ m de diámetro cubiertos de teflón y enrollados (separación vertical entre las puntas de ~0.5mm) colocados a una distancia de ~0.5mm de cada sitio de registro de ECoG. La estimulación consistió en pulsos cuadrados de 0.3 - 0.7 mA de 0.3ms de duración aplicados con una frecuencia de 0.5Hz o de entre 0.16 - 0.25Hz (ver después). En otros experimentos se estimuló la región mesopontina (RM) a través de electrodos bipolares concéntricos similares a los utilizados para registrar los ECoG. Los electrodos fueron colocados 1mm anterior al lambda, 2mm lateral a la línea media y 7.5mm por debajo de la superficie cortical, y se aplicaron pulsos de estimulación de entre 0.2 - 0.8mA de 0.3ms de duración, aplicados a 50Hz en trenes de entre 0.3 - 0.5 segundos (Núñez, 1996). Para realizar estos procedimientos se utilizó un generador de pulsos Isoflex y un estimulador Master-8 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel). La localización anatómica de los electrodos se realizó mediante tinciones de Nissl como ya fue explicado (ver más arriba).

Lesión de la vía nigro-estriatal mediante la inyección del neurotóxico 6-OHDA

En los experimentos tendientes a estudiar el rol de las proyecciones nigroestriatales en la fisiología córtico-estriatal, se realizaron registros en ratas con lesión unilateral de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral. Para esto, se inyectó de manera unilateral en el fascículo prosencefálico medial (FPM,) el neurotóxico específico para células catecolaminérgicas 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esta droga es captada por los terminales dopaminérgicos a través del transportador de dopamina, una vez dentro, sufre un proceso de oxidación que termina siendo letal para la neurona (*Ungerstedt, 1971*). Para realizar esta lesión quirúrgica, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50mg / kg, intraperitoneal), tratadas con anestésico local en el cuero cabelludo y en los puntos de fijación, y montadas en el marco estereotáxico. Una solución de 6-OHDA hidrobromuro (Sigma, St. Louis, MO, USA) de 8mg de droga libre de base en 4ml de ácido ascórbico al 1% fue inyectada en el FPM (coordinadas estereotáxicas: 4.3mm posterior al bregma, 1.6mm lateral a la línea media, y 8.3mm por debajo de la superficie cortical; *Paxinos y Watson, 1997*). Los animales fueron controlados durante la etapa de recuperación de la anestesia y luego vueltos a poner en sus cajas habituales.

La efectividad de la lesión fue evaluada dos semanas después de la cirugía mediante la prueba conductual de “ajuste de pasos” (*Olsson y col, 1995*). Esta prueba evidencia el grado de déficit motor en los miembros contralaterales a la lesión. Consiste en tomar al animal del cuerpo inmovilizando los miembros posteriores y una pata anterior, y con uno de los miembros delanteros apoyados en una mesa, arrastrarlo a lo largo de 80cm hacia un lado y otro. Los animales normales levantan y apoyan el miembro (ajustes) alternativamente varias veces a lo largo de la distancia recorrida, en cambio los animales lesionados tienen dificultades para realizar dicho movimiento con el miembro contralateral a la lesión. Los animales que poseían un déficit contralateral considerable (menos de 5 ajustes en 80cm) fueron seleccionados para los registros electrofisiológicos. El grado de denervación dopaminérgica fue también confirmado *post mortem* mediante una técnica de inmunohistoquímica. Se utilizaron cortes histológicos a nivel estriatal y de la SN. Las secciones se incubaron en una solución de albúmina bovina para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido, y posteriormente se expusieron a un

anticuerpo poli-clonal dirigido contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH; Pel Freez, Arkansas), marcadora de neuronas catecolaminérgicas. La visualización de la proteína se realizó utilizando un anticuerpo secundario biotinilado, incubando luego las secciones con un complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (Vector Labs), y utilizando la diaminobenzidina como cromógeno (Tseng y col, 2001).

Los registros electrofisiológicos se realizaron 6 a 10 semanas después de la cirugía, mediante los mismos procedimientos que se utilizaron en animales normales (ver más arriba). Los registros se obtuvieron del hemisferio lesionado, y el electrodo de estimulación de la RM se colocó ya sea en el hemisferio ipsilateral (2 experimentos) o el contralateral (3 experimentos).

Consideraciones especiales

En todos los casos se trabajó con la señal del ECoG normalizada. De esta manera se evitó que la amplitud absoluta de las señales, que puede variar de acuerdo a diversos parámetros como la resistencia del electrodo o la posición relativa respecto del centro generador de la actividad poblacional registrada, interfiera en los análisis cuantitativos. Por esta razón en las figuras no se señaló la escala de los ECoG, que osciló en torno al cero alcanzando valores relativos máximos de +1 y -1 (la amplitud absoluta típica de los ECoG en nuestros es de 0.4 a 1 mV pico a pico durante la oscilación lenta). Las Figuras están diseñadas para resaltar cambios en la amplitud en los casos en que se consideró necesario (como en las transiciones a los episodios de desincronización cortical). El trazo diferencial del ECoG fue trabajado de manera que la fase positiva corresponde al estado activo de los ensambles corticales, y la fase negativa al estado silente. Esto se evidencia claramente en el trazado del ECoG por la aparición de modulaciones de alta frecuencia en la cima de la fase activa de la onda, que coincide con el disparo de potenciales de acción por parte de los ensambles de neuronas corticales (Figura C.2).

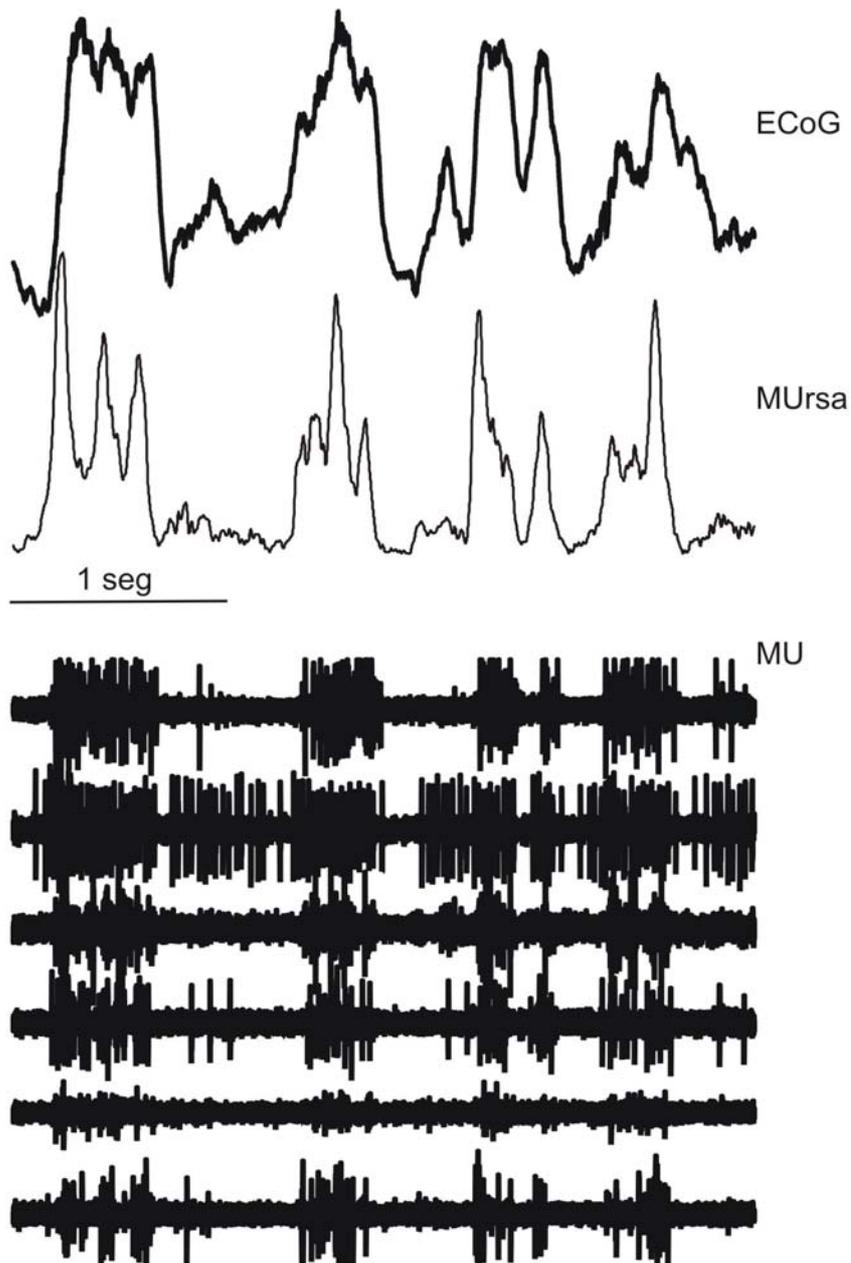


Figura C.2 Relación entre la polaridad de la onda del ECoG y los estados activos corticales. La polaridad de la onda de los registros diferenciales del ECoG se muestra de tal forma que la fase positiva corresponde a los períodos de tiempo en que los ensambles corticales están activos, como lo demuestra el registro MU cortical y su señal rectificadas, sumada y alisada (MUrsa). Nótese las modulaciones de alta frecuencia, típicamente en el rango de los husos de sueño, en la cima de la onda del ECoG que refleja la actividad de las unidades corticales.

Los gráficos de datos poblacionales están expresados en barras que reflejan el valor medio \pm el error estándar de la media (EEM). Caso contrario es especificado en el gráfico que corresponde. En cada Figura además se aclara la prueba estadística utilizada para hacer las comparaciones. En los casos en que existen diferencias significativas, un símbolo indica el valor que difiere de los demás, o se indicaron en la leyenda los valores que difirieron entre sí. De no haber ninguna señalización significa que no hubo diferencias significativas.

Los análisis de las series de tiempo de la parte 1 del primer capítulo se realizaron con el programa Statistica 4.2 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Para los estudios de las demás secciones se utilizaron rutinas diseñadas a tal fin en el laboratorio bajo el ambiente de programación Matlab 6.5 (The MathWorks Inc., USA).

Análisis de las señales

Se utilizaron diversas técnicas de análisis de series de tiempo con el objetivo de estudiar la presencia de componentes oscilatorios en las señales. Algunas además permiten establecer asociaciones lineales entre dos señales registradas simultáneamente. Existen también métodos tendientes a explorar asociaciones no lineales entre señales. Si bien resultaría interesante incursionar en esas técnicas, los métodos clásicos resultaron suficientes para cumplir con la mayor parte de los objetivos planteados en este trabajo.

Cada una de las técnicas posee ventajas y limitaciones. Un problema común a todas es la relación entre las dimensiones tiempo y frecuencia. Una señal electrofisiológica consiste de una serie de valores de voltaje en función del tiempo. Esa misma serie puede describirse y estudiarse en el dominio de las frecuencias. Cuanto mejor resolución de frecuencias se desea, más grande debe ser la ventana temporal a utilizar, es decir, menor resolución en el dominio tiempo. Según cuál sea el interés en cada caso, habrá que tener en cuenta este factor para diseñar correctamente el análisis.

Correlación cruzada

La correlación cruzada es una medida estadística de la similitud entre dos series de tiempo reales y estacionarias. Su definición formal es:

$$r_{xy}(l) = \int x(t) * y(t+l)$$

con $x(t)$ e $y(t)$ correspondiendo a series temporales, l = corrimiento temporal con $0 < l < l_{\max}$ y se integra el producto $x(t)*y(t)$ dentro de una ventana de tiempo predefinida de duración = N .

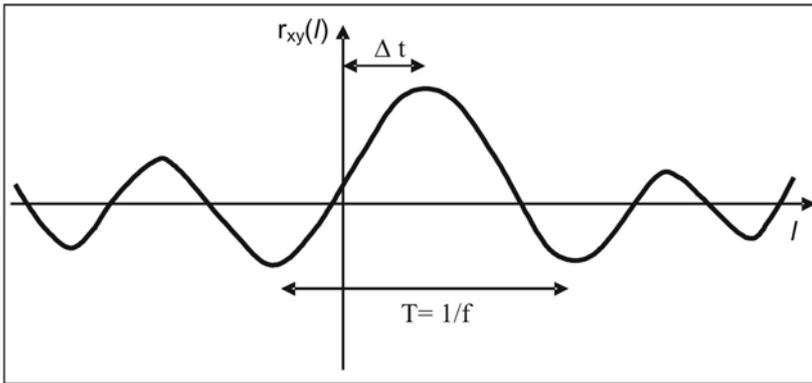
En la práctica, para el análisis de señales discretas, se utiliza la correlación cruzada como una herramienta que nos permite rescatar las componentes comunes a ambas señales, al tiempo que atenúa o anula las componentes aleatorias. Se calcula como:

$$r_{xy}(l) = 1/N (\sum x(t) * y(t+l))$$

desarrollando la sumatoria para los valores dentro de la ventana de duración N .

El resultado se expresa en tiempo relativo (o sea valores del l) y, en caso de existir correlación para determinadas componentes, da lugar a una función oscilatoria que contiene los periodos de dichas componentes, con valor máximo cercano a $l = 0$, atenúandose a medida que l crece en los campos positivo y negativo. La magnitud o grado de atenuación de las oscilaciones depende del nivel de ruido y de la variabilidad de estas componentes, de manera que la integral de esta función nos daría una estimación de la magnitud de la oscilación sincrónica entre ambas señales.

En caso de existir una única componente común, o netamente dominante, la diferencia entre $l = 0$ y el l correspondiente al máximo de la función nos permitiría calcular la diferencia de fase (Δt) entre ambas señales para dicha componente, y la diferencia entre 2 máximos o mínimos de la función al período (T) de la oscilación.

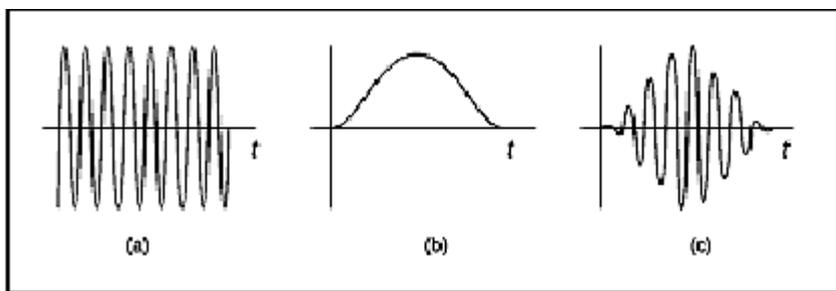


Análisis espectral mediante Transformada Rápida de Fourier (FFT)

La aplicación del algoritmo de la FFT permite cuantificar eficiente y rápidamente la composición frecuencial de una señal estacionaria. El Teorema de Fourier sostiene que una serie de eventos (como los registros electrofisiológicos) puede ser considerada como la convolución (“suma”) de una serie de funciones sinusoidales de diferentes frecuencias, amplitudes y fases. En el caso de los registros intra y extracelulares, así como en el EcoG, la metodología de adquisición de estas señales las limita a un rango frecuencial finito y, por lo tanto, pueden ser representadas por un conjunto finito de funciones sinusoidales a partir de las cuales estas pueden ser reconstruidas. El resultado obtenido al computar la FFT consiste en una serie numérica imaginaria asociada a cada componente frecuencial, a partir de la cual se puede obtener la amplitud (o la potencia = amplitud^2) y la fase para dicha componente contenida en la señal original.

Para poder caracterizar frecuencialmente una señal estacionaria, es necesario conseguir estabilidad estadística en la estimación de cada componente frecuencial, para lo cual utilicé el método de Welch. Según este la señal original es dividida en segmentos temporales estacionarios de duración predefinida = T , parámetro crítico ya que determinará la resolución espectral de la estimación ($\Delta f = 1/T$). A estos segmentos se les aplica una ventana de Hamming que modula la amplitud de la señal de manera que se inicie y finalice con valores cercanos a 0, evitando de esta manera los efectos de borde que agregarían componentes espúreas de alta frecuencia a

la estimación. Finalmente los se les aplica la FFT obteniéndose un periodograma que contiene los componentes frecuenciales contenidos en dicho segmento junto con su potencia y fase. Este proceso se repite a lo largo de la totalidad de la ventana temporal de análisis pudiendo cada segmento ser independiente del previo o presentando un cierto grado de superposición con el mismo, según la finalidad de la estimación: cracterización espectral o evolución de la composición espectral respectivamente. Para el primer caso los periodogramas son finalmente promediados para estabilizar la estimación.



Ejemplo de señal cruda, ventana de Hamming y señal modulada por la misma

Si al producto de la correlación cruzada le aplicamos este método de estimación espectral , se obtiene el espectro de potencia cruzado que permite cuantificar los componentes frecuenciales comunes a las señales que le dieron origen.

El análisis de coherencia es una medida de la correlación lineal normalizada que existe entre dos señales registradas simultáneamente. Se expresa en función de la frecuencia con valores que van de 0= ninguna coherencia, a 1= coherencia total. Esta medida de correlación ha sido utilizada para revelar la posible existencia de generadores comunes y evaluar su grado de interconexión biológica. Su representación gráfica se expresa en forma de un histograma de coherencia asociado a un espectro de fase para las mismas. Si la relación de fase para un rango frecuencial, que presenta coherencia elevada, resulta lineal, se puede calcular la demora temporal existente entre ambas señales para dicho rango frecuencial . Visto

de esta manera, los espectros de coherencia y fase son herramientas interesantes para estudiar el grado de interconexión entre las estructuras generadores de dichas señales y la propagación entre las mismas pudiendo, en ocasiones, determinar el origen de estas.

Transformada de Hilbert:

La Transformada de Hilbert es una herramienta matemática que permite expresar cualquier señal real en un componente real y otro imaginario, combinación a la que se conoce como señal analítica. Disponer de esta nueva expresión de la señal resulta de suma utilidad ya que no se pierde información y permite calcular atributos instantáneos de la señal como ser: la envolvente de la amplitud, la fase y la frecuencia instantáneas.

Desde el punto de vista formal la Transformada de Hilbert de la señal real $s(t)$ se define como:

$$s^H(t) = 1/\pi \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} s(\tau) / (t-\tau) d\tau$$

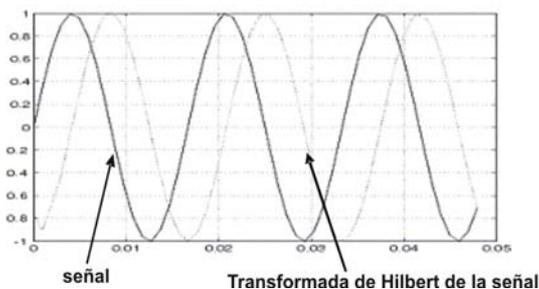
Otra forma de definirla es mediante la aplicación de convolución de señales:

$$s^H(t) = 1/\pi.t * s(t)$$

esta nueva expresión de la transformada en el ámbito temporal nos permite obtener fácilmente una representación en el ámbito frecuencial mediante la aplicación de la Transformada de Fourier a cada uno de sus términos, expresándose entonces como:

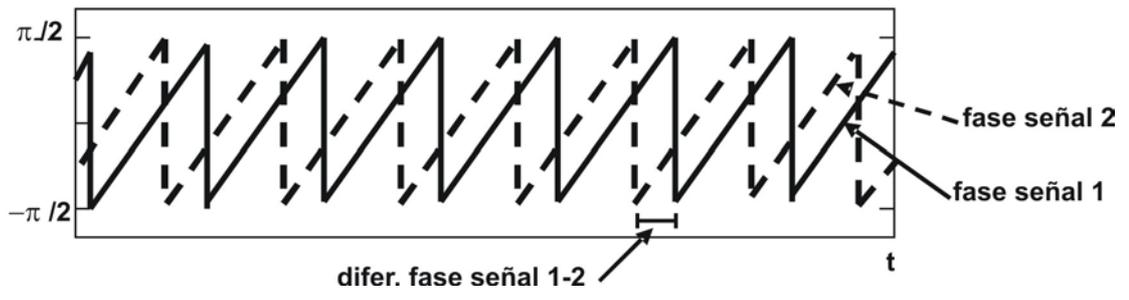
$$S^H(\omega) = -i \cdot \text{sgn}(\omega) \cdot S(\omega)$$

con $S(\omega)$ y $S^H(\omega)$ representando el espectro de frecuencia de la señal y su transformada de Hilbert, y $sgn(\omega)$ el signo de cada una de las componentes frecuenciales. Si ahora aplico la inversa de la Transformada de Fourier obtengo la Transformada de Hilbert de la señal original resultando en una copia exacta de la misma con un corrimiento de fase en -90° ($-\pi/2$). De esta manera uno puede estudiar la evolución temporal de la amplitud o la potencia (amplitud^2) de la señal, trabajando con el módulo del componente real de la señal analítica, o de la fase, calculando el argumento de la misma. La variación temporal de esta última permite evaluar la frecuencia instantánea de la señal.



Si bien teóricamente no existen limitaciones impuestas por la composición frecuencial de la señal a analizar por este método, para la determinación fehaciente de los atributos instantáneos de la señal es necesario acotar significativamente el rango frecuencial de la misma, para lo cual se utiliza un filtro pasa-banda de rango estrecho, y sobre esta señal filtrada se realiza el procedimiento de análisis descripto.

La aplicación de la Transformada de Hilbert a distintas bandas frecuenciales del ECoG se utilizó con la finalidad de estudiar la evolución temporal de las diferencias de fase entre distintos canales de registro.



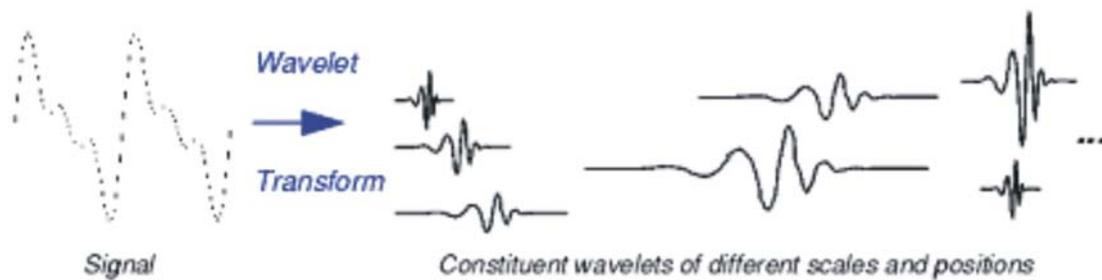
Análisis mediante wavelets

La utilización del análisis de wavelets en registros electrofisiológicos permite caracterizar la evolución temporal de las distintas componentes frecuenciales de las señales. La capacidad de descomposición frecuencial mediante ventanas temporales variables que se trasladan a lo largo de todo el registro transforma a este método en una excelente herramienta de análisis tiempo-frecuencia.

Las wavelets son funciones oscilatorias que presentan una rápida y suave atenuación hacia los extremos y proporcionan buena capacidad de localización tanto en tiempo como en frecuencia. Una familia de wavelets $\psi_{a,b}$ es un conjunto de funciones elementales generadas por expansión y traslación de una única función wavelet madre $\psi(t)$:

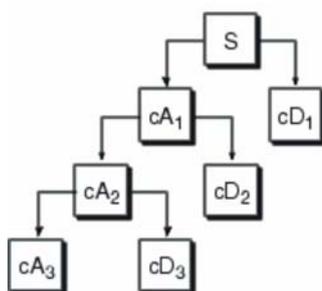
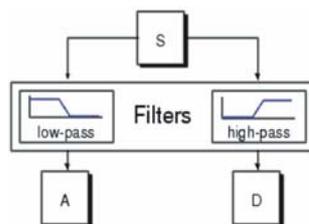
$$\psi_{a,b}(t) = |a|^{-1/2} \cdot \psi[(t-b)/a]$$

donde **a** y **b** son números reales, con **a** $\neq 0$, y constituyen los parámetros de **escala** y **traslación** respectivamente. A medida que **a** se incrementa la wavelet se torna cada vez mas comprimida.



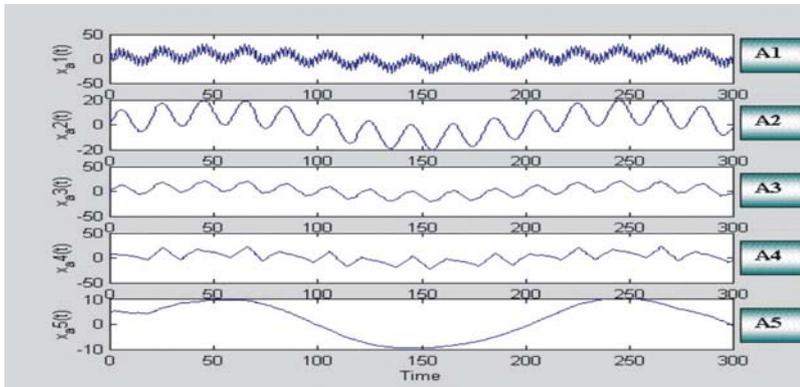
En el análisis continuo mediante wavelets los valores de escala se modifican paulatinamente de manera que el resultado presenta un gran número de coeficientes wavelet que contienen la información frecuencial de cada nivel de análisis. Dado que mi objetivo era fragmentar la señal en bandas

frecuenciales para analizar las correlaciones entre las mismas para diferentes canales de registro, decidí utilizar el método de análisis discreto mediante wavelets, que puede ser implementado mediante un banco de filtros digitales de rango frecuencial variable. Este método tiene como ventaja la velocidad de cálculo y el menor número de coeficientes que da como resultado. Para cada nivel de análisis, equivalente a cambios en el valor de escala, el algoritmo pasa la señal por un filtro pasa-altos que da lugar a un componente que contiene las altas frecuencias denominado detalle (D), quedando el resto de la señal como un componente denominado aproximación (A). Este último es re-muestreado a una frecuencia equivalente al 50% de la frecuencia de muestreo original y se repite el proceso para el siguiente nivel. El siguiente esquema muestra el proceso de análisis:



De esta manera la señal original queda descompuesta en una serie de componentes que contienen rangos frecuenciales cada vez mas estrechos mejorando la resolución frecuencial en detrimento de la capacidad de

localización temporal. El siguiente gráfico muestra el resultado de la descomposición frecuencial:



DESARROLLO EXPERIMENTAL

PRIMER CAPÍTULO.

CARACTERÍSTICAS TEMPORALES DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD CORTICAL Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS NEMs

Consideraciones generales

El objetivo general de este primer capítulo es determinar cuáles son las características de la dinámica temporal de la actividad de la corteza cerebral que influyen sobre las modulaciones del potencial de membrana de las neuronas estriatales. Con este fin, a continuación se presentan experimentos basados en el registro simultáneo de la actividad de campo cortical y del Vm de las NEMs en ratas anestesiadas con uretano. Los experimentos están divididos en tres partes, cada uno diseñado para contestar una pregunta diferente. En algunos casos, los mismos registros fueron sometidos a los tratamientos y/o análisis descritos en cada parte.

Para la primera parte se utilizaron NEMs registradas en la región más dorsal y lateral del estriado, con el concomitante ECoG de la corteza motora (Figura D.1). Las neuronas que fueron exitosamente marcadas con neurobiotina, reveladas y teñidas, evidenciaron la morfología típica de las neuronas espinosas de proyección. En un solo caso, la neurona marcada no presentó espinas y su soma era de mayor tamaño al de las otras, sugiriendo que se trataba de una interneurona gigante colinérgica. El registro de esa neurona no fue incluido en este trabajo.

En los experimentos de la segunda y tercera parte de este capítulo se incluyeron algunas neuronas del estriado dorsolateral, otras del estriado ventromedial y otras del estriado caudal, registradas concomitantemente con los ECoG de la corteza motora, pre-límbica y sensorial, respectivamente. Los pares NEM-ECoG fueron seleccionados de esa manera debido a que cada región cortical es la que inerva más fuertemente el correspondiente territorio

estriatal (ver en Introducción la organización de las proyecciones córtico-estriatales, Figura A.7, también ver Figura E.1). En el próximo capítulo utilizaremos, entre otros, estos registros para analizar en detalle la funcionalidad de la organización espacial de esas conexiones.

Además de los electrodos de registro de ECoG, en algunos experimentos se colocaron electrodos de estimulación (ver metodología) en la corteza respectiva (Figura D.1) o en la región mesopontina (Figura D.1). El propósito de los primeros fue inducir una estimulación local de la corteza cerebral con un pulso único, mientras que la RM se estimuló con un tren de pulsos para inducir una actividad desincronizada del ECoG (ver más adelante).

Por último, todas las NEMs registradas cumplieron con los parámetros de calidad de registro explicitados en la sección de metodología. Asimismo, presentaron las propiedades electrofisiológicas básicas típicas de las NEMs in vivo.

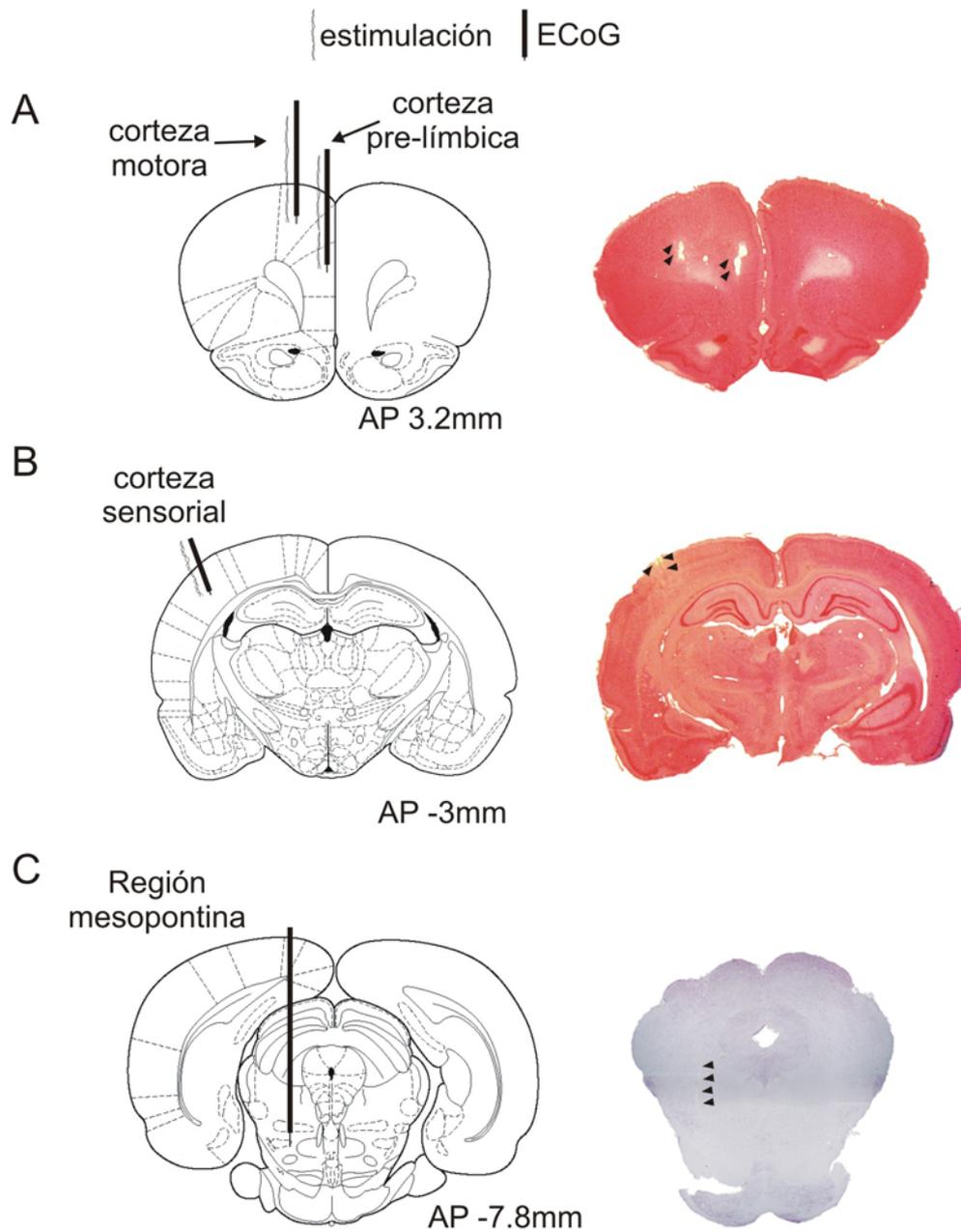


Figura D.1 Sitios de registro de los ECoG y de estimulación cortical y de la RM. Esquemas (izquierda) y cortes histológicos de tinciones de nissl (derecha) mostrando sitios de registro y estimulación en las cortezas frontales motora y pre-límbica (A) y sensorial parietal (B) y de estimulación de la región mesopontina (C).

I. La desincronización cortical interrumpe la alternancia de estados del Vm de las NEMs.

Introducción

Estudios recientes demostraron que existe una fuerte correlación entre la actividad lenta del ECoG frontal y las fluctuaciones del Vm de las NEMs en ratas anestesiadas con uretano (*Tseng y col, 2001; Mahon y col, 2001*), o barbitúricos (*Mahon y col, 2001*). En esas experiencias se observó que la llamada “oscilación cortical lenta” (un ritmo de 0.5-1Hz originado en la corteza cerebral) “dirige” las transiciones entre eUP y eDOWN en las NEMs. Los modelos actuales sobre procesamiento de información a nivel celular en el estriado suponen que las NEMs muestran un Vm que oscila entre dos estados mientras se desarrollan tareas cognitivas (*Wilson, 1993; O'Donnell y Grace, 1995*). De hecho, se ha postulado que en un momento dado, aquellas NEM que se encuentran en eUP constituyen un canal activo de procesamiento de información. Sin embargo, nunca fueron registradas NEMs en animales bajo un estado de desincronización de la actividad cortical, debido a los problemas técnicos y éticos que suponen la realización de registros intracelulares en animales no anestesiados.

Teniendo que la morfología del Vm de las NEMs depende fuertemente de la actividad rítmica lenta cortical (*Tseng y col, 2001; Mahon y col, 2001*), resulta de extrema importancia determinar cuales son las características del Vm de las NEMs cuando el EEG se desincroniza. Los resultados de estos experimentos podrían modificar completamente nuestra concepción actual sobre los mecanismos de procesamiento de información a nivel celular en el estriado.

Es un hecho conocido que la estimulación de la región mesopontina produce desincronización del ECoG en animales anestesiados y despierta a los animales dormidos (*Moruzzi y Magoun, 1949; Steriade 2000*). El estado de actividad cortical inducido por estimulación mesopontina en animales anestesiados ha sido repetidamente utilizado como modelo de la actividad cortical durante la vigilia (*Steriade, 2000*). Por otro lado, a partir de el monitoreo continuo durante las sesiones de registro, hemos notado que el ECoG de ratas anestesiadas con uretano suele experimentar desincronizaciones espontáneas que pueden durar

desde varios segundos hasta algunos minutos. Además, es posible inducir desincronizaciones transitorias del ECoG a través de la estimulación sensorial de los miembros traseros o de la cola del animal. Estos episodios no están asociados a modificaciones bruscas en el estado general de anestesia, de hecho, el animal no presenta respuesta refleja de retirada ante la estimulación de los miembros traseros, signo que suele utilizarse para determinar la profundidad del estado de anestesia y analgesia en este tipo de preparación.

Por lo tanto, con el objetivo de determinar cómo impactan los distintos estados de activación cortical sobre el Vm de las NEMs *in vivo*, se han realizado simultáneamente registros intracelulares de neuronas estriatales y del ECoG frontal en ratas anestesiadas con uretano. Una vez establecidos los registros, se tomó ventaja de las posibilidades descritas en el párrafo anterior para conseguir un episodio de desincronización cortical y poder contrastar la actividad con la observada mientras el ritmo lento domina el ECoG.

Resultados

La desincronización cortical está invariablemente asociada a una interrupción de la oscilación entre estados de las NEMs

El ECoG, en las ratas anestesiadas con uretano, estuvo dominado por un ritmo lento (oscilación de amplitud grande y baja frecuencia). Bajo esta condición de actividad cortical, el Vm de las NEMs presentó la típica fluctuación entre eDOWN y eUP (Figuras D.2A, D.4A). La periodicidad de esta actividad se pudo comprobar a partir del análisis de las series temporales (Figuras D.3A, D.5A). El espectro de potencia de las señales, calculado con una FFT, reveló que casi la totalidad de la potencia se encontraba en el rango de las bajas frecuencias, presentando un prominente pico alrededor de ~1Hz (Tabla D.1). Esto fue evidente para ambas señales. Como consecuencia, el espectro de potencia cruzado también se caracterizó por el pico de ~1Hz, y además el espectro de fase demostró que en ese rango de frecuencias la relación de fase entre el ECoG y las NEMs fue estable. Finalmente, dados estos resultados, el espectro de coherencia estableció que el ECoG y el Vm de las NEMs oscilaban de manera sincrónica al mostrar valores significativamente altos en el rango de

frecuentas correspondiente al pico de ~ 1 Hz. Asimismo, el análisis de la correlación cruzada entre las señales demostró una correlación significativa y periodicidad, avalando también la hipótesis de la oscilación sincrónica (Figuras D.3A, D.5A). Estos hechos, que fueron observados en todos los pares ECoG–NEM registrados ($n = 14$ neuronas en 13 ratas), están en total acuerdo con los reportes previos (*Tseng y col. 2001, Mahon y col. 2000*).

Durante el transcurso de los registros se pudieron observar, ocasionalmente, interrupciones del ritmo lento cortical, siendo reemplazado por fluctuaciones de pequeña amplitud y frecuencia mayor (desincronizaciones espontáneas) y de duración variada (desde unos pocos segundos hasta varios minutos) (Figura D.2A). A la hora del análisis de las series de tiempo, esto se vio reflejado en una importante reducción en la relación entre la potencia relativa de los componentes de baja y alta frecuencia (Tabla D.1). En todos los casos ($n = 7$ neuronas en 6 ratas), las desincronizaciones espontáneas fueron acompañadas por una despolarización prolongada (o estado UP persistente, eUPp) del Vm de las NEMs, con la consecuente interrupción de la fluctuación entre los eDOWN y eUP (Figura D.2A).

La estimulación eléctrica de la RM produjo episodios de desincronización cortical de varios segundos de duración, tal como había sido previamente reportado (*Steriade 2000, Nuñez y col. 1996*). El ECoG respondió a la estimulación modificando inmediatamente su patrón de actividad, reemplazando la típica oscilación de ritmo lento por fluctuaciones de muy baja amplitud y alta frecuencia (Figura D.4A). Luego, lentamente fue retomando el ritmo lento de ~ 1 Hz. La estimulación de la RM produjo inicialmente una modificación en la relación entre los componentes de baja y alta frecuencia, similares a los descriptos para las desincronizaciones espontáneas (Tabla D.1). Concomitantemente con las desincronizaciones, todas las NEMs registradas ($n = 14$ neuronas en 13 ratas) exhibieron un eUPp, y no retomaron la oscilación entre eDOWN y eUP hasta que el ECoG desplegó nuevamente el ritmo lento (Figura D.4A). No se evidenciaron diferencias entre los efectos de estimular la RM ipsilateral o contralateral a los registros.

1	Desincronización espontánea	1.1	ECoG sincronizado	ECoG desincronizado
			o	
	Relación entre la potencia relativa en los rangos de bajas (<2Hz) y altas frecuencias		9.45 ± 2.4	1.9 ± 0.3*
	Frecuencia de la oscilación coincidente estimada de espectro de potencia cruzado (Hz)		0.78 ± 0.05	
	Coherencia		0.83 ± 0.05	
	Diferencia de fase estimada del espectro de fase (ms)		-6.30 ± 32	
	Frecuencia de la oscilación coincidente estimada de la correlación cruzada (Hz)		1.00 ± 0.01	
	Coefficiente de correlación		0.59 ± 0.06	
	Diferencia de fase estimada de la correlación cruzada (ms)		-25 ± 20	
	Desincronización inducida por estimulación de la RM			
	Relación entre la potencia relativa en los rangos de bajas (<2Hz) y altas frecuencias		11.6 ± 1.6	3.4 ± 0.9**
	Frecuencia de la oscilación coincidente estimada de espectro de potencia cruzado (Hz)		0.9 ± 0.02	
	Coherencia		0.88 ± 0.02	
	Diferencia de fase estimada del espectro de fase (ms)		-41.49 ± 16.15	
	Frecuencia de la oscilación coincidente estimada de la correlación cruzada (Hz)		0.99 ± 0.02	
	Coefficiente de correlación		0.7 ± 0.03	
	Diferencia de fase estimada de la correlación cruzada (ms)		-48 ± 7	

Tabla D.1 Los datos corresponden a la medias ± EEM de 7 neuronas registradas en 6 animales (desincronización espontánea) o 14 neuronas de 13 animales (desincronizaciones inducidas por estimulación de la RM). * P<0.01, Prueba de Wilcoxon para medidas repetidas; ** P<0.01, Prueba de t de student para medidas repetidas. Las diferencias de fase fueron expresadas con el mismo signo para las estimaciones realizadas a partir de la correlación cruzada y del espectro de fase para facilitar la comparación. EL signo negativo implica que el ECoG precede a la señal intracelular.

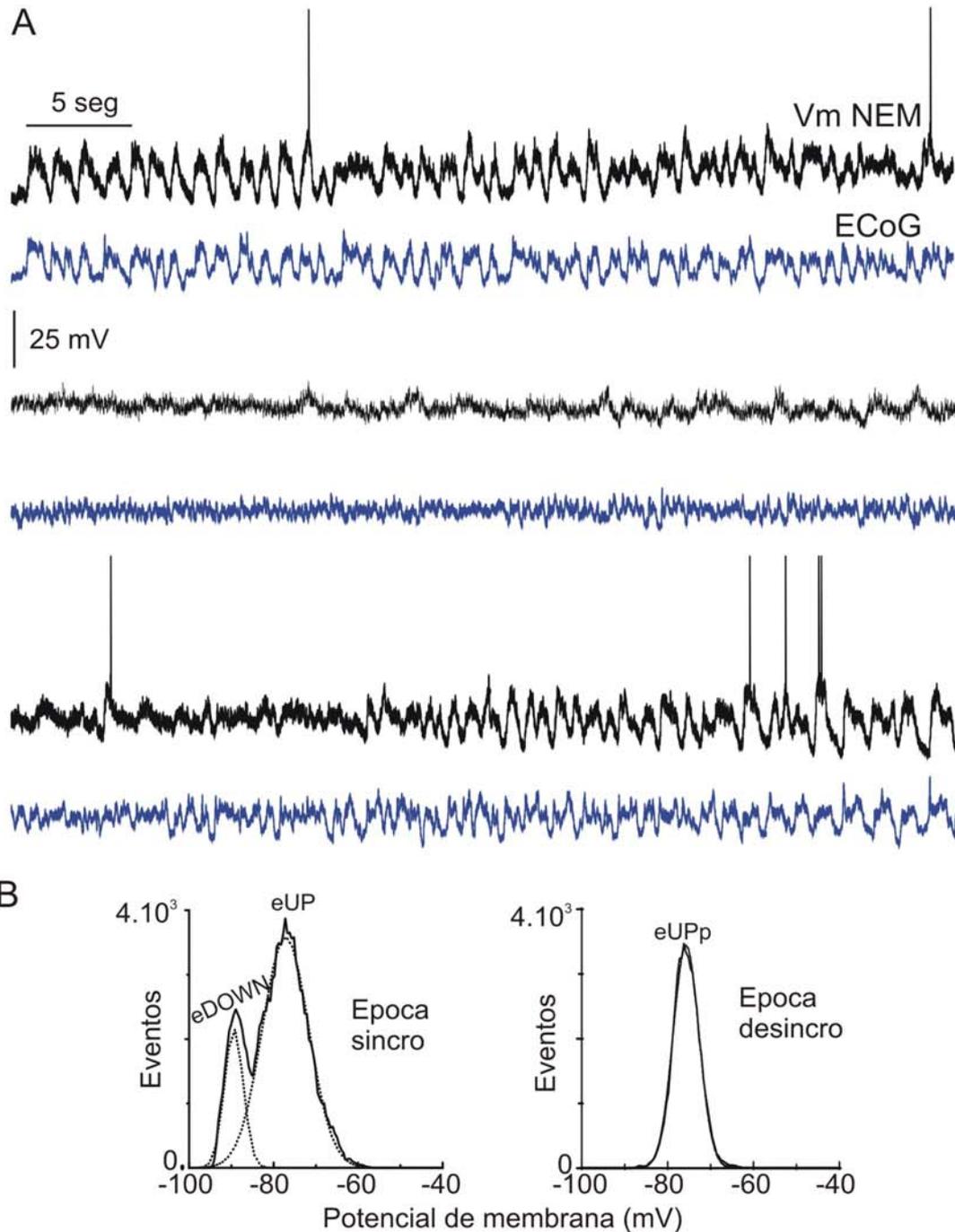


Figura D.2 Desincronización cortical espontánea. **A.** Segmento representativo de señal mostrando un episodio de desincronización espontánea del ECoG frontal en una rata anestesiada con uretano. Nótese la estrecha relación entre las transiciones de gran amplitud del Vm de la NEM y las fluctuaciones lentas del ECoG. La típica alternancia de estados del Vm de las NEMs fue interrumpida durante todo el tiempo que duró la desincronización cortical. **B.** Histogramas del Vm de la neurona estriatal mostrando que la forma bimodal característica del Vm que oscila entre dos estados es reemplazada por una curva unimodal durante el episodio de desincronización espontánea. Nótese que el valor de Vm alcanzado durante la desincronización es similar al del eUP.

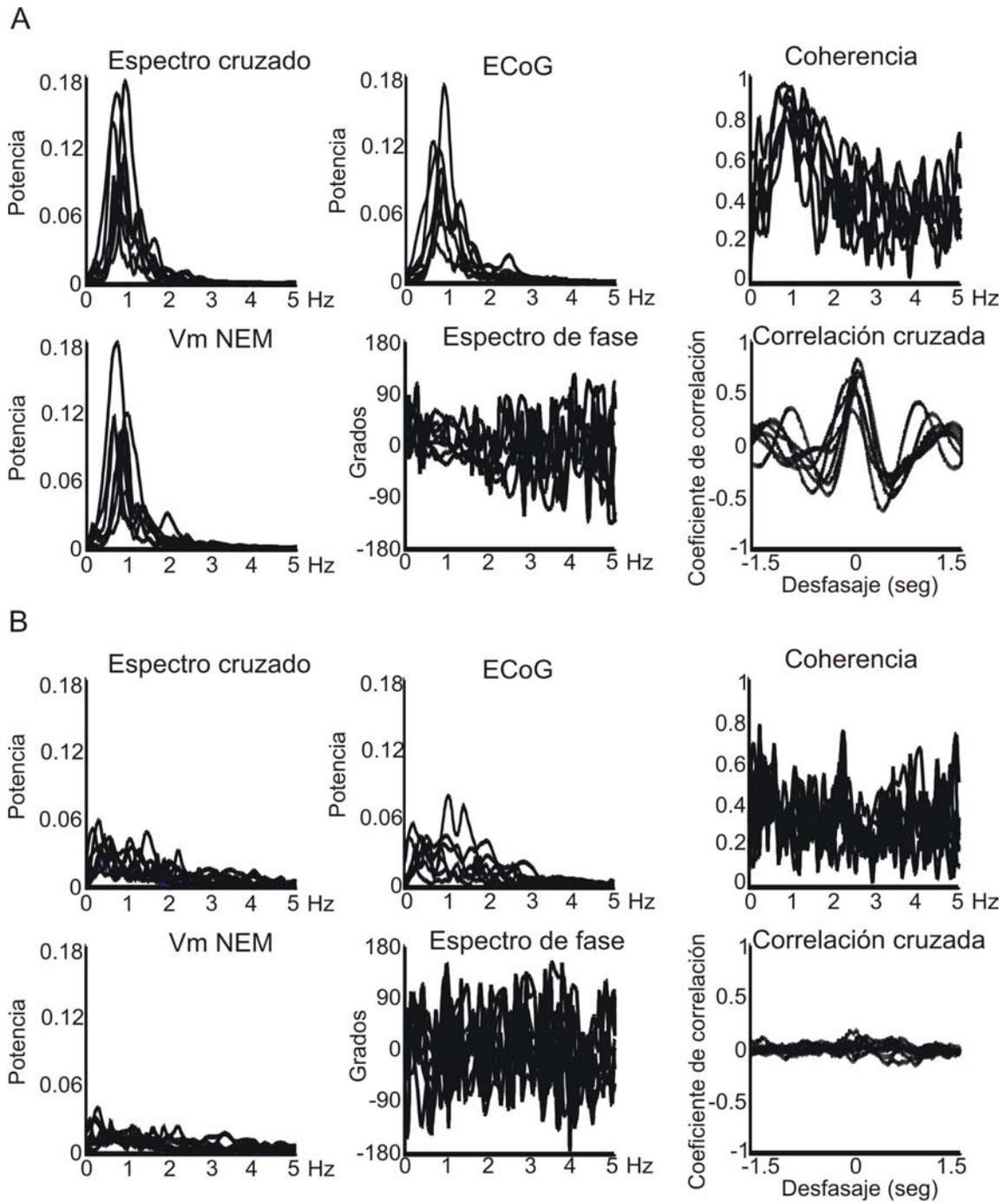


Figura D.3 Análisis de las series de tiempo durante las desincronizaciones espontáneas. Gráficos mostrando los espectro de potencia de las señales, el espectro de potencia cruzado, el espectro de fase, la coherencia y la correlación cruzada calculadas en segmentos de entre 6 y 30 segundos de actividad de ECoG sincronizado (A) o desincronizado (B). Cada trazo representa un par Vm NEM-ECoG y es el resultado de promediar 4 segmentos de señal del par correspondiente ($n=7$ pares). Los espectros fueron cortados en 5Hz para facilitar la visualización de las frecuencias bajas que representan las transiciones de estados del Vm de las NEMs y la oscilación de onda lenta cortical. Nótese la alta coherencia que presentan todos los pares cuando despliegan el ritmo de alrededor de 1 Hz. B.

La oscilación sincrónica a baja frecuencia entre ambas señales desapareció durante todos los eventos de desincronización, ya sea espontánea o inducida por estimulación de la RM. Los espectros de potencia individuales carecieron de algún pico dominante y significativo en el rango de las frecuencias estudiadas. Consecuentemente, lo mismo ocurrió en el espectro de potencia cruzado, y por ende no hubo picos en la coherencia que se pudieran considerar significativos, ni rangos de frecuencia para los que la relación de fase entre las señales fuera estable (Figuras D.3B, D.5B).

La fluctuación entre eUP y eDOWN se puede evidenciar a través de una distribución bimodal del histograma del Vm, donde las modas corresponden a los valores del Vm durante esos estados (Figuras D.2B, D.4B). Esto es algo típicamente observado en las NEMs registradas *in vivo* (Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern y col, 1997; Tseng y col, 2001). Dicho histograma del Vm, en cambio, presentó una distribución simétrica durante los episodios de desincronización cortical, cuya moda refleja el valor característico de los eUPp (Figuras D.2B, D.4B). No se observaron diferencias significativas entre los valores del Vm durante los eUP y los eUPp, tanto para los casos de las desincronizaciones corticales espontáneas como las inducidas por estimulación de la RM (Figura D.6).

La reaparición de las transiciones entre eUP y eDOWN es precedida por la resincronización de la actividad cortical

Las NEMs nunca recuperaron la típica oscilación de estados si no hasta que el ECoG reasumió la actividad de ritmo lento. Generalmente, la oscilación cortical reapareció algunos segundos antes que la estriatal (Figuras D.2A, D.4A, D.7). Esto se pudo estimar cuantitativamente a partir del siguiente razonamiento. Durante los estados sincronizados, la varianza de ambas señales en una ventana temporal de 2 segundos es grande, mientras que durante las desincronizaciones es pequeña. La evolución temporal de la varianza a partir del inicio de un episodio de desincronización presenta un incremento de tipo exponencial, por lo que se consideró al momento en que la varianza se recuperó en un 50% como el tiempo que caracteriza la reasunción de la oscilación en la respectiva señal (Figura D.7). De esta manera se

determinó que el ECoG se resincronizó 7.5 ± 2.4 segundos (media \pm EEM, $n = 14$) antes que el Vm de las NEMs recuperase las transiciones entre eDOWN y eUP. Por otro lado, incrementando la intensidad de la estimulación de la RM en un mismo par ECoG - NEMs, se indujeron desincronizaciones del ECoG de duración cada vez mayor, resultando en eUPp de similar permanencia creciente (Figura D.8A). Estos hechos sugieren que la duración de los eUPp está íntimamente ligada a la dificultad que tengan los circuitos corticales en reasumir la actividad de ritmo lento.

Otra evidencia de que la oscilación del Vm de las NEMs está relacionada con estado de activación cortical surge de registros obtenidos durante episodios de anestesia profunda (Figura D.9). Estos se caracterizan por mostrar un ECoG que consta de períodos de registro isopotencial (supresiones) interrumpidos por ráfagas de ondas lentas de gran amplitud (*Niedermeyer, 1999*). Las NEMs presentaron eDOWN coincidentes con las supresiones y eUP acompañando a las ráfagas de ondas lentas ($n = 4$) (Figura D.9).

La estimulación sensorial induce eUP persistentes en las NEMs solamente cuando es eficaz para interrumpir la oscilación lenta cortical

La aplicación de estímulos sensoriales mecánicos en los miembros distales y en la cola de la rata produjo en muchos casos eventos cortos de desincronización cortical (Figura D.8B). Estos eventos estuvieron asociados invariablemente con eUPp en las células estriatales registradas, que se mantuvieron en ese estado durante todo el tiempo en que el ECoG permaneció desincronizado ($n = 8$ neuronas en 7 ratas). Interesantemente, las NEMs no abandonaron la oscilación entre los eDOWN y eUP en los casos en que el estímulo sensorial no fue capaz de producir una desincronización del ECoG (Figura D.8.B). Otra vez, esto relaciona al comportamiento de las NEMs con el estado de activación cortical, sugiriendo que la respuesta de las NEMs a la estimulación sensorial parece estar relacionada con el efecto que el estímulo tenga sobre el patrón de activación del ECoG.

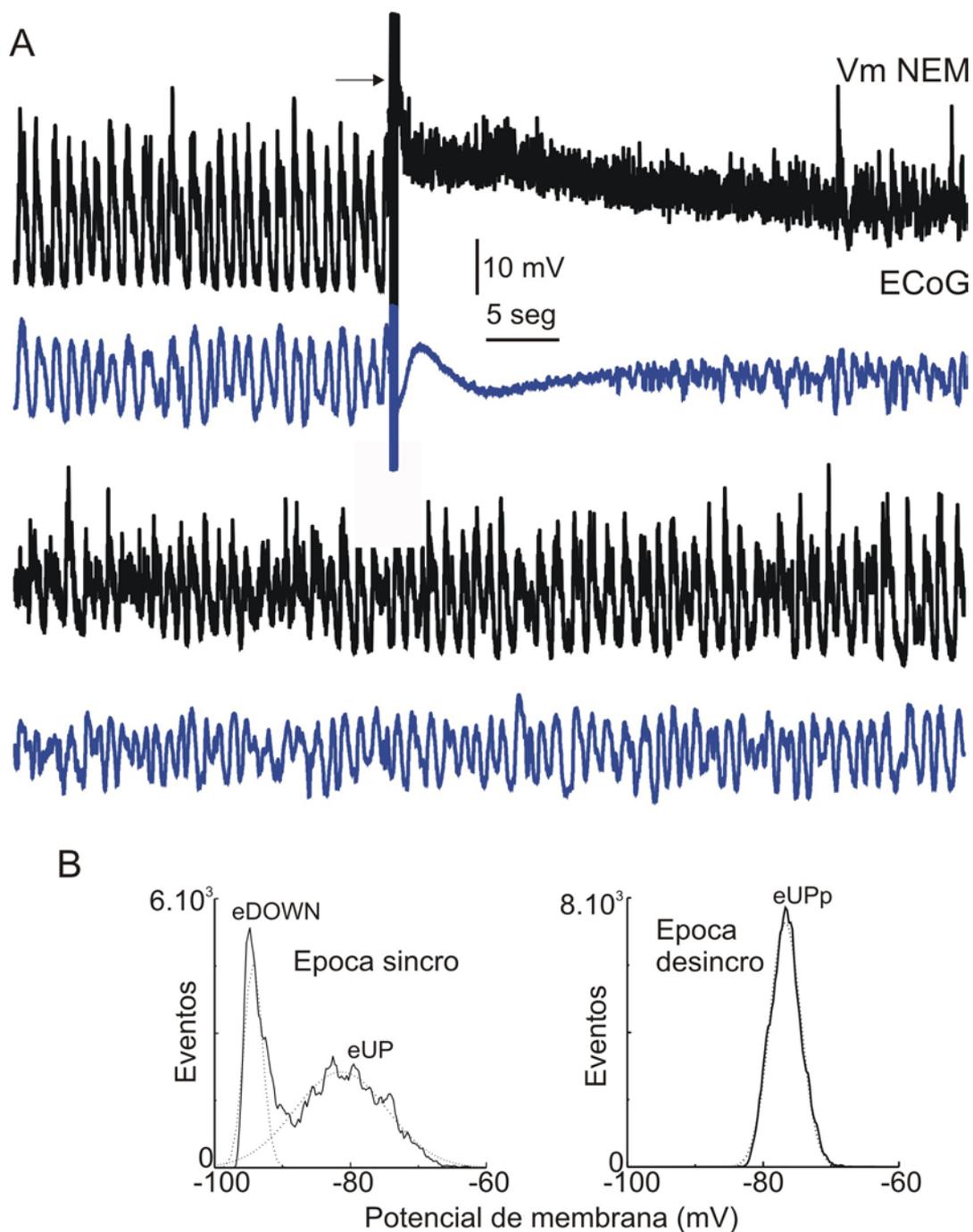


Figura D4. Desincronización inducida por estimulación de la RM. **A.** La interrupción de la oscilación lenta cortical inducida por un tren de estímulos en la RM fue acompañada por un cambio abrupto en la forma del Vm de la NEM, que reemplazó las transiciones entre eDOWN y eUP por un estado despolarizado persistente. La flecha señala el artefacto de estimulación. **B.** Histogramas del Vm de la NEM de la parte A de la figura realizados a partir de segmentos correspondientes a períodos en que el ECoG estaba sincronizado o desincronizado.

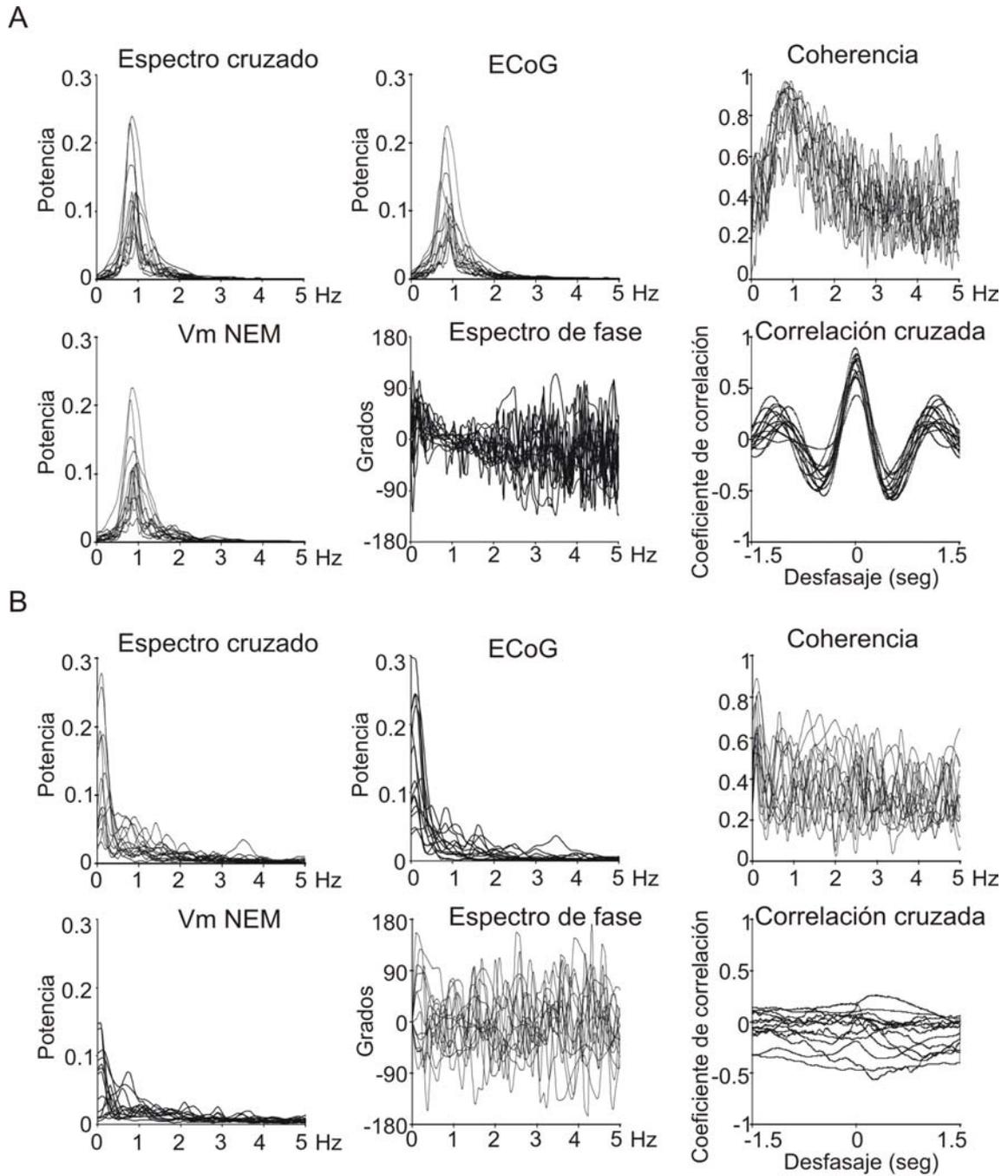


Figura D.5 Análisis de las señales antes y después de estimular la RM. Las modificaciones cuantitativas inducidas por la estimulación de la RM se hacen evidentes observando el análisis de las series de tiempo de los períodos precedente (A) y subsiguiente (B) al tren de estímulos. Los trazos corresponden a 14 pares calculados de la misma manera que en la figura D.3.

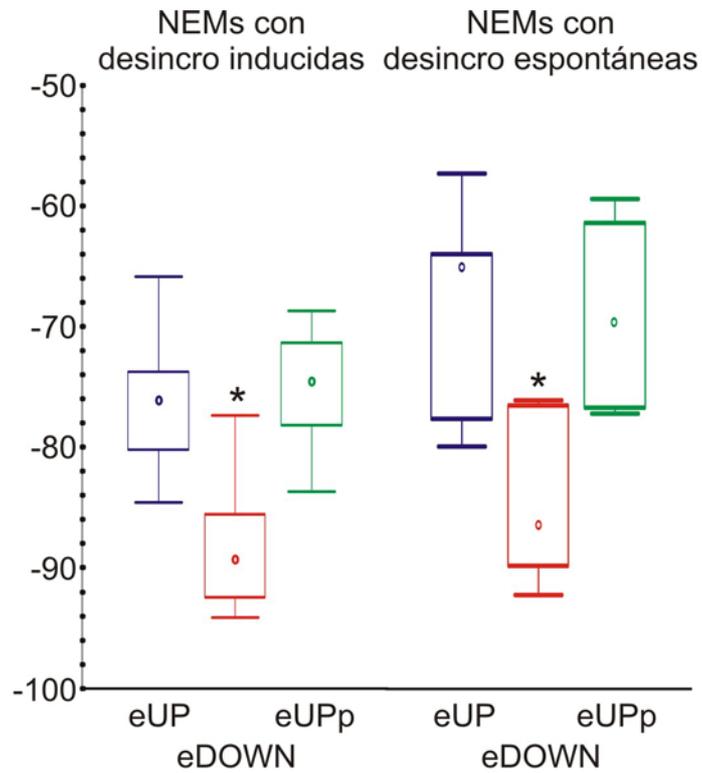


Figura D.6 Potencial de membrana de las NEMs durante los eUP, eDOWN y eUPp. Gráfico de cajas mostrando la mediana del Vm (círculo), los percentiles 25 y 75 (límite de las cajas) y el rango (barras de error), durante los eUP, los eDOWN y los eUPp observados previamente o durante las desincronizaciones espontáneas (derecha, n= 7) o inducidas (izquierda, n= 14) del ECoG. El Vm de las NEMs durante los eDOWN difirió significativamente de los valores alcanzados durante los eUP y los eUPp (*P<0.05, prueba de Tukey después de un ANOVA de una vía de medidas repetidas significativo (desincronizaciones inducidas) o método de Dunn después de un ANOVA de Kruskal-Wallis por rangos significativo (desincronización espontánea). No se encontraron diferencias significativas entre los valores hallados para las desincronizaciones espontáneas o inducidas (ANOVA de Kruskal-Wallis por rangos).

La proyección nigroestriatal no es necesaria para inducir eUP persistentes en las NEMs

Una gran cantidad de axones de la RM contacta neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra Pars Compacta (SNpr) ipsilateral (Oakman y col., 1995, 1999). Se ha propuesto que la dopamina podría contribuir a sostener los eUP promoviendo corrientes voltaje-dependientes de calcio presentes en las NEMs (Hernández-López y col., 1997; ver Introducción). Por lo tanto, los efectos de la estimulación eléctrica de la RM sobre las NEMs podrían estar mediados por la proyección nigroestriatal. Para verificar esta hipótesis, se realizaron registros en animales lesionados unilateralmente con 6-hidroxidopamina (neurotóxico de neuronas catecolaminérgicas) en la vía nigroestriatal. En todos los casos (n =5 neuronas en 5 animales) la estimulación de la RM ipsilateral a la lesión produjo una desincronización del ECoG y el concomitante eUPp en las NEMs (Figura D.10). Este dato, más el hecho que no hubieron diferencias en los efectos de estimular la RM ipsi o contralateral en animales normales (ver más arriba), sugieren que la dopamina nigroestriatal no es necesaria para producir eUPp en las NEMs.

La aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante durante los eUP no produce transiciones al eDOWN.

Existe una discusión en la literatura sobre la capacidad de las NEMs para sostener los eUP mediante mecanismos intrínsecos, independientemente de la presencia de entradas sinápticas excitatorias sostenidas (Hernández-López y col., 1997; Vergara y col., 2003). En nuestros experimentos, en ningún caso fue posible inducir una transición al eDOWN aplicando corriente a través del electrodo de registro durante el eUP de manera que el Vm se desviara hasta valores cercanos al potencial de equilibrio del potasio (Figura D.11). Este resultado sugiere que, *in vivo*, los eUP no son sostenidos exclusivamente por las corrientes voltaje-dependientes de las NEMs que son reclutadas en el rango de potencial de los eUP.

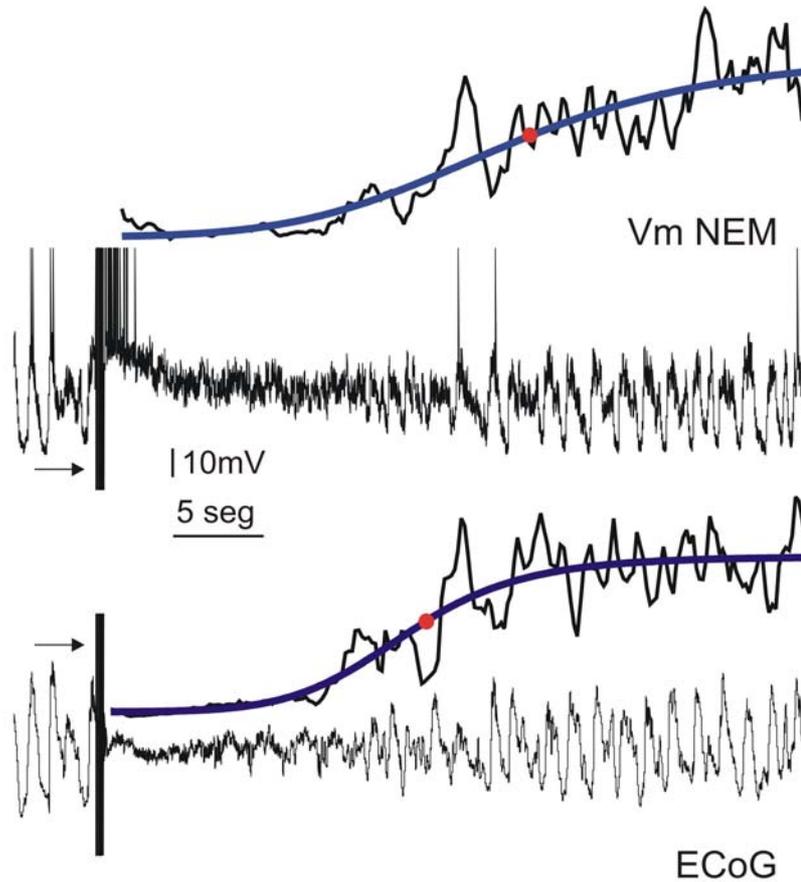


Figura D.7 Estimación de la diferencia de tiempo entre la recuperación del ritmo lento cortical y las transiciones entre estados de las NEMs después de estimular la RM. Episodio de desincronización cortical inducida por estimulación de la RM (las flechas indican el artefacto de estimulación) con la consecuente interrupción de la fluctuación entre eDOWN y eUP del Vm de la NEM. Los PA están truncados. Se ajustó una función sigmoidea (trazo azul) a la curva de la evolución temporal de la varianza. El centro de la función (punto rojo) es indicativo del tiempo de reasunción del patrón oscilatorio lento de las señales. En el ejemplo de esta figura el ECoG despliega el ritmo de ~ 1 Hz 6 segundos antes que el Vm de la neurona estriatal exhiba transiciones entre estados.

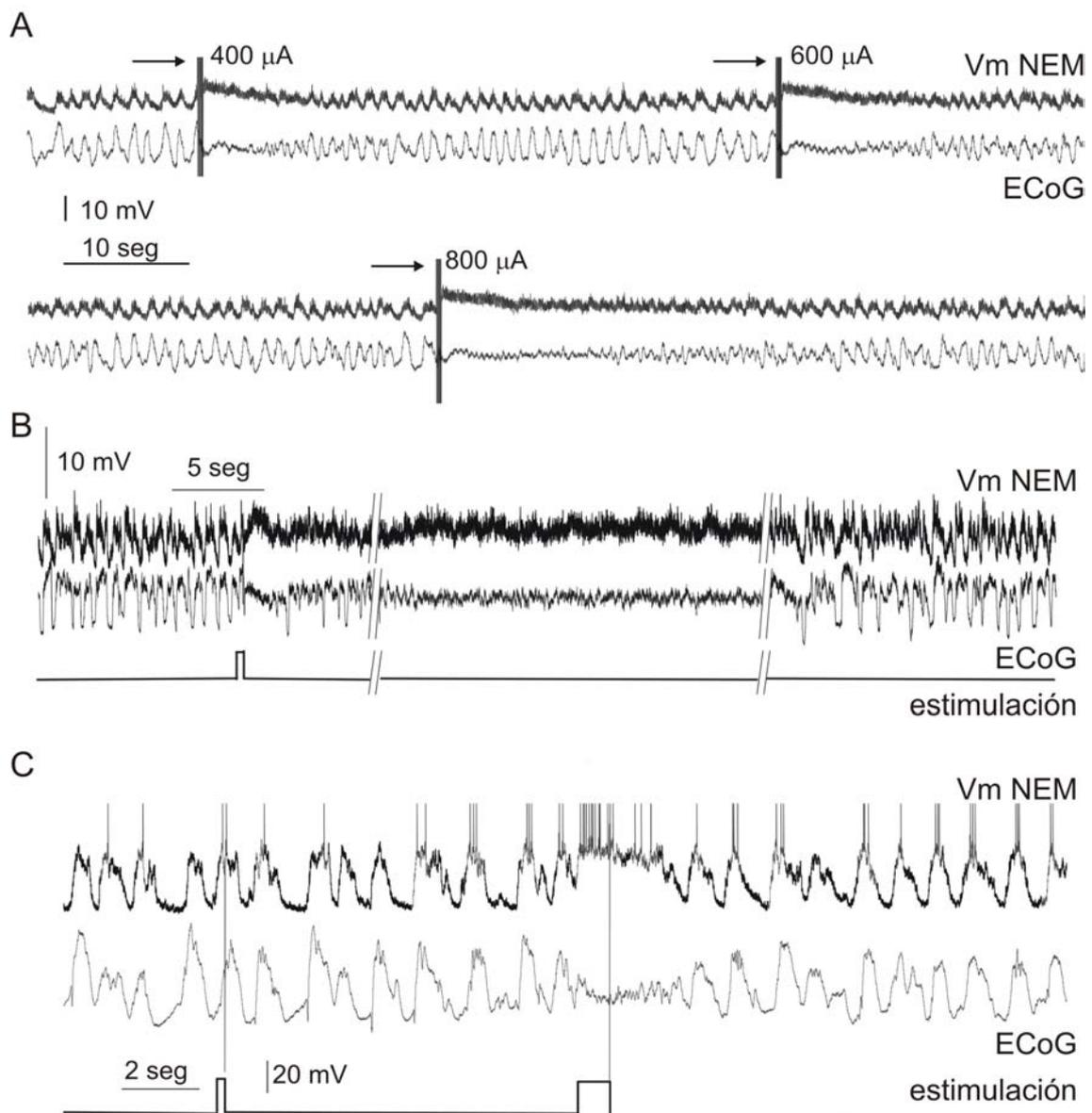


Figura D.8 Características particulares de las desincronizaciones inducidas por estimulación sensorial o de la RM. **A.** Intensidades crecientes de estimulación de la RM induce episodios de desincronización cortical de duración creciente, asociados con eUPp de permanencia igualmente creciente. Las flechas señalan los artefactos de estimulación. **B.** Estímulos sensoriales de corta duración (presión aplicada sobre la cola del animal) produce prolongados episodios de desincronización del ECoG y una concomitante interrupción de las transiciones entre estados del Vm de las NEMs (arriba). En otra rata (abajo), una breve presión aplicada en la cola que falló en desincronizar el ECoG no ocasionó cambios evidentes en el Vm de la neurona estriatal registrada. Seguidamente, una presión sostenida produjo un episodio breve de desincronización cortical acompañado por la interrupción de la transición entre eDOWN y eUP en la NEM. Las líneas verticales en los registros son artefactos introducidos por el aparato utilizado para presionar la cola de las ratas. Los PA están truncados.

Discusión

El estado de activación global de la corteza cerebral le da forma al Vm de las NEMs.

Corrientes rectificadoras de potasio sostienen el Vm de las NEMs en el eDOWN (cercano al potencial de reposo del potasio). Cuando a ese estado se oponen corrientes sinápticas glutamatérgicas sincrónicas de origen cortical, el Vm se despolariza y pasa a ser dominado por otras corrientes voltaje dependientes (de potasio, calcio, sodio) y las NEMs pasan al eUP (Nicola y col, 2000). De manera similar a los reportes previos (Tseng y col, 2001; Mahon y col, 2001), los experimentos aquí expuestos señalan que la alternancia entre eDOWN y eUP está fuerte e invariablemente correlacionada con la ocurrencia de una oscilación de gran amplitud y baja frecuencia presente en el ECoG. Transiciones rítmicas de estado en el Vm de las NEMs solamente pudieron ser observadas bajo la condición de un ECoG altamente sincronizado. Esta morfología del ECoG indica un estado de oscilación sincrónica a baja frecuencia de grandes conjuntos de neuronas piramidales en la cercanía del electrodo de registro (Steriade, 2000). La activación sincrónica de dichas neuronas corticales podría inducir de manera rítmica los eUP en las neuronas estriatales.

En absolutamente todos los casos, los episodios de desincronización cortical estuvieron asociados a una interrupción en la transición de estados del Vm de las NEMs. Cuando de manera espontánea, las ondas lentas de gran amplitud del ECoG fueron reemplazadas por fluctuaciones de baja amplitud y alta frecuencia, el Vm de las NEMs permaneció despolarizado en valores similares a los observados durante los eUP, y perdió la correlación que antes presentaba con el ECoG. Por otro lado, la estimulación sensorial sólo fue capaz de inducir eUPp en las NEMs cuando indujo eventos de desincronización del ECoG. Por último se estimuló la RM, que induce la liberación de neuromoduladores en diversas áreas del cerebro a través de vías ascendentes. Es sabido que esas vías se encuentran muy activas durante los estados de vigilia, y reducen apreciablemente su acción en las transiciones hacia el sueño (Steriade, 2000).

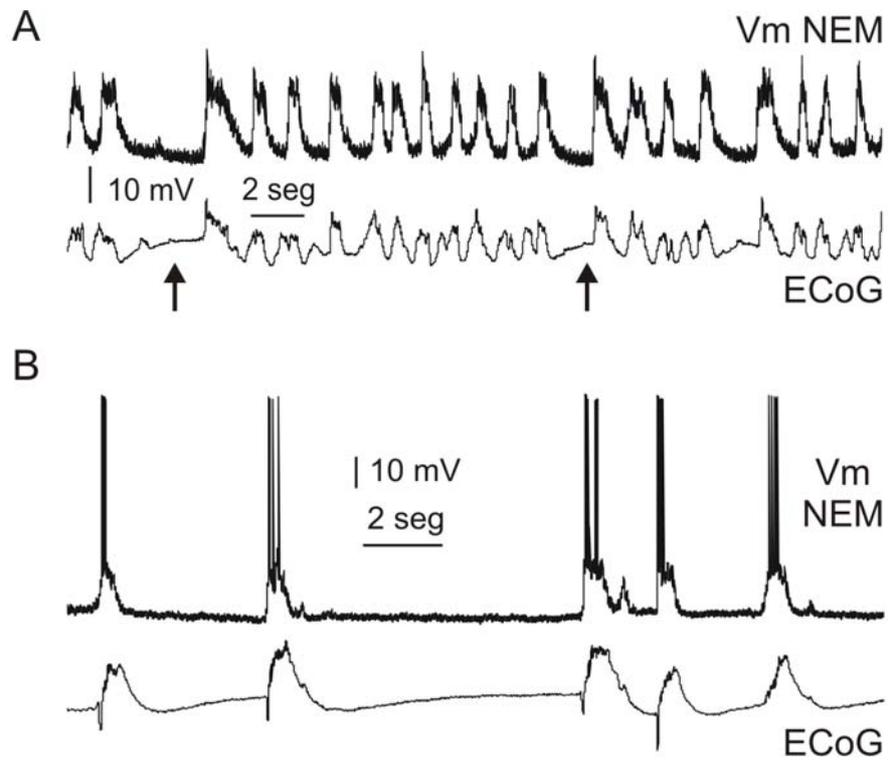


Figura D.9 Actividad córtico-estriatal durante episodios de supresión del ECoG. **A.** ECoG sincronizado que exhibe supresiones cortas (señalizadas con las flechas). Nótese la estrecha relación entre la duración de esas supresiones y la de los eDOWN estriatales. **B.** Típico ECoG de una rata muy profundamente anestesiada, que muestra un registro isopotencial interrumpido por ráfagas de actividad. Los eUP estriatales ocurren en concordancia con la activación cortical.

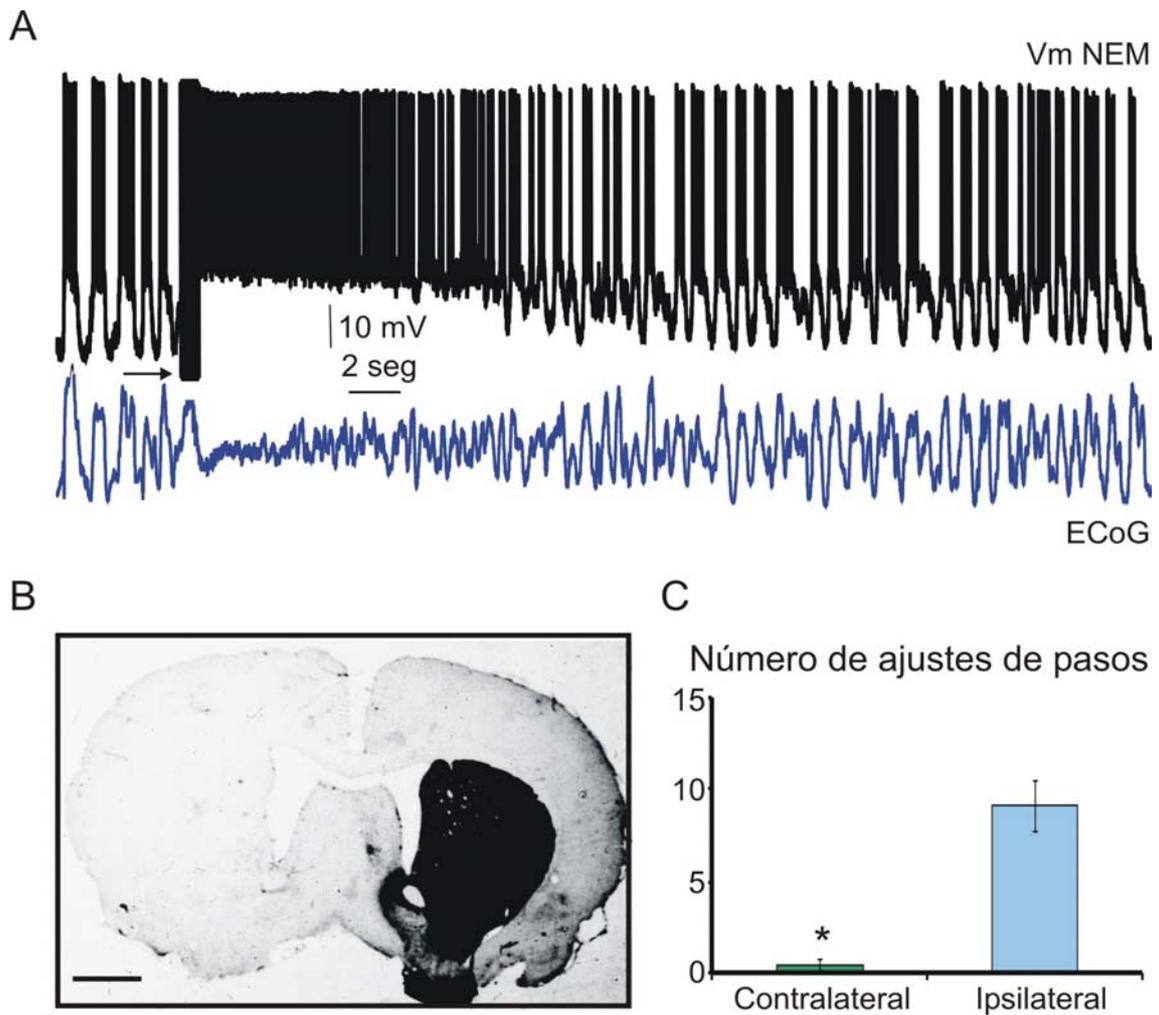


Figura D.10 Desincronización cortical inducida por estimulación de la RM en una rata lesionada con 6-OHDA. **A.** La estimulación de la RM produjo una desincronización del ECoG y la asociada interrupción de las transiciones entre estados de la neurona estriatal en una rata portadora de una lesión unilateral de la vía nigroestriatal. En este caso el electrodo fue colocado en la RM ipsilateral a la lesión y al registro. **B.** La inmunohistoquímica para la enzima tirosina hidroxilasa reveló una destrucción severa de las proyecciones nigroestriatales en las ratas lesionadas con 6-OHDA. La barra de calibración es 1.5mm. **C.** La prueba de ajuste de pasos demuestra una severa acinesia del miembro contralateral a la lesión inducida con 6-OHDA (* $P < 0.05$, Prueba de Wilcoxon).

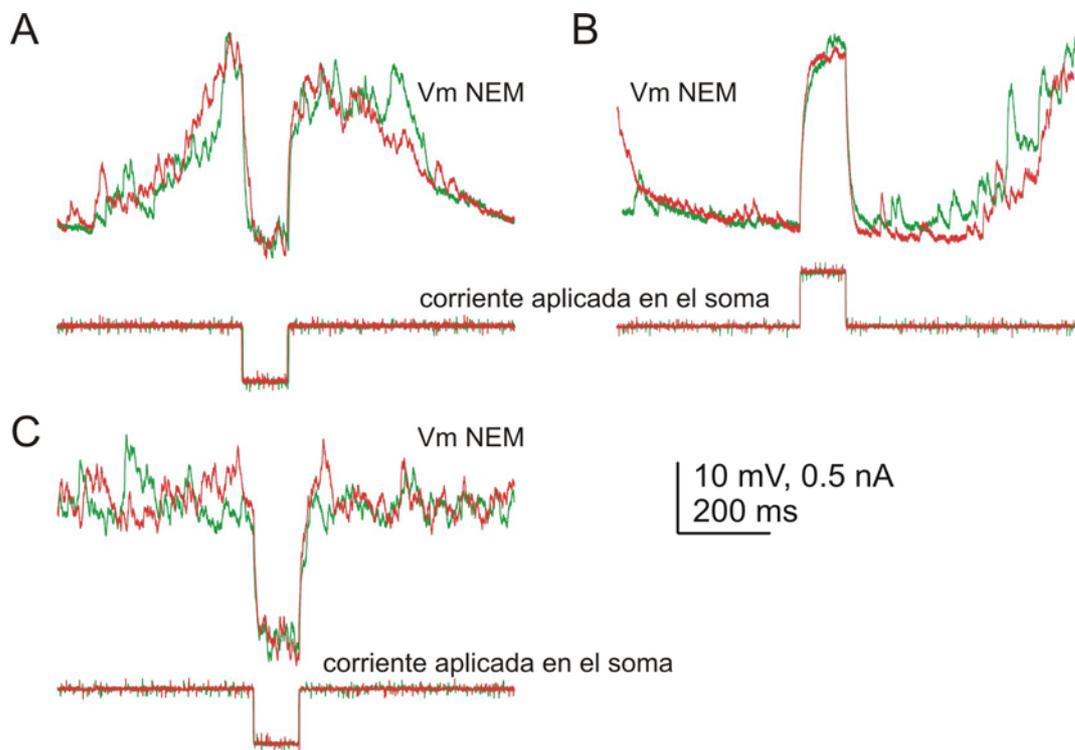


Figura D.11 La aplicación de corriente en el interior de las NEMs no produce transiciones de estados del Vm. La inyección de un pulso cuadrado de corriente hiperpolarizante en el soma de las NEMs durante un eUP (A) o un eUPp (C) que alcanza a hiperpolarizar a la célula hasta valores similares al eDOWN no logra estabilizar al Vm en ese estado una vez retirado el pulso. De manera similar, un pulso despolarizante aplicado en el eDOWN (B) no genera una transición al eUP. Las líneas verdes y rojas señalan dos eventos superpuestos correspondientes a la misma célula

Como respuesta a la estimulación de la RM, el ECoG se desincronizó, y el Vm de las NEMs perdió la alternancia entre eDOWN y eUP, los cuales fueron reemplazados por eUPp. Un ECoG caracterizado por ondas de baja amplitud y alta frecuencia refleja una actividad tónica y poco sincrónica de las neuronas piramidales de la corteza cerebral (*Steriade 2000*). Existen algunos reportes de experimentos hechos en gatos no anestesiados que demuestran que las neuronas corticales muestran eUPp y disparo tónico de potenciales de acción cuando el EEG se desincroniza (*Inubushi y col, 1978; Steriade y col, 2001*). Es posible que una entrada sináptica excitatoria sostenida haya contribuido a sostener los eUPp de neuronas estriatales durante los episodios de desincronización del ECoG en nuestros experimentos. Dado que las aferencias córtico–estriatales son dispersas, y que cada NEM recibe entradas de cientos de neuronas corticales, esa actividad podría ser suficiente para superar el efecto de las corrientes rectificadoras de potasio y mantener el Vm de las NEMs en el eUP. Esta posibilidad recibe soporte también del hecho que la aplicación de corriente hiperpolarizante durante un eUP no fue capaz de inducir transiciones al eDOWN.

Durante los episodios de ECoG sincronizado, la oscilación cortical precede al Vm de las NEMs por ~20 milisegundos (*Tseng y col, 2001; Tabla D.1*), retardo similar al del pico del potencial monosináptico córtico–estriatal. La estimación cuantitativa que se realizó del tiempo que transcurre desde la estimulación de la RM hasta que el ECoG o el Vm de las NEMs recuperan la actividad lenta estableció que, en promedio, el cambio del ECoG precede al del Vm de las NEMs por ~7 segundos. Estos hechos sugieren fuertemente que la oscilación lenta cortical dirige las transiciones de estados de las NEMs. Esto mismo es avalado por los eventos de supresión cortical, donde las NEMs permanecen en eDOWN cuando la actividad del ECoG es isopotencial, y se producen abruptas y no periódicas transiciones a eUP en conjunto con las ráfagas de ondas lentas corticales. Varios hechos sugieren que los eUPp inducidos por la RM no están mediados por aferencias distintas a la córtico–estriatal. Primero, a pesar de que las proyecciones desde la RM hacia los GB son ipsilaterales, la estimulación de la RM ipsilateral y contralateral a los registros fueron igualmente efectivos en inducir cambios concomitantes en el ECoG y el Vm de las NEMs. Segundo, los

animales con lesiones casi totales de la proyección nigroestriatal ipsilateral al registro exhibieron el mismo patrón de respuesta que los animales intactos. Sin embargo, cabe destacar que los registros de ECoG no necesariamente reflejan la actividad de neuronas córtico-estriatales y que otras neuronas activadas de manera sincrónica con las corticales en otras estructuras cerebrales, por ejemplo el tálamo, podrían contribuir a modelar el Vm de las NEMs en nuestros experimentos.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que en ratas anestesiadas, el patrón de actividad del Vm de las NEMs es determinado por el estado general de actividad cortical, alternando entre eDOWN y eUP cuando la corteza presenta oscilaciones lentas, y permaneciendo en eUPp cuando la actividad cortical está desincronizada. Estos hallazgos están de acuerdo con un reporte reciente de otro laboratorio. Mahon y col. (2001) trabajaron con ratas bajo un tratamiento farmacológico de neurolépticos y analgésicos (haloperidol + fentanyl), que se caracteriza por presentar un ECoG desorganizado. En esos casos, el Vm de las NEMs presentó fluctuaciones de baja amplitud y alta frecuencia que no correlacionaron con el ECoG. Por otro lado, en experimentos realizados con ratas anestesiadas con barbitúricos, el Vm de las NEMs presentó transiciones entre estados con una frecuencia de 5Hz (*Calabresi y col, 1990*), ocurriendo de manera sincrónica con un ritmo similar presente en el ECoG (*Mahon y col, 2001*).

Finalmente, dado que los experimentos aquí presentados fueron hechos en animales anestesiados, no sería correcto extrapolar los resultados directamente a otras circunstancias. Sin embargo hay datos que van en el sentido de que durante la vigilia el Vm de las NEMs se podrían comportar tal como fue observado en las condiciones de ECoG desincronizado. En ratas paralizadas no anestesiadas, las NEMs mostraron transiciones entre eDOWN y eUP de carácter irregular, donde los eUP podían durar varios segundos (*Wilson y Groves, 1981; Wilson, 1993; Wilson, 2004, SFN*). Además, en gatos no anestesiados, tratados con bloqueantes de la transmisión neuro-muscular, se observó que las NEMs presentaron despolarizaciones que podían durar desde algunos segundos hasta varios minutos, y durante las cuales pueden disparar potenciales de acción (*Hull y col, 1970*). En conjunto con los resultados aquí

presentados, estos antecedentes sugieren que la alternancia periódica, estereotipada entre eUP y eDOWN ocurriría solamente cuando la actividad de la corteza cerebral está fuertemente sincronizada, y que en otras circunstancias, vigilia incluida, la dinámica del Vm de las NEMs sería menos rígida, y la duración de los eUP menos predecible. De hecho, existen datos demostrando que las NEMs pueden disparar potenciales de acción de manera sostenida durante varios segundos en animales atentos (*Apicella y col, 1992; Shultz y Romo, 1992; Boussaoud y Kermadi, 1997*). En monos, la actividad relacionada a la preparación de un movimiento puede durar hasta 30 segundos, comenzando en la corteza frontal brevemente antes que en las neuronas del caudado / putamen. Es tentador aventurar que un eUPp subyace a la descarga prolongada de potenciales de acción de las neuronas estriatales durante la preparación motora, y que las neuronas estriatales son llevadas a ese eUPp por la activación del foco cortical involucrado en la tarea respectiva. Esto requeriría una estrecha relación temporal entre la duración de episodios de actividad persistente en la corteza cerebral y los eUP estriatales, tema sobre el que volveremos luego.

La duración de los eUP podría influir también en la excitabilidad celular y en fenómenos de plasticidad estriatal de corto y largo término. La historia reciente del Vm de las NEMs determina la disponibilidad de las corrientes voltaje dependientes que se activan durante los eUP. La respuesta tanto a la estimulación cortical, como a la administración de agonistas dopaminérgicos varía en función de las modulaciones recientes del Vm de las NEMs (*Mahon y col, 2000; Hernández López y col, 1997, Nicola y col, 2000*). Además, la historia del Vm y la dopamina influyen sobre la naturaleza y ocurrencia de la plasticidad de largo término de la transmisión córtico–estriatal (*Calabresi y col, 2000; Mahon y col, 2004*). De esta forma, el estado de activación cortical, que dirige la duración de los eUP estriatales, puede influir sobre la excitabilidad estriatal.

Para terminar, se observó una baja probabilidad de disparo de potenciales de acción en las NEMs cualquiera sea el estado de actividad cortical. Queda entonces sin resolver cuál es el rasgo cortical suficientemente coherente para producir que las NEMs disparen PA. Una hipótesis al respecto sería que la sincronización de una extensa red cortical en la escala de los cientos de

milisegundos (de coherencia mayor o menor, como las que se describen arriba) es suficiente para sostener a las NEMs en el eUP o en un eUPp, pero un episodio de fuerte sincronización en una escala temporal de unas pocas decenas de milisegundos en un conjunto de neuronas corticales sería necesario para llevar a una NEM hasta el umbral.

Consideraciones metodológicas especiales

Las señales que presentaron desincronizaciones espontáneas o inducidas fueron remuestreadas a una frecuencia de 333Hz con el método de sustitución por promedio del programa Axoscope (Axon Instruments) para facilitar el análisis de las series de tiempo. Para cada neurona se seleccionaron 4 episodios con el ECoG sincronizado y 4 con el ECoG desincronizado. La duración de las épocas varió entre 6 y 30 segundos dependiendo de la permanencia del registro en el estado desincronizado.

Las correlaciones cruzadas fueron computadas para corrimientos temporales de 3 segundos con una resolución de 3ms. Los espectros de potencia fueron calculados mediante transformaciones rápidas de Fourier (FFT). Para ello se utilizó una ventana Hamming (ancho=5), y la potencia relativa fue normalizada en relación a la potencia total del rango de 0-15Hz. El grado de desincronización cortical fue estimado a partir de la relación de potencia relativa entre los rangos de frecuencias bajas (<2Hz) y altas (>2Hz). Una coherencia considerada significativa (más de 0.66 en el espectro de coherencia luego de promediar el análisis de 4 segmentos no superpuestos de señal (*Rosenberg y col, 1989; Halliday y col, 1995*) en la frecuencia dominante del espectro de potencia cruzado fue tomada como indicativa de que las señales oscilaron sincrónicamente. Esto habilita a considerar la diferencia de fase observada en el espectro de fase.

Con el objetivo de estimar el tiempo exacto de la transición desde el estado dsincronizado al sincronizado, se calculó la varianza de las señales en ventanas de 2 segundos que se desplazaron con saltos de 200ms a lo largo de los episodios. La varianza debería oscilar alrededor de un valor estable cuando el ECoG está desincronizado, e incrementarse durante la transición al ritmo oscilatorio lento hasta estabilizarse. Luego se ajustó una función sigmoidea a la evolución temporal de la varianza a partir de la siguiente fórmula:

$$y = (A_1 + A_2) / (1 + (x/x_0)^P) + A_2,$$

donde A_1 y A_2 son los valores iniciales y finales de las series de tiempo, P es la potencia y x_0 es el centro de la función. Este último valor fue considerado representativo del momento de la transición entre estados globales de actividad córtico-estriatal.

II. El apagado de la actividad persistente cortical detiene los eUP estriatales y produce perturbaciones de fase en la actividad persistente córtico - estriatal.

Introducción

En los mamíferos se ha observado actividad neural persistente en la corteza cerebral, en el tálamo, en los ganglios de la base, en el tallo cerebral y en la médula espinal (*Major and Tank, 2004*). Se ha postulado que ésta puede servir de mecanismo para almacenar de manera transitoria información sensorial, motora o cognitiva, modular las respuestas neuronales por la atención, o mantener la actividad relacionada con el ciclo sueño – vigilia. La corteza cerebral puede exhibir actividad persistente *in vitro*, aun en ausencia total de aferencias (*Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Tseng y O'Donnell, 2005*). Esta actividad persistente es sostenida por actividad sináptica recurrente en el circuito local cortical (*Shu y col, 2003*) y es promovida por la dopamina y otros neuromoduladores (*Tseng y O'Donnell, 2005*).

Los estados despolarizados de las NEMs estriatales son un caso subcortical de actividad persistente, ya sean eUP o eUPp. Como acabamos de ver en la primera parte de este capítulo, la naturaleza oscilatoria de los eUP es un reflejo de la actividad sincrónica lenta en el bucle corteza – tálamo, y es interrumpida y reemplazada por un eUPp durante episodios de desincronización cortical. Así, quedó establecido que el comportamiento sub-umbral del Vm de las NEMs es modulado por el estado dinámico global del cerebro, pero queda por dilucidar con qué grado de precisión temporal se relacionan los estados despolarizados de las NEMs con la actividad persistente de los ensambles corticales que las inervan. Estados de actividad persistente sincrónicos en estructuras cerebrales alejadas proporcionarían el marco temporal apropiado para la transferencia de ritmos y eventos de alta frecuencia a través de redes distribuidas de neuronas (*Engel et al., 2001; Varela et al., 2001; Buzsaki y Draguhn, 2004*). Además, se ha postulado que modulaciones abruptas de la fase de las fluctuaciones entre estados silentes y estados activos (o de actividad persistente) servirían como

mecanismo para actualizar las representaciones internamente generadas frente a cambios en los estímulos externos (Zugaro y col, 2005; Buzsaki y Draguhn, 2004). Por lo tanto, un alineamiento temporal preciso y cambios simultáneos de fase entre la actividad persistente cortical y los eUP de las NEMs serían necesarios para que las NEMs puedan traducir eficientemente entradas corticales específicas en potenciales de acción (O'Donnell y Grace, 1995; Stern y col., 1998). Si bien es claro que los eUP de las NEMs son iniciados por las entradas excitatorias corticales, quedan por ser establecidos los roles de la actividad persistente cortical en su sostén y finalización, y la habilidad de los eUP para asimilar fielmente abruptas perturbaciones de la fase de la actividad persistente cortical.

Un pulso eléctrico aplicado en la corteza cerebral *in vivo* evoca una respuesta estereotipada en las NEMs, que consiste de un potencial excitatorio post-sináptico (PEPS), seguido por una hiperpolarización de larga duración (*long lasting hiperpolarization*, LLH), y una despolarización tardía (*late depolarization*, LD). La LLH es presuntamente causada por una reducción en la entrada cortical (Wilson y col., 1983). Estudios recientes reportaron que, *in vitro*, la actividad persistente cortical puede ser silenciada o encendida por estimulación eléctrica local (Shu y col., 2003). Si esto mismo ocurriese *in vivo*, la estimulación cortical sería una buena herramienta para determinar si la actividad persistente en la neocorteza y en el estriado pueden ser apagadas conjuntamente. De esta manera se podría establecer hasta qué punto ambos procesos se encuentran interrelacionados y condicionados por el estado dinámico global de activación cerebral. Además, si la estimulación eléctrica cortical es capaz de apagar las redes neuronales corticales abruptamente, proporciona un mecanismo para introducir variaciones bruscas de fase en los ritmos que estaban en curso y analizar su influencia sobre los ritmos subcorticales.

Para evaluar el impacto de la estimulación eléctrica cortical sobre la dinámica cortical y estriatal, se realizaron registros simultáneos del Vm de NEMs con el ECoG de regiones anatómicamente relacionadas, y en algunas ocasiones también con la actividad extracelular unitaria o multi-unitaria cortical, en ratas anestesiadas con uretano.

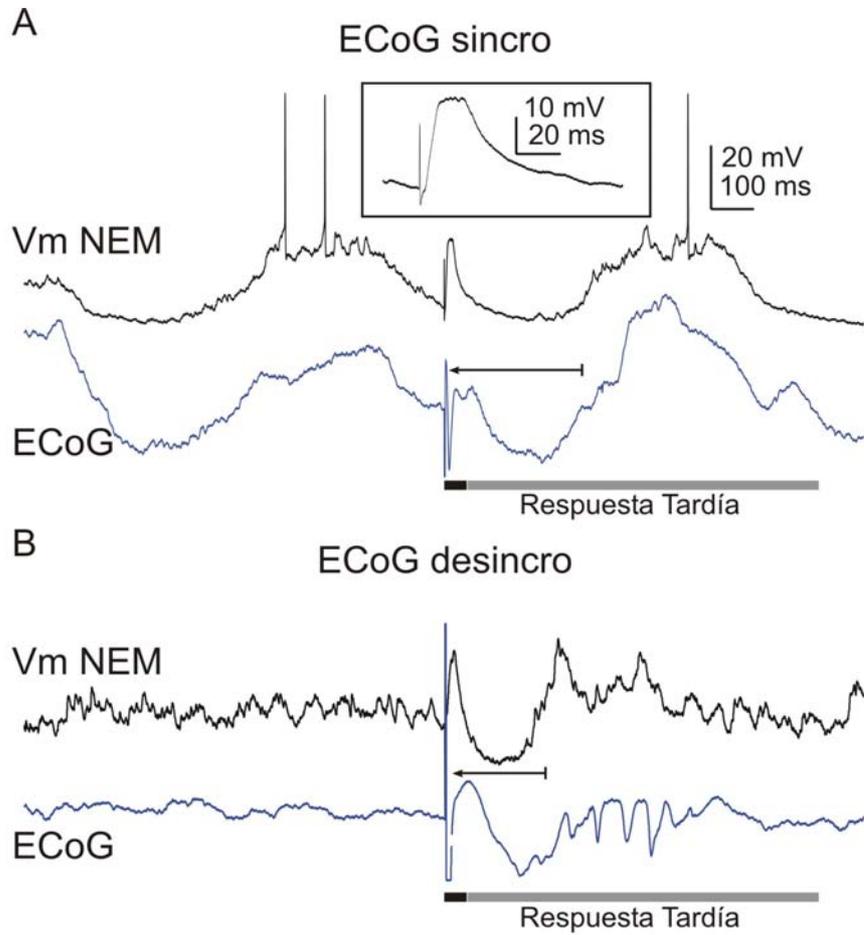


Figura D.12 Respuesta evocada en el Vm de las NEMs y en el ECoG por estimulación eléctrica cortical durante episodios de ECoG sincronizado o desincronizado. La estimulación cortical induce una respuesta en las NEMs que es similar ya sea que el ECoG esté sincronizado (A) o desincronizado (B). Consiste de un PEPS seguido de una RT compuesta por una LLH y una LD. El ECoG respondió a la estimulación con una onda lenta de fase inicial negativa en los casos en que la actividad espontánea exhibía una ritmicidad lenta (ECoG sincronizado) y también en los que no (ECoG desincronizado). Nótese la asociación temporal entre la RT del ECoG y la del Vm de las neuronas estriatales. Las flechas señalan el artefacto de estimulación, y su longitud es proporcional a la latencia de la LD de las NEMs. El recuadro de la parte A es una magnificación del PEPS de la neurona estriatal.

Resultados

Todas las NEMs registradas exhibieron transiciones del Vm entre eDOWN y eUP, en sincronía con las ondas del ritmo lento del ECoG (n =21). Los eUP ocurrieron concomitantemente con la fase positiva del ECoG registrado diferencialmente. En algunos de los registros se observaron episodios de desincronización espontánea de la actividad oscilatoria lenta del ECoG, como los reportados en el capítulo anterior. Consecuentemente con lo antes expuesto, en esos casos las NEMs presentaron eUPp.

La estimulación eléctrica de la corteza cerebral con un pulso simple a una distancia de ~0.5 mm del electrodo de registro del ECoG evocó un PEPS de corta latencia (17.5 ± 0.6 ms) seguido por una respuesta tardía (modulación lenta del Vm que consistió en una LLH de ~250ms de duración y una LD de ~300ms de duración) en todas las NEMs incluidas en este análisis (Figura D.12). La presencia del PEPS en la respuesta de la NEM asegura que existe una conexión funcional entre ésta y la región cortical registrada y estimulada. La secuencia LLH-LD es muy parecida a una transición espontánea desde un eDOWN a un eUP (Tseng y col, 2001; 2004). La respuesta tardía (RT) de las NEMs está fuertemente asociada a una onda lenta evocada en el ECoG, que se inicia con una fase negativa (es decir, silente; ver abajo). Este tipo de respuesta fue observada en el ECoG y en las NEMs en ambos estados de activación cortical (Figura D.12).

La estimulación cortical recompone la fase del ritmo oscilatorio lento espontáneo concomitantemente en los circuitos corticales y en las neuronas estriatales

Inicialmente, se intentó determinar si la RT de las NEMs constituye una actividad neural inducida *de novo* por el estímulo, y en qué medida está acoplada a la respuesta del ECoG. Las respuestas neurales evocadas generalmente consisten en una actividad oscilatoria asociada al estímulo, que se diferencia en potencia y / o en frecuencia respecto de la actividad espontánea de la señal (ver Shah y col, 2004; Fell y col, 2004, para consideraciones teóricas).

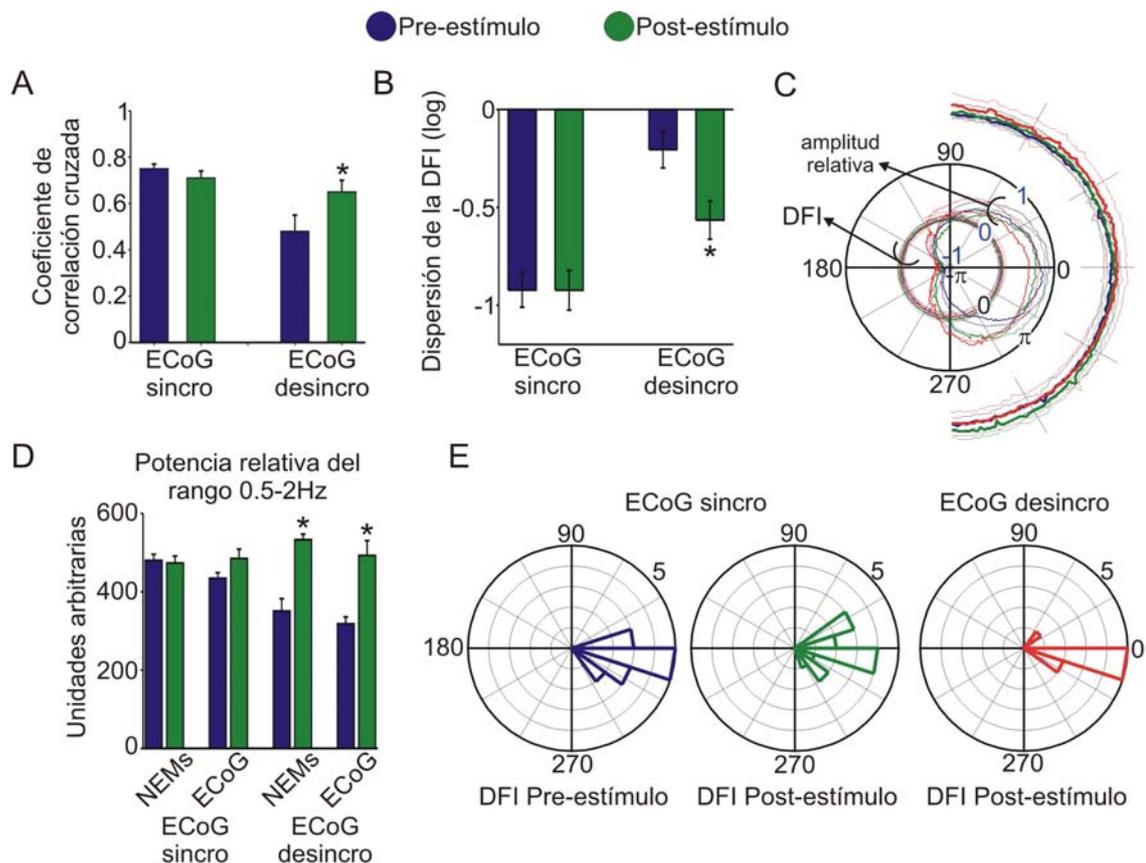


Figura D.13 Caracterización de la RT del Vm de las NEMs y del ECoG. **A.** En los episodios de ECoG sincronizado, el Vm de las NEMs y el ECoG presentaron una magnitud de correlación cruzada en la RT igual de alta que durante la actividad espontánea. En cambio, durante la desincronización cortical esa magnitud fue baja y se elevó significativamente producto de la estimulación cortical (* $P < 0.01$ prueba t de student de 1 cola). **B.** La dispersión de la DFI entre el Vm de las NEMs y el ECoG fue igualmente estrecha antes del estímulo y en la RT cuando el ECoG estuvo sincronizado, denotando un alto grado de asociación entre las señales en ambas circunstancias. Por su parte, durante segmentos de desincronización cortical el grado de acoplamiento aumentó en la RT respecto de la etapa previa al estímulo, como lo demuestra la reducción en la dispersión de la DFI (* $P = 0.01$, prueba t de student de 1 cola). **C.** El gráfico polar muestra la relación entre la FI de las señales y su amplitud relativa (rótulos azules) y entre la FI del ECoG y DFI entre el Vm de las NEMs y el ECoG (rótulos negros), (líneas llenas: media poblacional del Vm NEMs; líneas punteadas: media poblacional del ECoG; línea azul: primer segundo pre-estímulo con el ECoG sincronizado; línea verde: RT con ECoG sincronizado; línea roja: RT en desincronización cortical). Las fases que se encuentran en el semicírculo derecho equivalen a los eUP de las NEMs y a la fase positiva del ECoG. Nótese que la DFI es igualmente estrecha a lo largo de todo el ciclo de onda lenta espontáneo o inducido, y particularmente durante los eUP (ampliación por afuera del círculo). Las líneas gruesas representan la DFI media de la población, y las líneas finas el intervalo de confianza (\pm EEM). **D.** Potencia total de los componentes lentos de las señales en el segundo precedente y el subsiguiente al estímulo relativo a la potencia instantánea máxima en ese período de 2 segundos. El aporte de los componentes de 0.5-2Hz no se modifica en la RT cuando el ECoG estaba sincronizado, mientras que aumenta significativamente en los episodios de desincronización cortical tanto en el ECoG como en el Vm de las NEMs (* $P < 0.001$, prueba de t de student pareado de 1 cola). **E.** Histogramas poblacionales de la DFI media entre el Vm de las NEMs y el ECoG. Los valores en grados de la figura corresponden a -37 ± 14 ms, -27 ± 22 ms y -25 ± 25 ms, para la etapa previa y posterior al estímulo con el ECoG sincronizado y la RT con ECoG desincronizado, respectivamente. El signo negativo significa que el ECoG precede a las NEMs. Estas DF están de acuerdo con una transferencia en el sentido córtico-estriatal y son equivalentes al retardo monosináptico entre la corteza y el estriado.

Para los registros dominados por un ECoG sincronizado ($n = 13$), se calculó la correlación cruzada entre el ECoG y el Vm de las NEMs para el segundo precedente y el primer segundo subsiguiente al estímulo (intervalo entre estímulos de 2 segundos), y se obtuvo un coeficiente de correlación igualmente alto y significativo en ambos casos (Figura D.13A). Además, se estimó la sincronía entre el ECoG y el Vm de las NEMs a partir de la estabilidad de la diferencia de la fase instantánea (DFI) del componente lento de las señales. Si la actividad de dos señales está fuertemente acoplada en cierto ritmo, la DFI entre ellas tenderá a ser relativamente constante. La distribución de la DFI fue igualmente estrecha para el segundo previo como para el posterior al estímulo (Figura D.13B). Es más, los gráficos polares de la DFI en función de la fase del ECoG indicaron que la DFI se conservó a lo largo de todo el ciclo de la onda lenta tanto antes como después del estímulo (Figura D.13C). Los valores de DFI obtenidos son consistentes con la idea de que la corteza dirige la RT de las NEMs (Figura D.13E).

Estos resultados indican que las actividades del ECoG y del Vm de las NEMs estuvieron muy fuertemente acopladas, y que ese grado de asociación no fue modificado por la estimulación cortical.

A partir de un protocolo de estimulación donde los pulsos están espaciados por 2 segundos, podría haber la posibilidad de que los efectos evocados por el estímulo persistan en el tiempo e interfieran con las respuestas de los ensayos sucesivos. Para descartar esta posibilidad, se repitió el mismo análisis en registros donde el intervalo entre estímulos fue más prolongado (hasta 6 segundos, $n = 6$), y se obtuvieron resultados similares (coeficiente de correlación: 0.76 ± 0.03 y 0.71 ± 0.05 ; dispersión de la DFI (log): -0.44 ± 0.11 y -0.36 ± 0.11 ; media \pm EEM, respectivamente para los períodos precedentes y subsiguientes al estímulo, $p > 0.5$ versus los datos obtenidos con 2 segundos de intervalo entre estímulos).

Una estimación de la potencia de los componentes de baja frecuencia dominantes en las señales reveló que la misma no se modificó como consecuencia del estímulo, tanto en el ECoG como en el Vm de las NEMs (Figura D.13D).

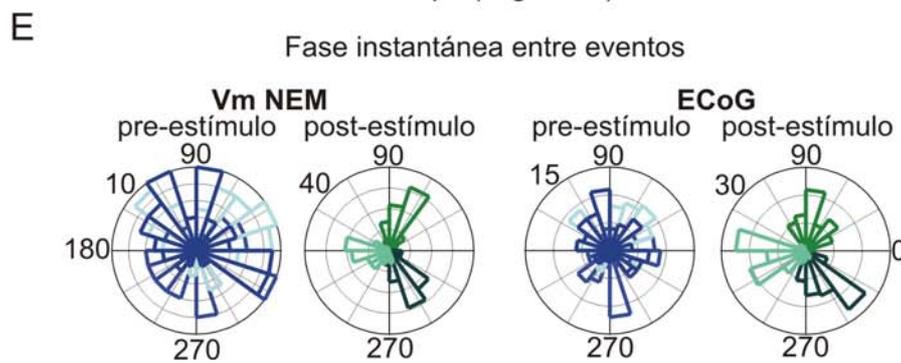
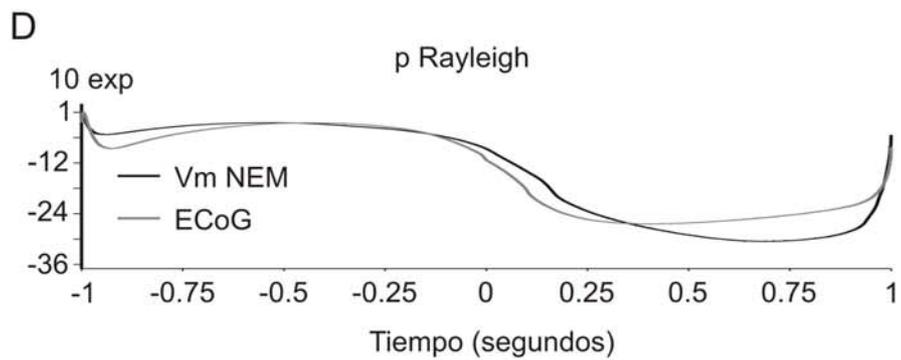
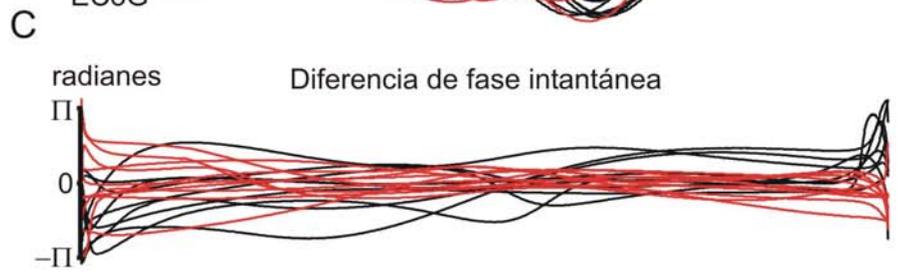
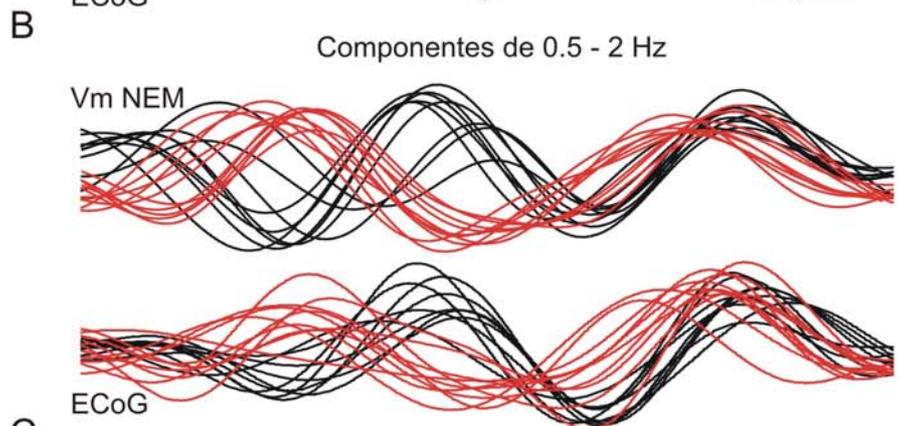
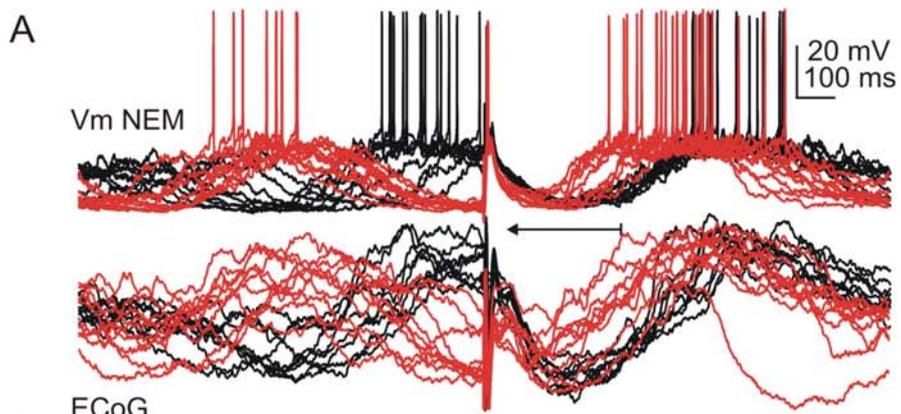


Figura D.14 La estimulación cortical induce una recomposición de fase de la oscilación lenta espontánea del ECoG y del Vm de las NEMs. **A.** 20 eventos de estimulación alineados al momento en que acaece el estímulo y superpuestos, pertenecientes a un par Vm NEM ECoG. Se evidencia el cambio de fase impuesto sobre la oscilación espontánea de las señales. Nótese que los eventos en que el estímulo acaece sobre un eDOWN (trazos rojos) presentan latencias a la LD menores que los eventos en que el estímulo impacta sobre un eUP (trazos negros). **B.** Los componentes de 0.5-2Hz aislados mediante la transformación wavelet representan fielmente el ritmo oscilatorio lento del ECoG y las transiciones entre estados de las NEMs. **C.** La DFI entre el Vm de las NEMs y el ECoG no parece ser afectada por el estímulo y permanece bastante estable durante el segmento precedente y el subsiguiente a la estimulación. **D.** Probabilidad para cada instante de tiempo (bin=1ms) de las señales alineadas de que la distribución de la FIE sea uniforme. Como el estímulo puede caer azarosamente en cualquier valor de FI de la oscilación lenta, la P de Rayleigh es cercana a 1 en la parte pre-estímulo. Durante la RT cae abruptamente evidenciando una recomposición de fase impuesta por la estimulación. **E.** Los histogramas de las FIE para tres diferentes instantes de tiempo previos (tonos azules) o posteriores (tonos de verdes) al estímulo muestran una distribución uniforme en los primeros y claramente no uniforme en los segundos tanto para el Vm de las NEMs como para el ECoG.

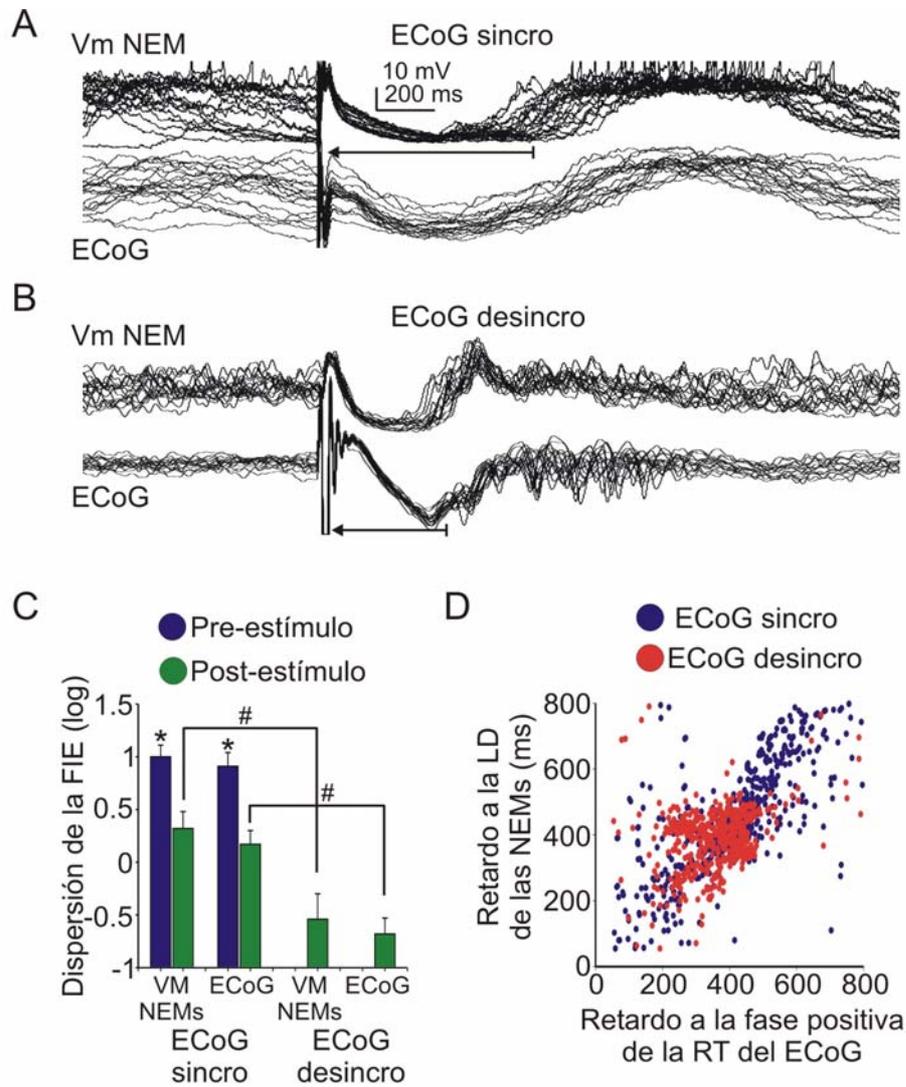


Figura D.15 La variabilidad de la RT del Vm de las NEMs y del ECoG depende del estado de activación cortical. **A-B.** Superposición de 20 eventos de estimulación de episodios con ECoG sincronizado (**A**) o desincronizado (**B**). Las flechas señalan los artefactos de estimulación y su longitud es proporcional a la latencia media de las LD. Nótese la alta variabilidad entre eventos de la LD en el episodio con actividad cortical sincrónica respecto del de ECoG desincronizado. **C.** La cuantificación poblacional de la dispersión de la FIE para el Vm de las NEMs y para el ECoG antes y después del estímulo con actividad cortical sincronizada establece que ocurrió una reducción impuesta por el estímulo avalando la hipótesis de la recomposición de fase (* $P < 0.001$, prueba t de student pareada de 1 cola). La dispersión de la FIE es aun menor en la RT cuando el ECoG está desincronizado, seguramente debido a la menor variabilidad de la latencia a la LD en esas circunstancias (# $P < 0.01$, prueba de Wilcoxon, post-estímulo sincro vs post-estímulo desincro). **D.** Existe una tendencia a la linealidad en la relación de la latencia a la LD de las NEMs respecto de la latencia de la fase positiva de la RT del ECoG. Cada punto corresponde a un evento de estimulación de un par Vm NEM-ECoG. Nótese que los puntos correspondientes a eventos acaecidos durante episodios de desincronización cortical están concentrados en un rango de latencias más estrecho.

En conjunto, estos resultados pueden ser tomados como evidencia de que la estimulación cortical no evocó una actividad neural adicional (*Makeig y col, 2002; Fell y col, 2004; Shah y col, 2004*). En cambio, el hecho de que la RT parecería estar vinculada temporalmente con el estímulo (Figuras D.14 y D.15) sugiere que la estimulación cortical indujo una recomposición de la fase (*reset*) de la oscilación espontánea. Para poner a prueba esta hipótesis, en cada par registrado se computó la fase instantánea de los componentes lentos del ECoG y del Vm de las NEMs y se alinearon todos los ensayos respecto del inicio del estímulo (Figura D.14). Entonces se analizó la distribución de las fases instantáneas entre-ensayos (FIE) para el segundo precedente y el segundo subsiguiente al estímulo (Figura D.14). Se podría especular que, para un instante dado antes del estímulo, las FIE deberían distribuirse uniformemente, dado que el estímulo podría acaecer azarosamente en cualquier fase de la oscilación lenta espontánea. Por el contrario, si el estímulo induce una recomposición de la fase del ritmo lento, las FIE deberían mostrar una distribución restringida y de poca dispersión por un período determinado de tiempo post-estímulo (*Makeig y col, 2002; Fell y col, 2004; Shah y col, 2004*). Como se esperaba, para cada instante de tiempo antes del estímulo, los gráficos polares describieron distribuciones de FIE uniformes (o casi uniformes en algunos casos), es decir FIE muy variables para ambas señales. Esas mismas distribuciones fueron no uniformes, condensadas y con muy baja variabilidad en cada instante de tiempo posterior al estímulo (Figuras D.14 y D.15). La probabilidad de que las distribuciones circulares de las FIE sean uniformes (prueba de Rayleigh, Figura D.14D) cayó abruptamente desde $p > 0.001$ durante el segundo previo al estímulo (NEMs: 0.12 ± 0.06 ; ECoG: 0.12 ± 0.05 , media \pm E.E.M) hasta valores que llegaron a ser de $p = 10^{-12}$ o aun menores durante el segundo posterior al estímulo (NEMs: 0.02 ± 0.01 , $p < 0.004$; ECoG: 0.007 ± 0.006 , $p < 0.006$ *versus* pre-estímulo, prueba pareada de Wilcoxon $n = 13$). Los seis pares registrados con intervalos entre estímulos mayores presentaron resultados similares.

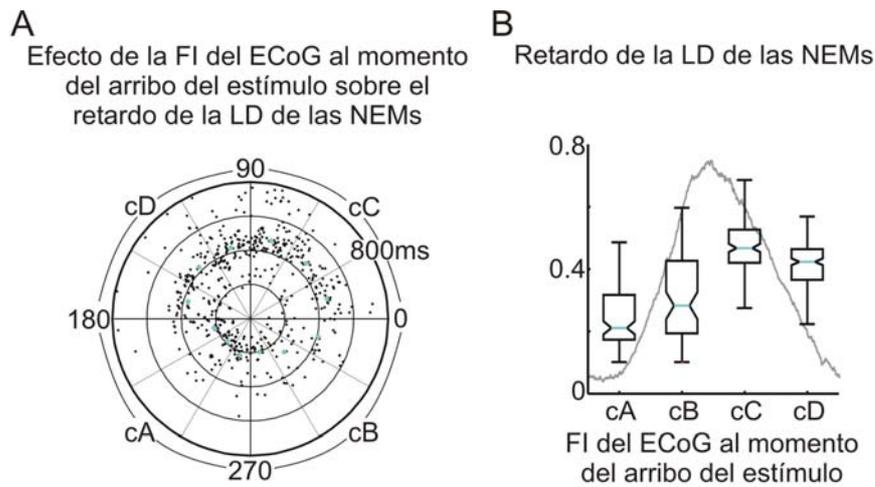


Figura D.16 Relación entre la latencia de la LD del Vm de las NEMs y la fase del ECoG al momento de acaecer el estímulo. **A.** Gráfico polar representando el retardo de la LD de las NEMs de eventos con ECoG sincronizado en función de la fase de la oscilación del ECoG al momento de la llegada del estímulo. Cada punto negro es un evento de un par Vm NEM ECoG, mientras que los puntos de color representan la mediana de los valores que pertenecen al arco de 30° correspondiente. Nótese que durante el intervalo de fases que corresponde a la parte final de la fase negativa del ECoG y al eDOWN de las NEMs (180°-270°, ver figura D.13) los valores de latencia son menores. **B.** Los mismos datos del gráfico de la parte A agrupados por cuadrantes y representados como cajas. El trazo gris representa la amplitud relativa del Vm de las NEMs en los sucesivos intervalos de fase. La latencia es mínima cuando el estímulo llega sobre el final del eDOWN, aumenta hasta hacerse máxima cuando lo hace sobre el final del eUP y vuelve a disminuir en el comienzo de un nuevo eDOWN. Existe un efecto significativo de la fase del ECoG al acaecer el estímulo sobre la latencia a la LD de las NEMs ($P < 0.001$, ANOVA de Kruskal-Wallis por rangos, todos los cuadrantes significativamente diferentes entre sí a partir del criterio de significancia honesta de Tukey). Las líneas de color representan la mediana, los límites de las cajas los percentiles 25 y 75 y las barras de error el rango de los datos.

La RT está temporalmente asociada a la estimulación cortical, sin embargo no queda claro si la recomposición de fase se limita al primer ciclo de onda lenta o perdura en los ciclos sucesivos. Para determinar esto, se cuantificó la probabilidad de que las distribuciones de las FIE sean uniformes durante los 4 segundos subsiguientes al estímulo, en los seis pares registrados con intervalos entre estímulos largos. La probabilidad obtenida con la prueba de Rayleigh debería ser pequeña durante el tiempo en que perdura el “reset”, y al hacerse no significativa se podría razonar que la señal ya no está influenciada por el estímulo. Así, se consideró al tiempo posterior al estímulo en que la probabilidad de Rayleigh se recuperó en un 50% como el tiempo de perduración de la recomposición de fase. Tanto para el ECoG como para el Vm de las NEMs, la estimulación cortical no alcanzó a influir sobre la fase más allá del primer ciclo de onda lenta (Figura D.17). No obstante, la causa de la labilidad del efecto del estímulo puede hallarse en la variabilidad intrínseca del ritmo oscilatorio lento. Al tomar segmentos largos de actividad espontánea de las señales, y alinear episodios de 4 segundos de duración en función de una transición al eUP, se obtiene una recomposición de fase artificial cuyo efecto perdura el mismo tiempo que aquel inducido por la estimulación cortical (Figura D.17).

Todos estos resultados indican que la RT del ECoG y del Vm de las NEMs puede ser descrita mejor como una perturbación transitoria y conjunta en la fase de la oscilación lenta de ambas señales, que como una actividad inducida *de novo* por el estímulo

La estimulación cortical induce una onda lenta en la actividad córtico – estriatal cualquiera sea el estado de activación de la corteza

La interpretación anterior, que propone el mecanismo de “reset”, es desafiada por el hecho que la estimulación cortical produjo una RT en el ECoG y en el Vm de las NEMs también durante episodios de ECoG desincronizado. Es decir, en ausencia de una oscilación lenta espontánea (Figura D.15B). Durante esos episodios, en que el Vm de las NEMs permanece en un eUPp, la estimulación cortical indujo una onda lenta en el ECoG y la secuencia LLH – LD

en todas las NEMs registradas ($n = 8$). En estos casos, la correlación espontánea entre el ECoG y el Vm de las NEMs para los componentes lentos que caracterizan a la RT fue muy baja, y se incrementó significativamente como consecuencia del estímulo, hasta alcanzar valores similares a los observados cuando el ECoG estaba sincronizado (Figura D.13A). Asimismo, la variabilidad de la DFI fue muy alta en el segmento previo al estímulo, y se redujo considerablemente en el segundo subsiguiente (Figura D.13B). La DFI se conservó durante la RT, y presentó valores consistentes con el hecho de que la corteza dirige la respuesta de las NEMs (Figuras D.13C y D.13E). Además, la potencia de las componentes de frecuencia lenta que dominan la RT se incrementaron significativamente debido al estímulo (Figura D.13D).

Por lo tanto, si la red de circuitos córtico–estriatal está experimentando una activación sostenida (ECoG desincronizado y eUPp en las NEMs), el estímulo induce una actividad neural *de novo* por algunos cientos de milisegundos. Esta RT se asemeja mucho a la onda lenta observada como respuesta a la estimulación cortical durante episodios de ECoG sincronizado, pero en este último caso el único efecto del estímulo fue una perturbación de la fase del ritmo oscilatorio espontáneo. En resumen, i) la aplicación de un pulso simple de descarga eléctrica en la corteza cerebral determinará la dinámica de la red cortical y del Vm de las NEMs por algunos cientos de milisegundos; ii) el potencial de campo local cortical y el Vm de las NEMs están íntimamente relacionados durante todo el curso temporal de la respuesta, con DFI que indican que los cambios en el ECoG preceden a los de las NEMs por ~ 30 ms (Figura D.13E). Esta diferencia de fase es similar a la latencia del pico de los PEPS monosinápticos, y es consistente con la idea de que la corteza dirige toda la respuesta de las NEMs.

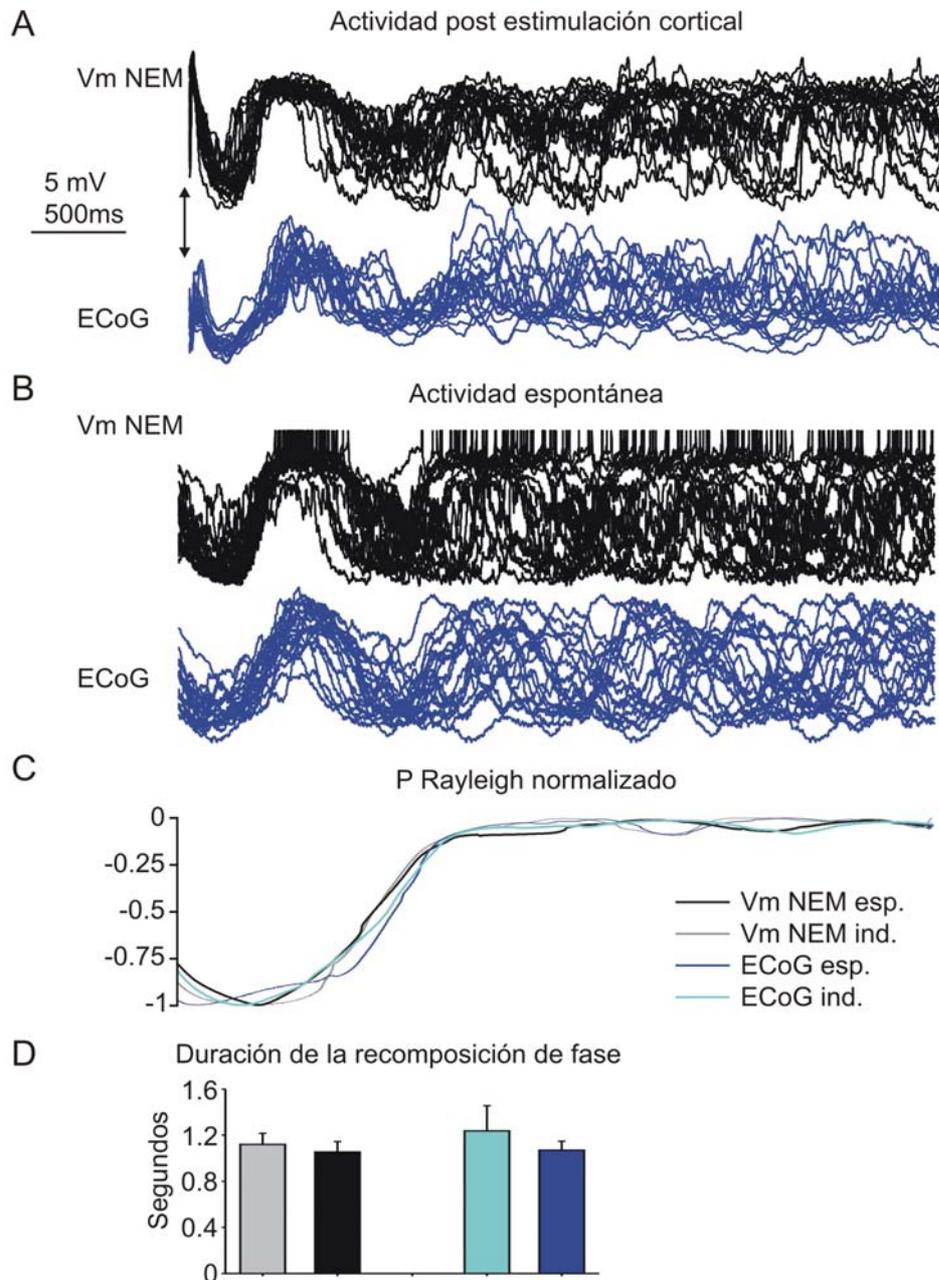


Figura D.17 Estimación de la duración de la recomposición de fase del Vm de las NEMs y del ECoG inducida por estimulación cortical. **A.** Superposición de 20 trazos correspondientes a episodios de 4 segundos de señal post-estimulación cortical de un par Vm NEM-ECoG. Nótese como el claro alineamiento de fase del primer ciclo va decayendo en los sucesivos. **B.** 20 trazos de 4 segundos de señal de Vm de NEMs y de ECoG alineados en la transición al primer eUP con la transición a la LD de la RT de las señal de la parte A. La transición al eUP se identificó en los componentes de 0.5-2Hz aislados por medio de una transformación wavelet como un cruce a través del cero con pendiente positiva precedido por más de 200ms de valores negativos y seguido de más de 200ms de valores positivos. En este caso también se observa un claro alineamiento de fases en el primer ciclo de onda lenta que decae rápidamente. **C.** Probabilidad de Rayleigh de presentar una distribución uniforme para las distribuciones de las FIE de los episodios alineados en las partes A y B. Los valores fueron normalizados al mínimo de cada señal. El tiempo de la pérdida de la recomposición de fase fue elegido como el momento en que la P de Rayleigh se recuperó en un 50% luego del alineamiento. Nótese la similitud entre la dinámica de la evolución de esa probabilidad luego de RT y luego del alineamiento artificial en las transiciones al eUP en las dos señales. **D.** Datos poblacionales de la duración de la recomposición de fase. En ningún caso hubo diferencias significativas.

La precisión temporal de la RT es modulada por la fase de la oscilación lenta espontánea al momento en que acaece el estímulo

Durante episodios de ECoG desincronizado, el estímulo indujo una contracción en la dispersión de la FIE de mayor envergadura a la observada cuando se estimuló durante estados de ECoG sincrónico (Figura D.15C). A simple vista se puede notar que, para cada neurona y en cada condición del ECoG, las transiciones a la LD ocurrieron con una latencia media característica ($402 \pm 42\text{ms}$ y $340 \pm 32\text{ms}$, media \pm EEM, para los estados de oscilación lenta espontánea y ECoG desincronizado, respectivamente; $p = 0.25$). Sin embargo, durante episodios de ECoG sincronizado, algunos ensayos mostraron marcados adelantos o retrasos de la LD, causando una variabilidad mayor en la latencia de la LD de esas neuronas (coeficiente de variación de la latencia de la LD: 0.41 ± 0.03 versus 0.19 ± 0.05 , media \pm EEM para los ensayos con ECoG sincronizado y desincronizado, respectivamente; $P=0.002$, prueba t de student). Esto, además da cuenta de la mayor dispersión de la FIE observada en ese estado de activación cortical (comparar Figuras D.15A y D.15B). En busca del origen de estas diferencias, se determinó si la latencia a la LD depende de alguna manera de la fase instantánea del ECoG al momento de acaecer el estímulo. El gráfico polar que relaciona estos dos parámetros muestra que existe una clara relación entre ellos (Figura D.16A). Los ensayos que mostraron un marcado adelanto de fase (latencias cortas) se agruparon en un rango de fases instantáneas del ECoG de 180 a 240° . En el gráfico polar de la amplitud relativa de las señales en función de la fase instantánea del ECoG (Figura D.13C) puede verse que este rango corresponde a la fase negativa de la onda del ECoG y al eDOWN de las NEMs. Por el contrario, cuando el estímulo acaeció en el rango de frecuencias instantáneas del ECoG de 60 a 120° , correspondiente a la segunda mitad de los eUP de las NEMs, se incrementaron las chances de que se produzcan LD retrasadas (latencias mayores). Como se vio, los avances y retrasos de la LD ocurrieron sin modificar las DFI entre el ECoG y el Vm de las NEMs (Figuras D.13C y D.14C). El hecho que los estímulos que acaecen sobre estados corticales silentes o activos inducen LD adelantadas o retrasadas, respectivamente, avala que la actividad cortical

prevalente al momento del estímulo influye sobre la precisión temporal de la RT, pero no sobre el formato general de la onda lenta córtico–estriatal evocada o sobre el grado de acoplamiento entre ECoG y Vm de las NEM.

La estimulación cortical apaga ensambles de neuronas corticales concomitantemente con eUP estriatales

Un hecho muy importante en lo visto hasta ahora es que un pulso eléctrico simple en la corteza puede producir una LLH en las NEMs acoplado a una deflexión negativa en el ECoG cualquiera sea el estado de activación cortical. Esto implica que el estímulo puede apagar los eUP de las NEMs (Figuras D.14A y D.15A). Se ha observado, *in vitro*, que la estimulación local puede apagar actividad persistente de ensambles corticales (*Shu y col, 2003*), por lo que no sería descabellado pensar que la estimulación cortical está apagando conjuntamente la actividad persistente cortical y estriatal en las condiciones experimentales, *in vivo*, aquí presentadas.

Los componentes lentos de los potenciales de campo están más relacionados con la actividad sináptica sincrónica que reciben las neuronas corticales, que con su disparo de potenciales de acción (*Pedley y Traub, 1990*). Con el objetivo de entender mejor la dinámica cortical que subyace a la finalización de los eUP y a la ocurrencia de la RT de las NEMs, se realizaron registros extracelulares de actividad unitaria o multi-unitaria en la vecindad del electrodo de registro del ECoG, en conjunto con el Vm de las NEMs. La actividad del ensamble de neuronas corticales se registró con un electrodo compuesto de 4 hileras de 4 contactos cada una (un total de 16 sitios de registro), obteniéndose una muestra de la actividad de una región cortical bastante extensa. Luego de rectificar, alisar y sumar la actividad de los 16 canales, se obtuvo una onda bastante similar a la del ECoG (Figura D.18A). Esto sugiere que los componentes de baja frecuencia del ECoG reflejan con bastante fidelidad el disparo de potenciales de acción del conjunto local de neuronas.

En las condiciones de registro de estos experimentos, la estimulación cortical produjo un cese transitorio en el disparo de potenciales de acción del ensamble de neuronas local, seguido de una actividad sostenida,

concomitantemente con las fases negativas y positivas del ECoG, respectivamente (Figura D.18). Este resultado inequívocamente demuestra que un estímulo simple en la corteza cerebral es capaz de apagar actividad persistente cortical *in vivo* en conjunto con eUP estriatales.

Para profundizar en las modificaciones dinámicas que la estimulación cortical produce en los disparos de potenciales de acción del ensamble cortical, se extrajeron los componentes lentos de la señal multi-unitaria rectificada, alisada y sumada entre canales. En general, los efectos observados fueron muy similares a los inducidos sobre los eUP de las NEMs. La estimulación cortical produjo una concentración de las FIE (Figura D.19A) de la actividad multi-unitaria. Luego, se determinó que la fase instantánea del ECoG al momento en que acaece el estímulo influye sobre la latencia del primer episodio de activación del ensamble cortical posterior al estímulo de la misma manera que lo hizo sobre las NEMs (Figura D.19B). Esto indica que la RT de las NEMs replica fielmente la dinámica que el estímulo induce sobre la actividad de disparo de potenciales de acción de un ensamble cortical en una región anatómicamente relacionada.

Finalmente, de estos hallazgos se desprende que las transiciones entre eDOWN y eUP de las NEMs son dictadas por transiciones entre estados activos y silentes en ensambles neuronales de la corteza cerebral, y que el disparo de potenciales de acción de esos ensambles es necesario para sostener los eUP de las NEMs. Para confirmar esta interpretación, se examinó la relación entre la actividad de los disparos de potenciales de acción de los ensambles corticales y los eUP espontáneos de las NEMs. Como es de esperar, un aumento en la actividad de los ensambles corticales estuvo estrechamente acoplado a transiciones hacia eUP en las NEMs, mientras que las transiciones a los eDOWN fueron precedidas por terminaciones espontáneas de la actividad persistente de los ensambles corticales (Figura D.19D).

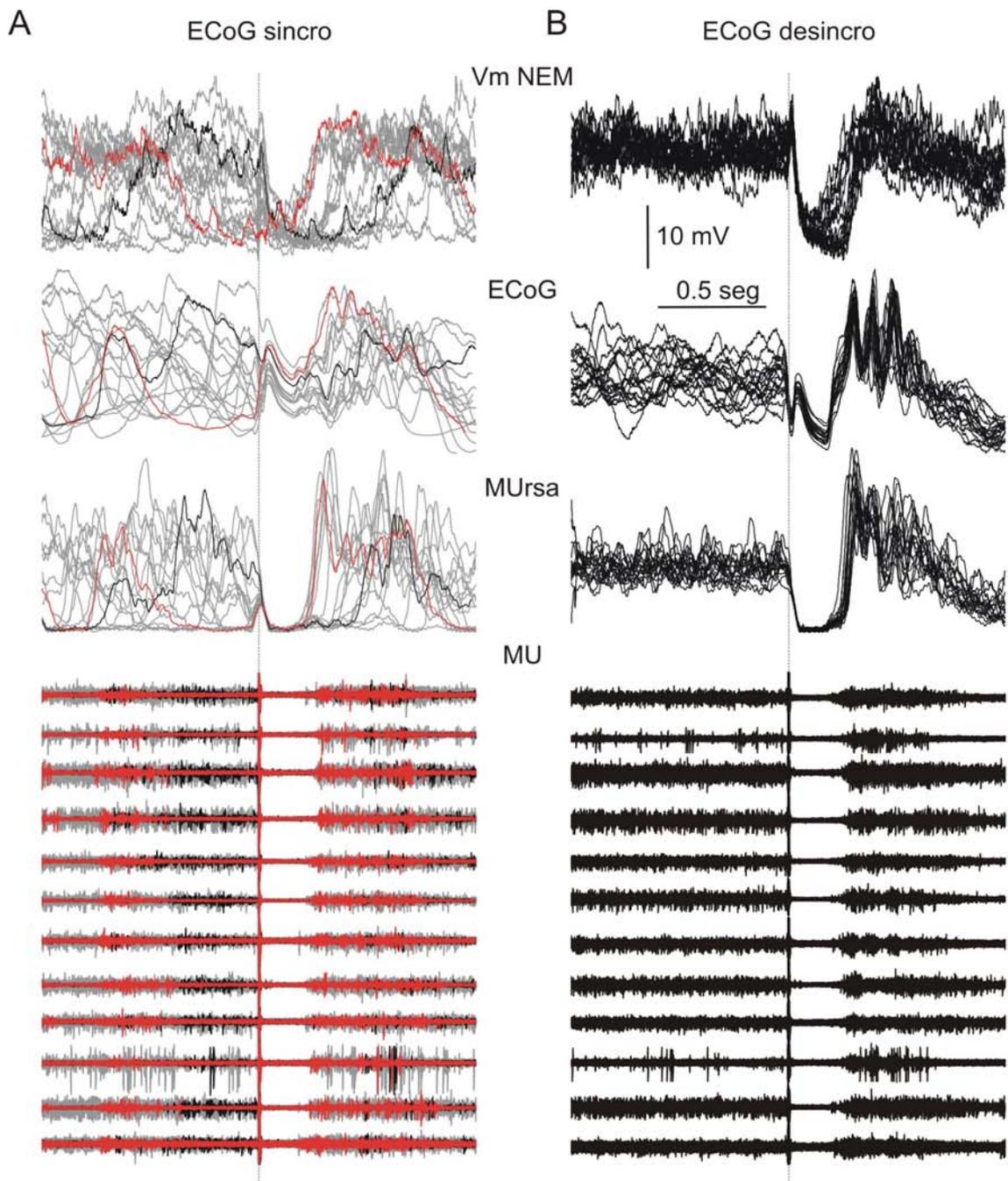


Figura D.18 Registros simultáneos de la RT de una NEM, el ECoG y la actividad multi-unitaria (MU) cortical en episodios de ECoG sincronizado y desincronizado. La estimulación local de la corteza cerebral produce una pausa de la actividad MU registrada en una región aledaña en ambos estados de activación cortical (sincronizado (A), y desincronizado (B)). La duración de la fase negativa del ECoG y de la LLH coinciden con la del apagado de la actividad MU, mientras que la transición a la LD coincide con el “reencendido” cortical. Nótese la estrecha relación entre la señal MU rectificada, sumada entre canales y alisada (MUrsa, con ventanas de 50ms) y el ECoG. La señal MUrsa describe fielmente la oscilación lenta entre estados activos y estados silentes de la actividad MU durante estados de sincronización cortical. Es interesante además que cuando el estímulo acaece en un estado silente (trazo rojo) la latencia del próximo estado activo es menor que cuando acaece en un estado activo (trazo negro). La línea punteada gris determina el momento de la llegada del estímulo y la presencia de los artefactos correspondientes.

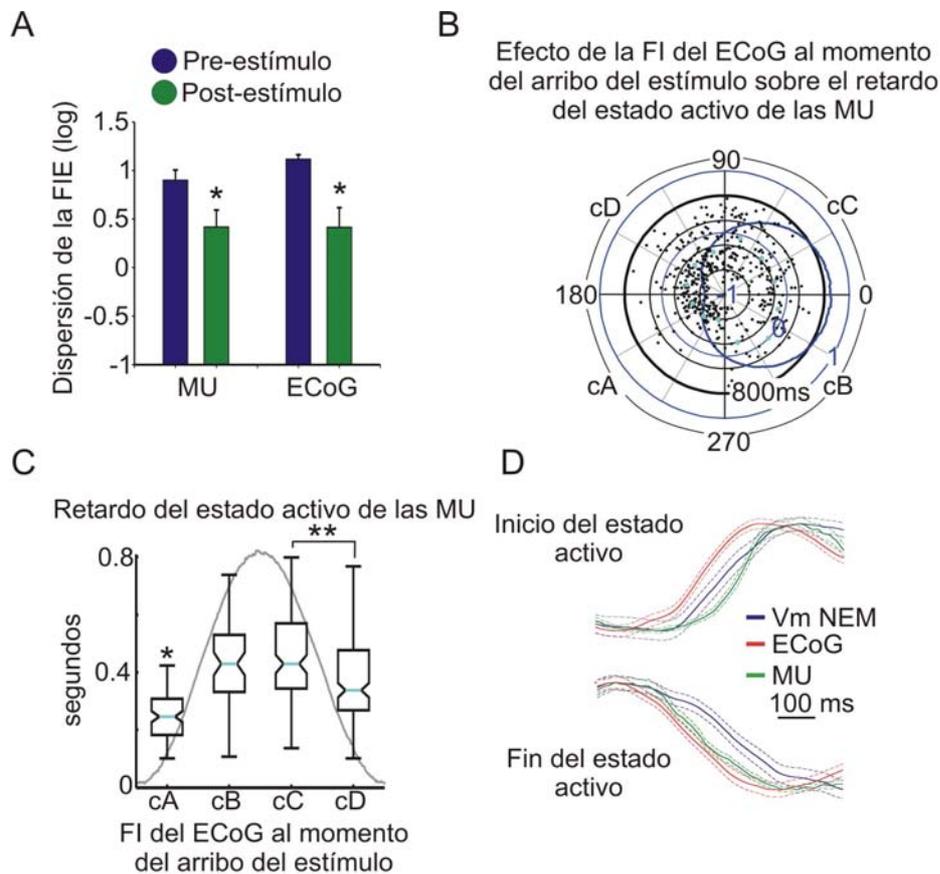


Figura D.19 Caracterización de la recomposición de fase de la actividad MU inducida por la estimulación cortical. **A.** Estudiando la dispersión de las FIE de las señal MUrsa se pudo demostrar una recomposición de fase de la actividad MU inducida por le estímulo cortical en episodios de ECoG sincronizado. Un resultado similar se observó en el ECoG concomitantemente registrado ($n=7$ pares, $*P<0.01$, prueba de t de student pareado de 1 cola). **B.** Relación entre la fase del ECoG al momento del acaecer el estímulo y la latencia de la transición al estado activo después del estímulo. Nótese, al igual que sucedió para la latencia de la LD del Vm de las NEMs, que los retardos más cortos se dan en el rango de fases que corresponden a la segunda mitad de la fase negativa del ECoG. Los puntos negros son mediciones de eventos individuales, y los de colores la mediana del arco de fases de 30° correspondiente. El trazo azul representa la amplitud relativa media de la señal MUrsa en función de la fase del ECoG. **C.** Los mismos datos del gráfico polar separados por cuadrantes y expresados como cajas (ver Figura D.16). En el cA, correspondiente al rango de fases de la segunda mitad de estado silente de la actividad MU (trazo gris de fondo), se acumulan las latencias menores, mientras que aumentan en el rango de fases que pertenecen al estado activo y vuelven a disminuir en el comienzo del estado silente. (Efecto significativo del factor cuadrante sobre la latencia de la transición al estado activo, ANOVA de Kruskal-Wallis por rangos. $*P<0.01$ para el cA versus los otros tres cuadrantes a partir del criterio de significancia honesta de Tukey. $**P<0.01$ entre cC y cD por el mismo criterio). **D.** Ejemplo de señales promedio de un registro simultáneo triple del Vm de las NEMs, ECoG y actividad MUrsa, gatillados por la transición al estado activo o al estado silente de la señal MUrsa (determinada de manera análoga a la transición al eUP de las NEMs, a partir del componente de 0.5-2Hz aislado mediante la transformación wavelet). Nótese la estrecha relación entre las transiciones de estados de la NEM y los cambios de estado de actividad cortical (silentes y activos). Las líneas punteadas son el intervalo de confianza de cada señal (\pm EEM). No se obtuvieron suficientes registros simultáneos triples como para cuantificar más precisamente las diferencias de tiempo de las transiciones.

Discusión

La especulación teórica, ya comentada, de que los eUP estriatales son ventanas de oportunidad durante las cuales las NEMs pueden transformar una entrada cortical específica (cuyos atributos no están claros) en potenciales de acción, requiere que esos eUP estén precisamente alineados a episodios de actividad persistente de disparo de potenciales de acción en ensambles neocorticales. De otra manera, la detección de la entrada cortical específica, presumiblemente contenida dentro del bombardeo sináptico más general que sostiene el eUP, se vería degradada. Quedó establecido en la sección anterior de este capítulo que el estado de activación general de la corteza cerebral gobierna el comportamiento subumbral del Vm de las NEMs. Sin embargo, restaba determinar hasta qué punto los episodios de actividad persistente estriatales y corticales están precisa y dinámicamente alineados temporalmente.

Los experimentos aquí presentados proveen evidencias de que los eUP de las NEMs invariablemente finalizan cuando la actividad persistente de disparo de potenciales de acción cortical es apagada mediante un estímulo eléctrico local. Además, demuestran que toda la dinámica de la perturbación de fase que sobre las fluctuaciones del Vm de las NEMs introdujo la estimulación cortical se puede explicar por la dinámica de la recuperación de la actividad persistente de los ensambles corticales.

Caracterización y origen de la respuesta tardía de las NEMs a la estimulación cortical

Al promediar muchos eventos de estimulación se puede reconocer una modulación lenta en la respuesta del Vm de las NEMs. Hay dos teorías respecto del origen de una respuesta neuronal de ese tipo (*Makeig y col, 2002; Fell y col, 2003; Shah y col, 2004*). Una sostiene que el estímulo produce una recomposición de fase parcial de una actividad oscilatoria subyacente, resultando en una concentración de fase entre ensayos inducida por el

estímulo. Esta teoría requiere que antes de la llegada del estímulo exista una oscilación con una frecuencia dominante similar a la de la respuesta, que idealmente, no debería sufrir un cambio inducido de la potencia. La teoría alternativa dice que el estímulo induce una actividad neuronal transitoria que es distinta de la dinámica de base que trae la señal. Por lo tanto, la respuesta debe estar compuesta por frecuencias nuevas o mostrar un incremento de la potencia de una oscilación preexistente. Los resultados aquí presentados demuestran que la RT de las NEMs posee la misma forma lenta cualquiera sea el estado de actividad espontáneo de la corteza cerebral. Así, aparece como una perturbación de la fase de un ritmo espontáneo cuando el ECoG presenta una actividad oscilatoria lenta, o como una actividad neuronal *de novo* cuando la corteza está desincronizada.

El origen de la RT de las NEMs ha sido durante mucho tiempo muy discutido. En un principio se pensaba que la LLH dependía de los circuitos inhibitorios intra–estriatales (Hull y col, 1970; Park y col, 1980). Después, Wilson y col, (1983), mostraron que la aplicación de corriente despolarizante o hiperpolarizante en las NEMs produce cambios comparables en la LLH y en el PEPS monosináptico evocados por la estimulación cortical, sugiriendo que poseen un origen similar. Además, encontraron que la estimulación eléctrica de la sustancia negra evoca una secuencia LLH – LD en las NEMs, que está ausente en animales decorticados. En base a esto, postularon que la LLH está relacionada con una disminución de la entrada excitatoria cortical y talámica (“desfacilitación”). En los registros aquí presentados, la LLH de las NEMs ocurrió en invariable concomitancia con una pausa en el disparo de potenciales de acción de los ensambles corticales y con la fase negativa del ECoG. Es más, la latencia de la LD estuvo linealmente relacionada con la duración de la pausa en el disparo de potenciales de acción de las neuronas corticales. De esta manera, estos datos establecen un rol para la desfacilitación cortical en el origen de la LLH de las NEMs, avalando la propuesta original de Wilson y col. (1983).

La estimulación cortical apaga conjuntamente disparos de potenciales de acción de ensambles neuronales y eUP estriatales in vivo

En la corteza cerebral aislada, ensambles de neuronas corticales pueden presentar episodios espontáneos de actividad persistente, los cuales son sostenidos por actividad recurrente excitatorias e inhibitorias y promovida por la dopamina (Sanchez-Vives y col, 2000; Shu y col, 2003; Tseng y O'Donnell, 2005). La estimulación eléctrica local puede apagar o encender esa actividad persistente dependiendo de la intensidad del estímulo y del tiempo transcurrido desde el inicio de un episodio de actividad persistente (Shu y col, 2003). De acuerdo con Shu y col. (2003), el cese de la actividad persistente involucra la activación preferencial de las conexiones inhibitorias locales. Estímulos de alta intensidad que acaezcan sobre el final del estado activo producirán una activación más fuerte de las interneuronas inhibitorias que de las conexiones excitatorias, y así tendrían más chances de apagar la actividad de la red de neuronas. En los experimentos *in vivo* de esta tesis, la estimulación eléctrica de las capas profundas de la corteza cerebral pudo apagar la actividad persistente de ensambles corticales. Con las intensidades de estimulación usadas (300 – 700 μ A) no se observaron inicios inducidos de actividad persistente. El mecanismo que origina el apagado de los ensambles corticales *in vivo* aun resta por ser dilucidado, dado que nuestros registros multi-unitarios no permiten diferenciar inequívocamente si la actividad procede de neuronas piramidales o de interneuronas corticales. De todas formas, el hecho que los antagonistas para receptores de GABA reducen más efectivamente la LLH de las NEMs cuando son aplicados de manera sistémica que de forma intra–estriatal sugiere que la activación de circuitos inhibitorios extra–estriatales contribuiría al apagado de la actividad persistente córtico–estriatal *in vivo* (Calabresi y col, 1990).

Contrariamente a lo que ocurre con la corteza cerebral, el estriado aislado no exhibe episodios espontáneos de actividad persistente. En animales decorticados las NEMs del estriado dorsolateral no presentan transiciones al eUP (Wilson, 1993), como tampoco lo hacen las NEMs del núcleo accumbens luego de una transección del fórnix (O'Donnell y Grace, 1995). En rodajas de cerebro, no puede inducirse eUP en neuronas estriatales mediante la aplicación de pulsos de corriente despolarizante (Nisenbaum y Wilson, 1995; Nicola y col, 2000). Tampoco es efectiva para inducir eUP en las NEM, *in vitro*, la estimulación cortical con pulsos eléctricos aislados o combinados con

agonistas de receptores NMDA y D1, aunque estos procedimientos inducen eUP en neuronas de la corteza pre-frontal (*Tseng y O'Donnell, 2005; Kasanetz y col, datos no publicados*). Es más, el bloqueo *in vivo* de corrientes catiónicas intrínsecas de las NEMs que podrían ayudar a sostener los eUP no elimina la alternancia espontánea entre estados del Vm de las NEMs (*Wilson y Kawaguchi, 1996*). En conjunto, estos resultados sugieren que los eUP son iniciados y sostenidos por entradas excitatorias, principalmente de origen cortical.

Sin embargo, las conexiones GABAérgicas locales pueden despolarizar a las NEMs cuando están en un eDOWN y podrían contribuir a iniciar y sostener estados despolarizados (*Czubayko y Plenz, 2002; Balckwell y col, 2003*). Además, se ha insinuado que una vez que un eUP es iniciado, su duración puede estar influenciada por corrientes intrínsecas voltaje dependientes (*Surmeier y col, 1991; Galarraga y col, 1994*). En apoyo de esto, se ha visto que en NEMs *in vitro* y en presencia de agonistas de receptores D1/D5, pulsos despolarizantes breves pueden inducir despolarizaciones con forma de meseta y disparos de potenciales de acción sobre el final de esa meseta, a través de un mecanismo que involucra a canales de calcio voltaje dependientes (*Hernández – López y col, 1997*). Recientemente, Vergara y col. (2003) reportaron que, también *in vitro*, pulsos supra-umbrales o trenes de estímulos breves aplicados en la corteza cerebral pueden evocar despolarizaciones con forma de meseta en NEMs y oscilaciones de baja frecuencia que se parecen a los eUP, mediadas por un mecanismo que presuntamente involucran un comportamiento bi-estable de las dendritas de las NEMs. Estos últimos estudios sugieren que las interacciones locales de los circuitos estriatales y los mecanismos intrínsecos de las células podrían dissociar el curso temporal de los eUP estriatales de la dinámica de la actividad de los ensamblajes corticales.

Los experimentos aquí presentados demuestran que el cese espontáneo o inducido por el estímulo de la actividad de ensamblajes corticales está invariablemente asociado a la terminación de los eUP en las NEMs. Este hecho no depende del estado general de activación cortical, ni del momento en que acaece el estímulo en relación a la fase de la oscilación espontánea (es decir, el tiempo que pasó la NEM en el eUP previamente a la llegada del estímulo). Estos resultados proveen evidencia directa que avala que las interacciones

intra–estriatales y las propiedades intrínsecas de las NEMs no pueden por sí solas sostener eUP de las NEMs *in vivo* en ausencia de actividad persistente cortical. Aun así, con estos resultados no se puede descartar un rol para las interneuronas estriatales de tipo *fast spiking* (FS) mediando la finalización de los eUP estriatales. Las interneuronas FS estriatales responden a los estímulos corticales más vigorosamente y a menores intensidades que las NEMs (Mallet y col, 2005) e inducen potenciales inhibitorios post–sinápticos (PIPS) mediados por receptores GABA_A en las NEMs (Plenz y Kitai, 1998; Koos y Tepper, 1999). Sin embargo, la LLH de las NEMs es débilmente influida por la aplicación de antagonistas GABA_A intra–estriatales (Calabresi y col, 1990), y la respuesta de las interneuronas FS a la estimulación cortical es sensible a la fase del ritmo lento espontáneo (Mallet y col, 2005). Además, no existen evidencias de una activación concomitante de las interneuronas FS con la finalización de los eUP de las NEMs (Mallet y col, 2005).

En resumen, el grueso de la evidencia disponible sugiere que ni bien la actividad cortical decae por debajo de cierto umbral, los mecanismos intrínsecos de la membrana de las NEMs fuerzan el V_m hacia un eDOWN (Bennet y Wilson, 2000).

La fase de las transiciones de estados de las NEMs permanece acoplada a la actividad de los ensambles corticales a pesar de las perturbaciones impuestas por el estímulo cortical

La actividad persistente ocurre en los ensambles corticales en diferentes estados de actividad cerebral, y puede sufrir modulaciones de fase impuestas por las aferencias. Los componentes más lentos de esa actividad sirven para unir redes neuronales extensamente distribuidas y proporcionan un marco temporal apropiado para que oscilaciones de alta frecuencia puedan ser transferidas a través de los ensambles neuronales. Por lo tanto, rápidas modulaciones de fase de oscilaciones lentas, ocurriendo de manera concertada entre regiones cerebrales, pueden ser esenciales para facilitar la comunicación en redes neuronales (Varela y col, 2001; Engel y col, 2001; Buzsaki y Draguhn, 2004). En este contexto, no estaba claro cómo una perturbación de la fase de la actividad cortical impactaría en la fisiología de las NEMs. A través de los experimentos

aquí reportados, se demostró que la estimulación eléctrica de un foco cortical produce perturbaciones de fase simultáneas de la actividad oscilatoria lenta de los ensambles corticales y de las transiciones de estado de las NEMs. La diferencia de fase instantánea entre el ECoG y el Vm de las NEMs se conserva durante las transiciones espontáneas entre eDOWN y eUP y la RT. Además, durante episodios de ECoG desincronizado, la estimulación cortical indujo una modulación lenta del Vm de las NEMs que está estrechamente acoplada en fase con la actividad evocada en los ensambles corticales. La única diferencia remarcable entre las RT de las NEMs evocadas durante el ritmo lento cortical y durante episodios de desincronización cortical fue la mayor variabilidad en la latencia de la LD en esta última condición. Esta misma variabilidad estuvo presente en la respuesta cortical y tiene relación con la fase de la oscilación de onda lenta al momento de acaecer el estímulo.

En conjunto, estos resultados indican que la dinámica de la RT de las NEMs a la estimulación cortical puede ser enteramente explicada por los efectos de la estimulación sobre la dinámica cortical. Luego de ser apagados por el estímulo local, los ensambles corticales retoman su actividad espontánea y dirigen los eUP de las NEMs del territorio estriatal anatómicamente relacionado.

Consideraciones metodológicas especiales

Las respuestas evocadas por estimulación cortical registradas concomitantemente en el ECoG y en el Vm de las NEMs fueron estudiados en segmentos que incluyeron un segundo precedente y otro subsiguiente a la aplicación del estímulo (a no ser que otra cosa sea especificada). Típicamente, se utilizaron entre 25 y 90 eventos consecutivos para cada neurona y sitio de estimulación estudiado. Las señales fueron re-muestreadas a 1000Hz (de la misma forma que en el punto anterior) para facilitar el análisis de las series de tiempo.

Con el objetivo de estimar el grado de acoplamiento entre el Vm de las NEMs y el ECoG se computó la correlación cruzada para corrimientos temporales de 0.75 segundos con una resolución de 1ms para las dos épocas de 1 segundo (pre y post-estímulo). Luego se promediaron los correlogramas de los sucesivos eventos con el fin de obtener un coeficiente de correlación medio para cada par NEM - ECoG.

Una manera adicional de estimar el nivel de asociación entre el Vm de las NEMs y el ECoG es la estabilidad (o de manera opuesta la dispersión) de la diferencia de fase entre ellos. La fase instantánea (FI) (ϕ_{MSNi} and ϕ_{ECoGi}) de las señales fue calculada por medio de la transformación de Hilbert, y la diferencia de fase instantánea (DFI) ($\Delta\phi = \phi_{MSNi} - \phi_{ECoGi}$)

expresada en una distribución circular caracterizada por una dirección media y una dispersión circular, obtenidas de la siguiente forma (Fisher, 1993):

Dirección media (θ): $\theta = \tan^{-1}(S/C)$, donde

$$S = \sum \sin(\Delta\phi_i) \text{ y } C = \sum \cos(\Delta\phi_i).$$

Dispersión circular (δ): $\delta = (1 - m_2)/(2 * R^2)$, donde

$$m_2 = 1/N * \sum(\cos(2 * (\Delta\phi_i - \theta))) , \text{ y}$$

$$R^2 = (C^2 + S^2) / N.$$

Con el fin de estudiar la recomposición de la fase de las señales inducida por estimulación eléctrica, se trabajó sobre los componentes de 0.5-2Hz aislados mediante la transformación wavelet. Los sucesivos eventos de estimulación fueron alineados al tiempo de acaecer el estímulo y para cada instante de tiempo (resolución de 1ms) se agruparon las FI de la señal en los sucesivos eventos. Así se obtuvieron muestras de N fases instantáneas entre eventos (FIE), donde N es el número de eventos. Se consideró a la variabilidad de las distribuciones de las FIE como un indicador del grado de recomposición de fase. Para determinar esa variabilidad se calculó la probabilidad de que esas distribuciones circulares sean uniformes por medio de la Prueba de Rayleigh (Fisher, 1993), y se estimó la dispersión circular como se señaló más arriba.

Los registros multi-unitarios corticales se hicieron con el objetivo obtener una estimación de la actividad de salida (disparo de potenciales de acción) de una población de neuronas corticales. Para tal fin, primero se identificaron por inspección visual los canales que presentaron una relación señal / ruido apreciable. La señal de esos canales fue rectificadas y luego sumada entre canales. Luego se alisó el trazo por promediación de vecinos con una ventana móvil de 50ms, y finalmente se redujo la señal a 1000Hz para facilitar posteriores análisis. A partir de esta resultante (MURas) se aislaron los componentes de 0.5-2Hz y las FI por medio de las transformaciones wavelet y Hilbert descritas en la sección Metodología.

III. Episodios transitorios de correlación a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y la actividad registrada en el ECoG

Introducción

La fase positiva de las ondas lentas del ECoG suele presentar modulaciones de alta frecuencia en el rango theta (3-12 Hz), como los husos generados por las interacciones córtico–talámicas. Durante los episodios de desincronización cortical pueden aparecer oscilaciones de baja amplitud y de frecuencias aun mayores, en el rango beta (15 – 35 Hz) o gamma (35-80 Hz) (*Steriade y col, 2001*). Existe abundante evidencia que relaciona a episodios de actividad sincrónica en esos rangos de frecuencia en la corteza cerebral (*Linás y Paré, 1991; Pulvermuller y col, 1997; Engel y col, 2001; Varela y col, 2001*) y también en el estriado (*Courtemanche y col, 2003*) con el procesamiento de información referida a conductas orientadas por un objetivo, a procesos mnésicos o sensoriales. Las neuronas corticales disparan potenciales de acción durante fases particulares de esas oscilaciones rápidas de la actividad de campo (*Engel y col, 2001; Varela y col, 2001*). Aunque fuera de su contexto conductual, las oscilaciones de alta frecuencia ocurren también en animales anestesiados (*Steriade, 2000*).

Para que una NEM dispare un potencial de acción durante un eUP o un eUPp es necesario que se despolarice varios milivoltios hasta alcanzar el umbral. Los estados despolarizados de las NEMs son un reflejo del estado de activación global de la corteza cerebral, por lo que es esperable que una señal específica, embebida en el estado activo cortical sea necesaria para impulsar el Vm de las NEMs hasta el umbral. Esto último podría estar vinculado con el grado de correlación de las descargas de potenciales de acción por parte de las neuronas córtico-estriatales. Las NEMs exhiben modulaciones de alta frecuencia en la cima de los eUP que eventualmente pueden provocar disparo de potenciales de acción (*Stern y col, 1997; 1998*), pero nunca ha sido demostrada una correlación de esos eventos con la actividad cortical. Para que los ritmos corticales rápidos representen la señal específica que hace disparar a las neuronas estriatales, es necesario que se transfieran al Vm de las NEMs.

Con el objetivo de evaluar esta posibilidad se realizó un estudio de correlación cruzada entre el Vm de las NEMs y el ECoG desplazando ventanas móviles a lo largo de extensos segmentos de señal correspondientes a eventos de sincronización o desincronización cortical.

1.1.1 RESULTADOS

Se estudió la presencia de episodios de sincronización entre el Vm de las NEMs y el ECoG en tres rangos de frecuencias. Para ello se descompusieron las señales mediante una transformación wavelet en las bandas de 3-8Hz, 8-17Hz y 17-35Hz y se los analizó por separado. Con cada banda se utilizó una ventana móvil de distinto tamaño, con el fin de optimizar la probabilidad de encontrar sincronizaciones transitorias de al menos algunos ciclos. En el rango de 3-8Hz se usaron ventanas de 3 segundos, con una superposición de $\frac{1}{4}$, para el de 8-17Hz las ventanas fueron de 1.5 segundos con la misma superposición, mientras que en el rango de 17-35Hz se aplicaron ventanas de 0.75 segundos superponiéndolas también $\frac{1}{4}$. La significación estadística de la correlación cruzada fue determinada de la siguiente manera. Para cada par se realizó un análisis de correlación cruzada real y otro subrogado. Es decir que en un caso se cotejó cada ventana del Vm de las NEMs contra el segmento de tiempo equivalente en el ECoG, y en otro esa misma ventana de Vm contra una ventana de igual tamaño elegida al azar de la señal del ECoG. Luego se determinó un límite de confianza para el área de la correlación cruzada de las ventanas como la media más / menos dos desvíos estándar del área de las ventanas de la correlación subrogada. Luego se cuantificó la proporción de ventanas significativas en la correlación cruzada de cada par y se la contrastó contra la proporción del subrogado (por definición ronda el 5%) por un método de comparación de proporciones.

Al observar las correlaciones cruzadas crudas (es decir previo a descartar las ventanas que no superan el límite de confianza) durante segmentos de actividad bajo la condición de ECoG sincronizado aparecen episodios frecuentes de sincronización a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y el

ECoG, sobre todo en el rango de 3-8Hz (Figura D.20B-D). Luego se puede identificar en la señal cruda o descompuesta las modulaciones que dieron origen a esa correlación (Figura D.21A, C, E). Sin embargo esos eventos de actividad sincrónica suelen ser cortos (transitorios), y de frecuencia variable (cada vez que aparecen lo hacen con alguna variación de frecuencia). Es quizás como consecuencia de esto que al cuantificar la validez estadística de las sincronizaciones a alta frecuencia se observan menos casos positivos de lo que uno esperaría al ver las señales. De las 64 NEMs analizadas durante episodios de ECoG sincronizado se encontraron 6 casos que presentaron una correlación cruzada en el rango de 3-8Hz significativamente distinta del subrogado con una probabilidad mayor al 95%. Si tomamos para la significación una probabilidad límite inferior del 90% los casos positivos ascienden a 11 (Figura D.21A-B, D.22A-B). En cambio, tanto en la banda de 8-17Hz como en la de 17-35Hz ningún par superó el valor límite de significación estadística (Figura D.21C-D, D.22C-F).

En los episodios de ECoG desincronizado se observa algo similar (Figura D.22). En este caso los eventos de alta correlación son igualmente transitorios y aun menos frecuentes en el rango de 3-8Hz, y lucen más robustos en las otras dos bandas. Sin embargo en ningún caso de estas últimas y en un solo par de 33 analizados en la banda menor alcanzan una significación estadística respecto del subrogado.

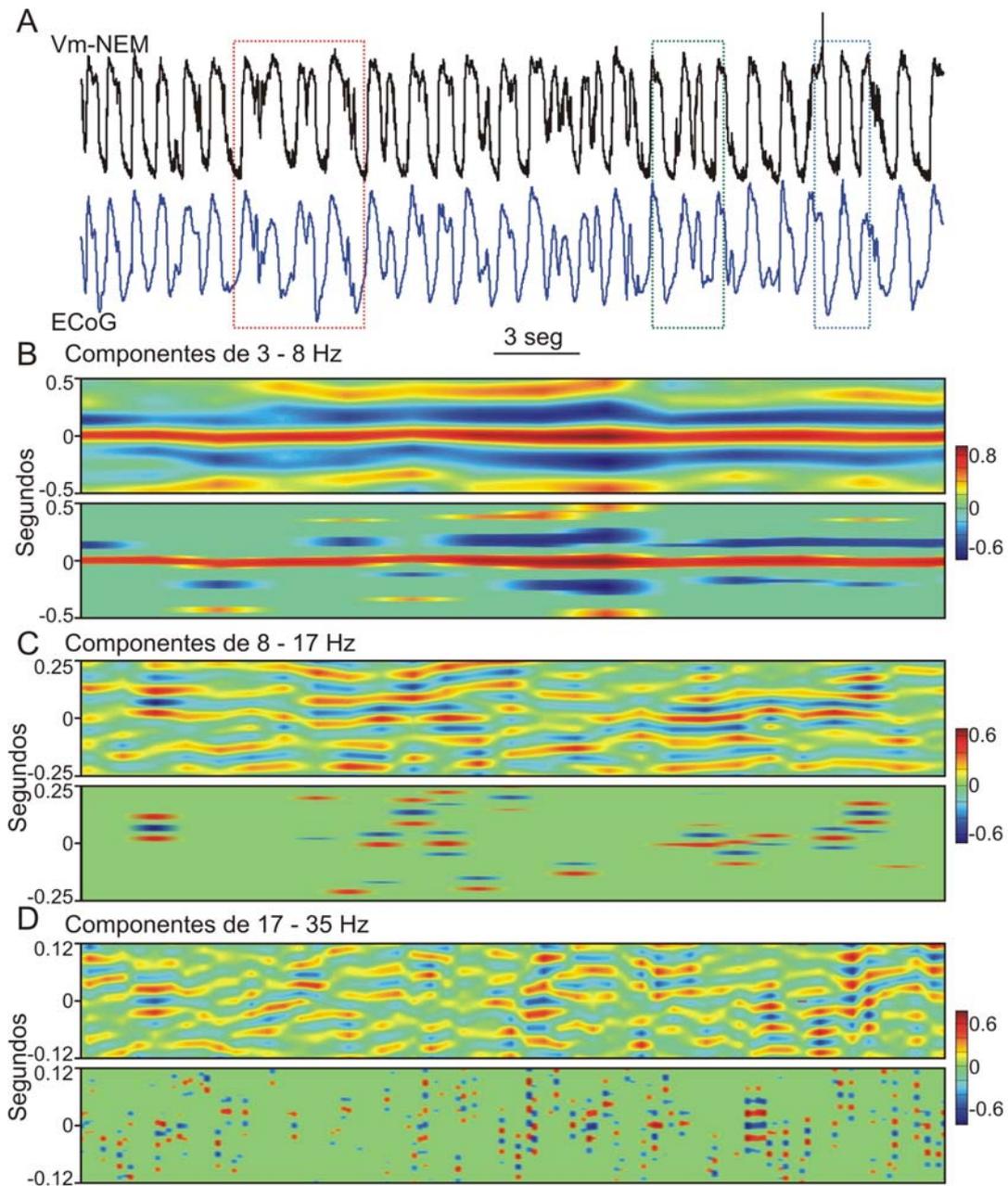


Figura D.20 Correlación a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y el ECoG durante la actividad oscilatoria lenta. **A.** Ejemplo de un registro simultáneo del Vm de una NEM y el ECoG frontal perteneciente a un segmento donde se estudió la correlación a frecuencias altas. Los recuadros de colores representan los episodios magnificados en la Figura D.21. **B.** Gráficos de la evolución temporal de la correlación cruzada correspondiente a la señal de arriba para los componentes de 3-8Hz (ver texto para el detalle de cómo se hizo el análisis). El gráfico de arriba muestra el resultado obtenido antes de seleccionar las ventanas que superan el intervalo de confianza impuesto por el análisis subrogado. Abajo: resultado luego de extraer las ventanas cuyo área de correlación cruzada no exceden el intervalo de confianza. Nótese la alta correlación durante todo el segmento, tornándose periódica en algunos episodios. **C.** Similar a B para los componentes de 8-17Hz. Vease como la correlación se pierde casi totalmente luego de aplicar el intervalo de confianza. **D.** Idem C para los componentes de 17-35Hz.

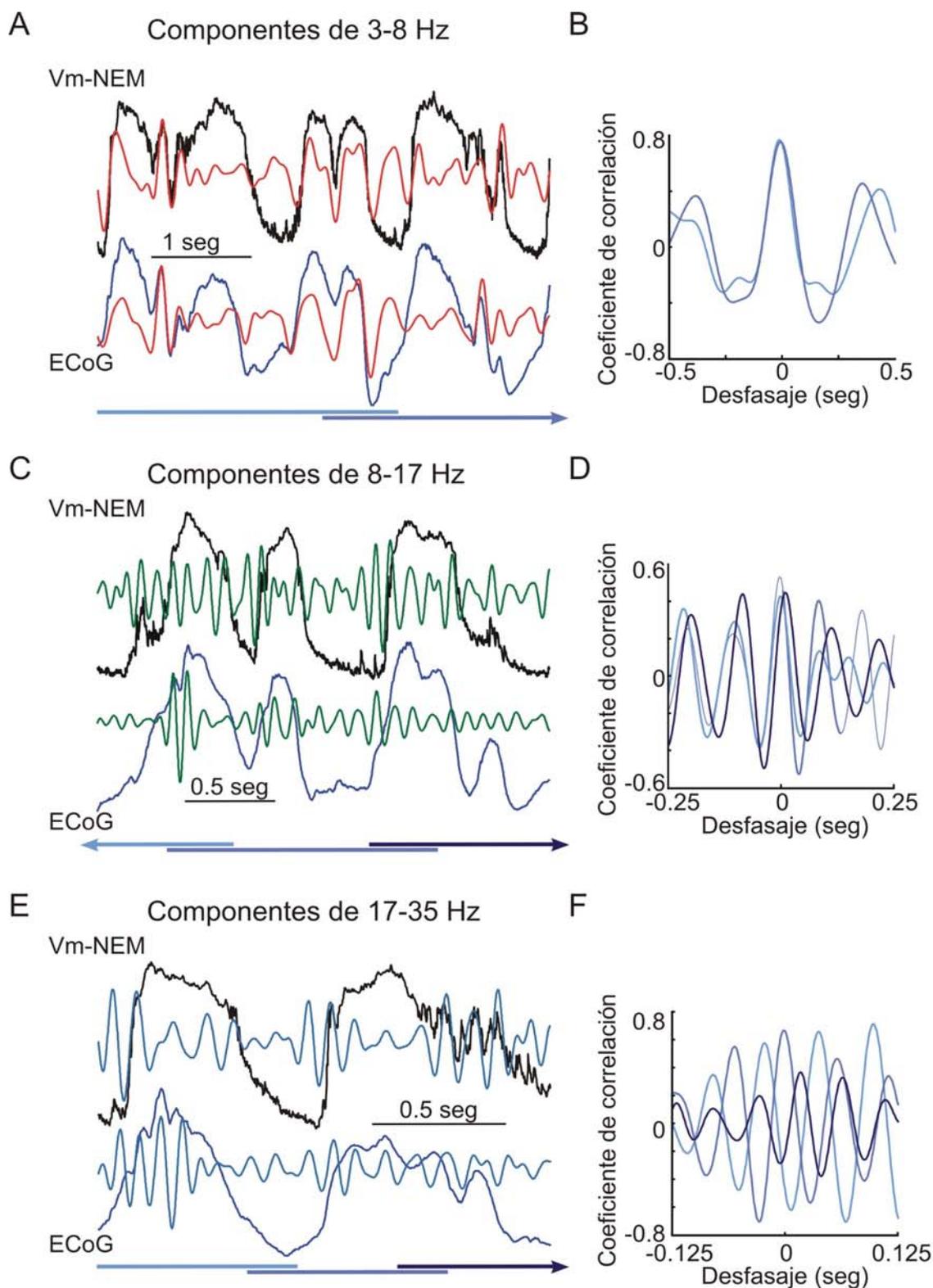


Figura D.21 Ejemplos de eventos transitorios de correlación a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y el ECoG. Magnificaciones de los episodios especificados en la Figura D.20 mostrando las señales completas y los componentes de 3-8Hz (A), 8-17Hz (C) y 17-35Hz (E) extraídos de las mismas. A la derecha de los trazos (B,D,E) están las correlaciones cruzadas respectivas calculadas en las ventanas de tiempo especificadas por las barras horizontales debajo de cada gráfico según el código de colores. Nótese la alta correlación periódica presente en algunas ventanas en todos los rangos de frecuencia

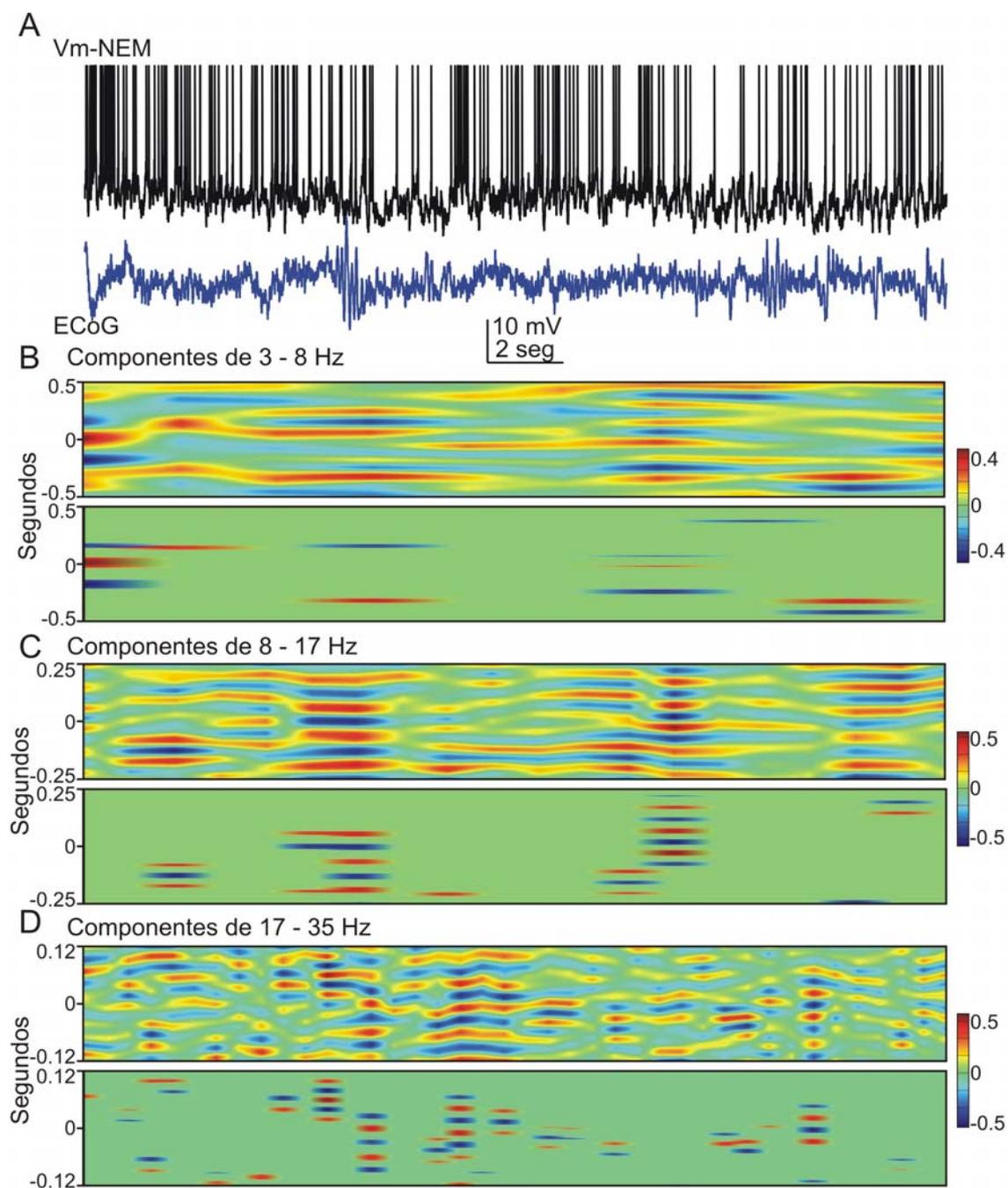


Figura D.22 Correlación a alta frecuencia entre el Vm de las NEMs y el ECoG durante episodios de desincronización cortical. **A.** Ejemplo de un registro simultáneo del Vm de una NEM y el ECoG frontal perteneciente a un segmento de desincronización cortical donde se estudió la correlación a frecuencias altas. **B.** Los gráficos de la evolución temporal de la correlación cruzada para los componentes de 3-8Hz muestran algunos episodios de alta correlación (arriba) que se pierden luego de seleccionar las ventanas que superan el intervalo de confianza impuesto por el análisis subrogado (abajo) **C-D** Similar a B para los componentes de 8-17Hz y de 17-35Hz respectivamente.

Discusión

Oscilaciones de alta frecuencia se observaron en el potencial de campo local registrado en el estriado de ratas (*Berke y col, 2004*) y monos (*Courtemanche y col, 2003*) no anestesiados, aunque su origen es aun desconocido. Las neuronas del estriado dorsolateral de la rata disparan potenciales de acción que mantienen una relación de fase estable con modulaciones del potencial de campo estriatal en el rango de los husos (*Berke y col, 2004*). Esa clase de actividad oscilatoria también ha sido observada en la cima de los eUP de las NEMs, y alternativamente pueden provocar el disparo de potenciales de acción (*Stern y col, 1997*). En el trabajo que aquí se presenta se analizó la existencia de una correlación entre esas modulaciones del Vm de las neuronas estriatales y la actividad de alta frecuencia presente en el ECoG, que representa el disparo de potenciales de acción de manera sincrónica por ensambles altamente específicos de neuronas corticales (*Engel y col, 2001; Varela y col, 2001; ver también Figura C.2*). Durante segmentos de ECoG sincronizado, es frecuente observar episodios de actividad sincrónica en el rango de los husos de sueño en la mayor parte de las neuronas, sin embargo sólo en algunos casos la correlación fue significativa. Más difícil aun fue discriminar eventos significativos de correlación en rangos de mayor frecuencia. Durante los episodios de desincronización cortical, las modulaciones en el rango de los husos fueron menos evidentes, y casi no se detectaron episodios de correlación significativa.

A pesar de haber sido encontrados con poca frecuencia en la población de NEMs analizadas, la significación de los eventos de correlación a alta frecuencia entre actividad de campo cortical y Vm de neuronas estriatales individuales no debería ser despreciada. La sincronización a alta frecuencia podría indicar que la actividad altamente sincrónica de los ensambles corticales puede trasladarse al Vm de la NEMs y acaso influenciar el procesamiento córtico-estriatal.

Existen muchas razones que pudieron influir para que los eventos de actividad sincrónica de alta frecuencia detectados hallan sido escasos. En la

preparación utilizada, la actividad rítmica a frecuencias altas suele ser transitoria y de composición frecuencial cambiante. Estos hechos degradan la capacidad de detección del estudio por correlación con ventanas móviles.

Por otro lado, las transformaciones impuestas por las neuronas córtico-estriatales, la integración que las dendritas de las neuronas estriatales hacen de la actividad aferente y las propiedades intrínsecas de las NEMs puede transformar la actividad oscilatoria de campo cortical (que no refleja la actividad de neuronas córtico-estriatales exclusivamente) y aparecer en el Vm registrado en el soma de las NEMs con características espectrales diferentes. Esto también perturba la capacidad de detección por medio de métodos lineales de análisis de señales.

Por último, una asociación estrecha entre las señales puede estar dada por acoplamiento estrechos de fase con variaciones independientes de la amplitud de la oscilación en ambas señales. Este tipo de asociación también podría escapar a la detección por métodos lineales de análisis de series de tiempo. En ese escenario sería más relevante realizar un estudio de enganches transitorios de fase que no contemple la magnitud de la actividad rítmica en el algoritmo de detección.

Finalmente, podría requerirse una estrecha relación anatómica entre la región cortical que presenta oscilaciones de alta frecuencia y la NEM registrada para que se establezca la transmisión de la oscilación. Aunque nuestros pares NEM – ECoG corresponden a territorios corticales y estriatales anatómicamente relacionados, podría ser necesario un análisis a nivel de conexionado fino entre grupos pequeños de neuronas corticales y microdominios estriatales para detectar con mayor probabilidad estos eventos.

En conclusión, de manera preliminar, las neuronas estriatales tendrían la capacidad de asimilar en el Vm eventos de actividad sincrónica de alta frecuencia de los ensambles corticales. Este trabajo invita a continuar con herramientas más precisas un estudio de esta índole.

Consideraciones metodológicas especiales

En esta sección se trabajó con segmentos largos de señal correspondientes a períodos de ECoG sincronizado o desincronizado espontáneamente (típicamente 90 segundos en un caso y entre 20 y 90 segundos en el otro). Las señales fueron sometidas a una transformación wavelet para extraer los componentes de tres rangos de frecuencias distintas (3-8Hz, 8-17Hz y 17-35Hz). Luego se trabajó con esos componentes para realizar los estudios de correlación cruzada.

Para cada rango de frecuencias se utilizaron ventanas móviles de tamaños diferentes con el fin de optimizar la localización de episodios de actividad sincrónica transitoria (3, 1.5 y 0.75 segundos par los tres rangos de frecuencia, en orden creciente, con superposiciones en todos los casos de ¼ de la longitud de la ventana).

La significación estadística de las correlaciones cruzadas se calculó de la siguiente manera. Para cada par se realizó un análisis de correlación cruzada real y otro subrogado. Es decir que en el primer caso se cotejó cada ventana del Vm de las NEMs contra el segmento de tiempo equivalente en el ECoG, y en el otro esa misma ventana de Vm contra una ventana de igual tamaño elegida al azar dentro del ECoG. Luego se determinó un límite de confianza para el área de la correlación cruzada como la media más / menos dos desvíos estándar del área de las ventanas de la correlación subrogada. Finalmente se cuantificó la proporción de ventanas significativas en la correlación cruzada de cada par y se la contrastó contra la proporción de ventanas significativas del subrogado (por definición ronda el 5%) comparando las proporciones de la siguiente manera:

$$z_1 = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1} + \frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}}}$$

donde p1 y p2 son las proporciones de ventanas positivas en el análisis real y en el subrogado, respectivamente, y n1 y n2 el total de ventanas de cada uno (que en este caso es el mismo para los dos). Luego Z1 es el factor de normalización que tiene una probabilidad asociada en la distribución normal.

SEGUNDO CAPÍTULO.

CARACTERÍSTICAS ESPACIALES DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD CORTICAL Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS NEMs

Introducción

Las proyecciones córtico–estriatales están finamente organizadas. Presentan un ordenamiento topográfico donde el eje estriatal dorsolateral–ventromedial determina un gradiente de aferencias corticales desde regiones sensorio–motoras a zonas relacionadas con el sistema límbico (Figura E.1) (Kunzle 1975; Kunzle, 1977; Graybiel y Ragsdale, 1979; Selemon y Goldman-Rakic, 1985; Donoghue y Herkenham, 1986; McGeorge y Faull, 1987, 1989; Flaherty y Graybiel, 1991, 1993, 1994; Wright y col., 2001; Hoffer y Alloway, 2001; Cheatwood y col., 2003; Haber, 2003; Groenewegen y col., 1987, 2004). Este hecho, en conjunto con algunas evidencias funcionales (Cruchter y De Long, 1984; Alexander y De Long, 1985), contribuyó a la proposición de modelos de funcionamiento en que la corteza y los GB procesan información a través de bucles paralelos y segregados (Alexander y Cruchter, Alexander y col, 1990). De hecho, se ha observado que el disparo de potenciales de acción por parte de las NEMs está funcionalmente relacionado con la actividad de la región cortical que provee la mayor parte de las aferencias que recibe el territorio estriatal donde fueron registradas (Cruchter y De Long, 1984; Alexander y De Long, 1985; Romo y Schultz, 1992; Barnes y col, 2005). Sin embargo, es claro también que las NEMs suelen estar moduladas por una combinación de aspectos sensorio-motores, cognitivos y motivacionales de la conducta (Hollerman y col, 1998; Kawagoe y col, 1998, Hikosaka y col, 1989), y se han propuesto diversos mecanismos por los cuales un circuito córtico-estriatal puede influir sobre los demás, incluyendo la superposición de proyecciones de distintas áreas corticales en la misma región estriatal, la gran extensión de los árboles dendríticos de las NEM, que cruzan los límites entre dominios funcionales estriatales, y el conexionado con forma de bucle abierto entre el tálamo o la sustancia negra y el estriado (Haber, 2003).

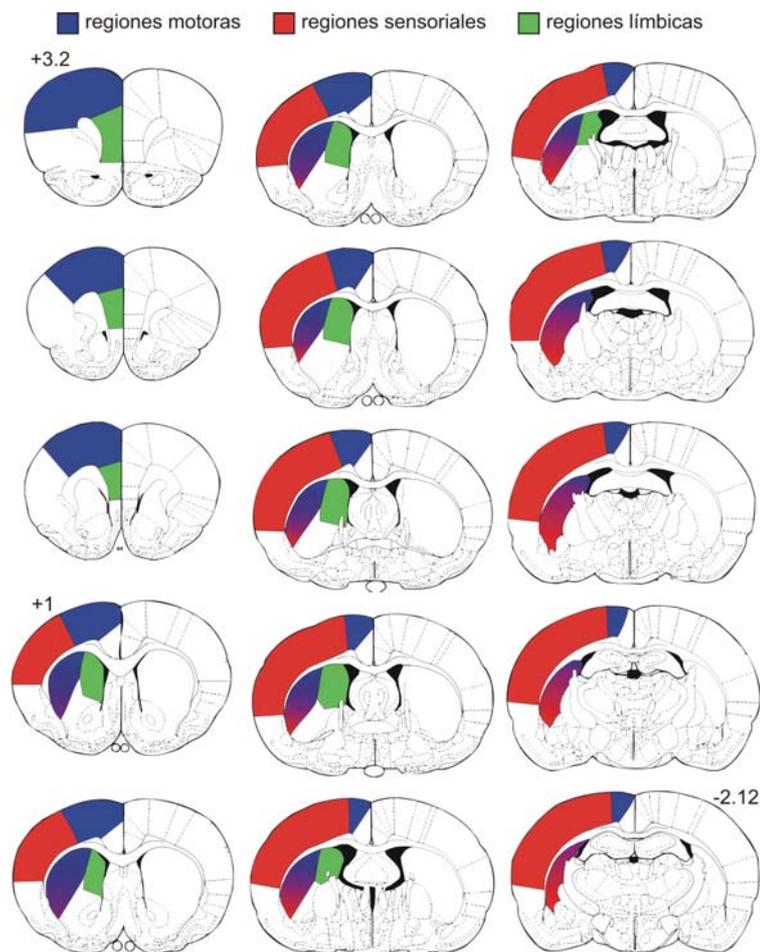


Figura E.1 Esquema de la organización de las proyecciones de las áreas corticales motoras, sensoriales y límbicas sobre el estriado. Dibujos de cortes coronales del cerebro. A partir de inyecciones de marcadores retrógrados en el estriado, McGeorge y Faull (1989) determinaron el nivel de segregación y convergencia de las proyecciones córtico-estriatales desde áreas sensorio-motoras y límbicas. Las cortezas motoras (azul), (primaria, secundaria, de los miembros superiores e inferiores, agranular medial) y sensoriales (rojo), (primaria y secundaria) proyectan bilateralmente desde la lámina V (aunque en menor medida también desde la lámina III) de manera muy densa hacia una extensa región dorsolateral del estriado abarcando todo el eje longitudinal anteroposterior. A partir de allí, las proyecciones se hacen más escasas gradualmente hacia la zona más medial y ventral. Existe una tendencia en que las regiones motoras predominan en el estriado rostral y las sensoriales en el estriado caudal. Sin embargo, la representación cortical sensorial de una parte del cuerpo converge con la representación motora de la misma parte, y en ningún caso se ha reportado la existencia de una zona estriatal puramente motora o puramente sensorial. Cabe aclarar que en este párrafo el término sensorial excluye a las cortezas visuales y auditivas. El grado de superposición de los colores azul y rojo marca la convergencia señalada anteriormente. Las proyecciones desde las regiones mesocorticales más ventrales (verde) terminan de manera bilateral en territorios estriatales mediales más ventrales, y del mismo modo, las zonas dorsales y caudales lo hacen en el estriado medial más dorsal y caudal. Así, las corteza infralímbica proyecta al núcleo accumbens y al tubérculo olfatorio, y las corteza prelímbica lo hace al núcleo accumbens y a la zona ventromedial del estriado. Los números al costado de los esquemas precisan la localización anteroposterior de los cortes.

Registros intracelulares *in vivo* simultáneos de dos NEMs presumiblemente pertenecientes a un mismo dominio funcional del estriado dorsal demostraron que estas células entran y salen del eUP conjuntamente (Stern y col., 1998). Por otro lado, registros de actividad de campo en el núcleo accumbens simultáneos con registros intracelulares de NEMs del núcleo accumbens muestran una fuerte correlación entre la actividad de campo local y las transiciones entre eUP y eDOWN (Goto y O'Donnell, 2001). Estos resultados han sido apreciados como evidencia de que NEMs que sufren eUP sincronizados constituyen un canal activo de procesamiento de información (O'Donnell, 2003). Presumiblemente, las transiciones entre eDOWN y eUP en dichas poblaciones de NEM son gobernadas por aferencias provenientes de regiones corticales específicas, de modo que distintos canales córtico-estriatales podrían estar en estados activos o silentes en un momento determinado, o mostrar estados activos con fases diferentes, constituyendo esto un correlato funcional del procesamiento en paralelo de información en los GB.

En capítulos previos demostramos que los registros simultáneos del Vm de las NEMs y de la actividad de campo cortical *in vivo* constituyen una buena herramienta para evaluar la organización funcional de las proyecciones córtico-estriatales. El comportamiento del Vm de las NEMs refleja fielmente la actividad de ensambles de neuronas corticales. Las neuronas del estriado dorsolateral presentan transiciones entre eDOWN y eUP o sostienen eUPp según cual sea el estado de activación del ECoG frontal. Además los estados despolarizados de las NEMs están precisamente alineados en el dominio del tiempo con estados activos registrados en ensambles de neuronas ubicados en regiones corticales anatómica y funcionalmente relacionadas con la zona estriatal registrada.

Con el objetivo de determinar si la organización espacial del conexionado córtico-estriatal se refleja en una más estrecha asociación funcional entre una NEM y una región cortical determinada, se registraron intracelularmente NEMs en conjunto con la actividad de campo local de tres regiones corticales anatómicamente segregadas en ratas anestesiadas con uretano. Además se

ubicaron electrodos de estimulación a corta distancia de cada sitio de registro cortical, con el propósito de determinar si las NEMs registradas recibían entradas sinápticas directas desde las diversas regiones corticales.

Resultados

Se realizaron registros intracelulares de NEMs concomitantemente con la actividad de campo de tres regiones corticales diferentes (Figura D.1): las cortezas motora (mot-ECOG), sensorial (sen-ECOG) y límbica (lim-ECOG). Entre las NEMs registradas, 22 pertenecieron al territorio estriatal dorsolateral (DL-NEMs), 12 se ubicaron en la región caudal (C-NEMs), y 14 en la zona ventromedial del estriado (VM-NEMs). En la figura E.2 se detallan las localizaciones de las neuronas registradas. Algunos de los sitios fueron identificados directamente a partir de la presencia de las NEMs exitosamente marcadas con neurobiotina y reveladas con un cromógeno, mientras que los otros fueron determinados en base a rastros que deja en el tejido el electrodo de registro. Comparando las Figuras E.1 y E.2 puede establecerse la correspondencia anatómica entre regiones corticales y estriatales de la siguiente manera: mot-ECOG con DL-NEMs, sen-ECOG con C-NEMs, lim-ECOG con VM-NEMs.

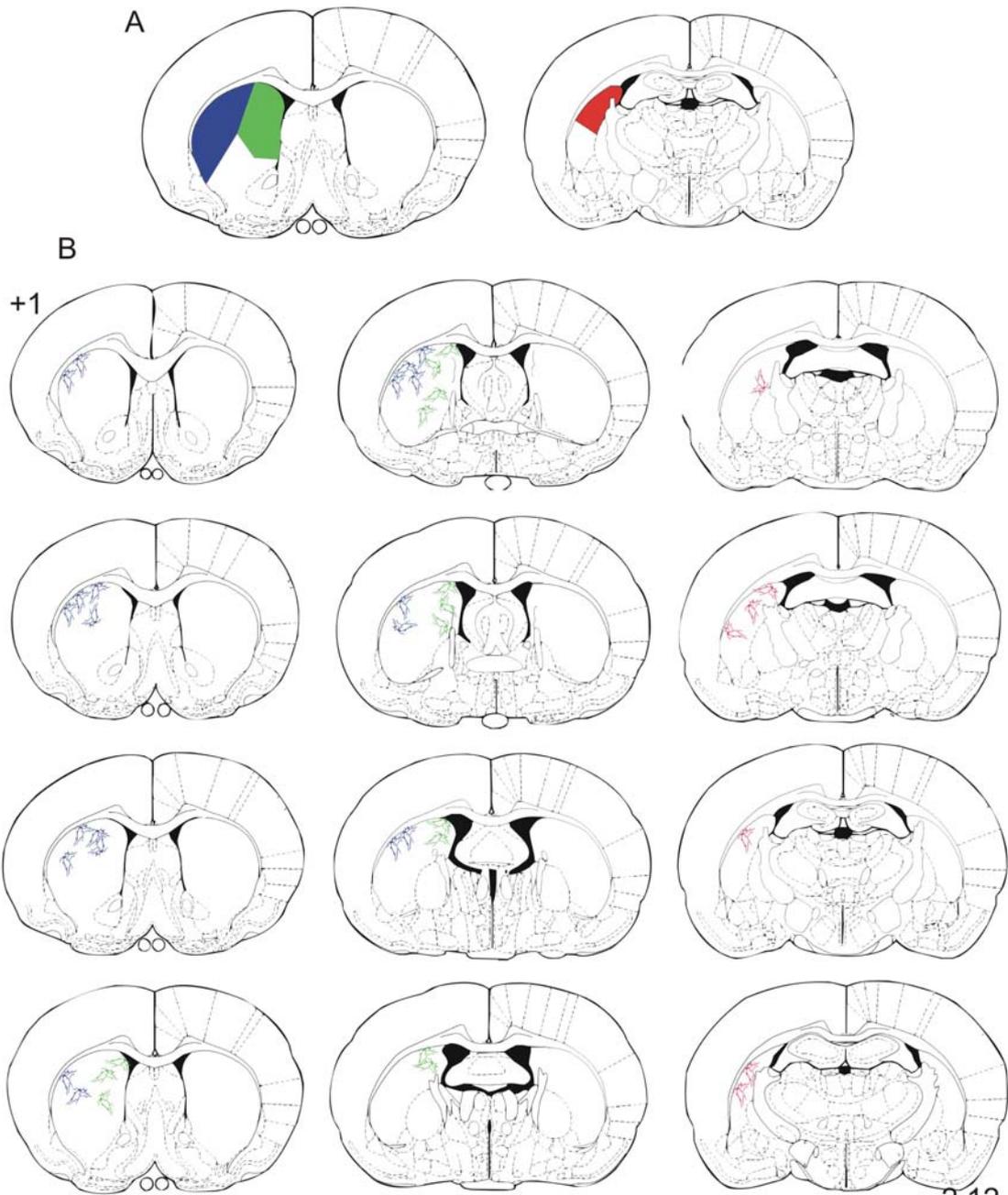


Figura E.2 Localización en el estriado de las NEMs registradas. **A.** Esquematación en dibujos de cortes coronales del estriado de la división regional utilizada para subdividir a las NEMs según el sitio donde fueron registradas. Azul: territorio dorsolateral, verde: ventromedial, y rojo: caudal. Este división se basa en la topografía del conexionado córtico-estriatal (ver figura E.1). **B.** Esquemas de cortes coronales del estriado identificando la localización de las neuronas estriatales registradas. El color de las células representa el territorio al que fue asignado el registro. Los números al inicio y al fin de los esquemas identifica la distancia en mm respecto al bregma

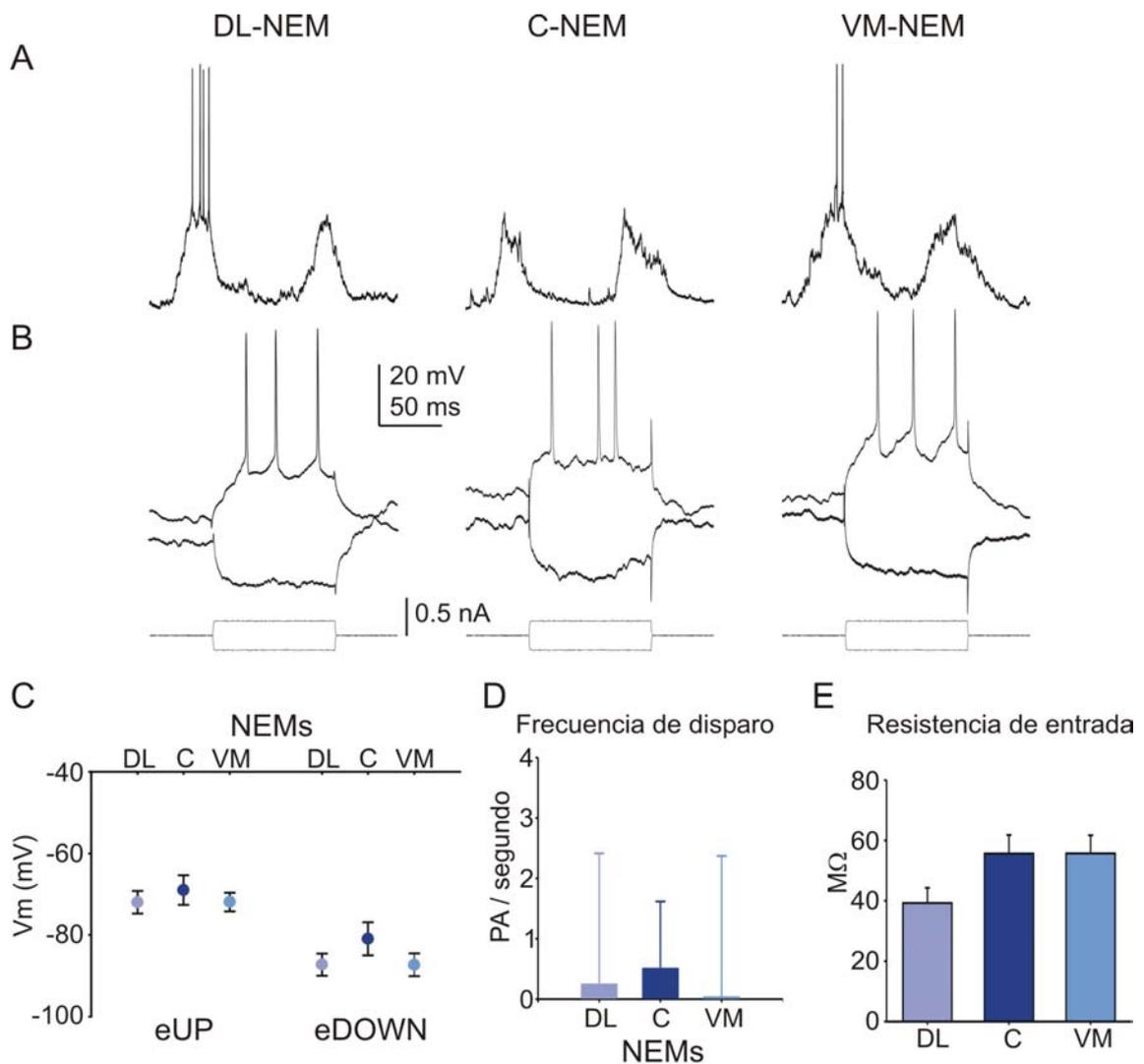


Figura E.3 Propiedades electrofisiológicas de las NEMs de los diferentes territorios estriatales. **A.** Las NEMs de las tres regiones estudiadas presentaron la alternancia de estados del Vm típica de los registros in vivo de estas neuronas. **B.** La resistencia de entrada de las neuronas se evaluó aplicando pulsos hiperpolarizantes de corriente de 0.2 nA de amplitud y 100ms de duración en el soma de las NEMs durante los eDOWN. **C.** Los valores del Vm en el eDOWN y en el eUP fueron determinados a partir de las modas de la distribución bimodal del histograma del Vm. No hubo diferencias significativas entre los valores preferidos para esos estados entre las NEMs de las tres regiones. **D.** Gráfico de cajas exhibiendo la distribución de la frecuencia de disparo de las NEMs. Resultó similar para las poblaciones de los tres territorios. En su mayoría fueron neuronas silenciosas, por lo que la mediana de las cajas está en el cero. El borde superior representa el percentilo 75 y las barras el rango. **E.** Resumen de los valores de resistencia de entrada hallados. Fueron estadísticamente similares para los tres grupos de neuronas.

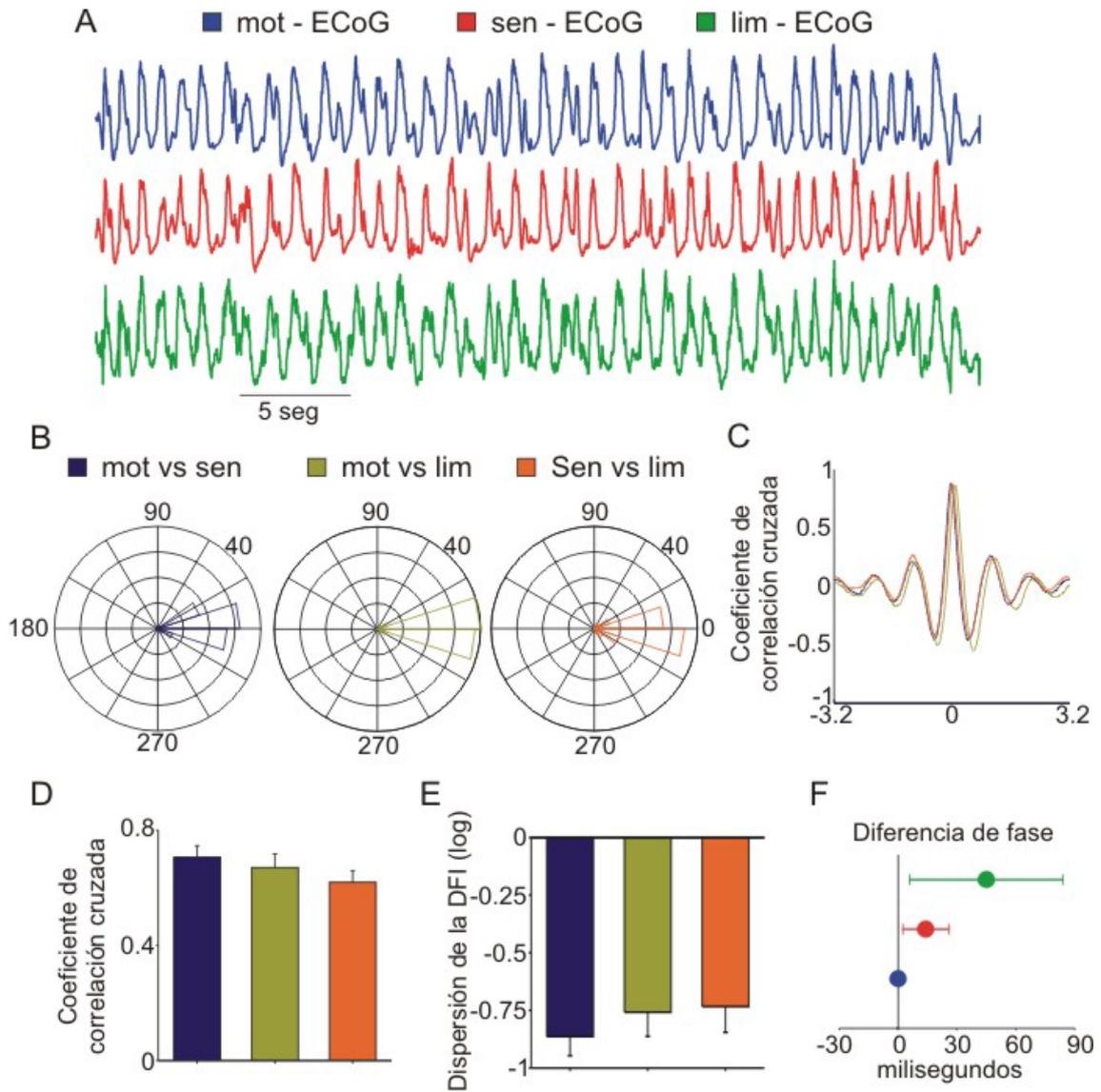


Figura E.4 Relación entre la actividad oscilatoria lenta registrada simultáneamente en tres regiones corticales segregadas anatómicamente. **A.** Segmento de actividad de ECoG sincronizados registrados en las cortezas motora, sensorial parietal y prelímbica. Nótese el alto grado de acoplamiento de las tres señales en el ritmo oscilatorio lento. **B.** Histograma de las DFI entre los ECoG identificados en los componentes de 0.5-2Hz (aislados mediante una transformación wavelet) de un segmento de señal de 90 segundos que incluye el episodio de la parte A. La oscilación lenta aparece con una diferencia de fase media cercano a cero entre las cortezas. **C.** Correlación cruzada entre los ECoG calculados a partir de ventanas móviles de 6 segundos desplazadas por los 90 segundos de señal real con una superposición de $\frac{1}{4}$. Cada trazo es la media de todas las ventanas calculadas. Nótese que la correlación es alta y posee componentes periódicos en los tres pares. **D.** Resumen de los resultados poblacionales de la correlación cruzada entre los ECoG. Los valores fueron altos para los tres pares y no hubo diferencias significativas entre ellos ($n=13$). **E.** El análisis de la dispersión de la DFI también reveló un alto grado de asociación entre las señales y no se observaron diferencias significativas entre los pares. **F.** FI media de cada señal expresada en relación a la fase del mot-ECoG.

Las propiedades electrofisiológicas de las NEMs de diferentes territorios estriatales son similares

Se realizó una breve caracterización de las propiedades electrofisiológicas de las NEMs de los diferentes territorios estriatales. De manera general, las DL-NEMs, las VM-NEMs y las C-NEMs se comportaron de forma muy similar respecto a parámetros como la proporción de neuronas activas (7 de 22 entre las DL-NEMs, 5 de 12 de las C-NEMs y 2 de 14 entre las VM-NEMs), la tasa de disparo de potenciales de acción, y la resistencia de entrada (Figura E.3). Además, las NEMs de las tres regiones estudiadas presentaron una alternancia oscilatoria del Vm entre eDOWN y eUP a una frecuencia de ~ 1 Hz. Los valores de Vm preferidos para cada estado no difirieron entre las distintas NEMs.

En conclusión, a partir de las características aquí evaluadas no es posible discriminar electrofisiológicamente a las NEMs de los diferentes territorios estriatales.

Las diferentes regiones corticales están altamente acopladas en el ritmo oscilatorio lento

En las ratas anestesiadas con uretano utilizadas en estos experimentos, las tres regiones corticales registradas mostraron la característica actividad oscilatoria de onda lenta. Al haber registrado en forma simultánea los ECoG de varias regiones, se pudo obtener información acerca de la dinámica espacio-temporal del ritmo lento que gobierna la actividad de la corteza cerebral. Inspeccionando visualmente los trazos se puede ver que las ondas lentas ocurren de manera sincrónica en las tres cortezas (Figuras E.4A, E.5). Esto se confirmó mediante un estudio de correlación cruzada entre las señales y a partir de la dispersión de su diferencia de fase (realizado de manera similar al estudio entre el Vm de las NEMs y los ECoG en capítulos precedentes, ver más adelante). El coeficiente de correlación fue significativamente alto para los tres pares de ECoG (mot-ECoG vs sen-ECoG, mot-ECoG vs lim-ECoG y sen-ECoG vs lim-ECoG; Figura E.4C-D) y no se encontraron diferencias significativas entre en el grado de asociación entre cortezas. Algo similar ocurrió para la dispersión de la diferencia de fase, que fue estrecha (diferencia

de fase estable) y equivalente para los tres pares (Figura E.4B,E). Tomando como referencia el mot-ECoG, se puede apreciar un leve adelanto de fase del sen-ECoG y un adelanto un poco mayor del lim-ECoG, aunque la alta variabilidad de esas mediciones indica que es difícil hablar de diferencias temporales significativas entre los tres ECoG (Figura E.4F).

Este análisis deja en claro que la oscilación de ritmo lento en ratas anestesiadas es un fenómeno espacialmente muy extendido en la corteza cerebral, y altamente correlacionado entre regiones diferentes.

Las transiciones de estados de las NEMs están preferentemente acopladas al ritmo lento de una región cortical

Bajo nuestras condiciones de trabajo, el ritmo oscilatorio lento está ampliamente distribuido en la corteza cerebral, por lo que no es de extrañar que al registrar una NEM, la alternancia entre eDOWN y eUP esté fuertemente acoplada a la actividad de onda lenta cortical registrada en cualquiera de las tres regiones estudiadas (Figura E.6). Esto surge claramente con solo mirar los registros simultáneos de las NEMs de cualquiera de los territorios estriatales y los tres ECoG (Figura E.5).

Sin embargo, es posible aprovecharse de la variabilidad que caracteriza a la periodicidad del ritmo de la oscilación cortical para tratar de determinar si las NEMs muestran una asociación más estrecha con la actividad de algunas de las cortezas. Para esto, se decidió calcular la correlación cruzada (CC) entre las NEMs y cada ECoG desplazando ventanas móviles de 6 segundos a lo largo de extensos episodios de actividad sincronizada. Así, en el cómputo de la CC en cada ventana se incluyen varios ciclos de la oscilación. Luego se obtiene el área bajo la curva de la CC para resaltar la relación periódica que exista entre las señales (Figura E.5). De esta forma, se observó que, por un lado, las DL-NEMs exhibieron una mayor correlación con el mot-ECoG que con el sen-ECoG y el lim-ECoG (aunque solo fue estadísticamente significativo versus lim-ECoG) (Figura E.7A). En cambio, las VM-NEMs presentaron un CC significativamente mayor con el lim-ECoG que con los otros ECoG, mientras que para las C-NEMs ese parámetro fue más elevado con el sen-ECoG que

con el mot-ECoG (diferencia significativa) o con el lim-ECoG (aunque no significativo) (Figura E.7A).

Otra forma de estimar el grado de asociación entre la actividad oscilatoria de dos regiones del cerebro es evaluando la estabilidad de la diferencia de fase entre las señales de ellas obtenidas. Para los mismos segmentos de registro utilizados en el análisis de la CC, se identificó cada ciclo de la oscilación lenta. Para esto se localizaron, a partir de los componentes de 0.5–2Hz de las señales intracelulares (extraídos por el método de descomposición wavelet), las transiciones desde eDOWN a eUP. Luego, utilizando como referencia el momento de esa transición, se alinearon segmentos de 1 segundo (250ms precedentes y 750ms subsiguientes) de cada una de las señales. Así, para cada uno de los episodios de onda lenta se calculó la dispersión circular de la diferencia de fase instantánea entre el Vm de las NEMs y cada ECoG (Figura E.6). Cualquiera fuese el par NEM – ECoG estudiado, el valor de dispersión medio resultó ser muy estrecho, evidenciando un alto grado de acoplamiento entre las actividades cortical y estriatal. A pesar de esto, para las DL-NEMs se pudo discriminar una mayor asociación (menor dispersión) con el mot-ECoG que con las otras zonas de la corteza (Figura E.7B), y las VM-NEMs mostraron un acoplamiento mayor con el lim-ECoG que con los ECoG de las cortezas motoras y sensoriales. En cambio, para las C-NEMs, la dispersión de la diferencia de fase resultó ser igualmente estrecha con los tres ECoG (Figura E.7B).

El área de la curva de la CC y la estabilidad de la diferencia de fase instantánea son medidas del grado de acoplamiento entre la actividad de las NEMs y la de los ECoG. Cuanto mayor la primera y menor la segunda, más estrecha será la relación entre las señales. Los valores hallados para cada par NEM – ECoG se pueden describir en un gráfico donde los ejes de coordenadas representen a esas dos variables (Figura E.7C). Allí, los puntos más alejados del origen de coordenadas (situados en el cuadrante de valores positivos del área de CC y negativos de dispersión de la diferencia de fase) corresponderán a los pares de señales mejor acoplados (Figura E.7C). De esta manera, se estimó un “grado de acoplamiento” como la magnitud del vector que une el origen del sistema de coordenadas con cada punto del gráfico. Así, se

compararon los valores medios de la magnitud de los vectores de cada par NEM-ECOG, y se observó que el grado de acoplamiento de las DL-NEMs con el mot-ECOG fue significativamente más elevado que con el lim-ECOG, aunque no difirió respecto del acoplamiento con el sen-ECOG (Figura E.7D). Por su lado, las C-NEMs estuvieron significativamente más acopladas al sen-ECOG que a los otros dos ECOG, y algo similar se observó para las VM-NEMs con el lim-ECOG respecto a los mot-ECOG y sen-ECOG (Figura E.7D).

De manera general, estos resultados establecen que la alternancia de estados de las NEMs está mejor acoplada con la actividad oscilatoria lenta registrada en la corteza que le provee mayor densidad de aferencias. Además, permiten apreciar que cuanto más emparentadas están dos regiones corticales desde el punto de vista funcional, menor es la posibilidad de establecer una asociación específica entre la NEM y uno de esos territorios corticales, como lo demuestran la influencia equivalente que ejercen las cortezas motora y sensorial sobre las DL-NEMs.

Finalmente, la diferencia de fase que existe entre el ritmo lento cortical y la alternancia de estados de las NEMs es coherente con una transferencia en la dirección córtico-estriatal. Para todos los ECOG, la actividad cortical precede al Vm de las NEMs de cualquiera de los territorios estriatales. La estimación de la diferencia de fase se caracteriza por una alta variabilidad que no permite discriminar un sentido en el flujo de la oscilación lenta desde las diferentes regiones de la corteza cerebral y a lo largo del territorio estriatal (Figura E.7E).

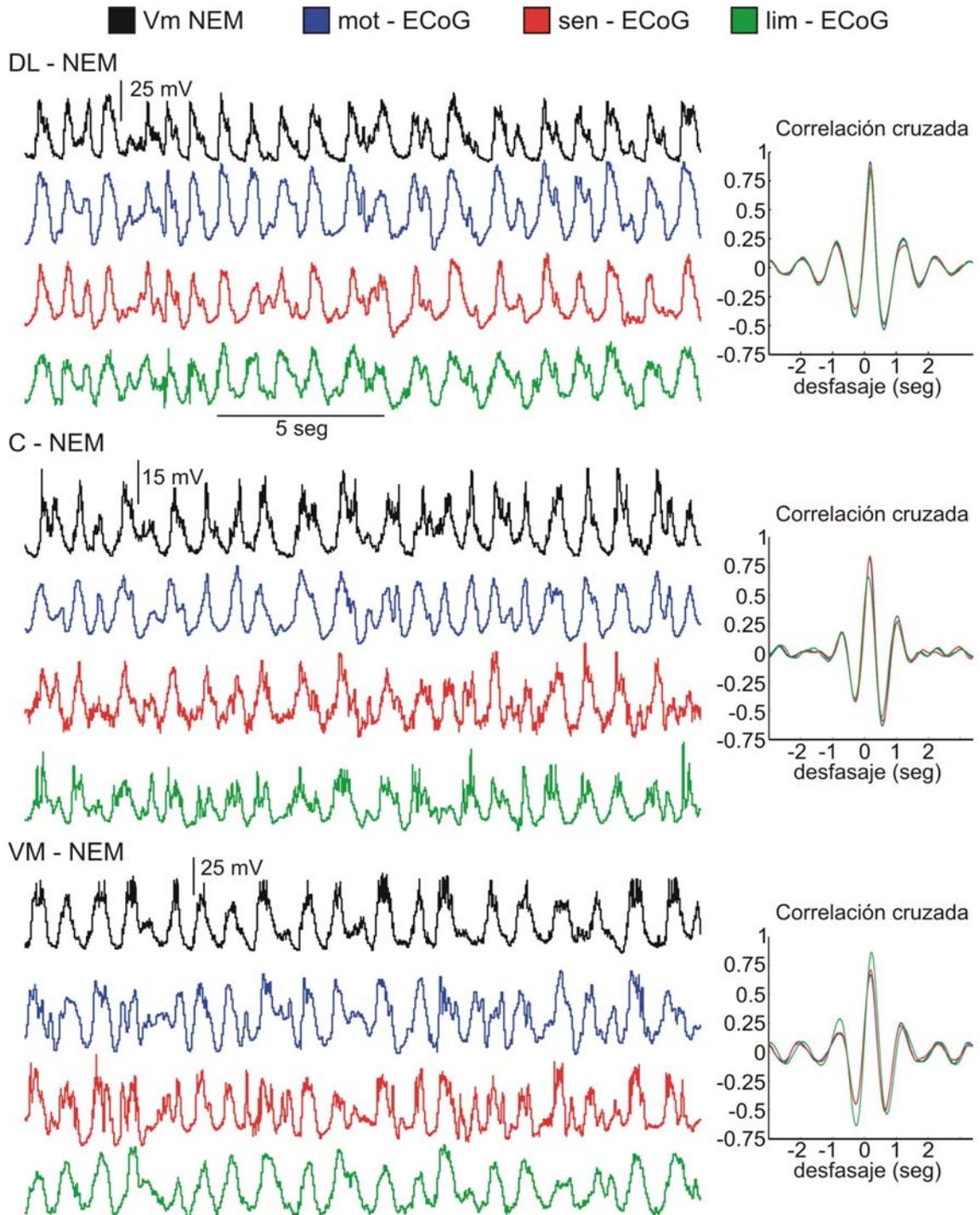


Figura E.5 Registros del Vm de NEMs simultáneamente con los ECoG de tres áreas corticales. Segmentos de 20 segundos de registros del Vm NEMs de tres territorios estriatales diferentes (DL-NEM, C-NEM y VM-NEM), cada uno adquirido concomitantemente con la actividad electrocorticográfica de las cortezas motora, sensorial y pre-límbica. Es evidente la alta correlación que existe entre la actividad lenta dominante en los tres ECoG y las transiciones de estados del Vm de las NEMs de los tres territorios estriatales. Los gráficos de la derecha muestran la correlación promedio de cada uno de los pares Vm NEM-ECoG en los tres registros.

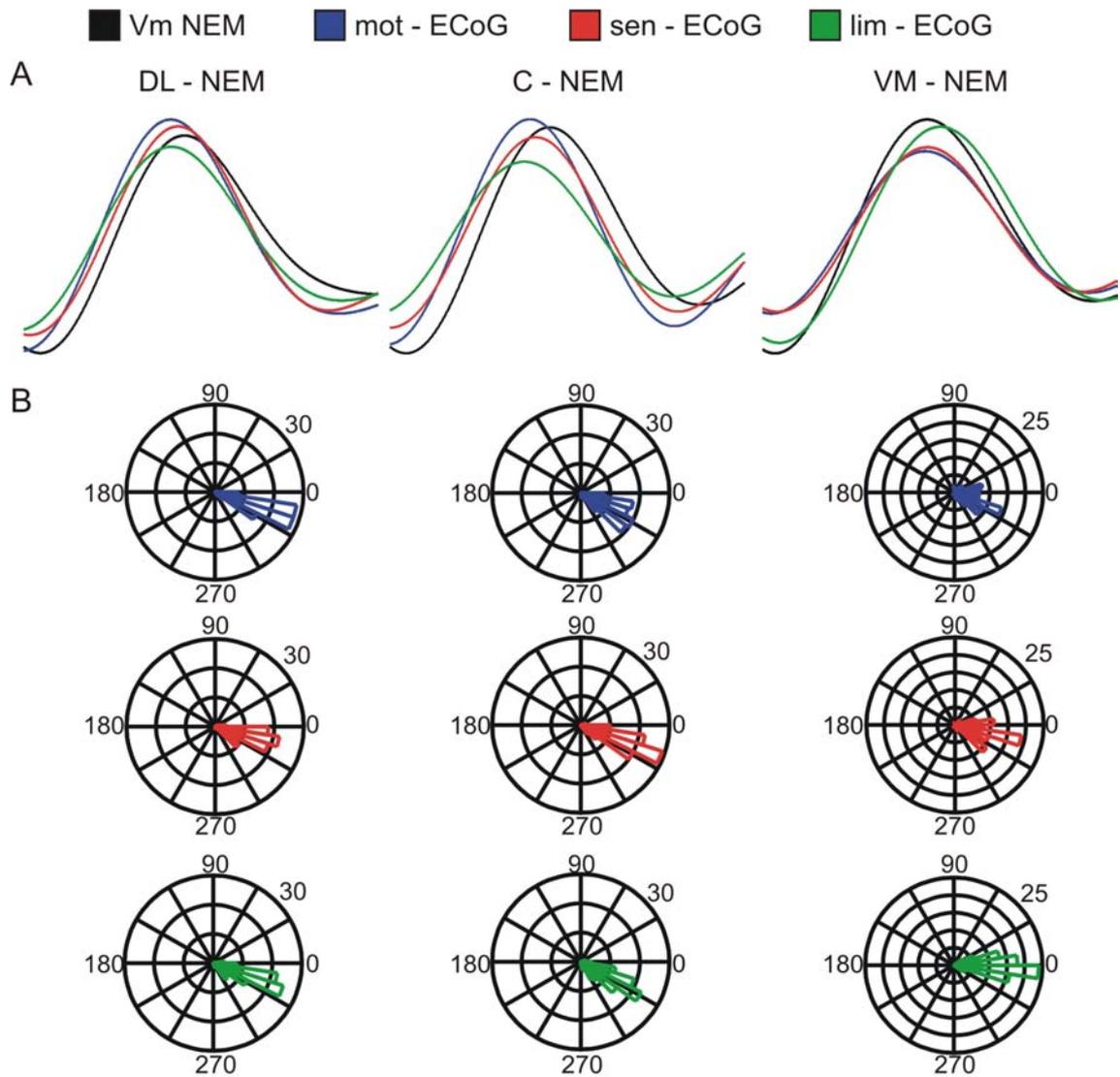


Figura E.6 Diferencia de fase entre los ciclos de onda lenta cortical y las transiciones entre eDOWN y eUP de las NEMs. **A.** Un ejemplo de señales promedio de los componentes de 0.5-2Hz (aislados mediante la transformación wavelet) de los sucesivos ciclos de onda lenta de 90 segundos de registro simultáneo del Vm de las NEMs y los tres ECoG, gatillados por la transición al eUP de las NEMs. La transición al eUP se identificó como un cruce desde valores negativos por más de 200ms a valores positivos por otros 200ms. **B.** Histogramas de las DFI medias entre los ECoG y las señal intracelular de cada uno de los ciclos identificados en los 90 segundos de registro utilizados para calcular los promedios de la parte A. Nótese la estrecha dispersión de la DF en todos los casos. La relación de fase muestra que la actividad de las tres regiones corticales precede al Vm de las NEMs.

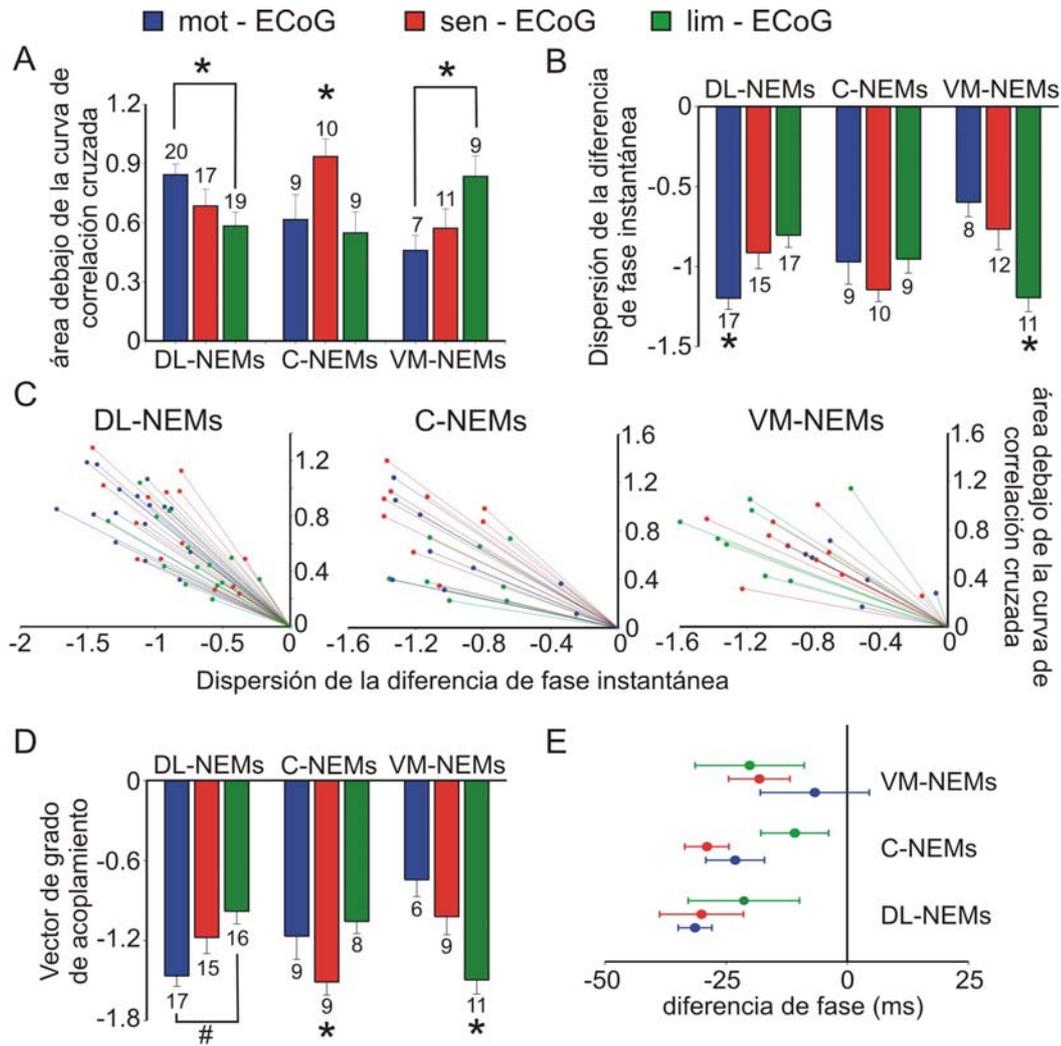


Figura E.7 Cuantificación del grado de asociación entre el Vm de las NEMs y los ECoG de las tres regiones corticales. **A.** El área debajo de la curva de la correlación cruzada identifica asociaciones preferidas entre las NEMs y los ECoG. (* $P < 0.01$, ANOVA para cada grupo de NEMs, donde los ECoG simultáneos son tres medidas repetidas dentro de cada grupo. El análisis post-hoc se hizo con un procedimiento de comparaciones múltiples de todos los pares por el método de Holm-Sidak). Los números sobre las barras señalan el n utilizado en cada caso. **B.** La dispersión de la DFI entre los componentes lentos de las señales refleja el grado de acoplamiento de las señales. Se utilizó para cada par Vm NEM-ECOG el valor medio de la dispersión de la DFI en cada ciclo de onda lenta aislados como en la Figura E.6. El análisis estadístico fue similar a la parte A (* $P < 0.001$) y los números debajo de las barras representan en n de cada caso. **C.** Gráfico que relaciona las variables estudiadas en las partes A y B para cada par Vm NEM-ECOG registrado. Cada punto representa el extremo de un vector que se inicia en el origen de coordenadas. Así, la magnitud de cada vector es una medida del grado de acoplamiento entre las señales. Nótese la gran extensión de los vectores azules (mot-ECOG) en el gráfico de las DL-NEMs, de los rojos (sen-ECOG) en el de las C-NEMs y de los verdes (lim-ECOG) en el de las VM-NEMs. **D.** Datos poblacionales de la extensión del vector de grado acoplamiento obtenido en la parte C. * $P < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas con el tratamiento post-hoc utilizado en la partes A y B. # $P = 0.05$, Prueba no paramétrica de Friedman, seguida de un procedimiento de comparaciones múltiples mediante una prueba de Tukey. **E.** Relación de fase (en ms) entre el Vm de las NEMs de los distintos territorios estriales y los ECoG de las cortezas motora, sensorial y pre-límbica.

Los eUPp estriatales comienzan y terminan de manera sincrónica con transiciones entre estados sincronizados y desincronizados que ocurren simultáneamente en toda la corteza cerebral

Las modulaciones del Vm de las NEMs son gobernadas por el patrón global de activación de la corteza cerebral. Alterna de manera rítmica entre eDOWN y eUP cuando el ECoG luce un ritmo oscilatorio de ondas lentas, y exhibe eUPp cuando se desincroniza la actividad cortical. Los eUPp de NEMs de un determinado territorio estriatal deberían estar más estrechamente ligados a episodios de desincronización de la actividad de la región cortical que le provee la mayor densidad de aferencias. Para establecer esta asociación, se calculó el tiempo de inicio y fin de los eUPp espontáneos en DL-NEMs y el inicio y fin de los eventos de desincronización correspondientes en los tres ECoG (no se obtuvieron suficientes eUPp espontáneos en NEMs de los otros territorios como para hacer una cuantificación, pero se pueden ver algunos ejemplos en la Figura E.8D-E). Para determinar el tiempo de las transiciones se realizó una estimación similar a la utilizada para determinar el fin de las desincronizaciones inducidas por estimulación de la RM en el primer capítulo (Figura D.7). Brevemente, cuando las señales están oscilando sincrónicamente, la varianza calculada en una ventana de 2 segundos de señal es alta, mientras que durante las desincronizaciones es baja. Así, se ajustó una función sigmoidea a la evolución temporal de la varianza en episodios que incluyen las transiciones hacia y desde eUPp (Figura E.8B). Se consideró el centro de la función de ajuste como el tiempo de la transición. Se comparó la diferencia de ese tiempo entre el Vm de las NEMs y cada uno de los ECoG (Figura E.8C). Mediante este análisis no se observaron diferencias significativas para el retraso de tiempo entre los tres pares, ni para el fin ni para el inicio de los eUPp de las DL-NEMs. Algo similar se pudo observar cualitativamente para los eUPp de las VM-NEMs y de las C-NEMs. Esto es fácilmente explicable observando las señales de los tres ECoG registrados simultáneamente, donde se puede apreciar que los episodios de desincronización comienzan y terminan concomitantemente en las tres regiones. De manera general, es muy poco frecuente observar que la actividad espontánea de los distintos ECoG se

desacople, al menos en las bandas frecuenciales más lentas, por lo que sería esperable que los eUPp se presenten al mismo tiempo en NEMs de territorios estriatales distintos.

El desacople de fase de ensambles corticales inducido por estimulación cortical se ve degradado en el territorio estriatal

La actividad persistente de las NEMs, ya sea en forma de eUP o de eUPp, es dirigida por una actividad similar que se origina en la corteza cerebral. El apagado transitorio de la actividad persistente cortical, inducido por una estimulación eléctrica local, es asimilado por las NEMs como una transición al eDOWN que perdura hasta que se “reencienden” los ensambles de neuronas corticales. Este apagado conjunto del sistema córtico–estriatal ocasiona una perturbación de fase de la actividad oscilatoria que venían desarrollando ambas estructuras. Se ha postulado que este tipo de modulaciones rápidas de actividad rítmica podrían servir para optimizar la comunicación entre regiones del cerebro (*Makeig y col, 2002; Zugaro y col, 2005; Buzsaki y Draguhn, 2004*). Presumimos que si se lograra apagar independientemente la actividad persistente de una región cortical, se podría discriminar una asociación específica entre esa corteza y las NEMs del territorio estriatal correspondiente. Con este objetivo, se aplicaron pulsos eléctricos simples (de entre 500 – 700 μ A, a una frecuencia de 0.5 Hz) en la corteza motora (mot–Cx), en la corteza sensorial (sen–Cx) o en la corteza límbica (lim–Cx) y se determinó la capacidad de los mismos para recomponer la fase de la oscilación del Vm de las NEMs y de los ECoG.

Para cada sitio de estimulación, se estudió su habilidad para apagar la actividad de todas las regiones córtico-estriatales estimando el grado de recomposición de fase inducido sobre la oscilación espontánea de las señales. Para ello se alinearon los sucesivos eventos al momento en que acaece el estímulo (Figura E.9) y, tal como se hizo en la segunda parte del capítulo 1, se calculó la dispersión circular de la distribución de las fases instantáneas entre eventos (FIE) de la respuesta tardía (RT, ver segunda parte del capítulo 1). Un estímulo en una corteza determinada inducirá eficientemente una

recomposición de fase en el Vm de las NEMs o en los ECoG cuando el valor de esa dispersión circular sea pequeño.

Inicialmente, se estudió la influencia que ejerce sobre los diferentes ECoG el apagado inducido de la actividad persistente de una zona de la corteza. La aplicación de pulsos eléctricos en la corteza motora recompone eficientemente la fase de la actividad del mot-ECoG, pero tiene un efecto menos marcado sobre el sen-ECoG y el lim-ECoG (Figura E.9D-F). De hecho, la dispersión de la distribución de las FIE del mot-ECoG fue significativamente menor que la de los otras dos ECoG (Figura E.10A). Cuando se estimuló la corteza sensorial, el resultado fue en el mismo sentido. Se observó una recomposición de fase muy evidente en el sen-ECoG pero no en el mot-ECoG o en el lim-ECoG (Figura E.9D-F, Figura E.10A). Finalmente, la estimulación eléctrica de la corteza pre-límbica resultó generalmente en el apagado simultáneo de la actividad persistente de las tres cortezas, con la consiguiente recomposición de fase de la actividad oscilatoria de los ECoG (Figura E.9D-F). Así, la dispersión de la distribución de las FIE fue muy pequeña para todos los ECoG (Figura E.10A).

Posteriormente se estudió la eficacia de la estimulación eléctrica cortical en inducir una recomposición de fase en las NEMs. Los pulsos eléctricos aplicados en la corteza motora produjeron una recomposición de fase de igual magnitud en las NEMs de los tres territorios estriatales, según indican los valores de dispersión de la FIE. (Figura E.9A-C, E.10B). Un resultado similar se observó al estimular la corteza sensorial y la corteza pre-límbica.

Estos resultados sugieren que los estímulos que tienen la habilidad de silenciar transitoriamente la actividad local de una zona de la corteza, diferenciándola así transitoriamente del estado de activación de otra región, no tienen la capacidad de diferenciar de la misma manera a las neuronas distribuidas en diferentes territorios del estriado.

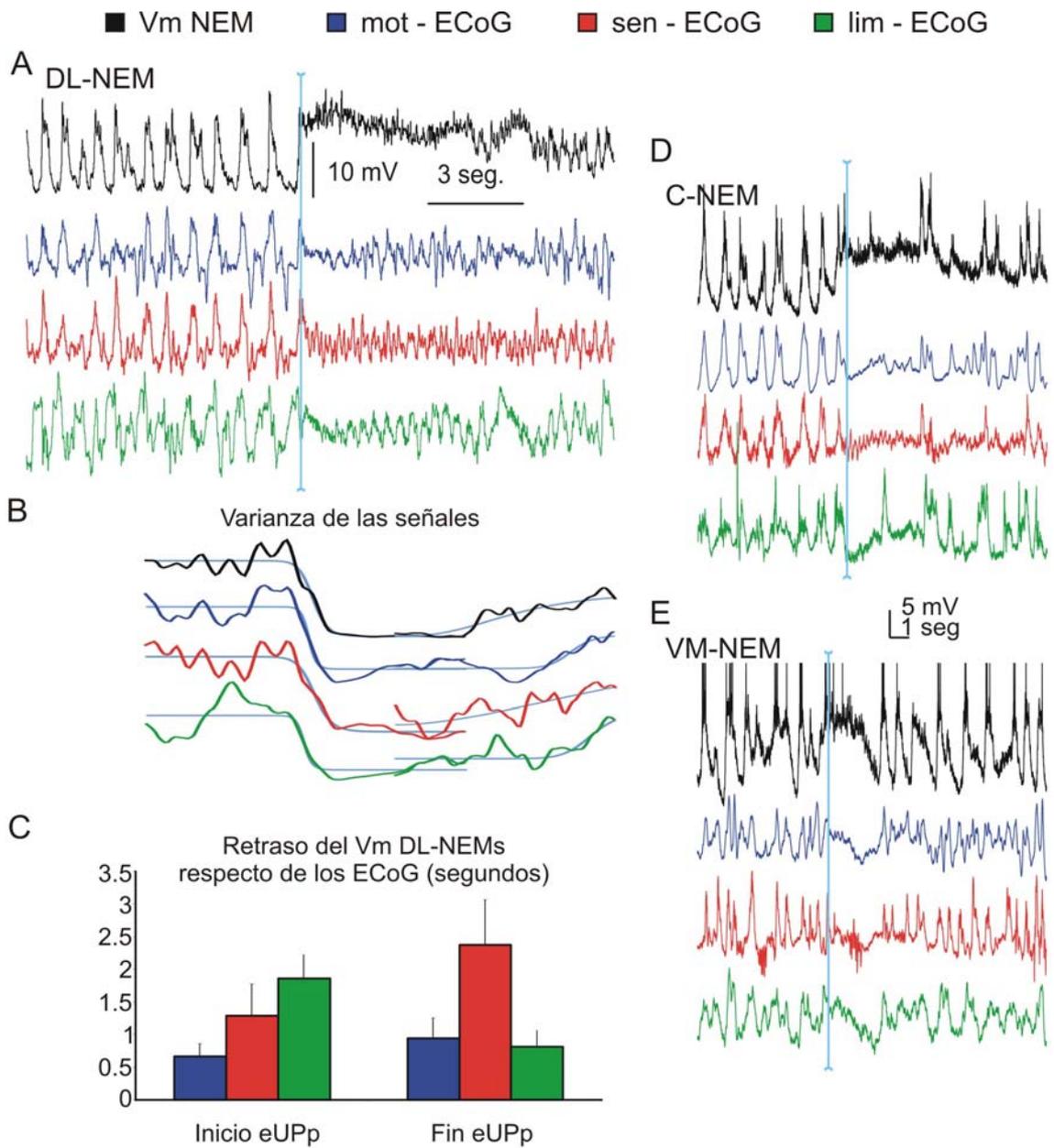


Figura E.8 Relación entre los eUPp estriatales y las transiciones entre estados de activación cortical. Los episodios de desincronización cortical ocurren simultáneamente en los tres ECoG registrados. Las NEMs de los tres territorios estriatales muestran interrupciones de la transición entre estado del Vm y permanecen en eUPp mientras duran las desincronizaciones (A,D,E). La línea celeste indica el inicio de una desincronización cortical. El ajuste de una función sigmoidea a la varianza de las señales en los períodos de transición entre los estados de activación cortical permite asignar un tiempo definido al cambio de patrón de actividad en todas las señales, ejemplificadas para los registros de la parte A (B). La diferencia entre el tiempo de las transiciones en las DL-NEMs y los ECoG fue similar para los tres pares (C).

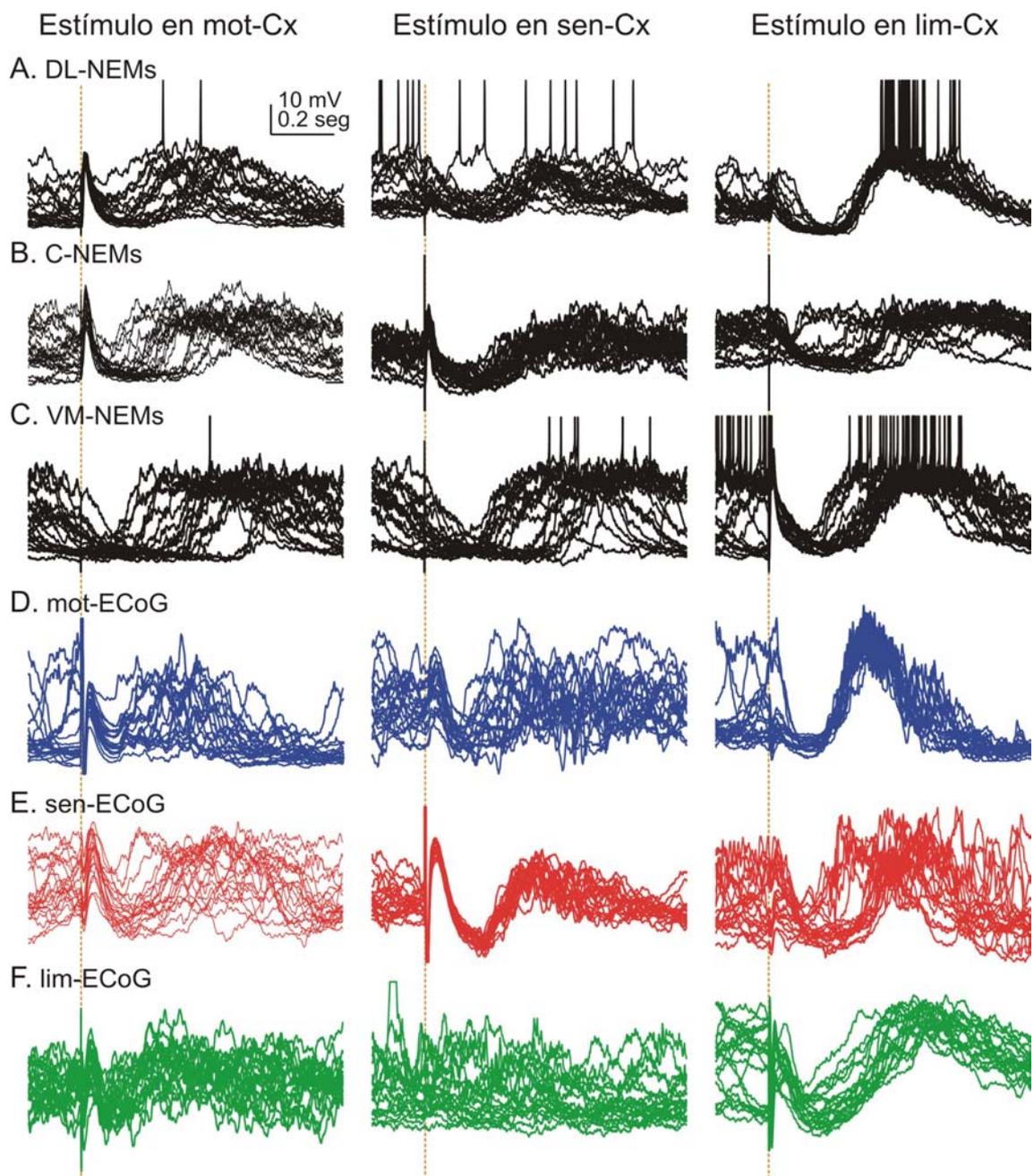


Figura E.9 Perturbaciones de fase de la actividad oscilatoria lenta del Vm de las NEMs y de los ECoG inducidas por estimulación eléctrica de la corteza cerebral. Trazos representativos de las RT de las NEMs de los tres territorios estriatales de los ECoG registrados en las tres regiones corticales a la estimulación eléctrica con un pulso simple en la corteza motora, sensorial o pre-límbica. Los trazos de la misma fila corresponden a registros de la misma neurona (A-C) o del ECoG en el mismo animal (D-F), para permitir la comparación del nivel de recomposición de fase impuesto por la estimulación de las diferentes cortezas. Nótese la capacidad del estímulo aplicado en la lim-cx para recomponer fuertemente la fase de todas las señales. Mientras que al estimular la mot-cx y la sen-cx se observa un efecto diferencial en las regiones registradas.

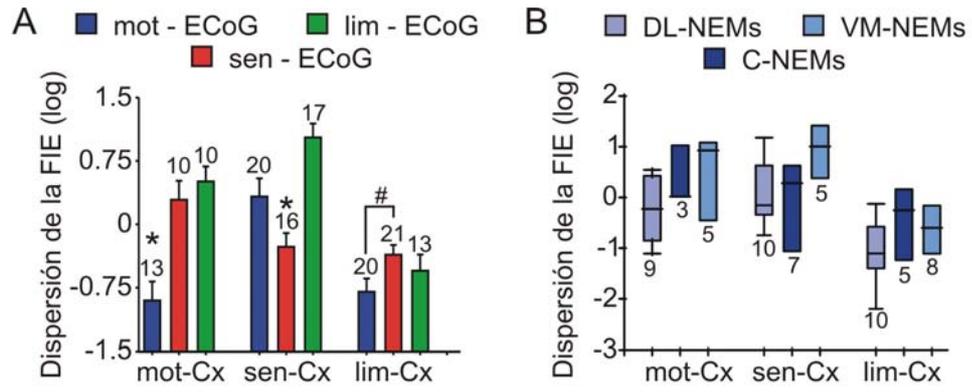


Figura E.10 Cuantificación de la recomposición de fase inducida por estimulación cortical. **A.** Dispersión de la FIE en la RT de los ECoG simultáneamente registrados luego de estimular eléctricamente las diferentes cortezas. * $P < 0.001$, ANOVA de una vía de medidas repetidas para cada sitio de estimulación, seguido de un procedimiento de comparaciones múltiples de todos los pares por el método de Holm-Sidak. # $P < 0.01$, Prueba no paramétrica de Friedman, seguida de un procedimiento de comparaciones múltiples mediante una prueba de Tukey. **B.** Distribución de las dispersiones de la FIE de la RT para las NEMs de cada territorio estriatal luego de estimular cada una de las tres regiones corticales. Las barra horizontal dentro de las cajas representa a la mediana, los límites de las cajas a los percentilos 25 y 75 y las barras de error al rango.

Segregación, convergencia y divergencia de las influencias monosinápticas córtico–estriatales.

La estimulación eléctrica con un pulso simple en una región de la corteza cerebral produce una respuesta excitatoria en las neuronas estriatales que reciben aferencias de esa zona. Esta respuesta, que tienen una latencia fija y típicamente de menos de 10 milisegundos, es considerada monosináptica y mediada por la proyección córtico–estriatal (*Wilson, 1993*).

Se estudió la respuesta excitatoria de DL–NEMs, VM–NEMs y C–NEMs evocada por la estimulación eléctrica de los tres sitios corticales (Figura E.11A). La latencia al pico de los PEPS fue similar en las NEMs de los tres territorios estriatales, independientemente de la corteza que se estimule. Su valor fue consistente con una conexión monosináptica córtico–estriatal (Figura E.11B). A su vez, el tiempo de subida de los PEPS de las diferentes neuronas fue similar (Figura E.11B).

En las DL–NEMs, los PEPS evocados por estimulación de la corteza motora (n =14) tuvieron amplitudes ligera pero no significativamente mayores a los observados luego de estimular la corteza pre–límbica (n =14) o sensorial (n =13) (Figura E.12A). Por su lado, los PEPS de las VM–NEMs resultaron de una amplitud largamente mayor cuando fueron inducidos desde la corteza pre–límbica (n =10) que cuando lo fueron desde la motora (n =10) o sensorial (n =10) (Figura E.12A). Y por último, la estimulación de la corteza sensorial (n =8) produjo PEPS más amplios en las C–NEMs que la estimulación de las cortezas motora (n =7) o pre–límbica (n =8) (Figura E.12A). Otra manera de leer estos resultados es decir que a través de la estimulación eléctrica de la corteza motora se inducen PEPS mayores en NEMs del estriado dorsolateral que en NEMs de otros territorios estriatales (comparar barras del mismo tono de color en el grafico). Una asociación similar se puede hacer entre la corteza pre–límbica con VM–NEMs y la sensorial con C–NEMs.

En principio, estos resultados establecen la existencia de una conexión más estrecha entre regiones corticales específicas con ciertos territorios estriatales, y sugieren una segregación funcional de las proyecciones córtico–estriatales (aunque en menor medida en el estriado dorsolateral). Sin embargo, a pesar de

que muchos de los PEPS evocados fueron de pequeña amplitud, es un hecho muy común observar que una misma NEM responda a la estimulación de más de una región cortical. En efecto, sólo una de las DL–NEMs puestas a prueba respondió de manera exclusiva a la mot–Cx, y la mayoría respondió con PEPS luego de estimular cada una de las tres cortezas (Figura E.12C). Este fenómeno de convergencia sináptica, aunque en menor medida, también se observó en las VM–NEMs y en las C–NEMs. Si bien ninguna de estas últimas exhibió respuesta a las tres cortezas, una proporción no despreciable de ellas respondió a la estimulación de dos regiones corticales distintas (Figura E.12C).

Visto desde el sitio de origen de la proyecciones, se podría hablar de una divergencia córtico–estriatal. Cada una de las regiones corticales estimuladas logró evocar una respuesta en una considerable proporción de NEMs de cada territorio (Figura E.12B). La estimulación de la corteza motora evocó PEPS en 13 de las 14 DL–NEMs estudiadas, en 3 de las 7 VM–NEMs y en 4 de las 10 C–NEMs. Por su lado, el estímulo aplicado en la corteza pre-límbica fue efectivo en inducir respuesta en todas las VM–NEMs estudiadas ($n = 10$), en la mayoría de las DL–NEMs ($n = 11$ de 13) y en poco más de un tercio de las C–NEMs ($n = 3$ de 8). Finalmente, la activación de la corteza sensorial indujo PEPS en las 8 C–NEMs puestas a prueba, en 11 de 14 DL–NEMs y en 5 de 10 VM–NEMs (Figura E.12B).

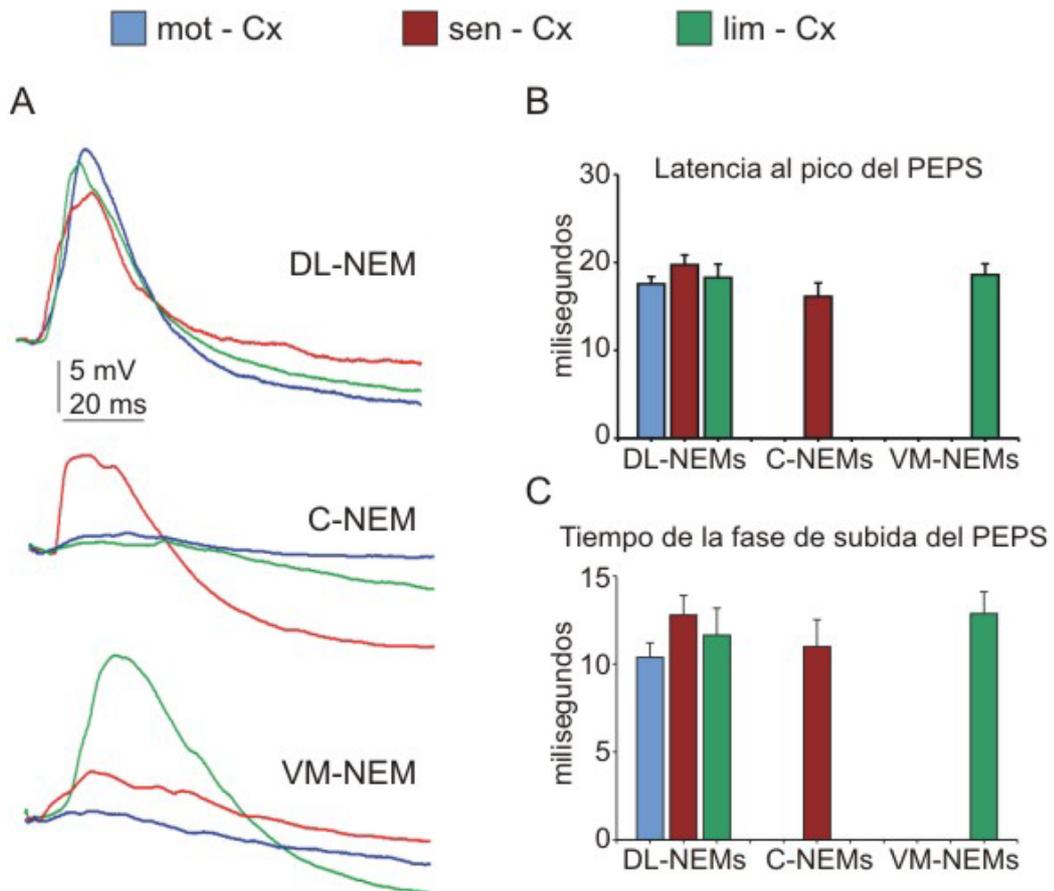


Figura E.11 Transmisión monosináptica entre la corteza cerebral y el estriado. **A.** Trazos representativos de las respuestas evocadas en el Vm de las NEMs de los diferentes territorios estriatales por estimulación eléctrica de las cortezas motora, sensorial y pre-límbica. **B.** La latencia al pico del PEPS fue calculada como la diferencia de tiempo entre el inicio del estímulo y el pico máximo del potencial sináptico evocado. Las C-NEMs respondieron con PEPS en muy pocas ocasiones a la estimulación de la mot-cx y de la lim-cx, por eso no se pudo estimar la latencia poblacional de esos eventos. Lo mismo ocurrió con las VM-NEMs al estimular la mot-cx y la sen-cx. **C.** El tiempo de la fase de subida del PEPS fue medido desde la inflexión con pendiente positiva del Vm que evidencia el inicio del potencial evocado hasta el pico máximo del mismo. Por la misma razón que en el punto anterior, no se pudo calcular este parámetro para todos los sitios de estimulación en las C-NEMs y en las VM-NEMs.

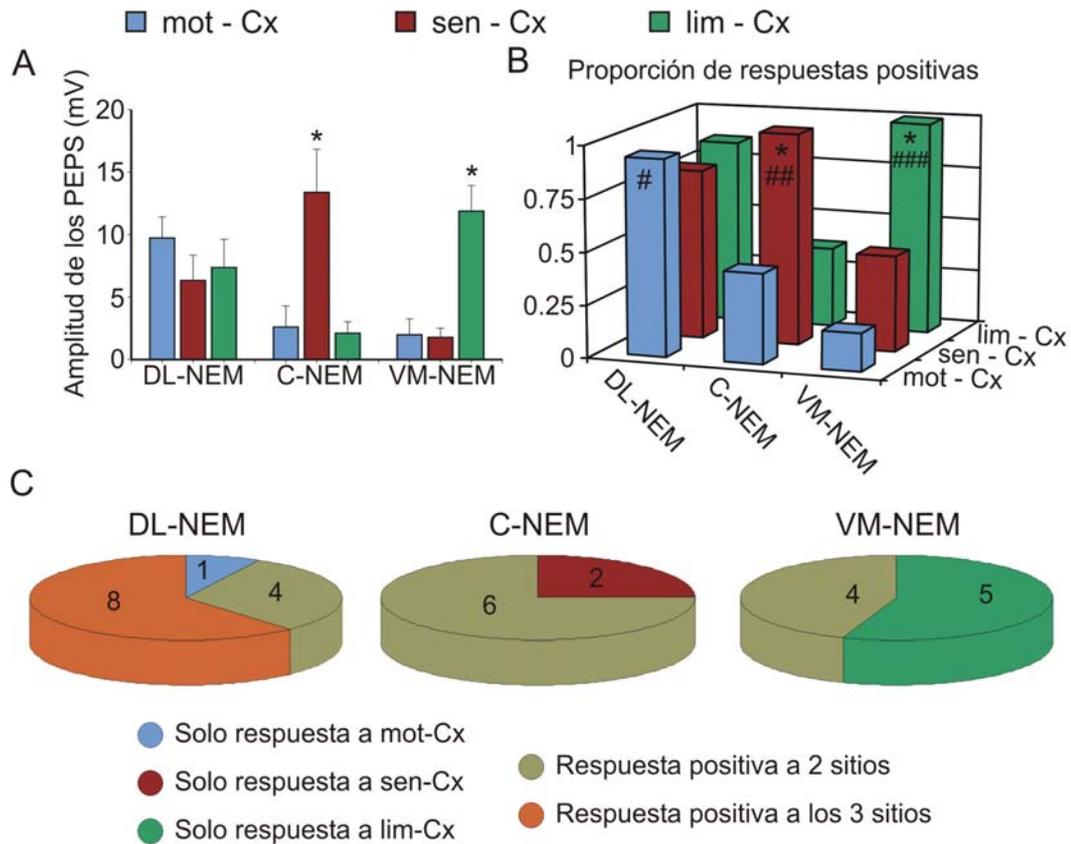


Figura E.12 Cuantificación de las respuestas monosinápticas estriatales evocadas por estimulación eléctrica cortical. **A.** La amplitud de los PEPS fue calculada luego de promediar los potenciales evocados de al menos 15 eventos de estimulación como la diferencia entre el valor del Vm inmediatamente antes de la aplicación del estímulo y el valor del pico máximo del PEPS. * $P < 0.01$, ANOVA de 1 vía para cada grupo de NEMs con medidas repetidas (estímulos es diferentes cortezas), seguida de un procedimiento de comparaciones múltiples de todos los pares por el método de Holm-Sidak. **B.** Las respuestas evocadas fueron consideradas positivas cuando la amplitud del PEPS superó el límite de confianza impuesto por la media más 2 desvíos estándar del ruido de la línea de base de los eventos promediados (1mV). * $P < 0.01$, Prueba exacta de Fisher para sen-cx versus mot-cx y sen-cx versus lim-cx en el caso de las C-NEMs y para lim-cx versus mot-cx y lim-cx versus sen-cx en el caso de las VM-NEMs. Luego, # $P < 0.05$, Prueba exacta de Fisher para estimulaciones en la mot-cx comparando DL-NEMs versus C-NEMs y DL-NEMs versus VM-NEMs. ## $P < 0.05$ con la misma prueba para C-NEMs versus VM-NEMs luego de estimular la sen-cx. Finalmente, ### $P < 0.01$, Prueba exacta de Fisher al estimular la lim-cx y comparar VM-NEMs con C-NEMs. **C.** Esquemas que exhiben la convergencia de respuestas monosinápticas sobre neuronas de distintas regiones estriatales luego de estimular las diferentes regiones corticales.

1.2 Discusión

Las robustas fluctuaciones subumbrales de las NEMs reflejan en alguna medida la organización espacial fina del sistema córtico-estriatal

Las modulaciones del Vm de las NEMs están dirigidas por las aferencias neocorticales. Las transiciones entre eDOWN y eUP están altamente correlacionadas con la actividad rítmica de onda lenta que caracteriza al ECoG en animales anestesiados. Además las NEMs muestran eUPp cuando la corteza cerebral experimenta desincronizaciones. En este trabajo se demuestra por primera vez que las fluctuaciones del Vm de las NEMs reflejan en alguna medida la delicada organización anatómica del sistema córtico-estriatal.

El ritmo oscilatorio lento suele observarse simultáneamente a lo largo de extensas estructuras corticales con un alto grado de correlación entre ellas (*Amzica y Steriade, 1995, 2002; Massimini y col, 2004*). Los registros simultáneos de tres ECoG aquí presentados no fueron la excepción. A pesar de esto, un profundo estudio del grado de acoplamiento entre las señales registradas en los ECoG y el Vm de las NEMs permitió develar que las transiciones entre eDOWN y eUP de neuronas registradas en territorios estriatales particulares están mejor acopladas al ritmo lento presente en el ECoG de la región cortical que más densamente inerva dicho territorio estriatal. Las transiciones entre el estado oscilatorio lento y el estado desincronizado de actividad cortical también ocurren de manera casi simultánea a lo largo de la neocorteza en la rata anestesiada con uretano, y son acompañadas por una despolarización sostenida de las NEMs a lo largo de todo el estriado dorsal.

El Vm de las NEMs del núcleo accumbens exhibe una estrecha relación con la actividad oscilatoria poblacional registrada en el hipocampo (*Goto y O'Donnell, 2001*), y esa asociación es más estrecha que la que poseen con la corteza pre-frontal. Las aferencias hipocámpales sobre el núcleo accumbens son más densas que las originadas en la corteza pre-frontal y es sabido que las NEMs del núcleo accumbens precisan de las entradas hipocámpales para alcanzar los eUP (*O'Donnell y Grace, 1995*). De manera similar, basados en las evidencias aquí presentadas de que las fluctuaciones entre eUP y eDOWN de las NEMs

del estriado dorsal son un reflejo de la actividad de sus aferencias principales, sería esperable que los eventos despolarizados de las NEMs sean gobernados por la ocurrencia de estados activos en la región cortical más afín, sin importar cuál sea la actividad que exhiban otras regiones. Aunque nuestro trabajo provee cierta evidencia funcional que soporta esta hipótesis, es claro que la actividad espontánea de diferentes regiones neocorticales permanece fuertemente correlacionada en los animales anestesiados y que las transiciones entre estados generales de actividad neocortical y estriatal ocurren de manera casi simultánea a lo largo de todo el sistema córtico-estriatal en las condiciones experimentales aquí utilizadas. Es interesante destacar que, recientemente, en base a registros extracelulares de potenciales de acción de conjuntos grandes de neuronas realizados en ratas no anestesiadas, se observó que la actividad poblacional cortical que refleja distintos estados conductuales está ampliamente distribuida y fuertemente correlacionada con una actividad similar registrada en estructuras subcorticales, como el tálamo, el hipocampo y el estriado (*Gervasoni y col, 2003*). De hecho, las transiciones entre esos estados generales de activación cerebral relacionados con el ciclo sueño-vigilia y comportamientos simples como el acicalamiento, ocurrieron sincrónicamente en todo el cerebro anterior (*Gervasoni y col, 2003*). Estos hechos sugieren que las transiciones entre estados sincrónicos y desincronizados de actividad cerebral ocurren de maneras comparables en ambas preparaciones.

En busca de la manifestación subumbral de una segregación espacial en los circuitos córtico-estriatales

La localización en el estriado determina la especificidad con que las neuronas disparan potenciales de acción en respuesta a la contracción de los músculos de las diferentes partes del cuerpo (*De Long y col, 1985; Alexander y DeLong, 1985*). Es sabido que para que las NEMs superen el umbral y disparen potenciales de acción deben estar en un estado despolarizado (eUP o eUPp). Se ha postulado que, en un momento dado, son las NEMs que fueron reclutadas en eUP las que están habilitadas para participar en una tarea. (*O'Donnell y Grace, 1995; Stern y col., 1998*). Alternativamente, una gran población de NEMs podría ser reclutada en eUP y la variabilidad en el disparo de potenciales

de acción podría deberse a modulaciones muy específicas embebidas dentro de una señal cortical mucho más general.

Nuestros resultados indican que la posibilidad de que NEMs de diferentes dominios estriatales presenten eUP de manera desacoplada depende de la capacidad de distintas regiones corticales para presentar distintos estados de activación. Aunque sin duda sería necesario registrar el Vm de NEMs *in vivo* al tiempo que un animal desempeña una tarea conductual para sacar conclusiones definitivas, se podría aventurar que la presencia de eUP o eUPp en una NEM no refiere al reclutamiento específico de esa neurona en la ejecución de una tarea, sino que estaría relacionado con el estado global de actividad tálamo-cortical del animal en ese momento. ¿Cómo se expresa entonces en el Vm de las neuronas estriatales la activación diferencial de cierto dominio funcional? Una alternativa sería que las NEMs puedan seguir perturbaciones locales rápidas de la fase de actividad oscilatoria cortical, optimizando la transferencia de información a través del circuito en que participan (*Buzsaki and Draguhn, 2004, Zugaro y col., 2005*). Los resultados de este trabajo no permiten afirmar que esto sea cierto. Las perturbaciones de fase impuestas sobre la actividad oscilatoria cortical por estimulación eléctrica local permitieron disociar la actividad persistente de las tres regiones corticales estudiadas. Tomando como caso la estimulación de la corteza motora, se produjeron pausas transitorias de actividad más marcadas en esa región que en la corteza sensorial o en la pre-límbica. Pese a esto, la recomposición de fase impuesta por la estimulación eléctrica de la corteza motora fue robusta sobre las NEMs de los tres territorios estriatales estudiados.

Pasando al terreno de la especulación, una NEM podría ser diferencialmente sensible a la actividad altamente correlacionada de alta frecuencia de ciertos ensambles corticales, y eso ser suficiente para lograr su activación específica. Este punto no pudo ser resuelto en este trabajo dado que, si bien fue posible hacerla evidente en la parte 3 del primer capítulo, la actividad correlacionada a alta frecuencia está poco representada en la actividad poblacional de las ratas anestesiadas con uretano utilizadas en estos experimentos.

La convergencia sináptica córtico-estriatal podría degradar la segregación funcional de los circuitos córtico-estriatales

Mucho se ha hablado en este trabajo de las evidencias, mayormente anatómicas (Figuras A.7, E.1), que sostienen o retan la concepción de que existe una estricta segregación del sistema córtico-estriatal en circuitos paralelos (Alexander y Crutcher, 1990; Alexander y col, 1990; Selemon y Goldman-Rakic, 1985; DeLong y col, 1985; Alexander y DeLong, 1985; Kimura y col, 1996; Nambu y col, 2002; McGeorge y Faull, 1989; Wiesendanger y col, 2004; hultx y col, 2005; Bar-Gad y Bergman, 2001; Bar-Gad y col, 2003). Una forma de evaluar funcionalmente este punto es estudiar las respuestas monosinápticas de las NEMs localizadas en distintos terrenos estriatales luego de estimular eléctricamente diferentes regiones corticales. Las NEMs del estriado dorsolateral mostraron un alto grado de convergencia sináptica, respondiendo en su mayoría a la activación de varias de las regiones corticales. En menor medida, también mostraron convergencia las NEMs del estriado caudal y ventromedial. Aunque los mecanismos responsables de la existencia de un fuerte acoplamiento funcional entre circuitos “paralelos” córtico-estriatales son seguramente diversos, incluyendo la fuerte articulación de actividad existente entre distintos canales tálamo-corticales, la convergencia sináptica en el sistema córtico-estriatal puede contribuir de manera no despreciable a producir respuestas generales en esta red. En particular, la existencia de una extensa convergencia córtico-estriatal podría explicar que la estimulación focal de una región cortical produzca cambios robustos de fase en las respuestas tardías de NEMs de distintos territorios estriatales.

Consideraciones metodológicas especiales

En este capítulo se estudió la asociación entre la actividad de neuronas estriatales registradas en tres territorios diferentes y la actividad electrocorticográfica de tres regiones anatómicamente segregadas. Para esto se realizaron los estudios en períodos de actividad con ECoG sincronizado de 90 segundos. Las señales fueron reducidas a una frecuencia de muestreo de 1000 Hz para facilitar el manejo de los datos. Las correlaciones cruzadas se calcularon con ventanas móviles de 6 segundos con corrimientos temporales de 3 segundos y una superposición de $\frac{1}{4}$ de la longitud de la ventana. Se utilizó el área debajo de la curva de

correlación de cada ventana para hacer comparaciones entre grupos de neuronas en lugar del coeficiente de correlación máximo.

El ritmo lento cortical está esparcido en extensas áreas de la corteza y sus propiedades dinámicas hacen que los sucesivos ciclos puedan iniciarse en diferentes regiones (Massimini y col, 2004). Por este motivo, con el fin de detectar sutiles cambios en la diferencia de fase instantánea (DFI) entre las señales, se calculó la DFI y la dispersión de las mismas en cada ciclo de onda lenta aislado. Luego se eligió el valor medio de la dispersión entre los ciclos para comparar el grado de asociación entre las poblaciones de neuronas. Los ciclos se identificaron a partir de los componentes de 0.5–2Hz de las señales intracelulares (extraídos por el método de descomposición wavelet). Se detectaron las transiciones desde eDOWN a eUP como cruces desde la fase negativa a la fase positiva de la onda, precedidos por al menos 200ms de valores negativos y seguidos por al menos 200ms de valores positivos. Luego, utilizando como referencia el momento de esa transición, se alinearon segmentos de 1 segundo (250ms precedentes y 750ms subsiguientes) de cada una de las señales.

Las transiciones entre estados sincronizados y desincronizados fueron evaluadas de la misma forma que en la parte 1 del primer capítulo. El estudio de la recomposición de fase se hizo de manera similar a la parte 2 de ese capítulo.

La latencia al pico del PEPS fue calculada como la diferencia de tiempo entre el inicio del estímulo y el pico máximo del potencial sináptico evocado. El tiempo de la fase de subida del PEPS fue medido desde la inflexión con pendiente positiva del Vm que evidencia el inicio del potencial evocado hasta el pico máximo del mismo. Las respuestas evocadas fueron consideradas positivas cuando la amplitud del PEPS superó el límite de confianza impuesto por la media más 2 desvíos estándar del ruido de la línea de base de los eventos promediados (que resultó menor a 1mV).

Conclusiones Generales

Los trabajos presentados en esta tesis exponen claramente el control que la actividad de grandes ensambles de neuronas corticales ejerce sobre el potencial de membrana de las neuronas estriatales:

- Las NEMs exhiben robustas fluctuaciones subumbrales entre eDOWN y eUP cuando la actividad poblacional cortical presenta una actividad rítmica de baja frecuencia.
- Las transiciones entre eUP y eDOWN de las NEMs se ven interrumpidas cuando la corteza cerebral exhibe períodos de actividad desincronizada. Durante los estados de desincronización cortical las NEMs se mantienen en un eUP persistente.
- Las NEMs precisan de un bombardeo sináptico constante de las aferencias corticales para sostener los estados despolarizados. Cuando esa actividad persistente se ve interrumpida espontáneamente o es apagada por estimulación eléctrica cortical las neuronas estriatales caen irremediamente al estado más polarizado.
- La actividad persistente estriatal está estrechamente alineada en el dominio temporal con la actividad de los ensambles de neuronas corticales. Es más, las NEMs tienen la capacidad de asimilar fielmente las perturbaciones que modifican la fase de la oscilación lenta cortical.
- Se observó cierto grado de asociación entre las modulaciones rápidas que presenta el potencial de membrana de las NEMs en los eUP con eventos de sincronización de alta frecuencia de ensambles de neuronas corticales. La significación funcional de este hallazgo preliminar debe ser explorada.
- La actividad persistente de una NEM está acoplada preferentemente a la actividad espontánea de la región cortical de la que recibe la mayor densidad de aferencias, reflejando en alguna medida la organización espacial del conexionado córtico-estriatal. Sin embargo, en las condiciones de actividad espontánea de nuestros experimentos, los diversos canales córtico-estriatales permanecen fuertemente acoplados funcionalmente tanto cuando domina la actividad oscilatoria lenta como durante los episodios de desincronización cortical.
- La estimulación de una región determinada de la neocorteza provoca respuestas monosinápticas excitatorias y recomposiciones de fase de las transiciones entre eDOWN y eUP en NEMs de distintos territorios estriatales. Esto sugiere que, a través de vías monosinápticas y circuitos multi-sinápticos, existe un fuerte potencial para la integración de información de distintos canales córtico-estriatales a nivel de NEMs individuales.

Referencias

- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forsberg H, Greengard P, Aperia A (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci.* 3(3):226-30.
- Albin RL, Young AB y Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12:366-375.
- Alexander GE y Crutcher MD (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13:266-271.
- Alexander GE y DeLong MR (1985 b). Microstimulation of the primate neostriatum. I. Physiological properties of striatal microexcitable zones. *J Neurophysiol.* 53(6):1401-16
- Alexander GE y DeLong MR (1985). Microstimulation of the primate striatum. II. Somatotopic organization of striatal microexcitable zones and their relation to neuronal response properties. *J. Neurophysiol.* 53:1417-1430.
- Amzica F y Steriade M (1995). Short- and long-range neuronal synchronization of the slow (< 1 Hz) cortical oscillation. *J Neurophysiol.* 73(1):20-38.
- Amzica F y Steriade M (2002). The functional significance of K-complexes. *Sleep Med Rev.* 6(2):139-49.
- Apicella P Scarnati E, Ljungberg T y Schultz W (1992). Neuronal activity in monkey striatum related to the expectation of predictable environmental events. *J. Neurophysiol.* 68:945-960.
- Bar-Gad I, Bergman H, (2001). Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:689-695.
- Bar-Gad I, Morris G, Bergman H (2003). Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia. *Prog Neurobiol.* 71(6):439-73.
- Bargas J, Gallarraga E y Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neonatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.* 75: 146 – 156.
- Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ y Graybiel AM (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature.* 437: 1158-61.
- Baunez C, Amalric M y Robbins TW (2002). Enhanced food-related motivation after bilateral lesions of the subthalamic nucleus. *J. Neurosci.* 22(2):562-568.
- Baunez C, Dias C, Cador M y Amalric M (2005). The subthalamic nucleus exerts opposite control on cocaine and 'natural' rewards. *Nat Neurosci.* 8(4): 484-9.
- Belforte JE, Barceló AC y Pazo JH (2001). Striatal modulation of jaw opening reflex. *Brain Res.* 891:138-147.
- Benes FM (2000). Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 31(2-3):251-69.
- Bennet BD y Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. En *Brain dynamics and the striatal complex*, editado por Miller R y Wickens JR, harwood academics publishers.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196:527-542.
- Bolam JP, Smith Y, Ingham CA, Von Krosigk M, Smith AD (1993). Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Prog Brain Res.* 99:73-88.
- Boraud T, Bezard E, Bioulac B y Gross CE (2002). From single extracellular unit recording in experimental and human Parkinsonism to the development of a functional concept of the role played by the basal ganglia in motor control. *Progress in Neurobiology*, 66: 265-283
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters Ech (2004). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 111(10-11):1303-15.
- Boussaoud D y Kermadi I (1997). The primate striatum: Neuronal activity in relation to spatial attention versus motor preparation. *Eur. J. Neurosci.* 9:2152-2168.
- Bouyer JJ, Park DH, Joh TH y Pickel VM (1984). Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase – containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res.* 302:267-275.
- Brown LL, Schneider JS, y Lidsky, T. I. (1997). Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:157-163.
- Buzsaki G (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 33(3):325-40.

- Buzsaki G y Draguhn A (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*. 304(5679):1926-9.
- Calabresi P, Centonze D y Bernardi G (2000). Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatum. *Trends Neurosci*. 23(Suppl. 10):S57-S63.
- Calabresi P, Mercuri NB, Stefani A y Bernardi G (1990). Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An in vivo analysis. *J. Neurophysiol*. 63:651-662.
- Carlsson A (2002). Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J Neural Transm*. 109(5-6):777-87.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*. 127(3296):471.
- Cepeda C y Levine MS (1998). Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev. Neurosci*. 20:1-18.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(20):9576-80.
- Cheatwood JL, Reep RL, Corwin JV (2003). The associative striatum: cortical and thalamic projections to the dorsocentral striatum in rats. *Brain Res*. 968(1):1-14.
- Courtemanche R, Fujii N y Graybiel AM (2003). Synchronous, focally modulated beta-band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys. *J Neurosci*. 23: 11741-52.
- Cowan RL y Wilson CJ (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J. Neurophysiol*. 71:17-32.
- Crutcher MD y DeLong MR (1984a). Single cell studies of the primate putamen I. Functional organization. *Exp. Brain Res*. 53:233-243
- Crutcher MD y DeLong MR (1984b). Single cell studies of the primate putamen II. Relations to direction of movements and patterns of muscular activity. *Exp. Brain Res*. 53:244-258
- Czubayko U y Plenz D (2002). Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *PNAS*. 99:15764-15769.
- DeLong MR (1973) Putamen: Activity of single units during slow and rapid arm movements. *Science* 179:1240-1242.
- DeLong MR (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 13:281-285.
- DeLong MR, Crutcher MD y Georgopoulos AP (1985). Primate globus pallidus and subthalamic nucleus: functional organization. *J. Neurophysiol*. 53:530-543.
- Donoghue JP y Herkenham M (1986). Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res*. 365(2):397-403.
- Egorov AV, Hamam BN, Franssen E, Hasselmo ME, Alonso AA (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature*. 420(6912):173-8.
- Engel AK, Fries P, Singer W (2001). Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci*. 2(10):704-16.
- Everitt BJ y Wolf ME (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci*. 22(9):3312-20.
- Fell J, Dietl T, Grunwald T, Kurthen M, Klaver P, Trautner P, Schaller C, Elger CE y Fernandez G. (2004). Neural bases of cognitive ERPs: more than phase reset. *J Cogn Neurosci*. 16(9): 1595-604.
- Flaherty AW y Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J. Neurophysiol*. 66:1249-1263.
- Flaherty AW y Graybiel AM (1993). Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *J. Neurosci*. 13:1120-1137.
- Flaherty AW y Graybiel AM (1994). Input - output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J. Neurosci*. 14:599-610.
- Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol*. 88(6):3010-20.

- Freund TF, Powell J y Smith AD (1984). Tyrosine hydroxylase immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, 13:1189-1215.
- Frotscher M, Rinne U, Hassler R y Wagner A (1981). Termination of cortical afferents on identified neurons in the caudate nucleus of the cat. A combined Golgi-EM degeneration study. *Experimental Brain Research*, 41:329-337.
- Gerfen CR (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*. 311: 461-64.
- Gerfen CR (1992). The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.* 15:285-320.
- Gerfen CR y Young WS III (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460:161-167.
- Gerfen CR, Baimbridge KG y Miller JJ (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *PNAS*, 82:8780-84.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ y Sibley DR (1990). D. and D₂ dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1426-1432.
- Gerfen GR (1989). The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science*. 246(4928):385-8.
- Gervasoni D, Lin SC, Ribeiro S, Soares ES, Pantoja J, Nicoletis MA (2004). Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. *J Neurosci.* 24(49):11137-47.
- Goldman-Rakic PS (1982). Cytoarchitectonic heterogeneity of the primates neostriatum: subdivision into islands and matrix cellular compartments. *J Comp. Neurol.* 205:398-413.
- Goldman-Rakic PS (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron.* 14(3):477-85.
- Gonon F (1997). Prolonged and Extrasynaptic Excitatory Action of Dopamine Mediated by D₁ Receptors in the Rat Striatum In Vivo. *Journal of Neurosci.* 17: 5972-5978.
- Gonon F, Burie JB, Jaber M, Benoit-Marand M, Dumartin B, Bloch B. (2000). Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in the rat striatum and in mice lacking the dopamine transporter. *Prog Brain Res.* 125: 291-302
- Goto Y y O'Donnell P (2001a). Synchronous activity in the hippocampus and nucleus accumbens in vivo. *J. Neurosci.* 21:RC131.
- Goto Y y O'Donnell P (2001b). Network synchrony in the nucleus accumbens in vivo. *J. Neurosci.* 21:4498-4504.
- Grace AA (2000). Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 31(2-3):330-41.
- Gray CM (1999). The temporal correlation hypothesis of visual feature integration: still alive and well. *Neuron.* 24(1):31-47, 111-25.
- Gray CM, Konig P, Engel AK, Singer W (1989). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature.* 338(6213):334-7.
- Graybiel AM (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem.* 70:119-136.
- Graybiel AM y Chesselet MF (1984). Compartmental distribution of striatal cell bodies expressing (Met) enkephalin-like immunoreactivity. *PNAS*, 81:7980-84.
- Graybiel AM y Ragsdale CW (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining. *PNAS.* 75:5723-5726.
- Graybiel AM y Ragsdale CW (1979). Fiber connections of the basal ganglia. *Prog Brain Res.* 51:237-83.
- Groenewegen HJ, Vermeulen-Van der Zee E, te Kortschot A, Witter MP (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience.* 23(1):103-20.
- Gurney K, Prescott TJ y Redgrave P (2001). A computational model of action selection in the basal ganglia. I. A new functional anatomy. *Biol. Cybern.* 84:401-410.
- Haber SN (2003). The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat.* 26(4):317-30.

- Haber SN, Funge JL y McFarland NR (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.* 20:2369–2382.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A y Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J. Neurosci.* 17:3334–3342.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J. Neurosci.* 2000; 20:8987-8995
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995). Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J. Neurosci.* 15(7 Pt 2):5222-37.
- Hikosaka O, Sakamoto M y Usui S (1989). Functional properties of monkey caudate neurons. III..Activities related to expectation of target and reward. *J. Neurophysiol.* 61:814-831.
- Hikosaka O, Takikawa Y y Kawagoe R (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol. Rev.* 80:953–978.
- Hoffer ZS y Alloway KD (2001). Organization of corticostriatal projections from the vibrissal representations in the primary motor and somatosensory cortical areas of rodents. *J. Comp. Neurol.* 439(1):87-103.
- Hollerman JR, Tremblay L y Schultz W (1998). Influence of reward expectation on behavior-related neuronal activity in primate striatum. *J. Neurophysiol.* 80:947–963.
- Hoover JP y Strick PL (1993). Multiple output channels in the basal ganglia. *Science.* 259(5096):819-21.
- Hornykiewicz O (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18(2):925-64.
- Hull CD, Bernardi G y Buchwald NA (1970). Intracellular responses of caudate neurons to brain stem stimulation. *Brain Research* 22:163-179.
- Humphrey DR y Schmidt EM (1990). Extracellular single – unit recording methods. From *Neuromethods*, 15: *Neurophysiological Techniques: applications to neural systems*. Editado por Boulton AA, Baker GB y Vanderwolf. The Human Press Inc, Clifton, NJ.
- Inase M., Li B-M y Tanji J (1997). Dopaminergic modulation of neuronal activity in the monkey putamen through D1 and D2 receptors during a delayed Go/NoGo task. *Exp. Brain Res.* 117, 207–218.
- Inubushi S, Kobayashi T, Oshima T y Torii S (1978). Intracellular recordings from the motor cortex during EEG arousal in unanaesthetized brain preparations of the cat. *Jpn J Physiol.* 28(5): 669-88.
- Izzo PN y Bolam JP (1988) Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 269 215-234.
- Jaeger D, Gilman S, Aldridge JW (1995). Neuronal activity in the striatum and pallidum of primates related to the execution of externally cued reaching movements. *Brain Res.* 694(1-2):111-27.
- Jaeger D, Gilman S, Aldridge JW, (1995). Neuronal activity in the striatum and pallidum of primates related to the execution of externally cued reaching movements. *Brain Res.* 694:111–127.
- Jaeger D, Kita H y Wilson CJ (1994). Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 72:2555–2558.
- Joel D y Weiner I (1994). The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience.* 63:363–379.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM (1999). Building neural representations of habits. *Science.* 286:1745-1749.
- Kawaguchi Y (1992). Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *J. Neurophysiol.* 67:1669-1682.
- Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13:4908 –4923.
- Kawaguchi Y (1997). Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J. Neurophysiol.* 78(3):1743-7.

- Kawaguchi Y, Wilson CJ y Emson PC (1989). Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J. Neurophysiol.* 62:1052-1068.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ y Emson PC (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10: 3421-3438.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18:527–535.
- Kimura M, Kato M, Shimazaki H, Watanabe K, Matsumoto N (1996). Neural information transferred from the putamen to the globus pallidus during learned movement in the monkey. *J Neurophysiol.* 76(6):3771-86.
- Kincaid AE, Zheng T, Wilson CJ (1998). Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J Neurosci* 18:4722–4731
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science.* 273(5280):1399-402.
- Kolomiets BP, Deniau JM, Mailly P, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (2001). Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. *J Neurosci.* 21(15):5764-72.
- Koob GF y Nestler EJ (1997). The neurobiology of drug addiction. *J.Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 9:482–497.
- Koos T y Tepper JM (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 2:467–472.
- Koos T, Tepper JM y Wilson CJ (2004). Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast spiking neurons in the striatum. *J. Neurosci.* 24:7916-7922.
- Künzle H (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res.* 88:195–209.
- Künzle H (1977). Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Exp. Brain Res.* 30:481– 492.
- Lauwereyns J, Takikawa Y, Kawagoe R, Kobayashi S, Koizumi M, Coe B, Sakagami M, Hikosaka O (2002). Feature-based anticipation of cues that predict reward in monkey caudate nucleus. *Neuron.* 33(3):463-73.
- Lauwereyns J, Watanabe K, Coe B, Hikosaka O (2002). A neural correlate of response bias in monkey caudate nucleus. *Nature.* 418(6896):413-7.
- Le Moine C y Bloch B (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol.* 355 (3):418-26.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(10):4205-9.
- Levesque M y Parent A (2005). The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(33): 11888-93
- Lewis BL y O'Donnell P (2000). Ventral tegmental area afferents to the prefrontal cortex maintain membrane potential “up” states in pyramidal neurons via D(1) dopamine receptors. *Cereb Cortex* 10:1168–1175.
- Llinás RR (2001). *I of the vortex. From neurons to self.* A Bradford book. The MIT press. Cambridge, Massachusetts. London, England.
- Llinás RR y Paré D (1991). Of dreaming and wakefulness. *Neuroscience.* 44(3):521-35.
- Llinas RR y Ribary U (1998). Temporal conjunction in thalamocortical transactions. *Adv Neurol.* 77:95-102.
- Loewenstein Y, Mahon S, Chadderton P, Kitamura K, Sompolinsky H, Yarom Y, Hausser M (2005). Bistability of cerebellar Purkinje cells modulated by sensory stimulation. *Nat Neurosci.* 8(2):202-11.
- Mahon S, Delord B, Deniau J. M y Charpier S (2000). Intrinsic properties of rat striatal output neurones and time-dependent facilitation of cortical inputs in vivo. *J. Physiol.* 527:345–354.

- Mahon S, Deniau JM y Charpier S (2001). Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: An in vivo study under different anesthetics. *Cereb. Cortex*. 11:360–373.
- Mahon S, Deniau JM y Charpier S (2004). Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci*. 27(8): 460-7.
- Major G y Tank D (2004). Persistent neural activity: prevalence and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 14(6):675-84.
- Makeig S, Westerfield M, Jung TP, Enghoff S, Townsend J, Courchesne E y Sejnowski TJ (2002). Dynamic brain sources of visual evoked responses. *Science*. 295(5555): 690-4..
- Massimini M, Huber R, Ferrarelli F, Hill S, Tononi (2004).. The sleep slow oscillation as a traveling wave. *J Neurosci*. 24(31):6862-70.
- McCormick DA (2005). Neuronal networks: flip-flops in the brain. *Curr Biol*. 15(8):R294-6.
- McGeorge AJ y Faull RLM (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*. 29:503-537.
- McGeorge AJ, Faull RL (1987). The organization and collateralization of corticostriate neurones in the motor and sensory cortex of the rat brain. *Brain Res*. 423(1-2):318-24.
- Mink JW (1996). The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*. 50(4):381-425.
- Moruzzi G y Magoun HW (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 1:455–473.
- Nambu A, Kaneda K, Tokuno H, Takada M (2002). Organization of corticostriatal motor inputs in monkey putamen. *J Neurophysiol*. 88(4):1830-42.
- Nicola SM, Surmeier J y Malenka RC (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual Review of Neuroscience* 23:185-215.
- Nicola SM, Surmeier J, y Malenka RC (2002). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*. 23:185–215.
- Niedermeyer E, Sherman DL, Geocadin RJ, Hansen HC y Hanley DF (1999). The burst-suppression electroencephalogram. *Clinical Electroencephalography*, 30:99-105.
- Nieoullon A (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog. in Neurobiol*. 67:53-83.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995). Potassium currents responsible for in-ward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15:4449 –4463.
- Nisenbaum ES, Xu ZC, Wilson CJ (1994). Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J Neurophysiol*. 71(3):1174-89.
- Núñez A (1996). Unit activity of rat basal forebrain neurons: relationship to cortical activity. *Neuroscience* 72: 757-766.
- O'Donnell P y Grace AA (1995). Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J. Neurosci*. 15:3622-3639.
- O'Donnell P y Grace AA (1998). Dysfunctions in multiple interrelated systems as the neurobiological bases of schizophrenic symptom clusters. *Schizophr Bull*. 24(2):267-83.
- Oakman SA, Faris PL, Cozzari C y Hartman BK (1995). Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 15:5859-5869.
- Oakman SA, Faris PL, Cozzari C y Hartman BK (1999). Characterization of the extent of pontomesencephalic cholinergic neurons projections to the thalamus: comparison with projections to midbrain dopaminergic groups. *Neuroscience*, 94:529-547.
- Owen AM (2004). Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist*. 10(6):525-37.
- Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernandez-Lopez S, Tapia D, y Galarraga E (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(C)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp. Brain Res*. 110:205–211
- Packard MG y Cahill L (2001). Affective modulation of multiple memory systems. *Curr Opin Neurobiol*. 11(6):752-6.
- Packard MG y Knowlton BJ (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*. 25:563-93.

- Park MR, Lighthall JW y Kltai ST (1980). Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194, 359-369.
- Pedley TA y Traub RD (1990). *Physiological Basis of the EEG. Current Practice of Clinical Electroencephalography*, Second Edition, edited by DD Daly and TA Pedley, Raven Press, Ltd., New York 1990.
- Percheron G, Yehrik J y Francois C (1984). A Golgi analysis of the primate globus pallidus. III. Spatial organization of the striato-pallidal complex. *J. Comp. Neurol.* 227:214-227.
- Phillips PEM, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM y Carelli RM (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422:614-618.
- Plenz D (2003). When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436–443.
- Pulvermuller F, Birbaumer N, Lutzenberger W y Mohr B (1997). High-frequency brain activity: Its possible role in attention, perception and language processing. *Prog. Neurobiol.* 52:427–445.
- Raz A, Feingold A, Zelanskaya V, Vaadia E y Bergman H (1996). Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *J Neurophysiol.* 76: 2083-8.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience.* 89(4):1009-23.
- Ribak CE, Vaughn JE y Roberts E (1979). The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry, *J. Crwnp. Neuro/.* 187:261-283.
- Romanelli P, Esposito V, Schaal DW, Heit G (2005). Somatotopy in the basal ganglia: experimental and clinical evidence for segregated sensorimotor channels. *Brain Res Brain Res Rev.* 48(1):112-28.
- Romo R, Brody CD, Hernandez A, Lemus L (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature.* 399(6735):470-3.
- Romo R, Scarnati E y Schultz W (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements II. Movement-related activity in the anterior striatum. *Exp. Brain Res.* 91:385395.
- Sanchez-Vives MV y McCormick DA (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci.* 3(10):1027-34.
- Schultz W y Romo R (1988). Neuronal activity in the monkey striatum during the initiation of movements. *Exp Brain Res.* 71(2):431-6.
- Schultz W y Romo R (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Exp Brain Res.* 91(3): 363-84.
- Schultz W, Dayan P y Read Montague P (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275:1593-1599.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR (2003). Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci.* 26(6):321-8.
- Selemon LD y Goldman-Rakic PS (1985). Longitudinal topography and interdigitation of cortico-striatal projections in the rhesus monkey. *J. Neurosci,* 5:776–794.
- Shah AS, Bressler SL, Knuth KH, Ding M, Mehta AD, Ulbert I y Schroeder CE (2004). Neural dynamics and the fundamental mechanisms of event-related brain potentials. *Cereb Cortex.* 14(5): 476-83.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA, (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature.*423(6937):288-93.
- Singer W y Gray CM (1995). Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 18:555-86.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E y Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience,* 86:353–387.
- Somogyi P, Bolam JP y Smith AD (1981). Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi peroxidase transport - degeneration procedure. *Journal of Comparative Neurology,* 195:567-584.
- Steriade M (2000). Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience.* 101(2):243-276.

- Steriade M, Amzica F, Nunez A (1993). Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. *J Neurophysiol.* 70(4):1385-400
- Steriade M, Gloor P, Llinas RR, Lopes de Silva FH, Mesulam MM (1990). Report of IFCN Committee on Basic Mechanisms. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 76(6):481-508.
- Steriade M, Nunez A, Amzica F (1993). A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci.* 13(8):3252-65.
- Steriade M, Timofeev I y Grenier F (2001). Natural waking and sleep states: A view from inside neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 85:1969–1985.
- Stern EA, Jaeger D y Wilson CJ (1998). Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature,* 394:475–478.
- Stern EA, Kincaid AE y Wilson CJ (1997). Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J. Neurophysiol,* 77:1697–1715.
- Surmeier DJ,argas J, Hemmings HC Jr., Nairn AC y Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385–397.
- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST (1992). Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(21):10178-82.
- Surmeier DJ, Foehring R, Stefani A y Kitai ST (1991). Developmental expression of a slowly-inactivating voltage dependent potassium current in rat neostriatal neurons. *Neurosci. Lett,* 112: 41-46.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* 16(20):6579-91.
- Taverna S, Van Dongen YC, Groenewegen HJ, Pennartz CM (2004) Direct physiological evidence for synaptic connectivity between medium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ. *J. Neurophysiol,* 91:1111–1121.
- Tepper JM y Bolam JP (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology,* 14:685–692.
- Tepper JM, Koos T y Wilson CJ (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends in Neurosci,* 27:662-669.
- Timofeev I, Grenier F, Bazhenov M, Sejnowski TJ, Steriade M (2000). Origin of slow cortical oscillations in deafferented cortical slabs. *Cereb Cortex.* 10(12):1185-99.
- Tseng KY y O'Donnell P (2005). Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1-NMDA co-activation. *Cereb Cortex.* 15(1):49-57.
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA y Murer MG (2001). Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J. Neurosci,* 21:6430–6439.
- Tseng KY, Riquelme LA y Murer MG (2004). Impact of D1-class dopamine receptor on striatal processing of cortical input in experimental parkinsonism in vivo. *Neuroscience.* 123(2): 293-8.
- Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A y Arieli A (1999). Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science.* 286:1943-1946.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A y Wickens JR (2002). Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat neostriatum. *J. Neurophysiol,* 88:1263–1269.
- Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci.* 2(4):229-39.
- Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, y Martinerie J (2001). The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:229–239.
- Walker RH, Arbuthnott GW, Baughman RW y Graybiel AM (1993). Dendritic domains of medium spiny neurons in the primate striatum: relationships to striosomal borders. *J. Comp. Neurol,* 337:614-628.
- Wang XJ (2001). Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci.* 24(8):455-63.
- Waszczak BL, Martin LP, Greif GJ, Freedman JE (1998). Expression of a dopamine D2 receptor-activated K⁺ channel on identified striatopallidal and striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(19):11440-4.

- Watanabe K, Lauwereyns J y Hikosaka O (2003). Neural correlates of rewarded and unrewarded eye movements in the primate caudate nucleus. *J. Neurosci*, 23(31):10052–10057.
- West AR y Grace AA (2002). Opposite Influences of Endogenous Dopamine D1 and D2 Receptor Activation on Activity States and Electrophysiological Properties of Striatal Neurons: Studies Combining In Vivo Intracellular Recordings and Reverse Microdialysis. *Journal of Neurosci*. 22: 294–304
- Wickens JR y Oorschot DE (2000). Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: a possible connection. En *Brain dynamics and the striatal complex*, editado por Miller R y Wickens JR, Harwood academic publishers.
- Wiesendanger E, Clarke S, Kraftsik R, Tardif E (2004). Topography of cortico-striatal connections in man: anatomical evidence for parallel organization. *Eur J Neurosci*. 20(7):1915-22.
- Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Progress in Brain Research*, 99: 277-297.
- Wilson CJ (2000). Striatal circuitry: Categorically selective, or selectively categorical? En *Brain dynamics and the striatal complex*, editado por Miller R y Wickens JR, Harwood academic publishers.
- Wilson CJ (2004). The basal ganglia. In: *The synaptic organization of the brain*, Ed 5 (Shepherd GM, ed.), pp 361–413. Oxford: Oxford UP.
- Wilson CJ y Groves PM (1981). Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Research*, 220:67-70.
- Wilson CJ, Chang HT y Kitai ST (1983). Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neurons in the rat. *Exp. Brain Res*. 51:227–235.
- Wilson CJ, Groves PM (1980). Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599 –615.
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397–2410.
- Winterer G y Weinberger DR (2004). Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci*. 27(11):683-90.
- Wise RA (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*. 36(2): 229-40.
- Wright AK, Ramanathan S, Arbuthnott GW (2001). Identification of the source of the bilateral projection system from cortex to somatosensory neostriatum and an exploration of its physiological actions. *Neuroscience*. 103(1):87-96.
- Wu Y, Richard S y Parent A (2000). The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res*. 38(1): 49-62.
- Zugaro MB, Moncoquit L y Buzsaki G (2005). Spike phase presesión persists alter transient intrahippocampal perturbation. *Nat Neurosci*. 8(1): 67-71.