

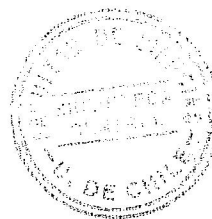
UCH-FC
DOC - BMCN
F952
C.2

Plasticidad e Integración Sináptica en la Red Tálamocortical durante el Sueño Lento

**Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias
por**

Pablo José Fuentealba Durand



Diciembre 2004

Director de Tesis Dr. Mircea Steriade
Profesor Patrocinante Dr. Osvaldo Alvarez

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Pablo José Fuentealba Durand

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de Enero de 2004.

Director de Tesis:

Dr. Mircea Steriade

Profesor Patrocinante

Dr. Osvaldo Alvarez

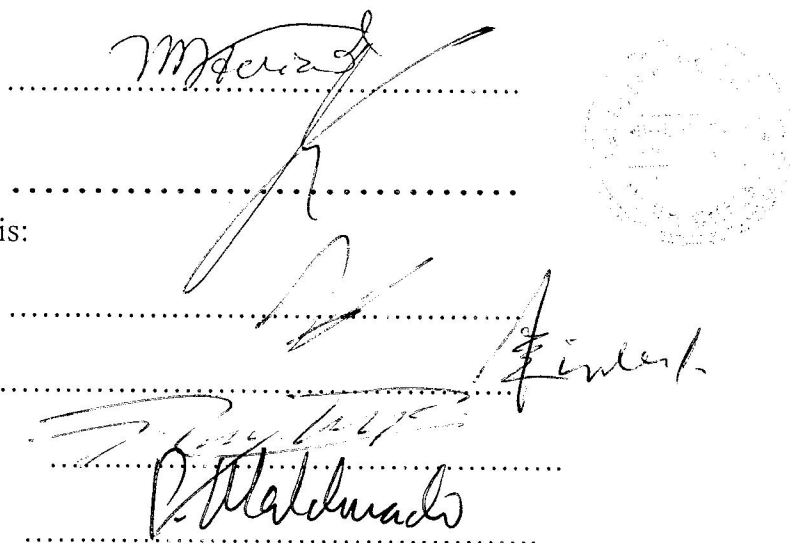
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

Dr. Ennio Vivaldi

Dr. Manuel Roncagliolo

Dr. Pedro Maldonado



The image shows a series of handwritten signatures and a circular stamp. The signatures are written over dotted lines corresponding to the names listed on the left. The circular stamp is located on the right side of the page, partially overlapping the signature lines. The stamp contains text that is difficult to read but appears to be an official seal of the Faculty of Sciences, University of Chile.

Agradecimientos

Como suele ocurrir, el trabajo realizado y aquí presentado no es producto del esfuerzo de una sola persona, sino de un equipo de gente que trabaja en un proyecto, del cual el presente escrito es sólo una parte.

Mis más sinceros agradecimientos a las personas que colaboraron en la realización de este trabajo:

Dr. Sylvain Crochet, trabaja en la influencia de los estados de vigilancia en respuestas sinápticas de neuronas corticales. Colaboró en la mayoría de los experimentos realizados en preparaciones crónicas.

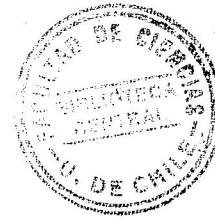
Dr. Youssouf Cissé, trabaja en actividades paroxísticas y epilépticas que se desarrollan en la corteza. Colaboró en los registros de respuestas a la estimulación de corteza contralateral.

Dr. Igor Timofeev, profesor de la Universidad Laval. Estudia la transmisión sináptica en la corteza.

Dr. Mircea Steriade, jefe del laboratorio.

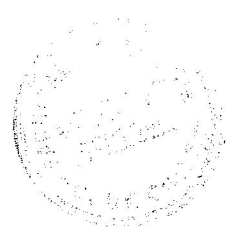
Pierre Giguère, técnico del laboratorio, encargado del mantenimiento y funcionamiento de todos los equipos electrónicos.

Indice de Materias



Agradecimientos	ii
Indice de Materias	iii
Lista de Tablas	v
Lista de Abreviaciones	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Etapas del Sueño	4
Sueño REM y Sueño Lento.....	8
1.2. Oscilaciones características del Sueño Lento	15
Husos.....	16
Delta.....	21
Oscilación Lenta.....	25
1.3. Función Fisiológica del Sueño	29
Sueño y Plasticidad	31
El caso del hipocampo	36
1.4. Mecanismos celulares y moleculares del sueño lento.....	39
Coda	44
1.5. Heurística	45
Hipótesis.....	46
Objetivo general.....	47
Objetivos específicos	47
2. METODOLOGÍA	49
2.1. Modelo de estudio	49
2.2. Preparación aguda	50
2.3. Preparación crónica.....	52
2.4 Registros electrofisiológicos	53
2.5. Paradigmas experimentales	55
Frecuencia	55
Vías aferentes	56
Áreas corticales	57
Integración sináptica	57
2.6. Análisis de datos	58
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Plasticidad Sináptica	63
3.1.1. Sueño Inducido (anestésicos).....	64
La Oscilación lenta.....	64

Vías aferentes	67
Corteza contralateral	68
Corteza ipsilateral.....	88
Tálamo.....	103
Vías heterosinápticas.....	110
3.1.2. Sueño Natural.....	116
Estimulación cortical.....	118
Estimulación talámica.....	123
Sueño Natural.....	128
3.2. Integración sináptica	138
Respuestas a estimulación cortical y talámica	139
Selección de vías independientes	140
Cambios en la resistencia de entrada	145
Pulsos pareados en vías homosinápticas	147
Condicionamiento talámico y control cortical	152
Condicionamiento cortical y control talámico	155
Cambios en la R_{in} durante el protocolo de pulso pareado.....	159
Registros en neuronas tálamo-corticales	165
4. DISCUSIÓN	172
Un parentesis metodológico	172
Sobre el modelo de estudio.....	173
Resultados generales	174
La oscilación lenta cortical.....	179
Los husos talámicos	180
Ausencia de una frecuencia preferencial para la inducción de plasticidad sináptica.....	181
Curso temporal de los cambios plásticos	182
Facilitación de respuestas sinápticas en las vías corticales contralaterales.....	183
Cambios múltiples al estimular vías intracorticales.....	187
Cambios múltiples al estimular vías tálamo-corticales	190
Ausencia de cambios plásticos al estimular vías heterosinápticas.....	190
Similitud en la expresión de plasticidad sináptica en áreas corticales distintas.....	192
El caso del sueño natural.....	193
Interacción e integración sináptica de distintas entradas sobre la corteza	194
Resumen final.....	202
5. BIBLIOGRAFÍA	206



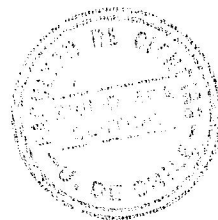
Lista de Tablas

Tabla 1 Plasticidad sináptica en vías intracorticales	71
Tabla 2 Plasticidad sináptica en vías tálamocorticales	91
Tabla 3 Plasticidad sináptica en vías corticales contralaterales	104
Tabla 4 Plasticidad sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento cortical y control talámico.....	112
Tabla 5 Plasticidad sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento talámico y control cortical	112
Tabla 6 Plasticidad sináptica en sueño natural. Vías intracorticales.....	119
Tabla 7 Plasticidad sináptica en sueño natural. Vías tálamocorticales	125
Tabla 8 Plasticidad sináptica en sueño natural. Sueño Natural.....	128
Tabla 9 Integración sináptica en vías homosinápticas. Corteza.....	150
Tabla 10 Integración sináptica en vías homosinápticas. Tálamo	150
Tabla 11 Integración sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento cortical y control talámico.....	155
Tabla 12 Integración sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento talámico y control cortical	156

Lista de Figuras

Figura 1.....	6
Figura 2.....	7
Figura 3.....	9
Figura 4.....	13
Figura 5.....	17
Figura 6.....	19
Figura 7.....	24
Figura 8.....	35
Figura 9.....	41
Figura 10.....	43
Figura 11.....	51
Figura 12.....	66
Figura 13.....	69
Figura 14.....	73
Figura 15.....	75
Figura 16.....	77
Figura 17.....	78
Figura 18.....	80
Figura 19.....	82
Figura 20.....	83
Figura 21.....	85
Figura 22.....	87
Figura 23.....	92
Figura 24.....	94
Figura 25.....	96
Figura 26.....	98
Figura 27.....	99
Figura 28.....	101
Figura 29.....	102
Figura 30.....	108
Figura 31.....	109
Figura 32.....	111
Figura 33.....	114
Figura 34.....	115
Figura 35.....	117
Figura 36.....	122
Figura 37.....	124

Figura 38.....	126
Figura 39.....	130
Figura 40.....	131
Figura 41.....	132
Figura 42.....	133
Figura 43.....	134
Figura 44.....	141
Figura 45.....	143
Figura 46.....	146
Figura 47.....	148
Figura 48.....	151
Figura 49.....	153
Figura 50.....	158
Figura 51.....	160
Figura 52.....	162
Figura 53.....	164
Figura 54.....	166
Figura 55.....	171



AHP, *afterhyperpolarization*

CaMKII, Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II

EEG, electroencefalograma

EMG, electromiograma

EOG, electrooculograma

FPP, *fast prepotential*

FRB, *fast rhythmic bursting* o *chattering*

FS, *fast spiking*

IB, *intrinsically bursting*

I_h , corriente depolarizante activada por hiperpolarización

I_T , corriente de calcio de bajo umbral

I_{CAN} , corriente catiónica no específica activa por Ca^{2+}

LTS, *low-threshold spike*

NMDA, *N*-metil-*D*-aspartato

PEPS, potencial excitatorio postsináptico

PIPS, potencial inhibitorio postsináptico

REM, *rapid eye movement*

RS, *regular spiking*

SPW, *sharp-waves*

RESUMEN

El sistema tálamocortical es responsable de la generación de los diferentes estados de conciencia y vigilancia, debido a la actividad recurrente generada en sus circuitos. Existen tres ritmos oscilatorios principales durante el sueño. Los husos son generados en el tálamo, debido a la actividad del núcleo reticular del tálamo que impone secuencias inhibitorias rítmicas a las células tálamocorticales. Existen además dos tipos de oscilación delta: una generada en el tálamo por corrientes intrínsecas, y otra cortical, debida a actividad de la red. La oscilación lenta de origen cortical es el sello definitorio de la actividad cerebral durante el sueño. Dicha oscilación tiene la virtud de agrupar los otros ritmos, generando un estado de coalescencia de múltiples ritmos.

Se ha propuesto que lejos de ser un epifenómeno, sin significado funcional, las oscilaciones del sueño producen cambios plásticos en las neuronas corticales y actividad resonante en los circuitos corticotálamicos; los cuales son fundamentales en procesos de adquisición y consolidación de memoria. Esta idea fue evaluada experimentalmente en el presente trabajo, y la capacidad de los diferentes ritmos para inducir cambios plásticos estudiada en preparaciones fisiológicas. Los resultados muestran que existe especificidad en cuanto a vías aferentes y frecuencias en la capacidad de evocar cambios sinápticos.

ABSTRACT

The thalamocortical system is responsible for the generation of the different states of vigilance and consciousness, due to the recurrent activity generated within its circuits. There are three major oscillations during sleep. Spindles are generated within the thalamus, due to thalamic reticular neurons that impose rhythmic inhibitory sequences onto thalamocortical neurons. There are two types of delta activity: one thalamic, which is generated by intrinsic currents; and another cortical, due to network interactions. The hallmark of sleep activity is the cortical slow oscillation, which has the virtue of grouping the other types of sleep activities, thus leading to a coalescence of different rhythms that can only be observed in intact-brain animals and humans.

It has been proposed that far from being epiphenomena, with no functional role, sleep oscillations, produce synaptic plasticity in target cortical neurons and resonant activity in corticothalamic loops, fundamental for processes related to memory acquisition and consolidation. This idea was tested in the present study, and the capacity of the sleep rhythms to induce plastic changes in synaptic responses was evaluated in physiological preparations. The results show that only certain pathways and frequencies are able to evoke synaptic changes in reliable way.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos el hombre ha mostrado fascinación por el misterio que entraña el sueño, pero no sólo este como estado fisiológico, sino el mismo como un estado general de la conciencia. Probablemente una de las descripciones más antiguas de tal estado se haya en los Upanishads*, textos sagrados de la India, que datan de hace por lo menos 4000 años.

* Dice la Cuarta Pregunta del Prashna Upanishad:

“Then Sauryayani Gargya asked him,
“Sir, what are those that sleep in a person here? What are those that remain awake?
What is the angel who sees dreams and who enjoys them?
In whom are all these things resolved?”

The seer answered him,
“Gargya, as the rays of the setting sun all become one in a circle of brilliance, and again when it rises, so all the human becomes one in the mind, the highest god. In that condition people do not see, hear, smell, taste, touch, speak, take, give, nor move.
It is said, “They sleep”.

[...]

The mind in sleep experiences its greatness. Whatever it has seen it sees again.
Whatever it has heard it hears again.
Whatever it has felt and thought and known in many regions and various places it experiences these again.
What has been seen and not seen, heard and not heard, experienced and not experienced, both real and unreal, one sees it all, for the mind is all...”

Easwaran E (1987) The Upanishads. Nalgiri Press. Tomales, California.

Desde el punto de vista de la neurociencia, el sueño es un estado fisiológico global e integrado, caracterizado por una reducción significativa de las respuestas a estímulos externos. Consiste además de una postura física característica, generalmente enmarcada en un ambiente especial y se representa como un patrón de actividad cerebral particular en el electroencefalograma (EEG). Su restricción produce un aumento homeostático del mismo (Chase & Roth, 1990; Kryger et al., 1994; Maquet, 2003).

Sin embargo, esta definición operacional está lejos de proveer una respuesta clara a la pregunta por el sentido del sueño (Chase & Roth, 1990). Desde los estudios iniciales sobre el tema (Caton, 1887), mas de cien años han transcurrido sin que hasta hoy sea posible para la neurociencia dar una respuesta definitiva a la pregunta por el sentido fisiológico del sueño (Chase & Roth, 1990; Hobson et al., 2000; Nielsen, 2000; Solms, 2000; Vertes, 2000; Maquet, 2003).

Fue hacia finales del siglo XIX que se demostró la presencia de ritmos eléctricos en el cerebro de animales (Caton, 1887). Sin embargo, fue en la década de los 30 que se registró actividad eléctrica cerebral en humanos, mostrando actividades distintas en la vigilia y en el sueño (Berger, 1930). Así se inició el estudio de la electroencefalografía. En el EEG humano se caracterizó el sueño como un conjunto de oscilaciones de gran amplitud y baja frecuencia (husos y oscilaciones lentas), mientras que la vigilia se definió por ondas de pequeña amplitud y altas frecuencias, y ritmos α (Davis et al., 1937; Harvey et al., 1937; Davis et al., 1938). De este modo se demostró que la idea de

experimental muestra la existencia ciertos grupos neuronales (sobre todo del hipocampo), cuyos patrones de descarga específicos se sabe están involucrados en conductas animales relacionadas con la exploración y reconocimiento del entorno espacial (Buzsaki et al., 1996; Kandel & Buzsaki, 1997; Steriade, 1997).

1.1. Etapas del Sueño

Conceptual y clásicamente ha habido en la historia de la neurociencia dos ideas dominantes con respecto a la fisiología del de sueño. Inicialmente se sostenía que el sueño es un fenómeno esencialmente pasivo, que se debe al cierre de compuertas cerebrales por donde transitan las señales de los órganos sensoriales. Idea también conocida como deaferenciación cerebral. Dicha idea parece remontarse hasta tiempos de Lucrecio, en el siglo I aC (Steriade, 2003b), que fue desarrollada durante el siglo pasado fundamentalmente por Frédéric Bremer, Giuseppe Moruzzi y Nathaniel Kleitman (Steriade, 2003b). En la segunda mitad del siglo XX, surgió la idea alternativa de que el sueño es un evento activo, promovido por mecanismos inhibitorios que se producen en ciertas regiones cerebrales (Steriade, 2003b). Parece ser sin embargo, que estos dos mecanismos propuestos no son opuestos sino complementarios, y que ocurren en etapas sucesivas.

La maquinaria responsable de la generación de ritmos oscilatorios característicos del sueño es el sistema tálamocortical (fig. 1). El signo distintivo de la transición entre la vigilia y el sueño es una serie de cambios particulares en la actividad eléctrica del cerebro, evidenciadas por el EEG. Dichos cambios son la causa, mas que el efecto, de la

característica condición quiescente que caracteriza al sueño. En humanos, son cuatro las etapas de sueño que se han definido en base a criterios fisiológicos y conductuales, y la mayoría de las variables fisiológicas evaluadas varían de acuerdo a la etapa de sueño en que se estudien (fig. 2) (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987). Por ejemplo la electrorritmicidad, las respuestas autonómicas y los umbrales sensoriales para la vigilia varían de forma definida con las etapas de sueño (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987).

Las oscilaciones presentes en el EEG que definen la transición hacia el sueño son principalmente los así llamados husos (*spindles*). Dichos husos están asociados con largos períodos de inhibición en las neuronas tálamocorticales, lo cual tiene como consecuencia un bloqueo de las vías sensoriales que transmiten hacia la corteza. Seguida la aparición de los husos, otros ritmos se manifiestan, primero las oscilaciones delta y finalmente la oscilación lenta que domina el EEG durante el sueño lento. La aparición de esta última, marca el estado de mayor profundidad del sueño (sinónimo de máximos umbrales de estimulación sensorial para inducir un cambio de estado hacia la vigilia) y coincide con una profunda inhibición de las neuronas corticales y talámicas (Steriade, 1997).

En humanos, la definición electrográfica del inicio del sueño es un cambio del EEG en que las ondas alfa, características de los estados relajados en la vigilia, ceden paso a un patrón de frecuencias mixtas de ondas de pequeña amplitud. Dicho estado constituye la etapa I del sueño. A diferencia de los husos, los mecanismos neuronales de la etapa I de sueño no han sido dilucidados por razones obvias (los experimentos en

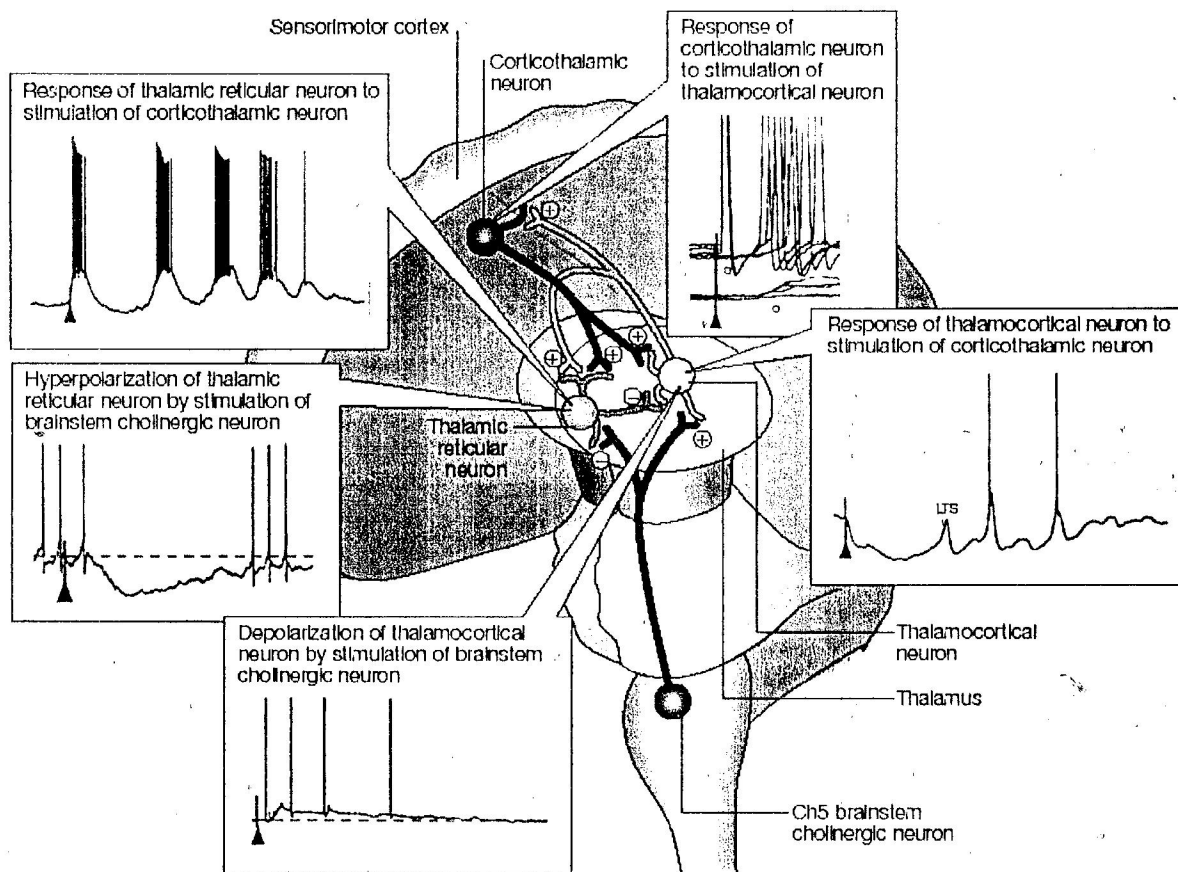


Figura 1. El sistema tálamocortical es encargado de la generación de ritmos oscilatorios durante el sueño lento. Estructuras anatómicas con neuronas representativas, presentadas esquemáticamente, incluyen el núcleo colinérgico pedúnculo-pontino-tegmental del tronco del encéfalo (Ch5), el núcleo reticular del tálamo (que envuelve los otros núcleos talámicos), la combinación de núcleos talámicos específicos (de relevo) y no específicos (difusos) (en su mayoría glutamatérgicos y, por tanto excitatorios), y la corteza (regiones sensoriales específicas que son objeto de proyecciones talámicas, y regiones motoras específicas que retornan proyecciones hacia el tálamo). Neuronas del tálamo reticular envían proyecciones GABAérgicas inhibitorias sobre los núcleos talámicos, mientras que la corteza y el tálamo envían proyecciones glutamatérgicas excitatorias. Interneuronas inhibitorias no se muestran. Los registros intracelulares muestran las respuestas de cada tipo celular a distintos estímulos (Hobson and Pace-Schott, 2002).

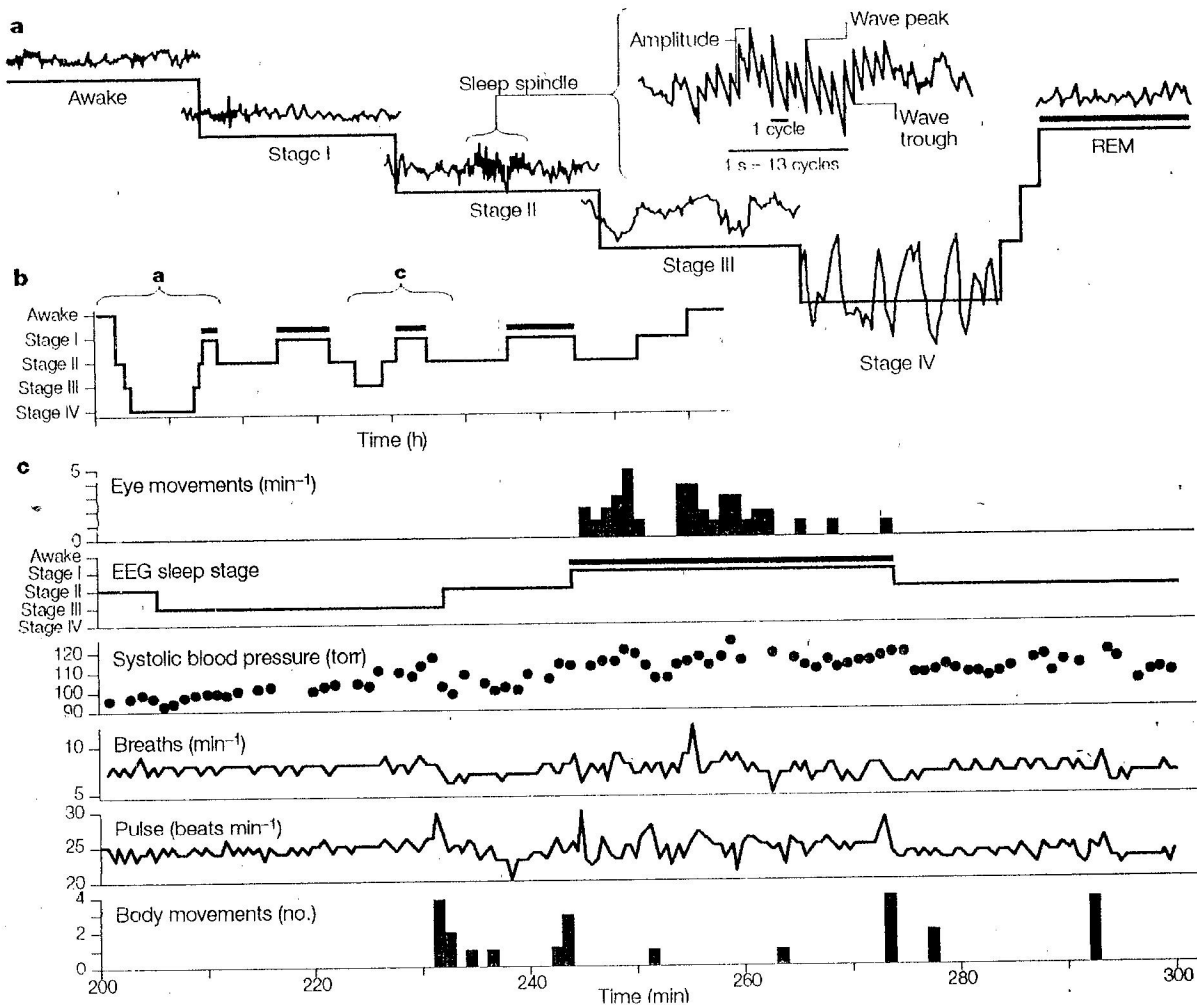


Figura 2. Ciclo del sueño. A, se muestran en detalle aspectos de distintas etapas de sueño, siendo la etapa I la de sueño ligero y la etapa IV la de sueño más profundo. B, ilustra las alternancias entre distintas etapas del sueño durante una noche de sueño en un individuo humano. Durante etapas tempranas de sueño, el sueño lento ocupa la mayor parte del tiempo, especialmente en el primer ciclo. Mas tarde, a medida que la noche avanza, el sueño lento cede espacio y se hace mas presente el sueño REM (barras horizontales). C, presenta un ciclo de etapas tardías de una noche de sueño, donde el sueño lento sólo alcanza hasta la etapa III. La duración constante del ciclo REM-sueño lento indica que un oscilador regular fija la ritmicidad del ciclo (Hobson and Pace-Schott, 2002).

humanos están prohibidos desde el Tratado de Nuremberg, 1946). Sin embargo, no hay un acuerdo generalizado sobre la etapa I del sueño como un marcador inequívoco del inicio del período de sueño. Es por este motivo que varios grupos consideran como más confiable y definitorio del sueño el correlato electrográfico de la etapa II (De Gennaro et al., 2001). En dicha etapa, un signo distintivo es la aparición de husos y de los así llamados complejos K, asociados con la oscilación lenta (fig. 3) (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987).

A medida que el estado de sueño progresa en el tiempo, ondas más lentas (1-5 Hz) aparecen en el EEG, adicionalmente a los husos ya presentes. Este es el correlato electrográfico que define la etapa 3 en humanos (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987). Finalmente, los husos ceden paso a una oscilación mucho más lenta, simplemente llamada la oscilación lenta (0.5-1 Hz), en la cual coalescen los otros ritmos del sueño (Steriade, 2003b), definitoria de la etapa IV de sueño (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987).

Sueño REM y Sueño Lento

Esta breve y superficial descripción del sueño deja ya un punto bastante claro, que el sueño no es un estado homogéneo sino que está constituido por distintos momentos. Hay que resaltar en este punto, que en el sueño existen dos períodos completamente diferentes, a saber: el sueño lento y el sueño REM, sueño rápido o sueño

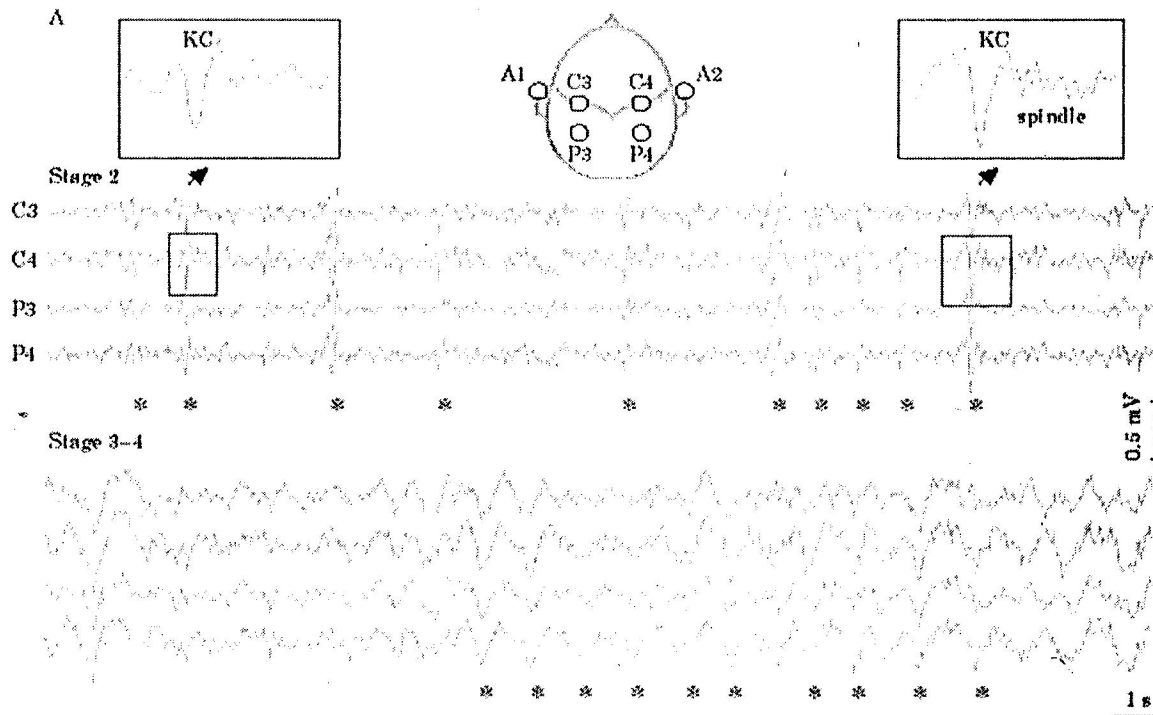


Figure 3. Complejos K (KCs) rítmicos en EEG humano durante sueño lento natural. A, cuatro trazos, registrados de ambos hemisferios cerebrales durante la etapa 2 de sueño, muestran KCs cuasi-rítmicos (a 0.5 Hz). Los insertos expandidos muestran un KC (izquierda) y un KC seguido de un huso (derecha). La etapa 3-4 de sueño en el EEG (abajo) está caracterizada por una oscilación más regular de los KCs (0.7 Hz). Los asteriscos muestran KCs obvios, sugiriendo cierta ritmicidad (Amzica and Steriade, 2002).

paradójico. La denominación de sueño REM proviene de de las sacadas oculares que ocurren durante este período, cuyas siglas en inglés son REM (*rapid eye movement*), mientras que la de sueño rápido proviene de la desincronización generalizada del EEG y la aparición de actividades de frecuencias rápidas (> 20 Hz). (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987). Las cuatro etapas antes mencionadas, son válidas sólo para el sueño lento, mientras que el sueño REM despliega una dinámica completamente distinta (fig. 2).

Una red neuronal dispersa es la encargada de generar los signos característicos del sueño REM. El resultado neto de la actividad cerebral durante el sueño REM es una activación (tónica y fásica) del sistema neuronal reticular (en el tronco del encéfalo) y sensorimotor. Brevemente, las características del sueño REM y sus mecanismos se indican a continuación (Pace-Schott & Hobson, 2002):

1. La activación del EEG ocurre por un incremento en la descarga tónica del circuito talamocortical, es decir, neuronas talámicas reticulares, talamocorticales y corticotalámicas son activadas.
2. Las ondas PGO (ponto-genículo-occipital) son potenciales fásicos que se registran secuencialmente en el tronco del encéfalo, el núcleo geniculado lateral del tálamo y la corteza occipital. Dichas ondas son el resultado de una desinhibición tónica y una excitación fásica de neuronas del tegmento lateral pontomesencefálico.

3. Las sacadas oculares son producto de la descarga fásica de neuronas reticulares y vestibulares, que activan indirectamente el nervio oculomotor.
4. El cambio en el potencial de campo registrado en el hipocampo, de un ritmo irregular a una oscilación theta regular (4-8 Hz) se debe a neuronas monoaminérgicas del tronco del encéfalo (p.ej. locus coeruleus).
5. La atonía muscular generalizada resulta de una inhibición tónica directa de las neuronas espinales mediada por la formación reticular pontomedular.

En muchos aspectos, especialmente relacionados a los correlatos electrofisiológicos de las funciones talámicas y corticales, la vigilia y el sueño REM se muestran similares. La actividad espontánea cerebral, así como las respuestas de neuronas corticales y talámicas son similares en la vigilia y el sueño REM. Hay un aumento de la probabilidad de descarga antidrómica y de la respuesta sináptica registradas tanto en neuronas talámicas como piramidales de la corteza (Steriade, 2003b), además las respuestas intrínsecas celulares son equivalentes cuando se miden con inyección intracelular de pulsos de corriente y los niveles de actividad espontánea son tan o más altos que en la vigilia (fig. 4) (Steriade et al., 2001). Aparte de ser similares estas respuestas entre la vigilia y el sueño REM, estas siempre son mayores o más probables que en el sueño lento (Steriade et al., 2001).

Probablemente, la única diferencia electrofisiológica entre estos dos estados es que las neuronas monoaminérgicas del cerebro medio, (como la neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, serotoninérgicas del Raphe posterior, histaminérgicas del hipotálamo posterior y dopaminérgicas de la sustancia nigra) están activas durante la vigilia y virtualmente silentes durante el sueño REM.

Debido a que las respuestas neuronales a estimulación sensorial son muy similares en el sueño REM y la vigilia, se esperaría que el umbral para despertar a un sujeto durante el sueño REM fuera relativamente bajo. Como se indicó anteriormente, el caso es completamente opuesto, ya que tanto en humanos como en animales los umbrales de estimulación sonora y táctil son mayores durante el sueño REM que en el sueño lento (Llinás & Paré, 1991). De aquí se deriva la idea del sueño paradójico, ya que los estímulos que son percibidos durante la vigilia no despiertan a los sujetos, aun cuando las respuestas corticales son similares a las de la vigilia. En otras palabras, aún cuando la red tálamocortical presenta una excitabilidad comparable a la de la vigilia (Steriade, 2003b), los estímulos sensoriales son ignorados.

La ausencia de respuestas conductuales a la estimulación sensorial no se puede explicar como un reflejo de la parálisis somática característica del sueño REM, debido a que estas son disectables (Llinás & Paré, 1991). Por un lado, lesiones específicas en el puente del encéfalo, anulan la atonía muscular durante el sueño REM en gatos. Aún cuando estos animales mostraron secuencias conductuales físicas características de la

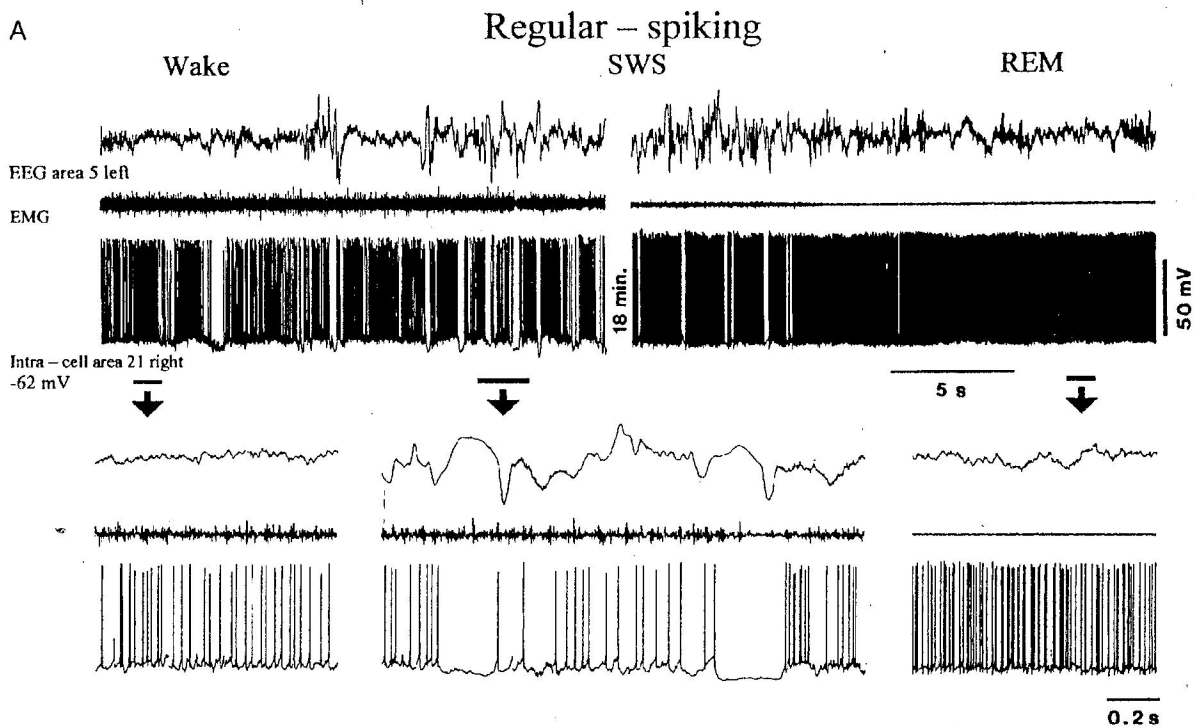


Figure 4. Cambios en el potencial de membrana y patrones de descarga durante vigilia y estados de sueño. A, una neurona cortical del área asociativa 21 fue registrada intracelularmente, junto con el EEG del área 5 y el EMG, durante la transición de la vigilia al sueño lento, y luego, a sueño REM. Nótese un período de 18 minutos de sueño lento que no se muestra. Los períodos marcados por barras horizontales se expanden más abajo (flechas). Nótese la descarga tónica durante períodos de vigilia y sueño REM, mientras que hiperpolarizaciones cíclicas están asociadas con las fases positivas del registro de campo durante el sueño (Steriade et al. 2001).

vigilia, las respuestas a estimulación sensorial periférica estuvieron ausentes (Llinás & Paré, 1991). Por otra parte, existen casos de alteraciones del sueño como la cataplexia en los pacientes narcolépticos. En estos casos, los pacientes están despiertos y concientes de su entorno, sin embargo no pueden moverse (Llinás & Paré, 1991).

En consecuencia, se ha propuesto que la paradoja del sueño REM se debe a una diferencia fundamental en cuanto al manejo que el cerebro hace de las señales sensoriales. Mientras que en la vigilia el estado cerebral es modulado por señales sensoriales, en el sueño REM lo es por memorias.

El sueño REM se ha considerado clásicamente como el período en el que ocurren los sueños, y por tanto esa es la actividad cognitiva que ocurriría en este estado de atención. Sin embargo, hay un creciente cuerpo de evidencia que muestra que el sueño REM puede ocurrir sin actividad onírica, y la actividad onírica en estados distintos al sueño REM, de modo que la discusión sigue abierta (Chase & Roth, 1990; Hobson et al., 2000; Solms, 2000)

Un caso muy distinto a lo anteriormente descrito es el del sueño lento. Este es un período que carece (generalmente) de actividad cognitiva, la actividad en la banda gama es mínima y en su lugar la corteza despliega actividades recurrentes de baja frecuencia (0.5-15 Hz), pero de gran amplitud, signo de que una actividad sincrónica de poblaciones neuronales a gran escala ocurre (Steriade, 1997; Solms, 2000). En este caso

la sincronía ocurre sin desplazamiento en la fase, de modo que hay un aumento evidente en la amplitud de las señales eléctricas registradas.

1.2. Oscilaciones características del Sueño Lento

Como se describió previamente, en la transición de la vigilia al sueño ocurren breves episodios de oscilaciones altamente sincronizadas en el rango de 7-14 Hz en el tálamo y la corteza, son los así llamados husos. A medida que el sueño se hace más profundo, los períodos de alta frecuencia (50-200 Hz), característicos de la vigilia, ceden paso a ritmos de baja frecuencia y gran amplitud, las oscilaciones delta (2-4 Hz). Finalmente, aparece un ritmo aún más lento que agrupa las oscilaciones delta y los husos: la oscilación lenta (<1 Hz) (Steriade et al., 1993b; Amzica & Steriade, 1997; Steriade, 1997, 2000).

Junto con este cambio en el patrón general de actividad cortical entre la vigilia y el sueño, hay otro fenómeno de gran importancia: la inhibición de la transmisión sináptica desde el tálamo a la corteza, el cual produce un estado de deaferenciación de la corteza cerebral (Steriade, 1997, 2000). Durante el sueño lento, el tálamo está inhibido en forma generalizada debido a la potente actividad del núcleo reticular del tálamo. Dicho núcleo, está compuesto única y exclusivamente por neuronas gabaérgicas que proyectan sobre la mayor parte del tálamo dorsal, inhibiéndolo (Thomson, 1988; Kim & McCormick, 1998).

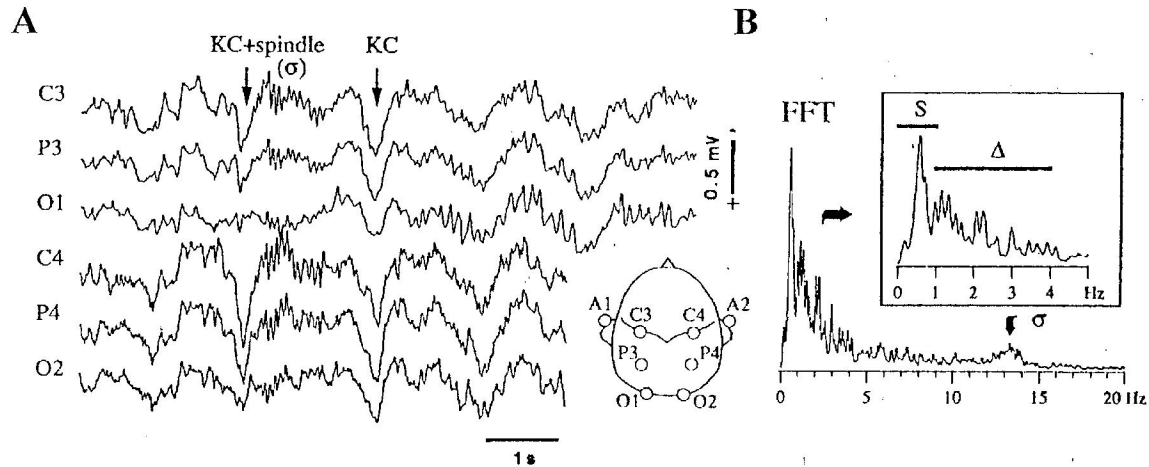


Figura 5. Frecuencias predominantes durante el SL. A, El complejo K (KC) durante sueño natural en humanos. Registros sobre el cráneo con electrodos monopolares con respecto a la oreja contraletal (ver inserto). Los registros corresponden a la etapa III de sueño lento. Las flechas muestran dos episodios KC. Nótese la sincronía de los KC a través de los distintos electrodos. At B, descomposición de frecuencias de la actividad eléctrica del primer registro (C3). Nótese la presencia de tres ritmos predominantes: la oscilación lenta (S, 0–1 Hz), ondas delta (D, 1–4 Hz) y husos (s, 12–15 Hz) (Amzica and Steriade, 1997).

Durante el sueño lento hay tres oscilaciones o ritmos característicos (fig. 5), a saber: La oscilación lenta (<1 Hz), los husos (7-14 Hz) y la oscilación de reloj o delta (2-4 Hz). Además de estos también existe actividad en el rango de frecuencia de la banda gamma (30-60 Hz) (Steriade et al., 1998a) y de los así llamados *ripples* (80-200 Hz) (Grenier et al., 2001, 2003). Sin embargo, estos últimos no implican sincronía a gran escala de poblaciones neuronales y se expresan en pequeña magnitud en el EEG (Llinás, 1993; Grenier et al., 2001).

Husos

Este ritmo recibió su nombre debido a la peculiar forma de huso que muestra la oscilación. Tal ritmo tiene una frecuencia de 7-14 Hz en gatos, y entre 12-15 Hz en humanos. Secuencias de husos recurren rítmicamente cada 2-5 s. Estas oscilaciones presentan en humanos diferentes frecuencias según la localización topográfica donde se registren. De modo que los husos rápidos (~ 14 Hz) se registran en regiones corticales posteriores y los husos lentos (~ 12 Hz) en regiones más anteriores de la corteza. Registros intracelulares de neuronas tálamicocorticales en animales anestesiados explican esta divergencia en las frecuencias, ya que los husos rápidos se deben a una hiperpolarización más corta (70-100 ms) entre los períodos activos, que en los husos lentos donde la hiperpolarización entre períodos activos es más larga (100-150 ms) (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987).

Las bases neuronales de esta oscilación han sido estudiados fundamentalmente por medio de registros intra y extracelulares, *in vitro* en rebanadas de tálamo visual de tejón, mientras que *in vivo* en gatos anestesiados (fig. 6). Los estudios han mostrado que los husos despliegan gran sincronía y amplitud, pero no presentan una incidencia constante en el tiempo. Son un tipo de oscilación que involucra la activación secuencial y recíproca del tálamo y la corteza (Steriade et al., 1993a; Contreras et al., 1996a; Contreras et al., 1997b). Los husos son iniciados en el núcleo reticular del tálamo y en breve el circuito es el siguiente: el núcleo reticular descarga sobre las neuronas talámicas dorsales hiperpolarizándolas, dicha hiperpolarización cambia el patrón de descarga en el tálamo generando los así llamados *bursts* de potenciales de acción por la activación de una corriente de calcio de bajo umbral (LTS) (McCormick & Bal, 1997). Ahora bien, las neuronas talámicas al descargar activan la corteza y también el núcleo reticular, aumentando la actividad de ambos en un circuito de retroalimentación positivo. La corteza, al ser estimulada descarga de vuelta sobre el núcleo reticular excitándolo, cerrando así el circuito (McCormick & Bal, 1997). La oscilación termina por una compleja acción de la corteza, cuyas neuronas descargan fuera de fase y desincronizan la actividad oscilatoria en el tálamo (Timofeev, 2001).

Los estudios realizados en las interacciones inhibitorias entre neuronas del núcleo reticular del tálamo han mostrado que los PIPSS (potenciales inhibitorios postsinápticos) son mediados por receptores GABA_A (Sanchez-Vives et al., 1997). En contraste con la suposición inicial de que estos PIPSS evitarían descargas de tipo *burst* y

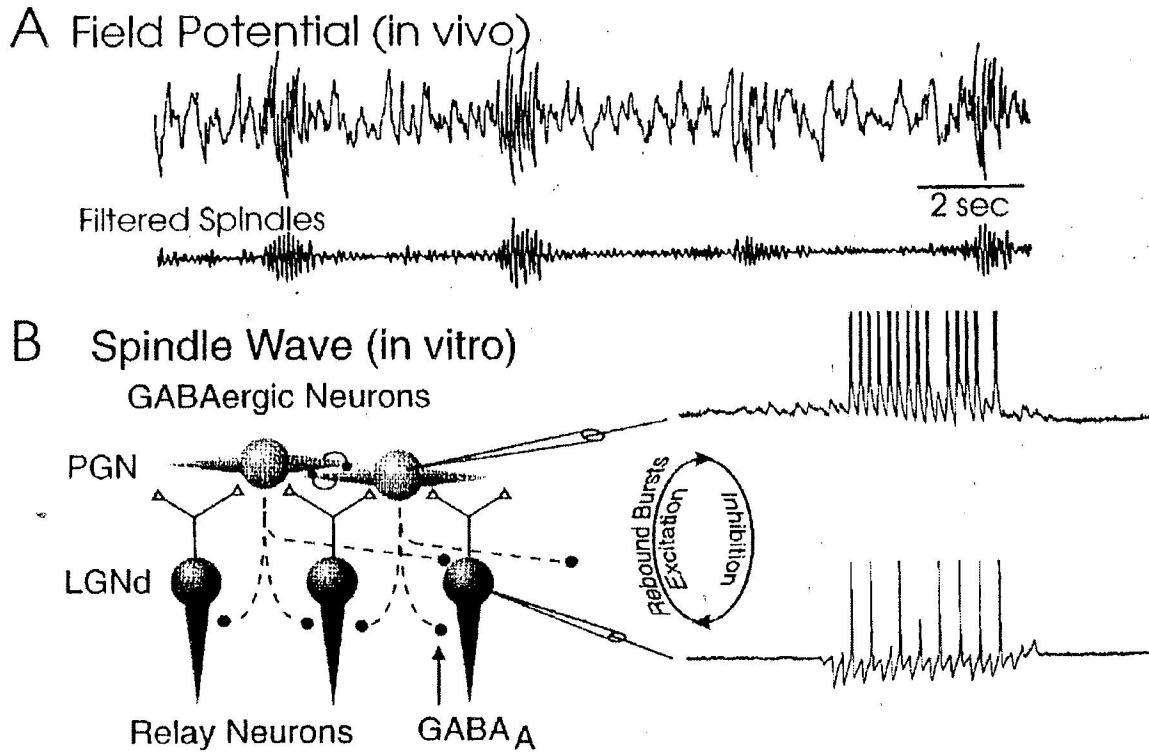


Figure 6. Oscilaciones en huso y la interacción entre neuronas reticulares talámicas y neuronas tálamo-corticales en la generación de husos talámicos. A, potencial de campo registrado en el núcleo talámico intralaminar central lateral (CL). Filtración digital del registro revela la presencia de ondas tipo huso. B, Los husos se generan por la interacción de neuronas reticulares y de relevo en el tálamo. Las neuronas reticulares inhiben a las de relevo, generando potenciales del rebote del tipo LTS. Esta excitación activa corrientes de calcio de bajo umbral en el núcleo reticular, y potenciales de acción se generan ahí cerrando el circuito. (McCormick and Bal, 1997)

así desincronizarían la actividad intrareticular, se mostró que estos PIPs pueden activar potenciales de bajo umbral (LTS, *low-threshold spike*) seguidos de *bursts* de potenciales de acción, cuando la membrana neuronal está hiperpolarizada bajo el potencial de reversión de cloruro (~ -70 mV) (Ulrich & Huguenard, 1997a, b), como es el caso durante el sueño natural (Bazhenov et al., 1999). Modelos lineales y bidimensionales de redes de neuronas reticulares del tálamo predicen que estas oscilaciones pueden propagarse y son consistentes con el rango de frecuencia de los husos (Bazhenov et al., 1999).

En resumen, se postula que los husos ocurren en tres etapas secuenciales, a saber:

Iniciación, que constituye los primeros 2 a 4 ciclos, es generada en el núcleo reticular del tálamo. Esto ocurre por un reclutamiento progresivo de neuronas reticulares que proyectan sobre el tálamo dorsal. Dicho reclutamiento se explica por mecanismos antes descritos como la generación de actividades autosostenidas por PIPs revertidos en polaridad (Bazhenov et al., 1999) y acoplamiento eléctrico (Landisman et al., 2002). Registros intracelulares muestran que durante los primeros ciclos de cada huso las neuronas tálamo-corticales no generan LTSs, de modo que no pueden estar implicadas en esta etapa, pues no activan a las neuronas reticulares del tálamo (Timofeev, 2001).

Mantención, después de la etapa inicial del huso, las neuronas tálamo-corticales comienzan a responder con LTSs a los potentes PIPs provenientes del núcleo reticular, y se establece el circuito de retroalimentación antes descrito (von Krosigk et al., 1993).

Adicionalmente, poblaciones corticales descargan en fase con las neuronas tálamocorticales. Esta retroalimentación activa tanto las neuronas reticulares como las tálamocorticales, reforzando la oscilación (Contreras & Steriade, 1995).

Terminación, que ocurre por una progresiva activación de la I_H (corriente depolarizante activada por hiperpolarización) en neuronas tálamocorticales (Bal & McCormick, 1996) y por una acción desincronizadora de la corteza (Timofeev, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que las neuronas reticulares del tálamo sufren depresión de la respuesta sináptica cuando se estimulan a relativamente bajas frecuencias (~ 10 Hz) (Timofeev & Steriade, 1998), hecho que puede contribuir a la terminación de los husos por una disminución en las respuestas sinápticas del núcleo reticular del tálamo, motor de esta oscilación.

Delta

Hasta antes de la descripción de la oscilación lenta (Nunez et al., 1993), ritmos en el rango de 0.5-4 Hz se llamaban de modo intercambiable ondas delta o lentas. En vista de que presentan frecuencias distintas y tienen mecanismos de generación diferentes, hoy en día se distingue entre la oscilación lenta (0.5-1 Hz) y la oscilación delta (1-4 Hz) (Nunez et al., 1993). Por tanto, en el presente trabajo se referirá a ondas deltas como aquellas en el rango de 1-4 Hz.

Existen dos orígenes de las oscilaciones delta, a saber: el tálamo y la corteza. Las neuronas tálamocorticales producen oscilaciones delta debido a la interacción de dos

corrientes intrínsecas bien conocidas y caracterizadas (fig. 7). Este ritmo se transfiere a la corteza por las proyecciones tálamocorticales recíprocas y puede ser visto ocasionalmente en el EEG, casi siempre acompañado de la oscilación lenta (Steriade, 1997). Las neuronas corticales por otra parte, generan una oscilación delta debido a sus propiedades intrínsecas y a la actividad de la red. El proceso de sincronización de las ondas delta no está muy bien comprendido debido sobre todo a su doble origen (Steriade, 2003b).

Estudios *in vitro* revelaron el mecanismo de generación de estas oscilaciones en el tálamo. En contraste con los husos, que se generan por interacciones sinápticas en redes intratalámicas, la oscilación delta ocurre debido a propiedades intrínsecas de la membrana de las neuronas tálamocorticales. Las dos corrientes responsables de la oscilación delta son I_H e I_T (McCormick & Pape, 1990a,b). El modelo para la generación de las oscilaciones delta propone que a niveles hiperpolarizados de membrana (menores a -65 o -70 mV) la I_H se activa. La lenta pero constante depolarización producida por esta corriente activa la I_T (que fue deactivada por la hiperpolarización) cuando alcanza el umbral. La activación de I_T genera un LTS seguido de potenciales de acción de alta frecuencia. La depolarización producida por el LTS inactiva la I_H , pero también la I_T , por tanto la membrana se repolariza. Tal repolarización deactiva la I_T y activa nuevamente la I_H , empezando el ciclo de nuevo (McCormick & Pape, 1990a, b). La oscilación delta es regulada por moduladores que actúan sobre receptores purinérgicos y adrenérgicos, que activan o inactivan la I_H (McCormick & Pape, 1990b).

La oscilación delta es bloqueada por las oscilaciones del tipo huso. Esto se debe principalmente a la diferencia en la dependencia de potencial que cada una presenta (Steriade, 1997). Esto es consistente con el hecho de que el EEG despliegue en etapas iniciales husos y después oscilaciones de tipo delta, en general agrupadas con la oscilación lenta (Steriade, 1997).

La actividad cortical potencia la oscilación delta en el tálamo. Esta acción sináptica de la corteza, indica que la oscilación delta es modulada por la actividad de la red. Dicha potenciación se expresa en un aumento de la amplitud de los LTSs generados durante la oscilación delta, que concluyen con una serie de potenciales de acción de alta frecuencia. Dichos LTSs permanecen por hasta 20 s una vez detenida la estimulación cortical (Steriade, 1997). Por tanto, la oscilación delta que es originada por propiedades intrínsecas de la membrana en neuronas tálamocorticales, es sincronizada por actividad cortical.

La corteza es capaz de generar su propio ritmo delta, pues esta actividad permanece en el EEG aún cuando se remuevan las conexiones con el tálamo (Steriade, 1997). La oscilación delta se describió inicialmente en la corteza, en las capas II, III y V. Los mecanismos celulares que generan la oscilación delta cortical no están tan claros como para el caso del tálamo, pues la corteza presenta al menos cuatro tipos neuronales electrofisiológicamente distintos y ninguno de estos parece presentar corrientes intrínsecas que le permitan oscilar (Steriade, 1997). Por tanto, se ha propuesto que la oscilación delta en la corteza es un evento generado por la actividad de la red (Steriade, 1997).

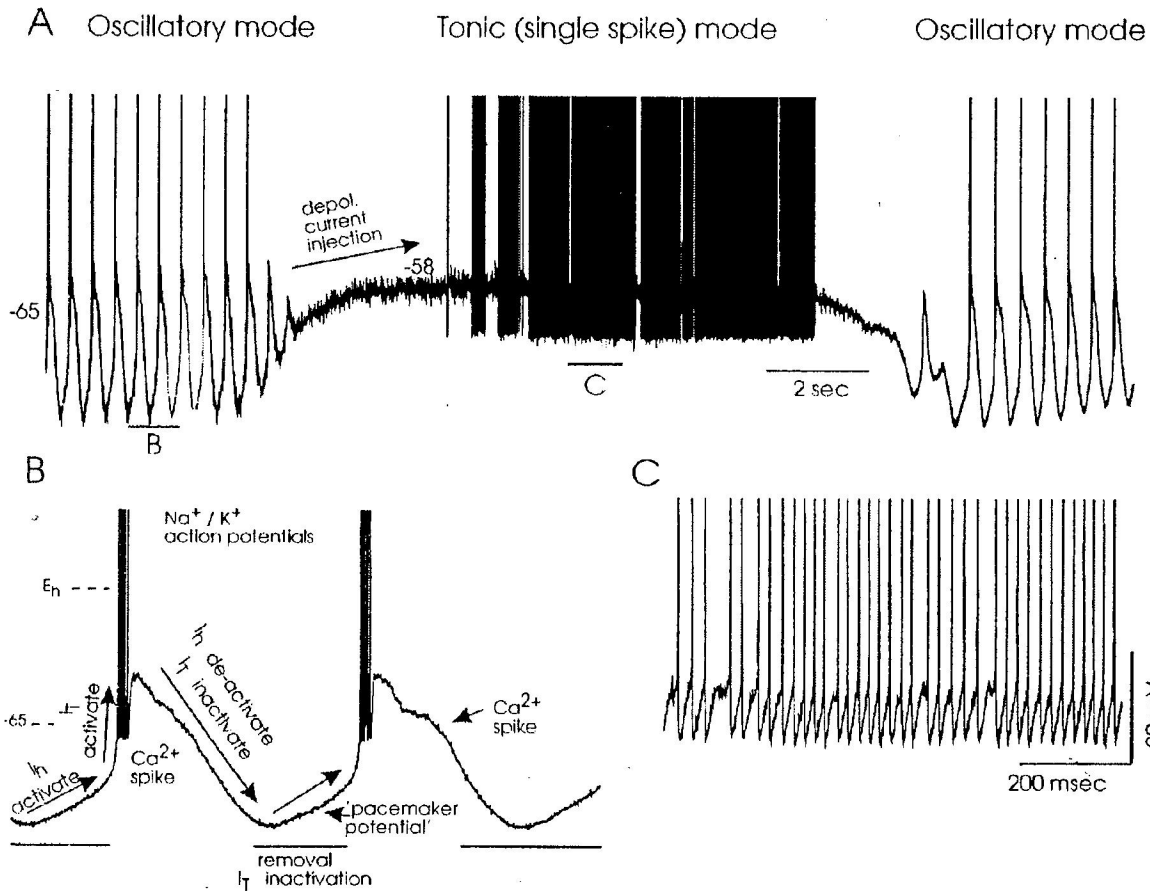


Figure 7. Neuronas tálamo-corticales pueden generar dos patrones de descarga debido a la interacción de dos corrientes intrínsecas. A, en reposo, la neurona descarga rítmicamente en rango delta (2 Hz). Depolarización de la membrana a -58 mV por inyección de corriente reemplazó la descarga oscilatoria por una de tipo tónico, debido a la inactivación de la corriente de calcio de bajo umbral (I_T). El patrón oscilatorio se recuperó más tarde cuando la corriente fue removida. B, aumento de la actividad oscilatoria y circuito de corrientes propuestas que son responsables de la oscilación. C, aumento de un período de descarga en modo tónico (McCormick and Pape 1990a.)

Se ha sugerido que la oscilación delta se genera en la corteza con una sincronización de hiperpolarizaciones de larga duración (AHP, *afterhyperpolarization*). Estas son corrientes producidas por una variedad de conductancias de potasio que hiperpolarizan la membrana neuronal (Schwindt et al., 1988a; Schwindt et al., 1988b). De los tres tipos de AHPs descritos, solo lo más lento, sAHP, se ha considerado como buen candidato pues su duración puede alcanzar varios cientos de milisegundos (Schwindt et al., 1988a; Schwindt et al., 1988b). Por otra parte, la hiperpolarización y consecuente disminución de excitabilidad neuronal producida por la AHP es consistente con la disminución en las respuestas sinápticas y antidrómicas durante épocas de oscilación delta en el EEG (Steriade, 2000).

Oscilación Lenta

La oscilación lenta es el ritmo fundamental durante el sueño lento, por un lado por su alto nivel de sincronía y gran amplitud, y por otro porque agrupa los demás ritmos lentos (fig. 5). La oscilación lenta fue descrita inicialmente utilizando registros intracelulares de distintos tipos neuronales en la corteza, además de ser detectada en el EEG cortical (Nunez et al., 1993). El origen cortical de la oscilación lenta se demostró en tres modelos: a) animales anestesiados talamectomizados desplegaron la oscilación lenta (Steriade et al., 1993c), mientras que b) animales decorticados no mostraron la oscilación lenta (Timofeev & Steriade, 1996). Adicionalmente, c) la sincronía a gran escala de dicha oscilación se pierde después de la desconexión de las fibras intracorticales (Amzica & Steriade, 1995).

La oscilación lenta consiste de una fase de depolarización prolongada, seguida de una larga hiperpolarización. Durante la fase depolarizante o activa, cerca del 30% de las neuronas muestran eventos rápidos de pequeña amplitud (3-10 mV), que son “todo o nada” y desaparecen con hiperpolarización de la membrana plasmática. Dichos eventos son llamados FPPs (*fast prepotentials*) y se consideran como putativos potenciales de acción dendríticos, ya que son más rápidos que los PEPSs (potenciales excitatorios postsinápticos) (Connors & Prince, 1982). Además de FPPs y PEPSs, durante la fase depolarizante de la oscilación lenta existen PIPs, generalmente agrupados en secuencias y que revierten su polaridad con depolarización de la membrana neuronal (Nunez et al., 1993). La presencia de dichos PIPs explica, al menos parcialmente, la marcada reducción en la excitabilidad neuronal en la corteza comparada con los períodos de hiperpolarización.

Inicialmente se pensó que la fase hiperpolarizante debía ser producto de la actividad masiva de neuronas inhibitorias, descargando sincrónicamente en la corteza. Sin embargo, registros intracelulares de neuronas inhibitorias mostraron que dichas neuronas siguen en fase la oscilación lenta del EEG, por tanto no pueden ser responsable de la etapa hiperpolarizante (Contreras & Steriade, 1995). Consistente con esto, registros intracelulares de animales crónicos, realizados con en la pipeta, han mostrado que la oscilación lenta no es afectada y por tanto la fase hiperpolarizante no se debe a la acción de receptores GABA_A. Sin embargo, registros realizados con Cs⁺, mostraron una considerable reducción o incluso supresión en varios casos la fase hiperpolarizante de la

oscilación lenta, sugiriendo que esta se debe a la acción de corrientes de K^+ (Steriade et al., 2001).

Otro factor fundamental en la prolongada hiperpolarización de la oscilación lenta es la disfacilitación que ocurre en la red tálamocortical. En neuronas corticales registradas durante sueño natural, la resistencia de entrada aparente (R_{in}) es cerca del doble durante la fase hiperpolarizante ($\sim 31 \text{ M}\Omega$) comparada con la fase depolarizante ($\sim 17 \text{ M}\Omega$) (Steriade et al., 2001). Este es otro punto a favor de la idea de que interneuronas gabaérgicas no descargan en la corteza durante la fase hiperpolarizante, ya que no hay un incremento de conductancias durante dicha etapa. Tal incremento en la R_{in} de neuronas corticales fue inicialmente descrito en animales anestesiados, de donde se concluyó que el proceso que da cuenta de este aumento es la ausencia de descargas neuronales durante la fase hiperpolarizante, proceso también conocido como disfacilitación sináptica (Contreras et al., 1996a). Un posible mecanismo celular propuesto para explicar la disfacilitación consiste en una depleción del calcio extracelular durante la fase depolarizante que está masivamente sincronizada a través de la corteza (Massimini & Amzica, 2001). En este caso, la falta de calcio produciría una disminución en la eficacia sináptica, la cual se extendería como una reacción en cadena finalmente produciendo una desconexión funcional de la corteza durante la fase hiperpolarizante.

Durante varios años se creyó también que la oscilación lenta en el tálamo era sólo un reflejo de la que se originaba corticalmente (Steriade, 1997). Sin embargo, se ha

demostrado que el tálamo tiene mecanismos autónomos que le permiten generar su propia oscilación lenta y por tanto sugieren un rol activo de esta estructura en la generación de mencionada oscilación (Hughes et al., 2002). Los mecanismos de la oscilación lenta talámica están bastante mejor descritos que los corticales, dada la homogeneidad de esta estructura. Brevemente, la oscilación lenta se expresa sólo cuando existe una activación de receptores metabotrópicos de glutamato, y depende de dos corrientes intrínsecas de las neuronas tálamocorticales. Por un lado la I_T , antes mencionada y responsable de la generación de LTSs y una corriente catiónica no específica activa por Ca^{2+} (I_{CAN}) (Hughes et al., 2002).

Contrariamente a lo que se observa en estudios realizados en rebanadas, el cerebro intacto despliega todas las oscilaciones antes descritas en conjunto. Se habla por tanto de un rol coalescente de la oscilación lenta en la agrupación funcional de todos los ritmos que ocurren durante el sueño lento (Steriade, 2003b).

La oscilación lenta está además relacionada con el ritmo delta, tanto el que se genera en la corteza como aquel generado en el tálamo. La activación sincrónica y masiva de fibras corticotalámicas arriba al tálamo, donde puede generar una oscilación delta a gran escala si las neuronas tálamocorticales se encuentran en el potencial de membrana adecuado (hiperpolarizadas bajo -65 o -70 mV). Dependiendo de la intensidad y la frecuencia de los estímulos corticales sobre el tálamo, el resultado será la sincronización del tálamo en el rango del ritmo delta, o bien de la oscilación lenta (Steriade, 2003b). Por otra parte, cuando grandes grupos de neuronas tálamocorticales

son sincronizadas en el rango delta, dicha oscilación se refleja en el EEG, que se ve en conjunto con la oscilación lenta. Consistente con lo anterior, la fase depolarizante de la oscilación lenta también presenta actividades en el rango de frecuencia delta. Esto se ha verificado en registro intracelulares (Nunez et al., 1993; Contreras & Steriade, 1995).

La oscilación lenta no sólo agrupa ritmos lentos como los husos y la oscilación delta, sino que además despliega ritmos rápidos (30-60 Hz) y ultrarrápidos (80-200 Hz) durante la fase depolarizante registrada en animales anestesiados (Grenier et al., 2001) y durante sueño natural (Steriade et al., 2001).

1.3. Función Fisiológica del Sueño

Hasta este momento del trabajo se ha hecho una breve recopilación de los datos electrofisiológicos disponibles acerca del sueño, sobre todo el sueño lento que es la condición fisiológica de interés del presente estudio. Como se habrá visto, la gran mayoría de los estudios que se realizan, utilizan el sueño como una condición conductual reproducible sólo para investigar mecanismos celulares implicados en la generación del mismo. Sin embargo, es poco lo que se ha aportado con respecto a la función fisiológica del sueño.

Por un lado, el rol del sueño se ha estudiado clásicamente en modelos animales que son privados de etapas específicas de sueño, y evaluando diversas variables fisiológicas (temperatura corporal, gasto energético, peso, etc.). Los efectos de privación de sueño pueden llegar a ser dramáticos. Animales privados de sueño

lento, sobre todo la etapa de sueño profundo, similar a la etapa 4 de humanos, produjo la muerte después de 23-66 días. Los animales privados desarrollan una apariencia física debilitada, lesiones en la piel, pérdida de peso, aumento en la ingesta de comida, incrementos agudos de temperatura, pero una disminución global de la misma (Rechtschaffen, 1998).

Durante los experimentos de privación de sueño se ha observado que no todas las etapas del sueño se recuperan por igual, sino que los principales componentes son la fase REM y la etapa 4 (Rechtschaffen, 1998). En base a estos resultados, se ha sugerido que la etapa 2, rica en oscilaciones tipo huso, no es indispensable. Esto ha llevado a la idea de proponer la hipótesis de que existe un sueño central (*core*) y otro opcional. Esta idea ha sido criticada sobre la base de que la etapa 2 representa cerca del 50% del tiempo del sueño total, lo que sugiere que dicha etapa no es dispensable u opcional (Chase & Roth, 1990). Por otro lado, los protocolos de privación de sueño siguen siendo criticados hasta hoy debido a la imposibilidad de una privación absolutamente selectiva de las diversas etapas de sueño (Chase & Roth, 1990; Hobson, 2000a; Stickgold, 2001; Stickgold et al., 2001; Hobson & Pace-Schott, 2002).

Como se indicó con anterioridad, el descubrimiento del sueño REM demostró que el sueño no es un período homogéneo y pasivo como se solía pensar, sino que es una condición activa de intensa actividad cerebral (Jouvet et al., 1959). Los experimentos fueron por tanto refinados y se estudió este nuevo estado del sueño. Gran parte de los esfuerzos dedicados al estudio del sueño se centraron en el sueño REM debido a una

serie de razones: primero, es fácil de reconocer en los registros de EEG; segundo, es relativamente fácil de privar selectivamente a los animales de esta etapa; tercero, como estado activado del cerebro, se esperaba que fuera más probable que estuviera relacionado con actividades cognitivas y cuarto, está relacionado con los sueños en humanos (Maquet, 2003).

Sueño y Plasticidad

Plasticidad sináptica es un término más bien extenso y suerte de comodín utilizado en neurociencias para referirse a prácticamente cualquier cambio de una función del sistema nervioso dependiente de la actividad de la misma. En el presente estudio, se adoptará la definición de que plasticidad sináptica es un cambio *funcional* que ocurre en las conexiones sinápticas entre las neuronas dependiente de la actividad de las mismas. Dicha funcionalidad implica que los cambios ocurridos en las sinapsis afectan la actividad y el papel de las mismas en el circuito neuronal en que actúan. En otras palabras, la plasticidad es un cambio en las conexiones sinápticas de duración variable, que depende de la historia de una red neuronal; tal cambio puede evolucionar de un reforzamiento o debilitamiento temporario de las sinapsis hasta la formación de nuevas conexiones físicas (Steriade, 2003b).

Existen varias versiones sobre la hipótesis que relaciona el sueño y la plasticidad sináptica. Probablemente la primera es la que señaló la importancia del sueño para el desarrollo cerebral. La gran cantidad de sueño que requieren los mamíferos durante el

período perinatal y la infancia sugiere una relación del sueño con la maduración del cerebro (Roffwarg, 1966).

Otra versión, y tal vez la más popular en los últimos años es la que indica que el sueño es un estado donde ocurre consolidación de conexiones sinápticas relacionadas con memorias adquiridas en las vigilia (Maquet, 2003). Este tipo de propuesta se basa en resultados obtenidos en experimentos fisiológicos sobre animales (Maquet, 2003; Steriade, 1997; Buzsaki, 1996; Hobson & Pace-Schott, 2002), así como psicológicos en humanos (Maquet, 2003; Hobson & Pace-Schott, 2002). En ambos casos, el paradigma de interpretación es el de la red cerebral considerada como una suerte de computador en que hay entradas y salidas precisas, almacenamiento y procesamiento de información, etc. (Maquet, 2003; Steriade, 1997; Buzsaki, 1996; Hobson & Pace-Schott, 2002). Si bien es cierto que un considerable contingente crítico puede ser erigido ante esta posición, este no es el objetivo del presente trabajo. Por otro lado, la mayor parte de la literatura científica relacionada con el tema de Sueño y Plasticidad se inscribe en este marco teórico, motivo por el cual es difícil realizar un trabajo que escape a su alcance. Por estas razones, se procederá a través del trabajo a explicar algunos conceptos fundamentales en el área.

Consolidación se refiere al procesamiento de memorias lo cual incluye reactivación, análisis e incorporación gradual en memorias de larga duración (Maquet, 2003). La idea de que el sueño podría estar relacionado con procesos de memoria no es nueva y fue sugerida ya a fines del s. XIX por observaciones en humanos. La capacidad

de recordar un conjunto de sílabas era mucho mejor después de un período de sueño que en ausencia de este (Ebbinghaus, 1885).

Los estudios sobre consolidación de memoria durante el sueño se han centrado sobre todo en el sueño REM (Hobson, 2000a; Stickgold, 2001; Stickgold et al., 2001; Hobson & Pace-Schott, 2002). La evidencia del papel del sueño REM en la consolidación de memoria es de tres tipos:

1. El aprendizaje y adquisición de nuevas memorias produce un aumento en la duración del sueño REM. Si el sueño REM es la etapa de consolidación de memorias, por tanto, mientras mayor sea el aprendizaje ocurrido en la vigilia, mayor debería ser el tiempo de sueño REM (Peigneux et al., 2001; Stickgold, 2001; Stickgold et al., 2001).
2. Procesamiento de memorias ocurren durante el sueño REM. La mayor evidencia en este sentido está provista por ciertos grupos neuronales, que durante el sueño repiten los patrones de descarga que ocurrieron durante la vigilia (Karni et al., 1994; Louie & Wilson, 2001).
3. Bloqueo de formación de nuevas memorias en la ausencia de sueño REM. Un gran número de estudios sugiere que tanto animales como humanos privados de sueño REM no ocurre adquisición de recuerdos o memorias relacionadas con ciertas tareas cognitivas evaluadas (Hobson, 2000a; Stickgold, 2001). Por ejemplo, sujetos privados

de sueño REM tienen mayor dificultad en retener listas de palabras aprendidas el día anterior, que sujetos que han dormido normalmente (Hobson, 2000a).

Estas tres líneas de argumentación han sido criticadas fuertemente por diversos motivos. Por un lado, contrariamente a lo que se podría esperar, la proporción diaria de sueño REM no se correlaciona con el grado de cefalización en los mamíferos. Así pues, la especie humana, que despliega el mayor grado de cefalización muestra sólo moderados niveles de sueño REM (Siegel, 2001) (fig. 8). Por otra parte, es bien sabido que los inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO), que se administran en forma terapéutica para el tratamiento de la depresión, son capaces de suprimir por completo la fase de sueño REM. Dichos tratamientos duran meses e incluso años, sin que los pacientes muestren problemas en la formación de nuevas memorias (Vertes, 2000; Siegel, 2001).

Como se ve, la idea de consolidación de la memoria durante el sueño se ha convertido en un escenario bastante fructífero de ideas (Hobson, 2000b; Hobson et al., 2000; Hobson & Pace-Schott, 2002; Steriade, 2003b), pero también de una vigorosa discusión, debido a la gran variedad de resultados y difícil reconciliación de muchos de estos (Vertes, 2000; Siegel, 2001). Ideas más parsimoniosas han surgido, tratando de conciliar las diferencias encontradas entre el sueño lento y REM.

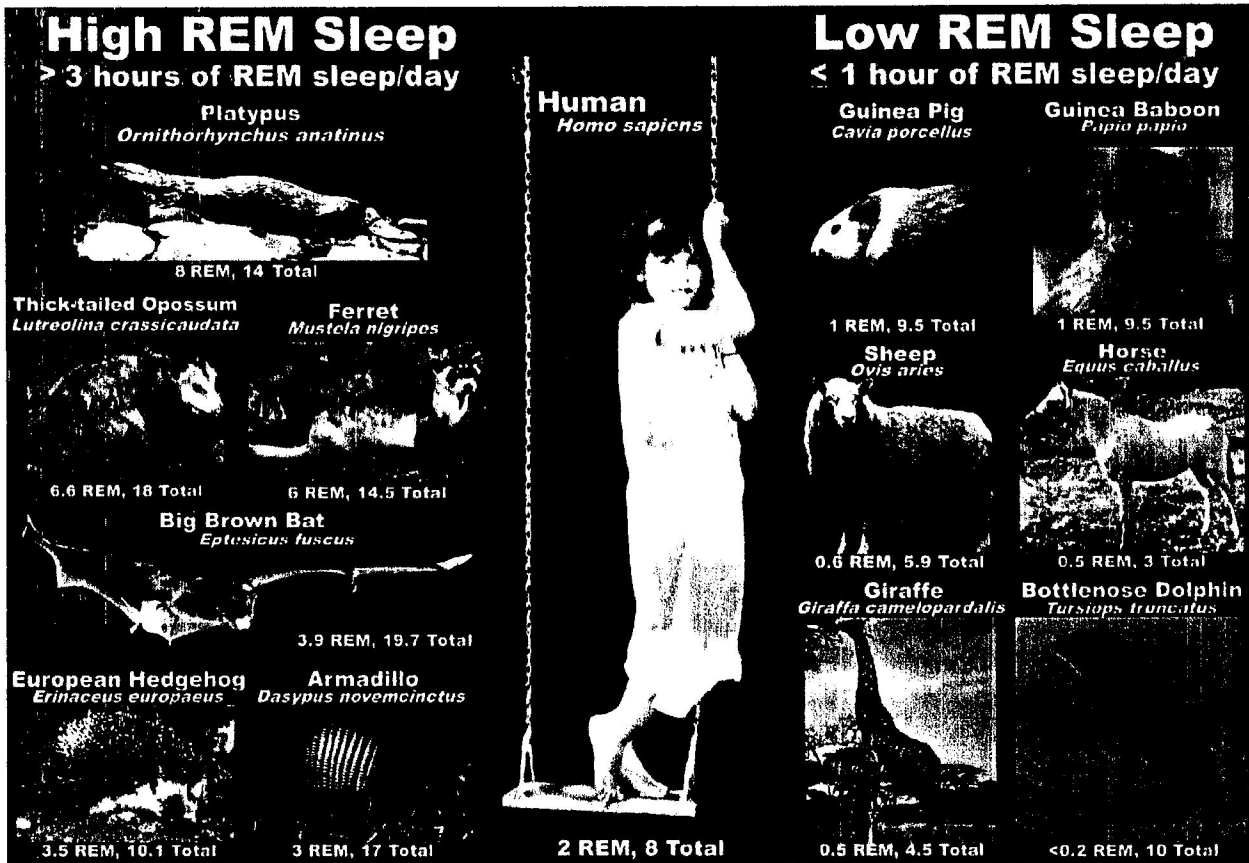


Figure 8. Duración de períodos de sueño para algunos mamíferos. La duración diaria de sueño REM en mamíferos no se correlaciona con el grado de cefalización. Los mayores niveles de sueño REM se ven en el ornitorrinco y los menores en el delfín. A pesar de sus capacidades de aprendizaje únicas, los períodos de sueño de humanos son inusuales comparadas con otras especies de mamíferos. Se muestra el número de horas totales de sueño y de sueño REM, para ciclos de 24 horas

Parece ser sin embargo que la idea que mayor apoyo experimental y potencia predictiva ha desplegado es la de consolidación de memoria durante el sueño lento en la vía hipocampo-corteza entorrinal.

El caso del hipocampo

Los estados cerebrales que se plasman en el EEG del hipocampo y estructuras asociadas alternan entre oscilaciones gamma y theta, y SPW (*sharp waves*) asociadas con oscilaciones ultrarrápidas (140-200 Hz). Las oscilaciones theta son producto de la acción concertada de varias estructuras cerebrales y de mecanismos celulares intrínsecos (Buzsaki et al., 2002), mientras que las SPW son endógenas del hipocampo y emergen en los circuitos recurrentes excitatorios de la región CA3 (Csicsvari et al., 2000). Las SPW son descargas transitorias (40-100 ms) que implican la sincronía de 40-80 mil neuronas en el eje CA3-CA1-complejo subicular-corteza entorrinal (Chrobak & Buzsaki, 1998). Las SPW y las oscilaciones ultrarrápidas están presentes en todos los mamíferos investigados hasta la fecha, incluyendo los humanos (Bragin et al., 1999).

En base a experimentos hechos en rata, se ha propuesto que hay transferencia de señales relacionadas con la experiencia adquirida en la vigilia de la corteza al hipocampo. Esta está asociada con ciertas frecuencias específicas (bandas theta y gamma) del EEG durante la vigilia, sistemas moduladores subcorticales (como el colinérgico) y vías entorrino-hipocampales (Buzsaki, 1996). Durante el sueño, el hipocampo consolida memorias que se transfieren luego a la corteza para almacenamiento de largo plazo. Tal transferencia está asociada con frecuencias

específicas del EEG y la atenuación de sistemas moduladores subcorticales. Durante el sueño la transferencia ocurre del hipocampo a la corteza entorrinal, contrariamente a la vigilia en que la vía es inversa. Debido a que los ritmos de descarga del hipocampo sobre la corteza están altamente sincronizados durante el sueño lento, esto establece condiciones favorables para que ocurran cambios plásticos en las sinapsis corticales (Buzsaki, 1996).

Hay varias razones que apoyan la idea de que las SPW son inductores de plasticidad sináptica. Primero, la ventana temporal de las SPW en poblaciones neuronales corresponde a la constante de tiempo del receptor de NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), a través del cual fluye Ca^{2+} , el ión clave en los procesos de plasticidad sináptica (Kandel, 2001; Augustine et al., 2003). Segundo, el resultado de los SPW es una respuesta oscilatoria de alta frecuencia (140-200 Hz), ideal para inducir LTP. Tercero, durante las SPW hay un aumento de cuatro a cinco veces en la excitabilidad de la red neuronal, lo cual genera condiciones favorables para la potenciación sináptica (Csicsvari et al., 1999).

En base a resultados obtenidos en rata implantadas crónicamente, se ha propuesto que los cambios de la actividad eléctrica del hipocampo asociados a estados de vigilia distintos, permite el procesamiento y almacenamiento de información en dos etapas diferentes (Buzsaki, 1989). Por un lado, la activación de fibras de la corteza entorrinal que descargan en patrones particulares sobre subgrupos de neuronas

piramidales de la región CA3 durante la actividad exploratoria, asociadas a frecuencias theta, donde se cree que las representaciones del espacio explorado son temporalmente almacenadas. Por otro lado, hacia el fin de la etapa exploratoria, las SPW se inician en aquellas neuronas cuya conectividad recurrente ha sido potenciada durante la etapa de exploración. Dicha excitación se transmite en las neuronas piramidales desde las más excitables a las menos excitables a través de las colaterales recurrentes de la región CA3. Las SPW tienen una cierta estructura espaciotemporal, y se postula que sus funciones son: consolidar los cambios de conectividad ocurridos durante la etapa exploratoria y transferir patrones de descarga neuronal específicos, asociados a la representación del espacio explorado, a la red cortical a través de la región CA1 y la corteza entorrinal (Buzsaki, 1996). En esencia, la información colectada durante la etapa exploratoria es “retransmitida” durante los SPW en orden reverso (Buzsaki, 1989). Aunque este modelo no ha sido probado conclusivamente, existen varias predicciones que se han confirmado experimentalmente.

Un supuesto fundamental de este modelo de dos etapas es que la participación neuronal en las SPW es modificada por la experiencia (Buzsaki, 1996). Tal supuesto ha sido comprobado experimentalmente de varias maneras. Primero, la participación de neuronas piramidales en SPW consecutivas no es aleatoria. Algunas neuronas descargan en 40% de las SPW, mientras que otras lo hacen muy raramente (Ylinen et al., 1995). Segundo, cuando las neuronas piramidales fueron activadas mediante confinamiento del animal al campo espacial de dichas neuronas, estas descargaron con mayor frecuencia que las neuronas no activadas durante el siguiente episodio de sueño (Pavlides &

Winson, 1989). Tercero, SPW de dos períodos de sueño lento consecutivos se compararon. Las neuronas que estuvieron activas durante la etapa de vigilia intermedia fueron las que más descargaron durante el segundo período de sueño, pero permanecieron silentes durante el primer período de sueño (Buzsaki, 1996). Cuarto, neuronas que representan regiones similares del ambiente descargan en un patrón temporal que se sobrepone durante los períodos de exploración. Durante el período de sueño lento siguiente a la exploración, dichas células mostraron una mayor tendencia a descargar conjuntamente que en períodos de sueño precedentes, mientras que neuronas que permanecieron silentes durante la etapa exploratoria no mostraron una correlación de descarga (Wilson & McNaughton, 1994). Estos resultados se han interpretado como una reexpresión de las experiencias adquiridas durante la vigilia en el sueño (Buzsaki, 1996).

1.4. Mecanismos celulares y moleculares del sueño lento

Las “respuestas en aumento” (*augmenting responses*) son potenciales sinápticos que aumentan en amplitud cuando se estimula una vía sináptica a una frecuencia de 10 Hz. Este tipo de protocolo ha sido utilizado como el modelo experimental de las oscilaciones tipo huso, pues estos presentan el mismo rango de frecuencia e implican la activación de grandes poblaciones neuronales. Adicionalmente, este es un modelo de plasticidad de corta duración, pues representa un cambio en la respuesta sináptica debido al uso repetido de una vía aferente (fig. 9).

Los mecanismos celulares de las respuestas en aumento han sido estudiados en varios modelos distintos. En rebanadas *in vitro*, (Castro-Alamancos, 1996; Castro-Alamancos & Connors, 1996a, b), en preparaciones de cerebro intacto *in vivo* (Steriade et al., 1998b; Timofeev & Steriade, 1998; Timofeev et al., 2002) y en modelos computacionales *in silico* (Bazhenov et al., 1998a, b). Se ha descrito una variedad de respuestas en aumento, pues estas ocurren en circuitos intratálámicos (Timofeev & Steriade, 1998), tálamocorticales (Steriade et al., 1998b) e intracorticales (Timofeev et al., 2002). Sin embargo las más dramáticas en su efecto parecen ser las respuestas en aumento tálamocorticales, sugiriendo que el mayor efecto ocurre cuando la red tálamocortical se conserva intacta.

Resultados experimentales y de simulaciones computacionales predicen que las oscilaciones de tipo huso son altamente efectivas en producir entradas de Ca^{2+} en las dendritas de neuronas piramidales de la corteza (fig. 10) (Contreras et al., 1997a). Tal entrada puede actuar como una señal que inicia una serie de cambios bioquímicos que después se hacen permanentes en la red tálamocortical, ya que el Ca^{2+} es una condición necesaria para activar cascadas de transducción relacionadas con plasticidad sináptica (Braun & Schulman, 1995; Augustine et al., 2003; Berridge et al., 2003; Roderick et al., 2003).

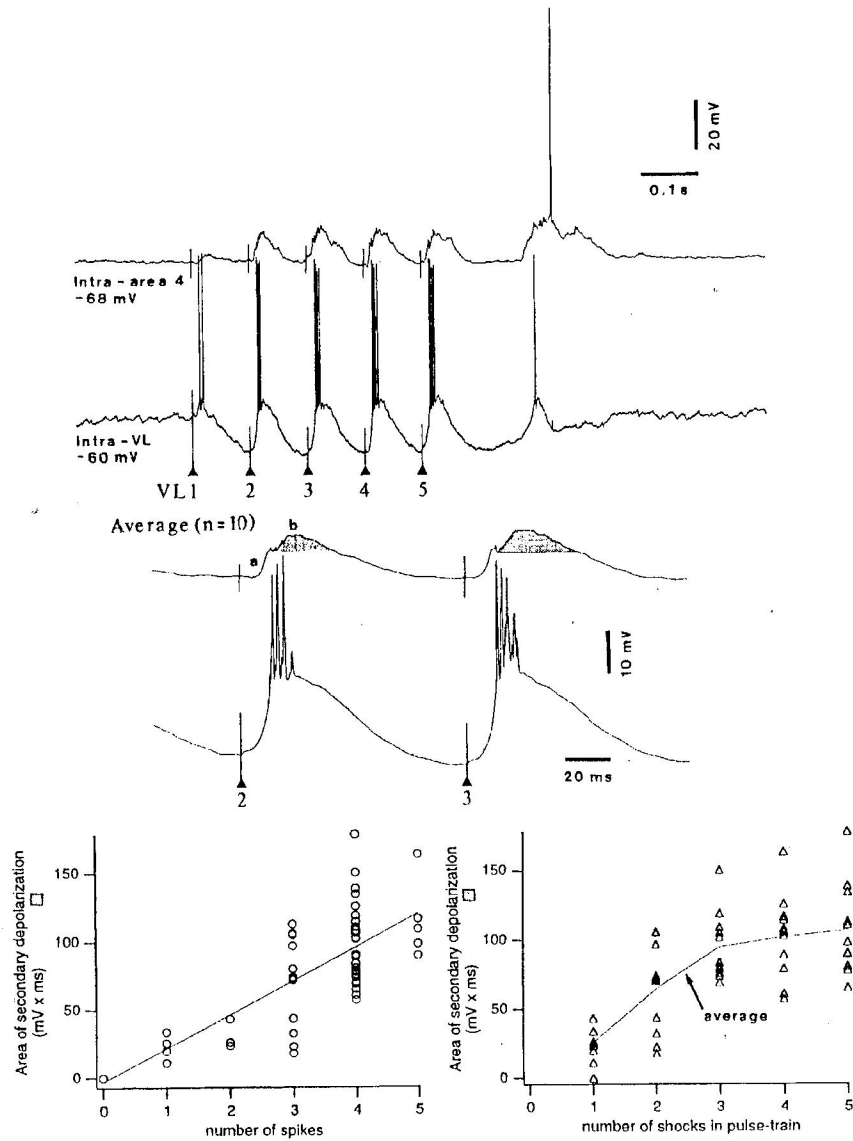


Figure 9. “Respuestas en aumento” en la corteza y el tálamo. “Respuestas en aumento” fueron evocadas por estimulación talámica. El área de depolarización en neuronas corticales aumenta en función lineal con el número de potenciales de acción en las neuronas tálamo-corticales. Anestesia Ketamina-xylazina. Los trazos superiores muestran un registro simultáneo doble, de una neurona del área 4 de la corteza y una neurona del núcleo talámico ventro lateral (VL).

Las conductancias sinápticas evocadas por las proyecciones talámicas sobre las neuronas corticales son más que simples PEPSs cuyo efecto es cancelado por la activación paralela de PEPSs. Datos morfológicos muestran que las sinapsis no están igualmente distribuidas en las neuronas piramidales, el árbol dendrítico recibe principalmente sinapsis excitatorias, mientras que la mayoría de las sinapsis inhibitorias alcanzan el soma (DeFelipe & Farinas, 1992). Tal desbalance implica que las dendritas reciben una potente excitación, la cual no es visible a nivel somático debido a la inhibición local. De modo que, y en forma consistente con el modelo, las neuronas piramidales están sometidas a una gran presión excitatoria durante los husos, pero esta no es reflejada como un aumento en la frecuencia de descarga debido a la inhibición somática, también incrementada en paralelo durante los husos (Sejnowski & Destexhe, 2000). Parece ser por tanto, que durante los husos se generan condiciones adecuadas para depolarizar las dendritas de neuronas corticales, sin afectar mayormente el patrón de descarga de estas. Durante los husos, la mayoría de neuronas talámicas decargan *bursts* sincronizados sobre la corteza. Simulaciones han sugerido que este tipo de descarga puede generar eficientemente una entrada de Ca^{2+} en las dendritas de neuronas piramidales (Contreras et al., 1997b), lo cual es consistente con resultados *in vitro* que muestran que la depolarización dendrítica está acompañada por entradas de Ca^{2+} (Yuste & Tank, 1996). Es esperable por tanto que durante los husos ocurra una entrada masiva de Ca^{2+} en las dendritas, la cual no afecte el patrón de descarga neuronal debido a la inhibición somática.

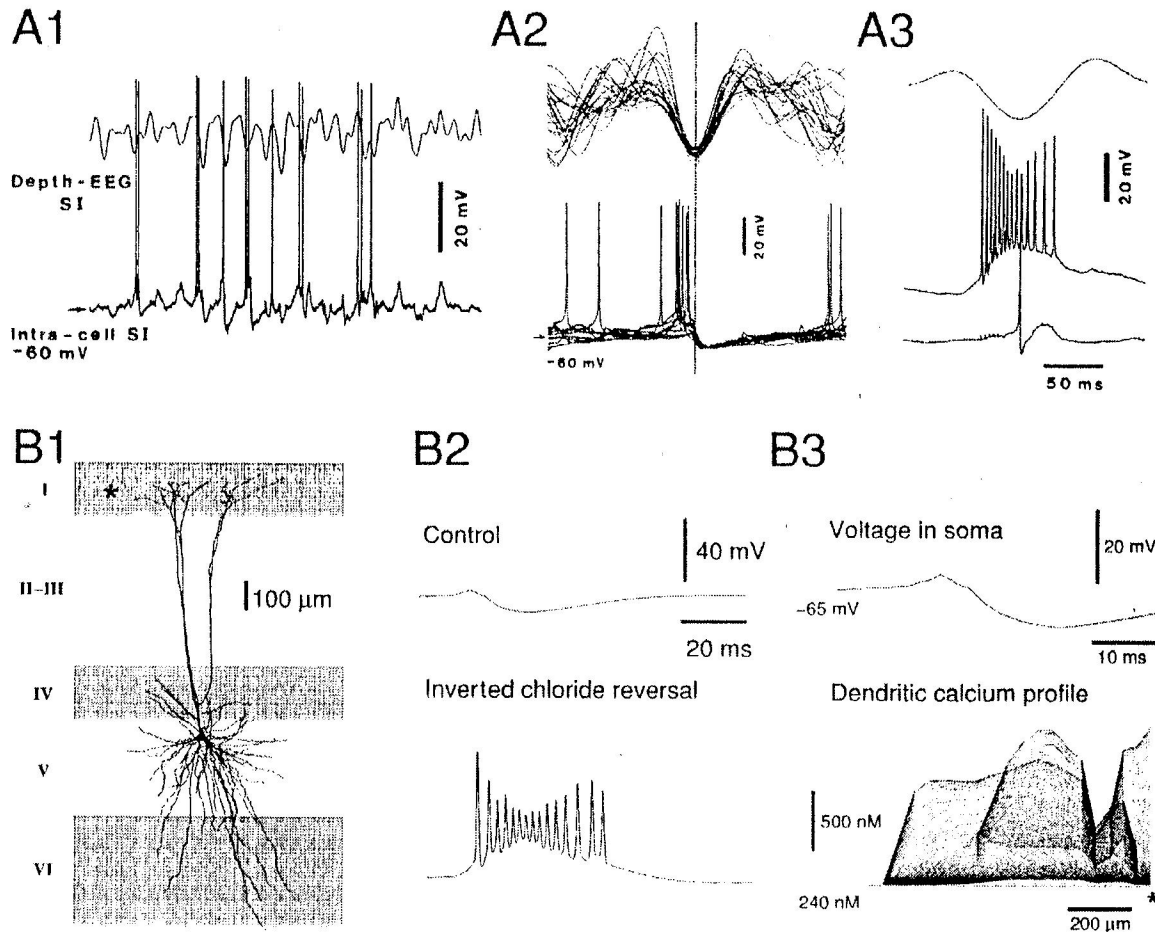


Figure 10. Las oscilaciones tipo huso pueden generar entradas de calcio en las dendritas de neuronas piramidales. A, un registro intracelular *in vivo* de una neurona cortical durante oscilaciones en huso. (A1) registro simultáneo de la actividad extracelular e intracelular. (A2) cada ciclo de los husos corresponde a secuencias de PEPS/PIPS en la neurona registrada. (A3) dos registros simultáneos en que una neurona se registra con cloruro en la pipeta (trazo medio), para revertir los PIPSs. Nótese que la secuencia PEPS/PIPS se transforma en una potente excitación. B, Simulaciones por computador de las entradas talámicas en neuronas piramidales. (B1) morfología usada para las simulaciones. Una neurona de la capa V registrada, teñida y reconstruida. (B2) Simulación de secuencias EPSP/IPSP y *burst* ocurridos por la utilización de cloruro en la pipeta de registros. (B3) cambios en la concentración de calcio en las dendritas luego de la activación de aferencias talámicas.

Coda

Como se habrá notado, gran parte de los estudios del sueño han sido centrados en el sueño REM, cuyas características lo hacen seductoramente similar a la vigilia. Ambos son estados donde actividad cognitiva ocurre y más importante aún, estados de conciencia. Hoy por hoy el tema del estudio científico de la conciencia atraviesa no sólo la neurociencia, sino que moviliza también otras disciplinas (Penrose, 1989; Searle, 1999, 2000). De hecho se ha planteado que el tema fundamental del que las ciencias biológicas deben dar cuenta es el de la conciencia (Searle, 1999).

Por otra parte, los esfuerzos dedicados al estudio del sueño lento se han centrado básicamente en los mecanismos que dan origen a sus características oscilaciones (McCormick & Bal, 1997; Steriade, 1997, 2000, 2003b). Curiosamente, se conocen bastante mejor los mecanismos que da origen a las oscilaciones características del sueño lento que la significación fisiológica que estas podrían tener. Sólo en años recientes se ha prestado atención al sueño lento como protagonista en los eventos de consolidación de memoria y plasticidad sináptica (Buzsaki, 1996; Steriade, 2001). Una breve presentación del asunto mostró que el tema se ha desarrollado bastante para el modelo del hipocampo y la corteza entorrinal. Sin embargo, condiciones similares no han sido aún estudiadas en profundidad en la corteza.

En este trabajo se abordará el tema del sueño lento y su posible función fisiológica desde la idea que sugiere que este es un estado favorable a la ocurrencia de procesos de plasticidad sináptica (Buzsaki, 1996; Steriade, 2001); donde dichos procesos plásticos, parecen estar relacionados con funciones cognitivas superiores como son la memoria y el aprendizaje (Chase & Roth, 1990; Hobson et al., 2000; Nielsen, 2000; Solms, 2000; Vertes, 2000; Maquet, 2003). Se ha propuesto que los motores de generación de tales cambios plásticos son los grandes ritmos oscilatorios que ocurren durante el sueño lento (Steriade, 2001). Para probar esta idea se ha diseñado un modelo experimental, en el cual se emularán las condiciones de sueño lento y también los ritmos lentos, evaluando su impacto en la actividad sináptica de neuronas, tanto a nivel individual como poblacional.

1.5. Heurística

En las secciones anteriores se mostró que de las diversas ideas en torno a la función fisiológica del sueño, una de ellas propone, en sus múltiples versiones, que durante este estado ocurre consolidación de memorias y cambios plásticos a nivel sináptico en el cerebro. A pesar de la gran controversia y diversidad de resultados, parece haber consenso en el sentido de que el sueño es un estado favorable a la inducción de plasticidad sináptica.

Se indicó también que durante el sueño lento ocurren ciertos ritmos particulares que implican la activación sincrónica de grandes poblaciones neuronales, tales

oscilaciones implican la descarga coordinada de potenciales de acción de miles a millones de neuronas en el sistema tálamocortical. Esta condición de por sí sugiere la posibilidad de cambios plásticos en las estructuras receptoras de tales descargas.

De manera análoga a la idea que se ha propuesto para el eje hipocampo-corteza entorrinal, en que el flujo ocurre del hipocampo a la corteza durante las SPW y *bursts* neuronales; también se ha propuesto que en el sistema tálamocortical ocurre una función similar en la cual las oscilaciones lentas del EEG tienen un papel en la generación de cambios plásticos a nivel sináptico en la corteza (Steriade, 2000).

Tal idea ha sido parcialmente corroborada en el estudio de las respuestas en aumento, en preparaciones de cerebro intacto. Como se indicó más arriba, este es un protocolo que induce plasticidad de corta duración y se ha usado como modelo para evaluar el efecto de las oscilaciones tipo huso en la red tálamocortical.

Hipótesis

Se ha propuesto que los ritmos oscilatorios que se presentan durante el período de Sueño Lento tienen una función fisiológica, que es la reorganización y especificación de circuitos en el sistema tálamocortical. Dicha reestructuración se expresa como cambios en plasticidad sináptica de la red (Steriade, 2000).

Si esto es así, se propone que protocolos de estimulación que imiten las oscilaciones características del Sueño Lento, serán capaces de inducir cambios plásticos en la transmisión sináptica en la red durante tal estado, sea este natural o inducido.

Objetivo general

Identificar las condiciones bajo las cuales se dan cambios de plasticidad sináptica en la corteza durante el sueño lento o una condición similar, inducida por anestésicos (ver Discusión).

Objetivos específicos

1. Determinar las distintas **frecuencias** de estimulación que son capaces de inducir plasticidad sináptica en la corteza cerebral durante sueño lento (natural o inducido).
2. Caracterizar la diversidad en formas de plasticidad sináptica cuando se estimulan distintas **vías aferentes** sobre la corteza.
3. Investigar diferencias entre **áreas corticales** en cuanto a su propensión en la expresión de plasticidad sináptica.

4. Estudiar la **integración temporal** en la corteza de la transmisión sináptica en vías héterosinápticas (el origen de este objetivo, que no estaba presupuestado al iniciar el proyecto, será explicado mas adelante, en la sección Resultados).

2. METODOLOGÍA

2.1. Modelo de estudio

La tendencia actual muestra que por razones tanto económicas como éticas la rata y el ratón sean los animales de elección para el estudio de la neurociencia. Sin embargo para el estudio del sueño, el gato muestra ventajas comparativas amplias sobre las demás especies que se han utilizado. Por un lado, el gato muestra una clara propensión al sueño natural, sobre todo durante el día (Crochet, 2001), lo cual facilita el estudio del sueño natural. Por otra parte tanto su neuroanatomía como sus períodos de sueño presentan considerable similitud con los humanos (Contreras et al., 1997b; Steriade, 1997; Crochet, 2001). Ambos aspectos han sido estudiados ampliamente en la tradición de la neurociencia (Steriade, 1997).

En el modelo animal elegido fueron estudiadas únicamente la actividad electrofisiológica de neuronas individuales (registros intracelulares) y de grupos neuronales (potencial de campo). La aproximación inicial para estudiar el sueño lento fue la inducción de un estado similar al sueño mediante diversos anestésicos. De modo que la gran mayoría del trabajo se realizó en preparaciones agudas de animales anestesiados. Sin embargo la gran desventaja que presenta cualquier anestésico, por muy bueno que este sea, es que no imita todas las características del sueño. Por este motivo, la parte final del trabajo se realizó en preparaciones crónicas en animales no

anestesiados que dormían en forma natural. Un esquema general del diseño experimental utilizado en la mayoría de los experimentos se muestra en la figura 11.

2.2. Preparación aguda

La mayoría de los experimentos fueron realizados bajo anestésicos que inducen un estado similar al sueño lento. Los anestésicos usados fueron ketamina-xylazina, uretano, halotano o barbitúrico (pentotal, tiopental, somnotol). Cada anestésico reproduce ciertas características del sueño natural, pero no todas. Así por ejemplo, la mezcla de ketamina-xylazina reproduce fidedignamente la oscilación lenta, mientras que los barbitúricos generan oscilaciones del tipo huso. Los diversos anestésicos fueron probados para determinar si es que había uno que presentara condiciones más favorables para la inducción de plasticidad sináptica.

Para los casos en que se comprobó que los distintos anestésicos producían resultados experimentales equivalentes, la mayoría de los experimentos se realizaron de preferencia con somnotol, pues su efecto es prolongado y en general produce preparaciones más estables.

La preparación experimental se describe brevemente a continuación. Una vez que el animal ha sido anestesiado se le realiza una traqueotomía para una posterior ventilación artificial. Se lo ubica luego en un aparato estereotáxico y se registra la actividad cortical en forma extracraneal. Cuando el animal presenta un estado de sueño

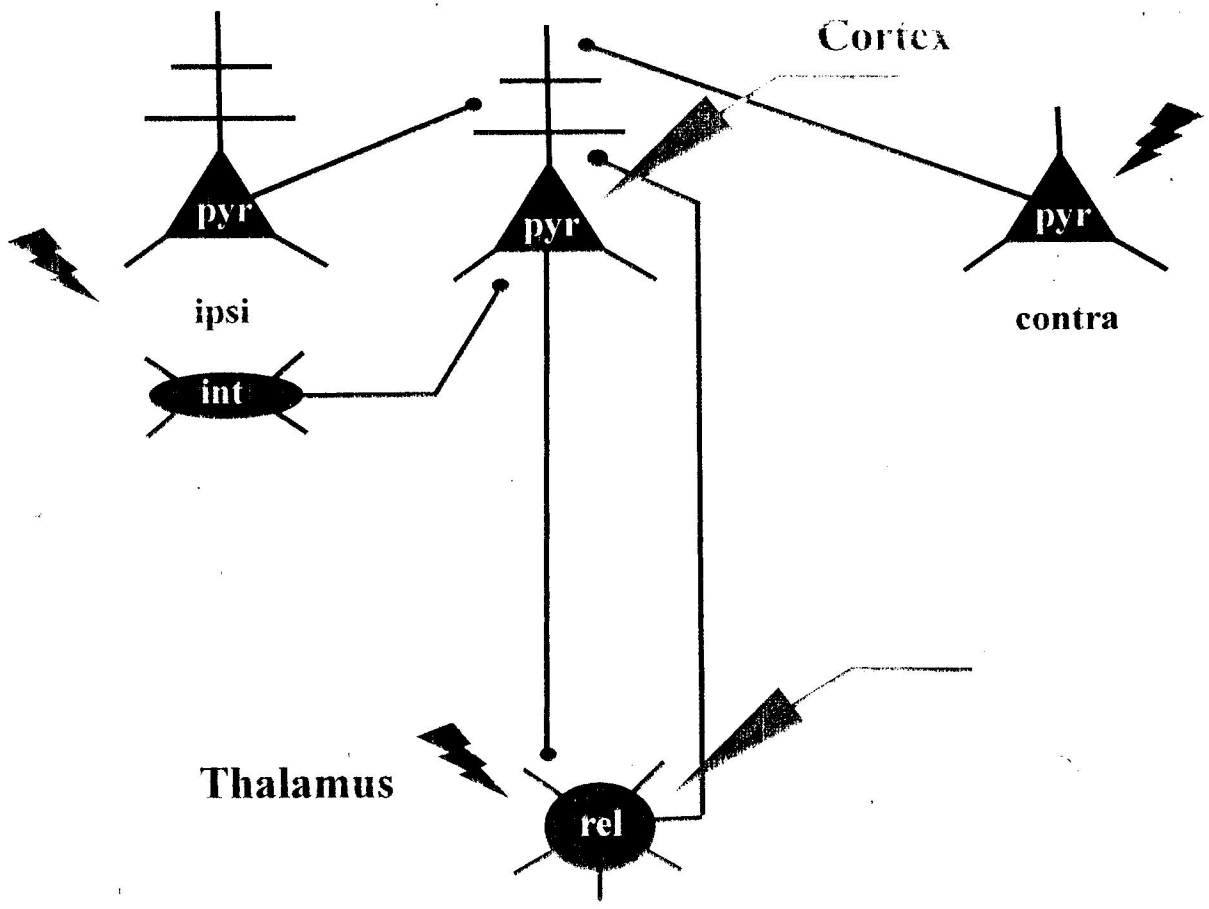


Figure 11. Esquema general del diseño experimental. Se muestra una versión simplificada del circuito tálamocortical estudiado. Neuronas corticales piramidales (pyr) en azul, interneurona cortical (int) en rojo y neurona talámica de relevo (rel) en verde. Los registros intracelulares se realizaron en la corteza o en el tálamo, dependiendo del protocolo (ver Metodología). Símbolos grises representan pipetas de registro. Los estímulos eléctricos se aplicaron en la corteza ipsilateral, contralateral o en el tálamo (ver Metodología). Símbolos rojo oscuro con forma de rayo representan la estimulación eléctrica. Todas las sinapsis son excitatorias, salvo la de la interneurona sobre la piramidal, y representan aproximadamente el lugar de acción en el árbol dendrítico.

profundo, es paralizado con galamina y conectado a una bomba de ventilación que mantiene la concentración máxima de CO₂ en 3.5%. La temperatura interna se mantiene en 37° C y la frecuencia cardiaca se monitorea durante todo el experimento, admitiendo valores entre 90 y 120 lpm. Suero salino con glucosa se administra dos o tres veces como terapia fluida durante el experimento. El estado de anestesia se controla mediante el monitoreo constante de la actividad cortical. Mayor detalle en las referencias citadas (Bazhenov et al., 1998a, b; Steriade et al., 1998b; Timofeev & Steriade, 1998).

2.3. Preparación crónica

Los experimentos se realizaron en gatos adultos. Electrodo de estimulación y registro fueron implantados en forma crónica bajo anestesia profunda (somnitol, 35 mg/kg, ip), seguido de la administración de un analgésico (buprenorfina, 0.03 mg/kg, im) y un antibiótico (penicilina, 5x10⁵ unidades, im) durante tres días. Los animales fueron implantados con una o dos cámaras para permitir la penetración de pipetas para registros intracelulares en la corteza. Las cámaras se implantaron en las regiones precruiciada (motora) y/o suprasilvica anterior (asociativa). Macroelectrodos coaxiales fueron implantados para registro y estimulación en distintas regiones de la corteza y núcleos talámicos asociados para determinar la organización orto y antidrómica de las neuronas registradas.

Después de la cirugía, se realizó un período de entrenamiento en que los animales son fijados sin presión ni dolor en el aparato estereotáxico. Después de 4 a 5 días, los animales comienzan a dormir en estas condiciones y las sesiones de registro

intracelular comienzan. Para esto, la duramadre de las regiones expuestas por las cámaras de registro fue removida. Una vez expuesta la corteza se ubican pipetas de registro sobre esta y se rellena la cámara de registro con una solución estéril de agar 4%. Para mayores detalles revisar referencia (Steriade et al., 2001).

2.4 Registros electrofisiológicos

Los registros intracelulares se realizan mediante micropipetas de vidrio, llenas con acetato de potasio (KAc) 3M, y que contienen un electrodo de plata clorurada. Las pipetas se ubican en la corteza en la región que desea estudiarse. Las pipetas se conectan a un preamplificador (10x), el cual a su vez está conectado a otro amplificador (5x). De aquí la señal se distribuye para ser enviada a un osciloscopio, una impresora térmica y un computador. Los registros extracelulares y estimulación se realizan mediante electrodos de tungsteno de 100 k Ω , conectados de modo similar al anterior (pero con menor amplificación).

En general se utilizan dos micropipetas, un electrodo de estimulación cortical, un electrodo de estimulación en otra vía aferente (p. ej. tálamo, corteza contralateral o ipsilateral) y un electrodo de registro de la actividad cortical ipsilateral. Las señales de todos los canales se registran a 20 kHz y se almacenan en un computador para su posterior análisis, paralelamente y durante todo el experimento, se imprimen en papel. Para detalles se pueden revisar las referencias (Bazhenov et al., 1998a, b; Steriade et al., 1998b; Timofeev & Steriade, 1998; Steriade et al., 2001).

Las aferencias tálamocorticales y corticocorticales actúan en regiones distintas del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza. En efecto, todas las proyecciones tálamocorticales son de tipo excitatorio y alcanzan sobre todo la capa III de la corteza, es decir las regiones mediales y medio-distales del árbol dendrítico (Jones, 1985). Por otro lado, las proyecciones intracorticales pueden ser inhibitorias, en cuyo caso alcanzan el soma o las cercanías del mismo (DeFelipe & Jones, 1985) o bien pueden ser excitatorias, en cuyo caso alcanzan sobre todo las regiones distales del árbol dendrítico (DeFelipe & Farinas, 1992). Esta organización diferencial de las proyecciones sinápticas tiene implicancias para las propiedades integrativas de las neuronas corticales. Esto será discutido más adelante (ver Discusión).

Para los análisis de resultados obtenidos en preparaciones agudas, se consideran solo neuronas que generan un registro estable por lo menos 30 minutos. El potencial de membrana (V_m) en reposo debe ser -60 mV o menor, y no variar durante el experimento, los potenciales de acción deben sobrepasar 0 mV. En el caso de los resultados obtenidos en preparaciones crónicas las exigencias son menores debido a la extrema dificultad técnica que presentan los registros intracelulares en esta preparación. En este caso se consideraron para análisis registros en que el V_m fue estable y no menor a -50 mV.

Cada tipo neuronal se caracteriza por procedimientos standard, es decir estimulación antidrómica y ortodrómica, de modo de conocer su ubicación en el circuito

corticotalámico, así como pulsos de corriente negativa y positiva, para determinar su patrón de descarga y las propiedades pasivas de la membrana (Steriade et al., 2001).

En algunos casos, finalizado el experimento el cerebro fue perfundido con una solución de suero salino (9%) y luego fijado con para-formaldehído (4%), almacenado en formaldehído (4%), glutaraldehído (3%) y sucrosa (30%) durante 48 horas (o más). Luego, secciones (80 μ m) fueron hechas con un criótomo y fijadas sobre portaobjetos de vidrio para un análisis posterior, incluyendo mapas histológicos y reconstrucción neuronal (NeuroLucida, MicroBrightfield, Inc.). De esta manera se determinó el sitio de estimulación, la eventual presencia de lesiones debida a la estimulación, la región cortical y el tipo neuronal estudiado.

2.5. Paradigmas experimentales

Frecuencia

Se evaluaron cuatro valores de frecuencia distintos en su capacidad de inducir plasticidad sináptica, a saber: 1 Hz (oscilación lenta), 10 Hz (husos), 40 Hz (banda gamma) y 100 Hz (ripples). Estos valores de frecuencia fueron elegidos con la intención de imitar actividades que ocurren en estado fisiológico, y por esa misma razón no fueron evaluados otros (ver Revisión Bibliográfica).

La intensidad de estimulación se ajustó de acuerdo a cada caso, de modo de obtener una respuesta subumbral (que no genere potenciales de acción) estable en el

tiempo. Una vez logrado esto, se registró un número variable de muestras, en general entre 10 y 30. Dicho control fue obtenido estimulando a baja frecuencia (0.33-0.5 Hz). Hecho esto, se realizó el periodo de condicionamiento con un tren de 5-10 estímulos (en general 5) a distintas frecuencias (frecuencias internas de cada tren de estímulos de 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz, etc.), cada tren se repitió una vez por segundo (1 Hz) durante un minuto (otros protocolos de condicionamiento fueron evaluados, pero no siendo observada una gran diferencia en cuanto a la inducción de plasticidad sináptica se decidió conservar el aquí descrito para el resto de los experimentos). Por ejemplo, para un protocolo de condicionamiento tipo de 10 Hz, se aplicó un tren inicial de 5 estímulos, donde cada estímulo estuvo separado del siguiente en 100 ms (esto es, la frecuencia intra-tren fue de 10 Hz); a su vez, los distintos trenes estuvieron separados por 1 s (esto es, la frecuencia inter-tren fue de 1 Hz). Siendo que se estimuló durante un minuto, 60 trenes de condicionamiento fueron aplicados. Inmediatamente finalizado el período de condicionamiento, se registró nuevamente la respuesta a un solo estímulo (a baja frecuencia) y se tomó un número de muestras similar al control para poder compararlas posteriormente.

Vías aferentes

En el presente estudio se evaluaron tres vías aferentes, a saber: corteza ipsilateral, corteza contralateral homotópica y tálamo. Esta decisión obedece a la organización de la red tálamocortical. Una región cualquiera de la corteza, tiene conexiones internas (ipsilateral), está conectada además en forma recíproca con su par

homotópico en el hemisferio opuesto (contralateral) y con al menos un núcleo talámico específico (Steriade, 1997).

Áreas corticales

Debido a que las regiones corticales son homogéneas en cuanto a sus tipos celulares, pero no en cuanto a sus funciones y estructura en algunos casos, se considera posible que haya diferencia en la expresión de plasticidad sináptica entre ellas (Castro-Alamancos et al., 1995). Para evaluar esto, se realizaron registros intracelulares en distintas regiones corticales mientras se estimulaban vías aferentes correspondientes (para la corteza motora el núcleo talámico ventrolateral y para la corteza somatosensorial el núcleo lateroposterior). Se compararon los resultados obtenidos en la corteza somatosensorial (áreas 5 y 7) y la corteza motora (áreas 4 y 6). Debido a que estas regiones corticales cumplen funciones fisiológicas distintas en cuanto al procesamiento de información sensorial, se consideraba plausible (aunque no necesario) que haya algún tipo de diferencia en la expresión de plasticidad sináptica entre ambas. Como se mostrará más adelante, esta suposición no encontró cabida alguna en los resultados experimentales del presente estudio.

Integración sináptica

Esta sección del trabajo se realizó solamente en preparaciones agudas, es decir en animales anestesiados.

Las proyecciones talámicas sobre la corteza son todas excitatorias y arriban fundamentalmente sobre las espinas de las dendritas distales de las neuronas piramidales (capas III-IV). Por otra parte, las proyecciones intracorticales contactan básicamente las dendritas proximales (excitatorias) y el soma (inhibitorias) (fig. 11) (DeFelipe & Farinas, 1992). Esta organización espacial específica sugiere que el impacto sináptico de cada vía (cortijo-cortical vs. tálamo-cortical) es distinto.

Para abordar el tema de la integración cortical se utilizó el conocido protocolo de pulsos pareados, sólo que en este caso se acoplaron estímulos de vías heterosinápticas (tálamo y corteza) en distintos intervalos temporales (entre 0 y 200 ms en general). Para cada intervalo temporal se evaluó el efecto del primer estímulo (condicionante) en la respuesta sináptica al segundo (control).

2.6. Análisis de datos

Todos los análisis de datos se realizaron con el programa Igor Pro 4.0. Para todos los experimentos de plasticidad sináptica el análisis fue similar. Se realizó un promedio de las respuestas sinápticas intracelulares obtenidas, antes y después del protocolo de condicionamiento, y se compararon inicialmente en varios parámetros (amplitud, duración, área, constantes de activación e inactivación). Los primeros resultados mostraron que los cambios más significativos ocurrían en la amplitud de la respuesta y por este motivo se consideró este parámetro en forma casi exclusiva para los posteriores análisis de resultados.

Hubo casos en que la red tálamocortical mostró una actividad tal, que no fue posible obtener respuestas subumbrales constantes en el tiempo (sobre todo en preparaciones crónicas donde el sueño es natural), para estos casos se comparó la probabilidad de generar potenciales de acción, antes y después del condicionamiento.

En la serie final de experimentos se calculó además la duración del cambio en la respuesta después del protocolo de condicionamiento. En todos los casos, se consideraron para el análisis solamente las neuronas que no variaron significativamente su potencial de membrana después del protocolo de condicionamiento y que cumplen los requisitos especificados mas arriba.

Para los experimentos de integración sináptica el análisis fue el siguiente. En primer lugar fue necesario obtener registros estables de neuronas que exhibieran respuestas tanto a estimulación talámica como cortical. Para cada caso se realizó un test para comprobar que los estímulos (cortical y talámico) fueran independientes, es decir que activaran vía sinápticas distintas, como de hecho se esperaba. De este modo se excluyó la posibilidad de que la activación del primer estímulo (condicionante) produjera un período refractario presináptico sobre el segundo estímulo (control). Para realizar este test se estimulan ambas vías al mismo tiempo y se calcula la pendiente ($\Delta V/\Delta t$) de la fase inicial de la respuesta, los estímulos se consideraron independientes si la pendiente de la respuesta (al estimular ambas vías) era de un valor de por lo menos el 80% de la suma aritmética de las pendientes de las respuestas individuales (fig. 45) (Pouille & Scanziani, 2001; Berger & Luscher, 2003). Aquellos casos que no

cumplieron con este test no fueron considerados para análisis posterior, de modo que los resultados aquí presentados se refieren sólo a vías sinápticas independientes. Luego, se calculó el cambio en el tiempo de amplitud y área de la respuesta al estímulo control, al ser acoplado el estímulo condicionante.

Todos los datos se compararon estadísticamente mediante la aplicación de un t-test. Conjuntos de datos para los que $p > 0.05$ no se consideraron significativos y sus diferencias fueron tomadas como nulas.

3. RESULTADOS

Los resultados principales del presente trabajo son los siguientes:

- La probabilidad de producir un cambio en la respuesta sináptica en una preparación *in vivo* es baja en comparación con preparaciones *in vitro*.
- Los valores preferenciales de frecuencias para la inducción de cambios plásticos en las respuestas sinápticas dependen de la vía aferente estimulada. En otras palabras, no hay una frecuencia preferencial para inducir plasticidad, sino un compromiso entre la vía de activación y la frecuencia del estímulo.
- La vía cortical contralateral parece ser una vía preferencial para la expresión de cambios plásticos en la respuesta sináptica, especialmente a altas frecuencias de estimulación (>100 Hz).
- Bajas frecuencias (10 Hz) son más efectivas en la inducción de cambios plásticos de las respuestas sinápticas en vía corticocorticales ipsilaterales.

- Altas frecuencias (100 Hz) son más efectivas en la inducción de cambios plásticos en las respuestas sinápticas en las vías tálamo-corticales. Tales cambios son principalmente facilitación de la respuesta.
- No se observó una diferencia significativa en la capacidad de inducir cambios plásticos en las respuestas sinápticas entre áreas corticales distintas.
- Períodos de sueño natural separados por etapas de vigilia pueden transformar plásticamente las respuestas sinápticas.
- Inhibición por activación de conductancias es la única interacción que ocurre cuando se estimulan en forma pareada corteza y tálamo, en que el estímulo condicionante siempre produce depresión de la respuesta al estímulo control.

Por razones de orden práctico, los resultados serán presentados en dos secciones.

La primera parte versará sobre los experimentos orientados al estudio de plasticidad sináptica en la corteza, incluyendo los distintos protocolos para evaluar frecuencias, vías aferentes y regiones corticales; sobre todo en preparaciones agudas, pero también crónicas. A continuación se presentarán los experimentos realizados sobre integración temporal de las respuestas sinápticas en la corteza.

3.1. Plasticidad Sináptica

Base de datos y estabilidad de las respuestas sinápticas en registros de larga duración

Neuronas corticales ($n = 101$) fueron registradas por largos períodos (30-120 minutos) en las regiones asociativas (áreas 5 y 7) y motoras (áreas 4 y 6) de la corteza, en animales anestesiados con somnotol o ketamina-xylazina ($n = 96$), o bajo condiciones de sueño natural ($n = 5$). Las neuronas fueron registradas a profundidades variando entre 0.3 y 2.3 mm por debajo de la superficie cortical, lo cual sugiere que todas de las capas neuronales fueron estudiadas en el presente trabajo. Sin embargo, la mayoría de las neuronas (67%) fueron registradas a profundidades entre 1 y 1.5 mm. Por tanto la mayoría de los registros corresponden a las capas V/VI de la corteza. El potencial de membrana en reposo fue $V_m = -74 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$ ($n = 50$) y en todos los casos se registraron potenciales de acción sobrepasando 0 mV. Las neuronas registradas mostraron respuestas a la estimulación de una o varias de las vías aferentes estimuladas, a saber: cortical ipsilateral, cortical contralateral o tálamo-cortical.

Sólo fueron analizadas neuronas que presentaron un potencial de membrana estable a lo largo del registro. La estabilidad del potencial de membrana es crítica en estudios de plasticidad sináptica de este tipo, pues las respuestas neuronales son claramente afectadas por cambios en los potenciales de membrana. La figura 14 muestra ejemplos de dichos registros de larga duración y de gran estabilidad. Dos neuronas RS (*regular spiking*) (fig. 14,A,B) y una neurona FRB (*fast rhythmic bursting*) (fig.14C)

fueron registradas por largos períodos juntos con sus respuestas sinápticas a la estimulación cortical contralateral. Nótese que el potencial de membrana no cambió en ningún caso en más de 1-2 mV, y los PEPSs evocados se mantuvieron constantes. Las largas latencias de los PEPSs evocados por estimulación contralateral (~5 ms) observados en varias ocasiones, no se debe a un circuito poli sináptico sino a la lenta velocidad de conducción de los axones del cuerpo caloso, que presentan latencias de invasión antidrómica de hasta 18 ms en algunos casos (Siseé et al. 2003).

3.1.1. Sueño Inducido (anestésicos)

Esta sección presenta los resultados obtenidos de experimentos realizados en preparaciones agudas, es decir animales que fueron anestesiados ya sea con somnotol o ketamina-xylazina. Neuronas corticales fueron identificadas y registradas en las regiones asociativas (áreas 5, 7 y 21) y motoras (4 y 6) en todos los casos.

La Oscilación lenta

La posibilidad de que tal baja frecuencia sea capaz de producir algún cambio en las respuestas sinápticas se debe a que es el ritmo predominante durante el sueño lento. Por este motivo, estimulación a baja frecuencia (1 Hz y menor) fue evaluada en registros de larga duración (30-120 minutos) de maneras distintas.

Para esta frecuencia se evaluaron dos protocolos distintos. Una primera aproximación consistió en estimular vías aferentes corticales a 1 Hz en forma continua por períodos de hasta dos horas y paralelamente hacer un seguimiento de la respuesta.

Un ejemplo de este protocolo se puede apreciar en la figura 12, en que una neurona corticotálámica fue identificada por invasión antidrómica al estimular el núcleo talámico lateral posterior. Estimulación a alta frecuencia (3 estímulos a 100 Hz) demuestra que el potencial de acción generado es de hecho antidrómico y no ortodrómico debido a activación sináptica (fig. 12). La intensidad de estimulación se ajustó para tener en todos los casos un potencial de acción antidrómico (fig. 12), sin embargo nótese que después de éste hay siempre una activación sináptica debido la recurrencia del sistema tálamocortical (Edelman & Tononi, 2000). A pesar de que la respuesta sináptica que sigue a la activación antidrómica mostró gran variabilidad, esta se mantuvo en el mismo rango de amplitud durante toda la duración del registro (fig. 12). Este mismo protocolo se utilizó con otras frecuencias del rango de la oscilación lenta (0.2 Hz, 0.33 Hz, 0.5 Hz) y en todos los casos el resultado fue el mismo (resultado no mostrado). Este tipo de experimento mostró que la respuesta sináptica no es afectada por estimulación a muy baja frecuencia (1 Hz o menor) y permitió utilizarla como control para los demás experimentos.

En el segundo protocolo utilizado, se realizó un período de control a muy baja frecuencia (0.2-0.5 Hz) y luego el condicionamiento se hizo a 1 Hz (10-30 estímulos). En la figura 13 se muestra un registro intracelular que ejemplifica este protocolo. La neurona registrada fue estimulada desde una región cercana de la corteza ipsilateral a 0.5 Hz (fig. 13), después de aplicar un protocolo de condicionamiento (10 estímulos a 1 Hz, fig. 13), no hubo un cambio apreciable en la respuesta sináptica (fig. 13).

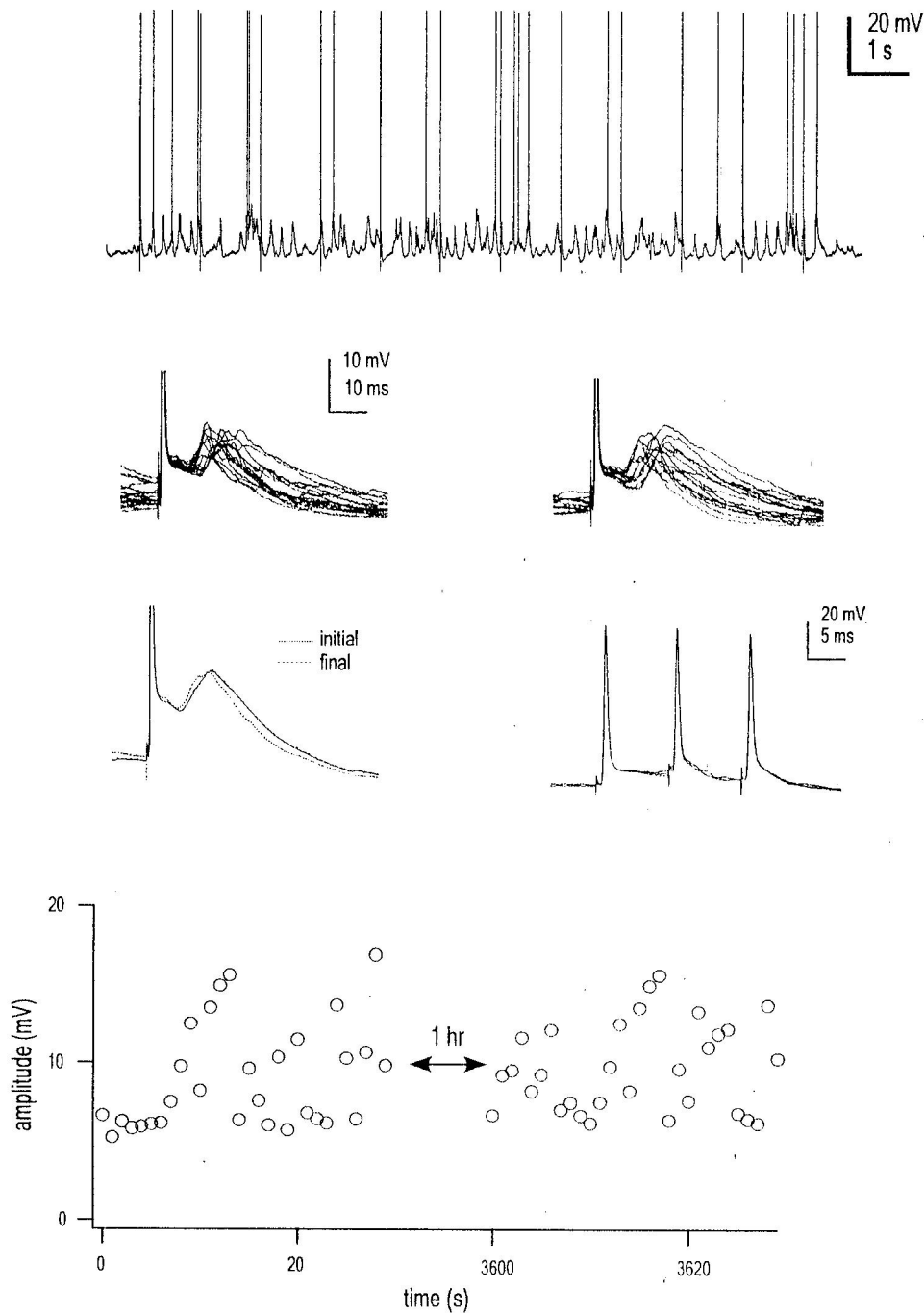


Figura 12. Ausencia de cambios en respuestas evocadas al estimular a muy bajas frecuencias. Registro realizado bajo barbitúrico. Registro intracelular de una neurona del área 5. Estimulación del núcleo talámico lateral posterior (LP) produce un potencial de acción antidrómico, seguido de activación sináptica. Se muestra una superposición de respuestas al principio (izquierda) y al final (derecha) de una hora de estimulación continua a 1 Hz. Más abajo los promedios ($n = 50$) de las respuestas muestran ausencia de cambios en las respuestas. 3 estímulos a 100 Hz identifican la respuesta inicial como un potencial antidrómico. Abajo se muestra la amplitud de la respuesta sináptica en el tiempo.

La validez de este enunciado se extendió ulteriormente, pues se verificó en experimentos posteriores que independiente de la vía aferente estimulada (corteza ipsilateral, corteza contralateral o tálamo) o del anestésico utilizado (barbitúrico o ketamina-xylazina), la frecuencia de 1 Hz no produjo cambios en la respuesta sináptica, ni en amplitud ni en curso temporal (tablas 1-5). Este mismo tipo de preparaciones demostró la estabilidad y calidad de los registros intracelulares aquí presentados, pues las variaciones en el V_m fueron mínimas, así como la amplitud de las respuestas sinápticas, a pesar de los largos períodos de registro. Este mismo punto será nuevamente mencionado más adelante en el estudio de la vía cortical contralateral, donde se obtuvo plasticidad sináptica con mayor frecuencia.

Estos resultados muestran que muy bajas frecuencias (1Hz y menor), que pretenden imitar la oscilación lenta que ocurre espontáneamente durante el sueño lento, no son capaces de inducir plasticidad sináptica en la corteza bajo las condiciones experimentales aquí utilizadas.

Vías aferentes

Como se indicó al inicio de la sección, la capacidad de inducir plasticidad sináptica parece ser un compromiso entre la vía aferente estimulada y la frecuencia de estimulación. Los resultados de experimentos realizados en preparaciones agudas mostraron que la corteza contralateral exhibió la mayor eficiencia en cuanto a inducción de plasticidad sináptica. A altas y bajas frecuencias el resultado fue consistentemente una facilitación de la respuesta sináptica (en todos los casos PEPSs). Por otro lado, las

vías corticales ipsilaterales produjeron cambios mixtos a bajas frecuencias (10 Hz) mientras que las vía tálamocorticales lo hicieron preferencialmente a altas frecuencias (100 Hz).

Corteza contralateral

Prácticamente todas las frecuencias de estimulación aplicadas en esta vía produjeron potenciación de las respuestas sinápticas (PEPSs en todos los casos). Tal potenciación se mantuvo por 5-30 minutos señalando cambios plásticos de mediana duración.

Primero, se presentará la base de datos y se documentará la estabilidad del potencial de membrana y los PEPSs evocados por estimulación contralateral durante los largos períodos de registro utilizados. Luego, se mostrarán resultados obtenidos al estimular la corteza contralateral con protocolos de condicionamiento de entre 10 Hz y 40 Hz, para comparar los efectos de estas frecuencias en los PEPSs. Finalmente, se muestran los resultados de la aplicación de protocolos condicionantes con valores de frecuencia en incrementos (desde 10 Hz hasta 500 Hz) y luego en decrementos (desde 500 Hz hasta 10 Hz).

Base de datos y estabilidad de las respuestas sinápticas en registros de larga duración

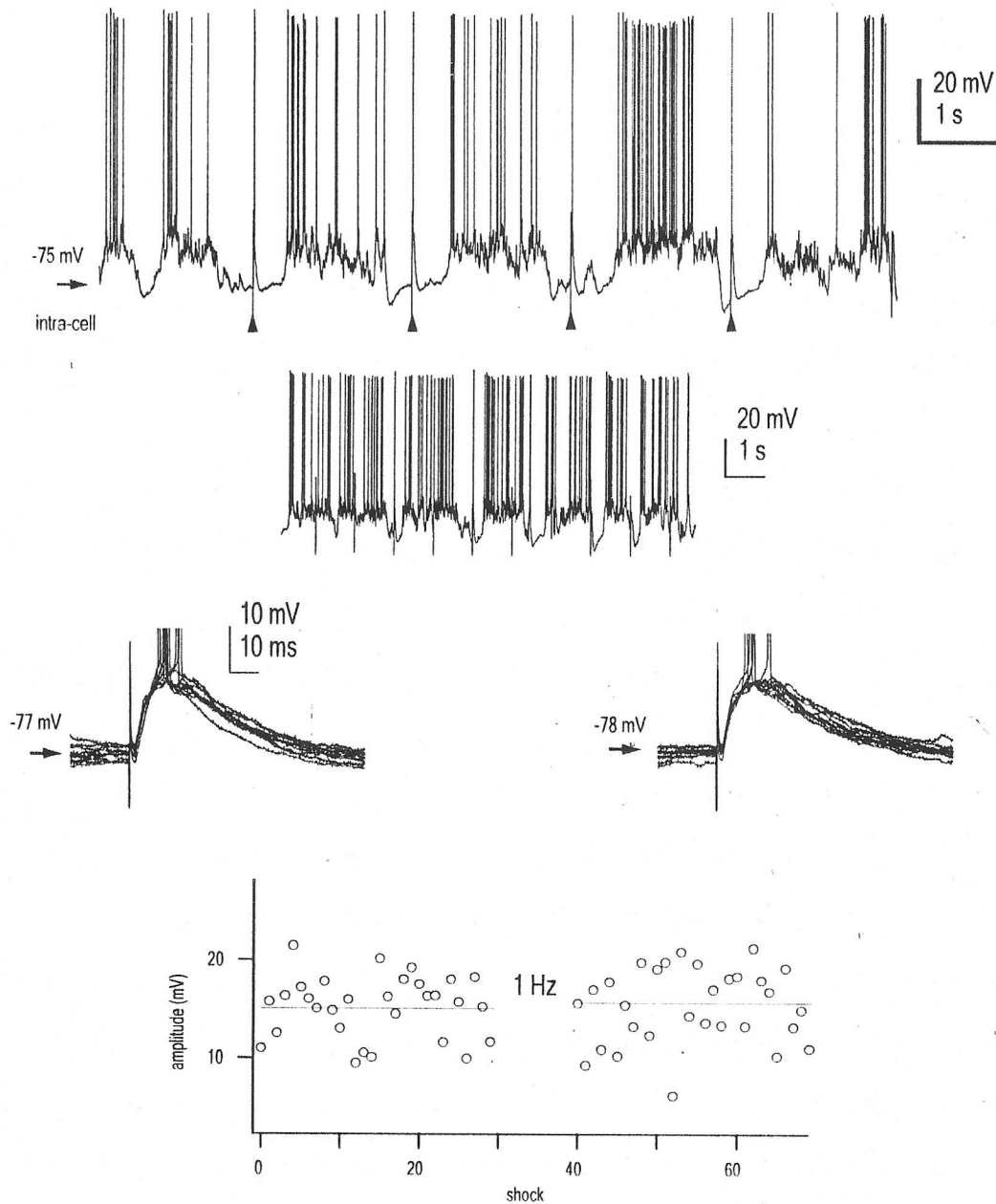


Figura 13. Ausencia de cambios en respuestas evocadas al estimular a muy bajas frecuencias. Registro realizado bajo ketamina-xylazina. Registro intracelular de una neurona del área 5. Estímulos individuales fueron aplicados cada 2 s. Estimulación del núcleo talámico lateral posterior (LP) produce una respuesta excitatoria de gran amplitud (PEPS), que ocasionalmente da lugar a potenciales de acción. Se muestra una sobreposición de respuestas antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento a 1 Hz. Abajo se muestra la amplitud de la respuesta sináptica en el tiempo, antes y después de estimular a 1 Hz.

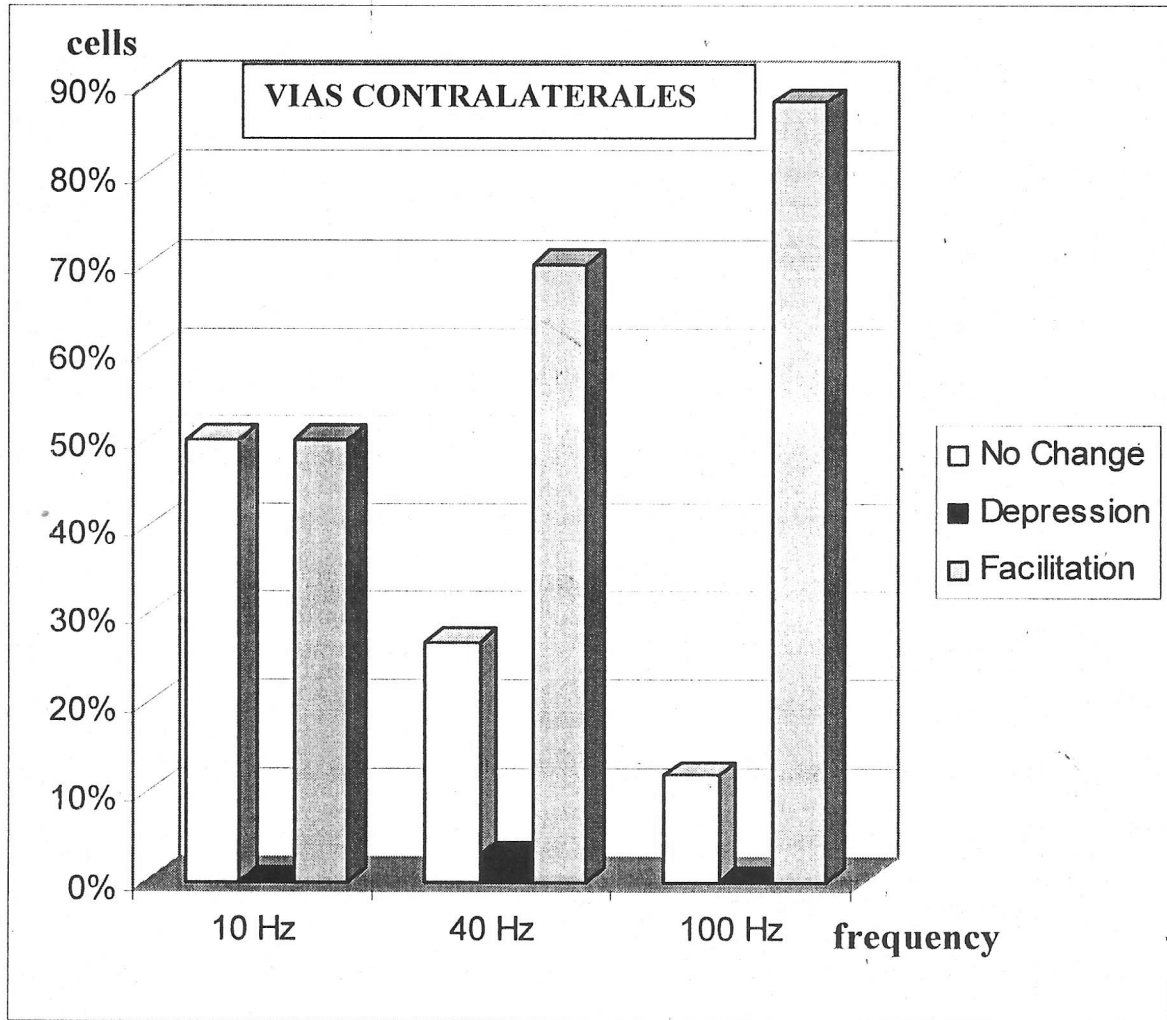
Neuronas corticales ($n = 40$) fueron registradas por largos períodos (30-120 minutos) en las áreas 5 y 7, de la corteza asociativa. El potencial de membrana en reposo fue $V_m = -72 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$ y sus fluctuaciones no excedieron 1-2 mV (fig. 14). De las 40 neuronas registradas 32 fueron RS, 5 FRB y 3 IB (*intrinsically bursting*), identificadas por sus patrones de descarga ante pulsos cuadrados de corriente positiva. Los resultados obtenidos en esta sección se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Plasticidad sináptica en vías corticales contralaterales

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1	0	19	22		5/7
2	0	0	0		5/7
3	0	0	44		5/7
4	0	0	0		5/7
5	0	52	42		5/7
6	0	30	0		5/7
7	0	92	24	0	5/7
8		0	0	62	5/7
9		0	28	21	5/7
10		0	0	52	5/7
11		13	27	0	5/7
12		109	0	0	5/7
13		0	30	35	5/7
14		15	37		5/7
15		0			5/7
16		17	0	52	5/7
17		25			5/7
18		13	30	49	5/7
19		10	29	60	5/7
20		0	35	77	5/7
21		13	40	66	5/7
22		0	37	49	5/7
23		0	11	24	5/7
24		109	106	133	5/7

25		46	55		5/7
26		31	93		5/7
27			45	91	5/7
28		52	66		5/7
29		0	51		5/7
30		0	0	18	5/7
31				75	5/7
32				138	5/7
33				60	5/7
34				49	5/7
35		0	16	63	5/7
36		0	18	84	5/7
37		9	29		5/7
38			0	157	5/7
39		9	0	71	5/7
40		0	-21	6	5/7
No cambio	100%	50%	27%	12%	
Depresión	0%	0%	3%	0%	
Potenciación	0%	50%	70%	88%	

Table 1



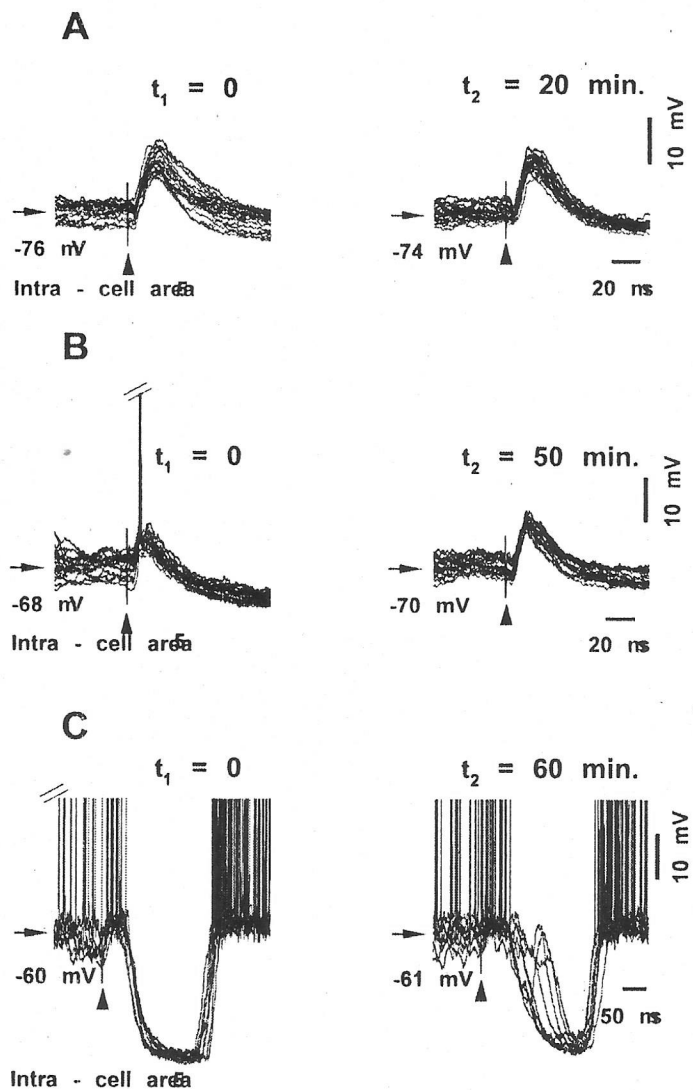


Figura 14. Estabilidad del potencial de membrana y los PEPSSs evocados por estimulación de vías corticales contralaterales. Respuestas de tres experimentos distintos, todos bajo barbitúricos. A-B, células RS, C FRB. Estímulos individuales fueron aplicados cada 2 s en el área 5 del hemisferio derecho, y los registros se hicieron en la misma área del hemisferio izquierdo. En todos los casos, los PEPSSs son comparados al principio (t_1) y al final (t_2) del registro. Nótese solo cambios menores en el potencial de membrana, así como en las respuestas sinápticas.

Las neuronas que mostraron respuestas a la estimulación contralateral se encontraron en su mayor a profundidades entre 0.3-1.5 mm de la corteza. Esta amplia distribución que abarca diversas capas corticales (II-IV) es consistente con resultados morfológicos y fisiológicos que muestran que las proyecciones contralaterales a través del cuerpo calloso están ubicadas no sólo en las capas II/III, sino también en capas infragranulares (Barbaresi et al. 1994; Innocenti 1986; Innocenti et al. 2002).

Se ha descrito que las respuestas sinápticas de neuronas FRB a la estimulación contralateral muestran amplitudes dos o tres veces mayores, y latencias dos o tres veces menores que las respuestas de otros tipos neuronales (Cissé et al. 2003). Este tipo de PEPSs fueron también observados en los presentes experimentos. La figura 14 muestra una de tales neuronas en que se puede apreciar un PEPS inducido por estimulación contralateral de gran amplitud (~ 12 mV) y corta latencia (~ 1.4 ms).

Potenciación de PEPSs evocados por estimulación contralateral a distintas frecuencias

Estímulos eléctricos individuales fueron aplicados a la corteza contralateral a muy baja frecuencia (0.3-1 Hz) para evocar PEPSs en neuronas corticales. Una vez colectado el control (20-40 estímulos) se aplicó el protocolo de condicionamiento consistente en 10 trenes, separados por 2-3 s, a frecuencias de 10-20 Hz (fig. 15) o mayores, 40-100 Hz (fig. 19). Luego, estímulos individuales fueron nuevamente aplicados para evaluar los cambios en las respuestas sinápticas.

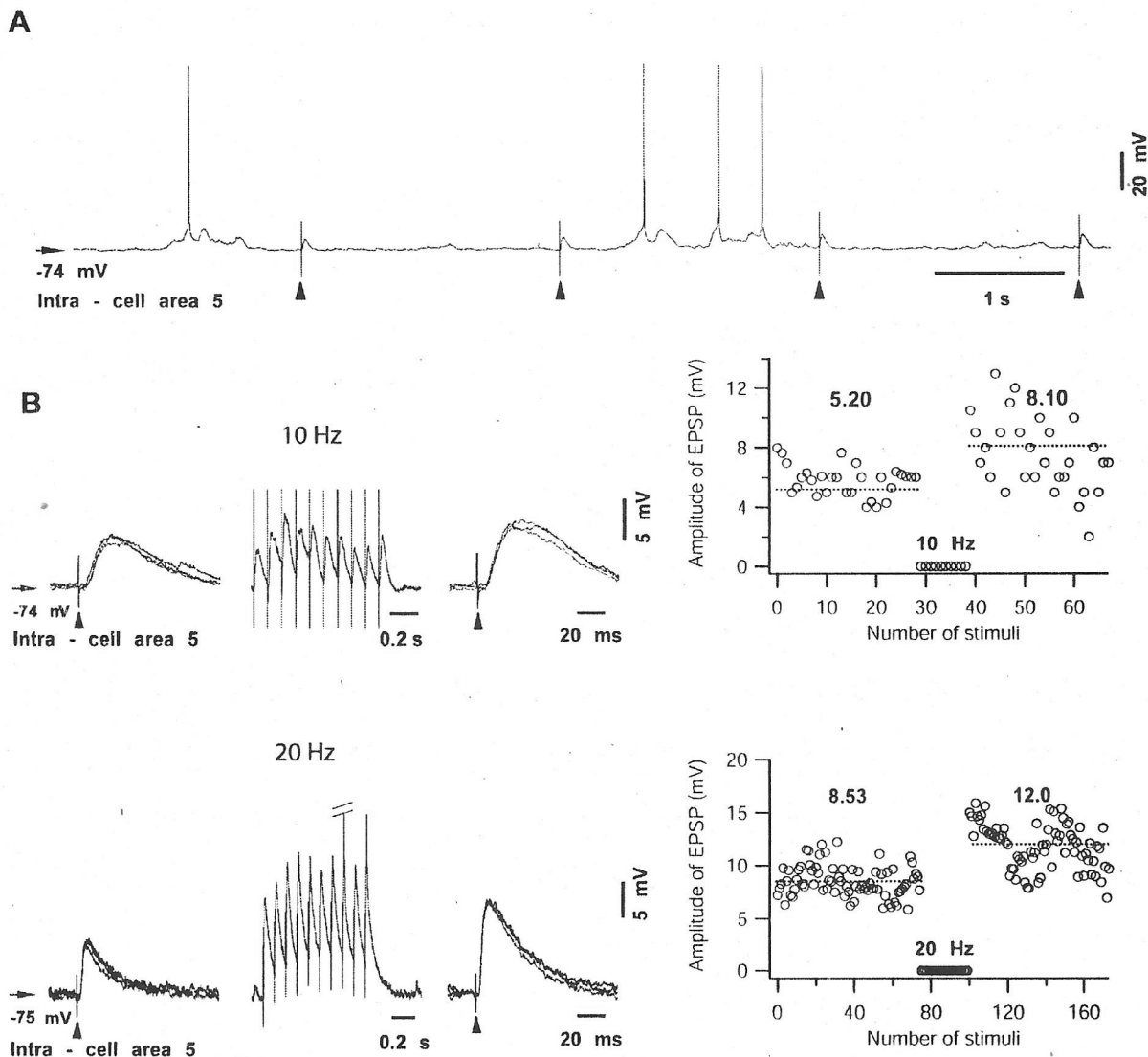


Figura 15. Potenciación de las respuestas evocadas por estimulación contralateral, luego de la estimulación rítmica a 10 Hz y 20 Hz. Registro bajo barbitúricos. A-B, dos neuronas RS. A, el trazo superior muestra la actividad espontánea de una neurona del área 5 y cuatro estímulos (flechas) aplicados cada 2 s. El panel medio muestra PEPSs evocados por la estimulación del sitio homotópico de la corteza contralateral en el área 5. Se muestran además, las respuestas obtenidas antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento a 10 Hz y 20 Hz. Nótese el patron cambiante de la amplitud de las respuestas durante el condicionamiento a 10 Hz. Los gráficos muestran la amplitud en el tiempo de las respuestas sinápticas, antes y después del condicionamiento. Las líneas punteadas indican el promedio de amplitud para cada caso.

El efecto del protocolo de condicionamiento fue facilitación de la respuesta sináptica en la gran mayoría de los casos (98%, 39 de 40 neuronas), independientemente de la frecuencia utilizada. Sin embargo, la evolución temporal de dicho cambio fue muy variable de una neurona a otra. Una potenciación *residual* fue observada en la mayoría de los casos, con una duración de hasta media hora después de la primera serie de trenes de estimulación del protocolo de condicionamiento (fig. 19).

Tales resultados de potenciación de los PEPSs evocados por estimulación cortical contralateral fueron estudiados en preparaciones con distintos anestésicos. Los experimentos mostraron que las condiciones bajo las cuales era posible inducir plasticidad sináptica eran sólo en preparaciones con barbitúricos. Experimentos realizados en animales anestesiados con ketamina-xylazina mostraron ausencia de cambios plásticos en las respuestas evocadas en forma independiente de la frecuencia de condicionamiento (fig. 16). Así pues, en todos los casos registrados en ketamina-xylazina ($n = 5$), no se observaron cambios en las respuestas sinápticas. Por este motivo, todos los resultados de esta sección corresponden exclusivamente a preparaciones de animales anestesiados con barbitúricos.

La inducción de plasticidad sináptica en la vía contralateral mostró una dependencia de la frecuencia. Así pues, altas frecuencias se mostraron más eficientes en la inducción de cambios en las respuestas sinápticas evocadas. La figura 17 muestra un ejemplo de una neurona cortical que mostró PEPSs estables en respuesta a la estimulación contralateral. La aplicación de un protocolo de condicionamiento a baja

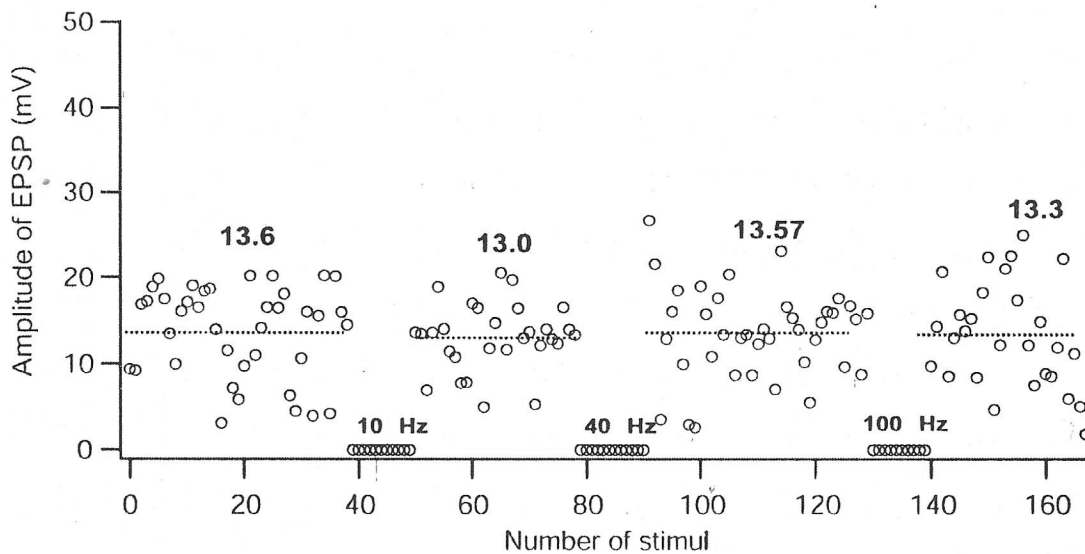
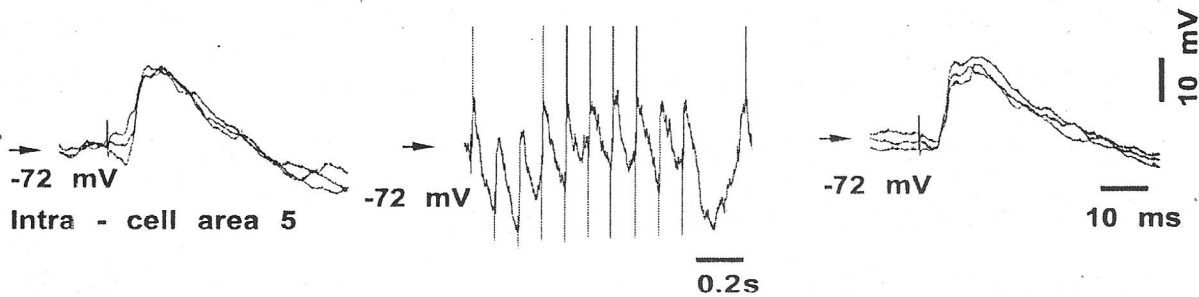


Figura 16. Ausencia de cambios de las respuestas evocadas por estimulación contralateral en preparaciones con ketamina-xylazina. Registro bajo ketamina-xylazina de una neurona registrada en el área 5. Trazos superiores muestran las respuestas antes y después del condicionamiento a 10 Hz. Nótese la ausencia de cambios en la amplitud de las respuestas evocadas. Abajo, el gráfico muestra la evolución temporal de la amplitud de los PEPSs evocados, luego de la aplicación de sucesivos protocolos de condicionamiento a distintas frecuencias. Nótese la ausencia de cambios para todas las frecuencias ensayadas.

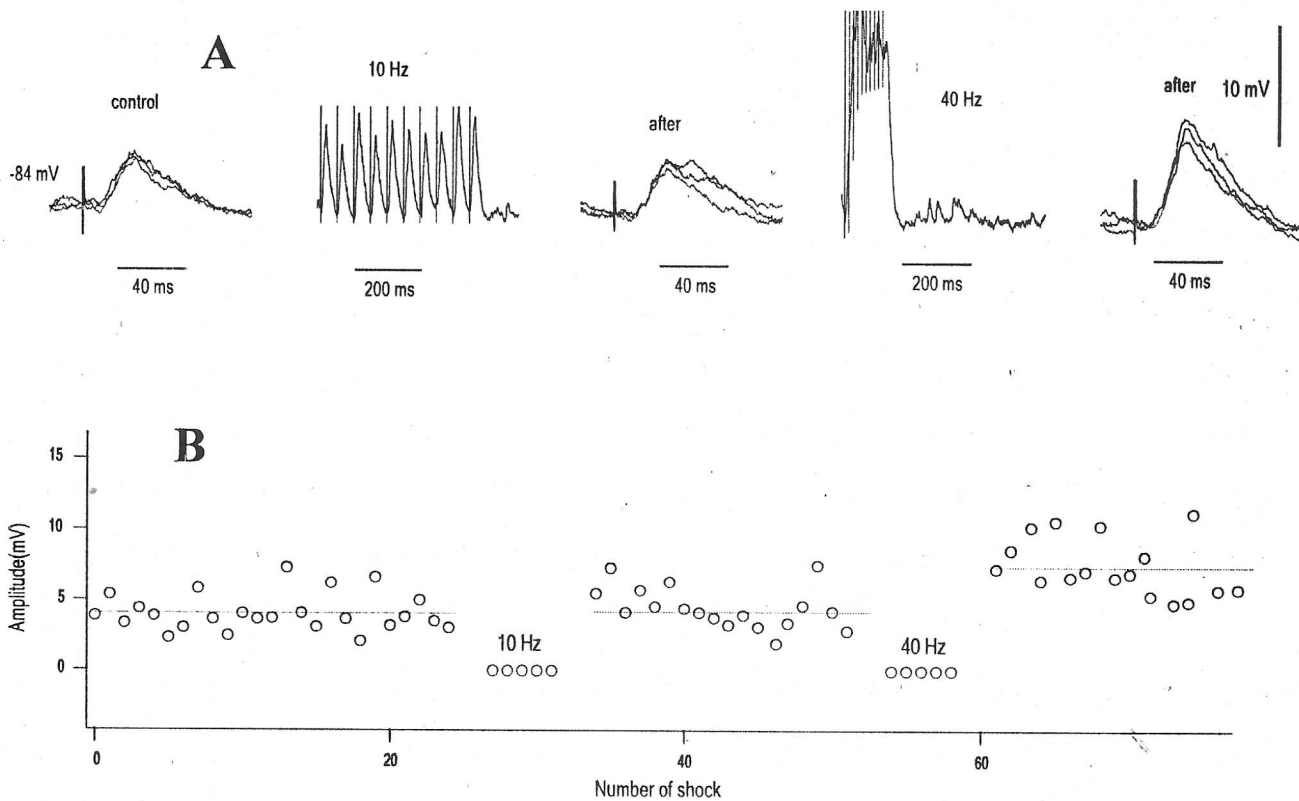


Figura 17. Facilitación de respuestas evocadas por estimulación cortical contralateral, después de la estimulación de vías contralaterales a 40 Hz. Registro realizado bajo barbitúrico. Registro intracelular de una neurona del área 5. A, superposición de respuestas sinápticas al estimular el área 5 contralateral, en forma individual o con un protocolo de condicionamiento a 10 Hz y 40 Hz. B, gráfico que muestra la variación de amplitud de las respuestas sinápticas después de la aplicación de cada protocolo de condicionamiento. Nótese que sólo la estimulación a 40 Hz es capaz de inducir facilitación en esta neurona.

frecuencia (10 Hz) no produjo ningún cambio en las respuestas excitatorias. Sin embargo, un aumento en la frecuencia de estímulos en el protocolo de condicionamiento generó un cambio apreciable en la magnitud de la respuesta.

Por otra parte, las frecuencias utilizadas en los protocolos de condicionamiento mostraron un efecto saturable en el sentido de que después de aplicado el tren de condicionamiento una sola vez, se obtenía la máxima respuesta posible para esa frecuencia. Esto se ilustra con un ejemplo en la figura 18, donde las respuestas excitatorias evocadas por estimulación contralateral fueron potenciadas por la aplicación de un tren de condicionamiento a 40 Hz. Después de 2 minutos de volvió a aplicar el mismo tren de condicionamiento y la respuesta no mostró una facilitación ulterior, sugiriendo un efecto saturable de los trenes de condicionamiento. Este mismo resultado se obtuvo al aplicar repetidas veces los trenes de condicionamiento a frecuencias más altas (100-200 Hz).

En algunas neuronas ($n = 12$), el protocolo de condicionamiento fue aplicado repetidamente a varias frecuencias para comparar su efecto (fig. 20). Frecuencias de 10 Hz o 20 Hz en el protocolo de condicionamiento produjeron aumentos similares en las respuestas sinápticas. Por ejemplo, las neuronas mostradas en la figura 15 mostraron un aumento similar (~50 %) en los PEPSs evocados después del protocolo de condicionamiento. En un subgrupo de neuronas ($n = 17$) estimuladas con trenes de 10-20 Hz en el protocolo de condicionamiento, en todos los casos hubo un aumento en la

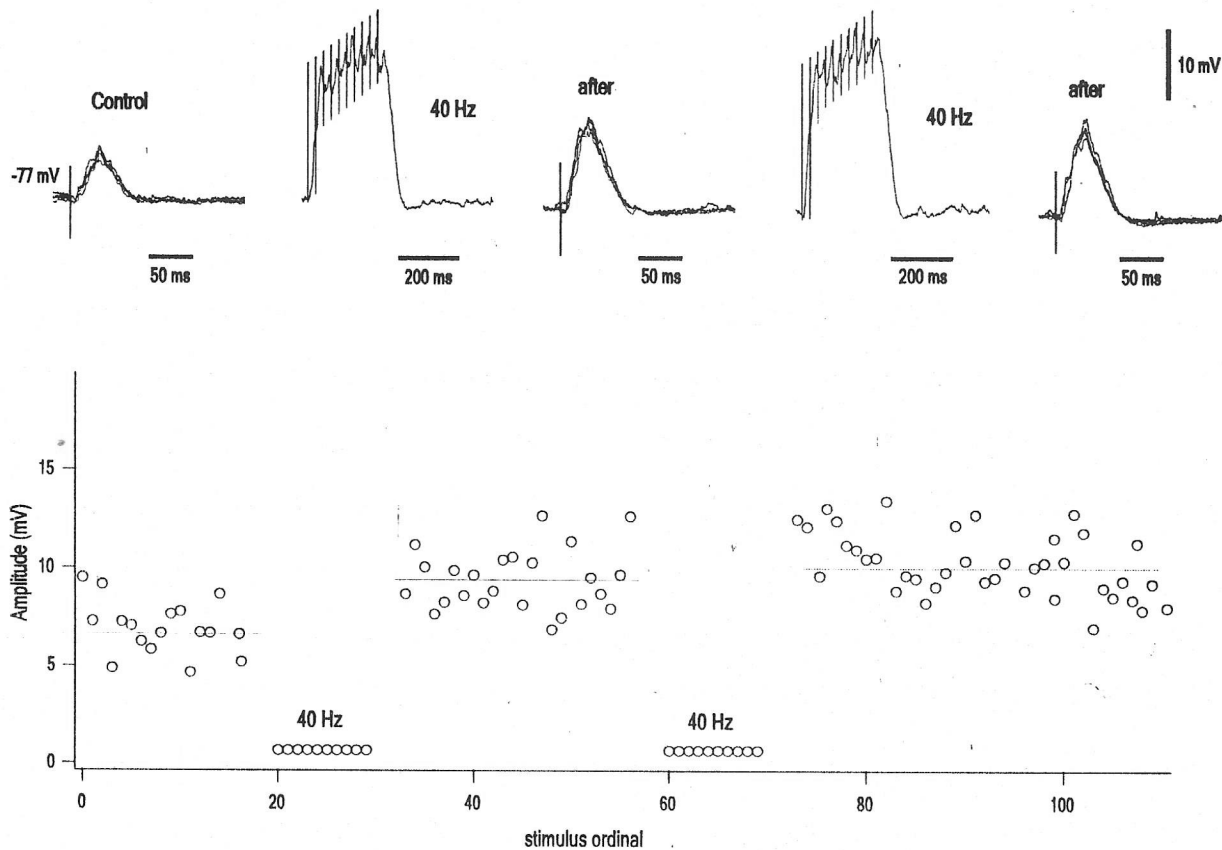


Figura 18. Saturación de la facilitación de respuestas evocadas por estimulación cortical contralateral. Registro realizado bajo barbitúrico. Registro intracelular de una neurona del área 5. A, superposición de respuestas sinápticas al estimular el área 5 contralateral, en forma individual o con un protocolo de condicionamiento a 40 Hz. B, gráfico que muestra la variación de amplitud de las respuestas sinápticas después de la aplicación de cada protocolo de condicionamiento. Nótese que la amplitud de la respuesta muestra un gran incremento después de la primera aplicación del protocolo, pero no después de la segunda.

amplitud del PEPS evocado (control, $5.4 \text{ mV} \pm 0.8 \text{ mV}$; y después del condicionamiento, $6.7 \text{ mV} \pm 0.9 \text{ mV}$), siendo la facilitación de un 24% en promedio.

Frecuencias mayores, como 40 Hz o 50 Hz, en el protocolo de condicionamiento produjeron aumentos similares al producido por frecuencias más bajas en las respuestas sinápticas evocadas. Nuevamente, en todos los casos ($n = 39$) se observó potenciación de los PEPSs evocados. La amplitud inicial de los PEPSs fue de $6.5 \text{ mV} \pm 0.7 \text{ mV}$, que aumentó a $7.9 \text{ mV} \pm 0.7 \text{ mV}$, después del condicionamiento. Esto representa un aumento promedio del 21% en la respuesta sináptica.

El curso temporal de la facilitación del PEPS evocado presentó variaciones de una neurona a otra. Por ejemplo, la primera neurona mostrada en la figura 19 presentó una potenciación en la respuesta que persistió por ~ 4 minutos, mientras que la otra neurona (fig. 19) mostró una facilitación que aumentó progresivamente en el tiempo, inicialmente $\sim 35\%$ para alcanzar $\sim 50\%$ después de 13 minutos; y permaneció en este nivel hasta el final del registro (~ 30 minutos).

La facilitación *residual* de los PEPSs evocados se mantuvo por 15-30 minutos ($n = 27$). Un ejemplo de tales casos se muestra en la figura 20, donde se compara el efecto producido por dos rangos de frecuencia, 10 Hz y 40 Hz. La neurona mostrada presentó una potenciación de $\sim 15\%$ a 10 Hz, que duró por ~ 25 minutos. Mientras que la estimulación a 40 Hz produjo un incremento sobre la respuestas ya potenciada de un $\sim 19\%$.

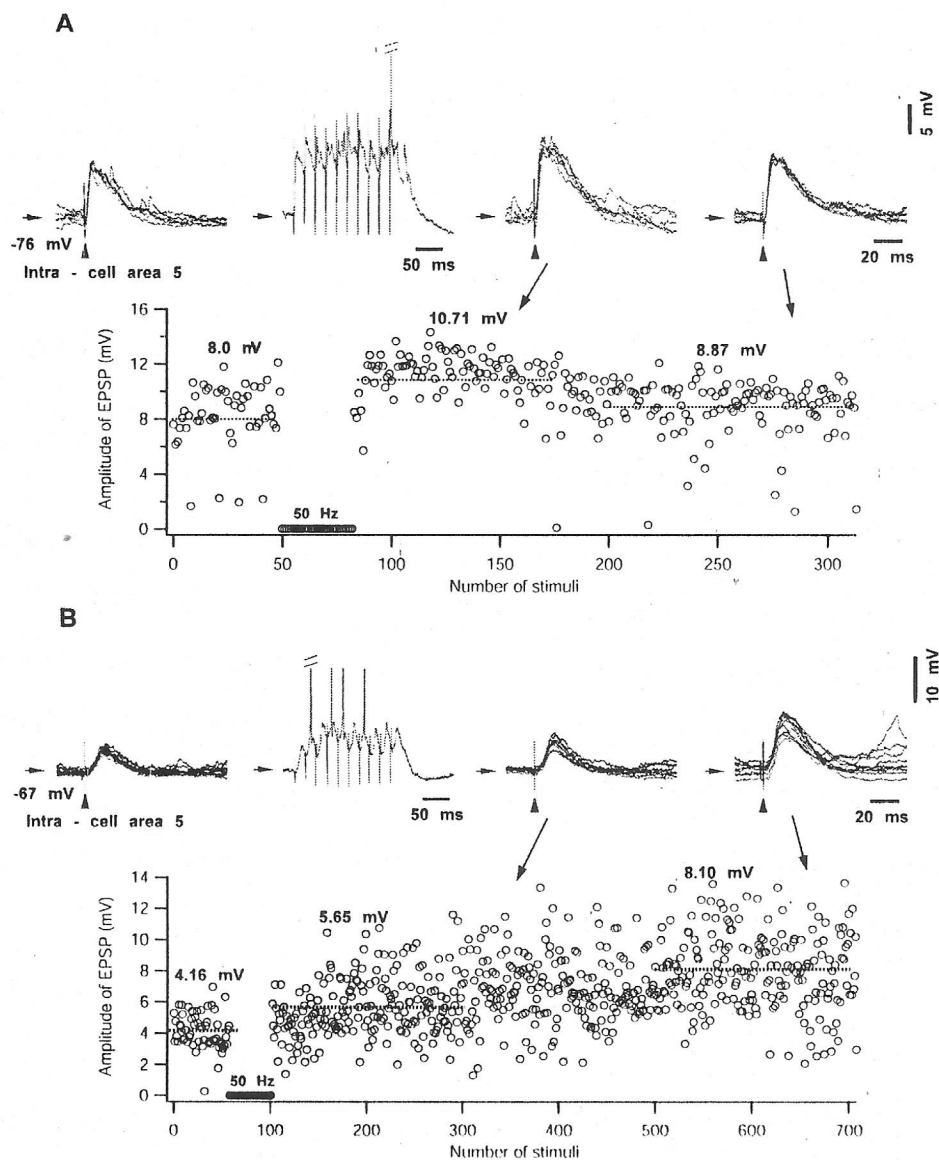


Figura 19. Curso temporal de la facilitación inducida en vías corticales contalaterales. Registro bajo barbitúricos. Potenciación de PEPSs luego del condicionamiento a 50 Hz aplicado en las vías contralaterales. Dos neuronas distintas en A y B. En A la potenciación fue máxima inmediatamente después del condicionamiento y permaneció por cerca de 5 minutos, mientras que en B, la facilitación se manifestó progresivamente en aumento, y permaneció por cerca de 60 minutos (la duración total del registro). Nótese la generación de potenciales depolarizantes sostenidos durante el condicionamiento.

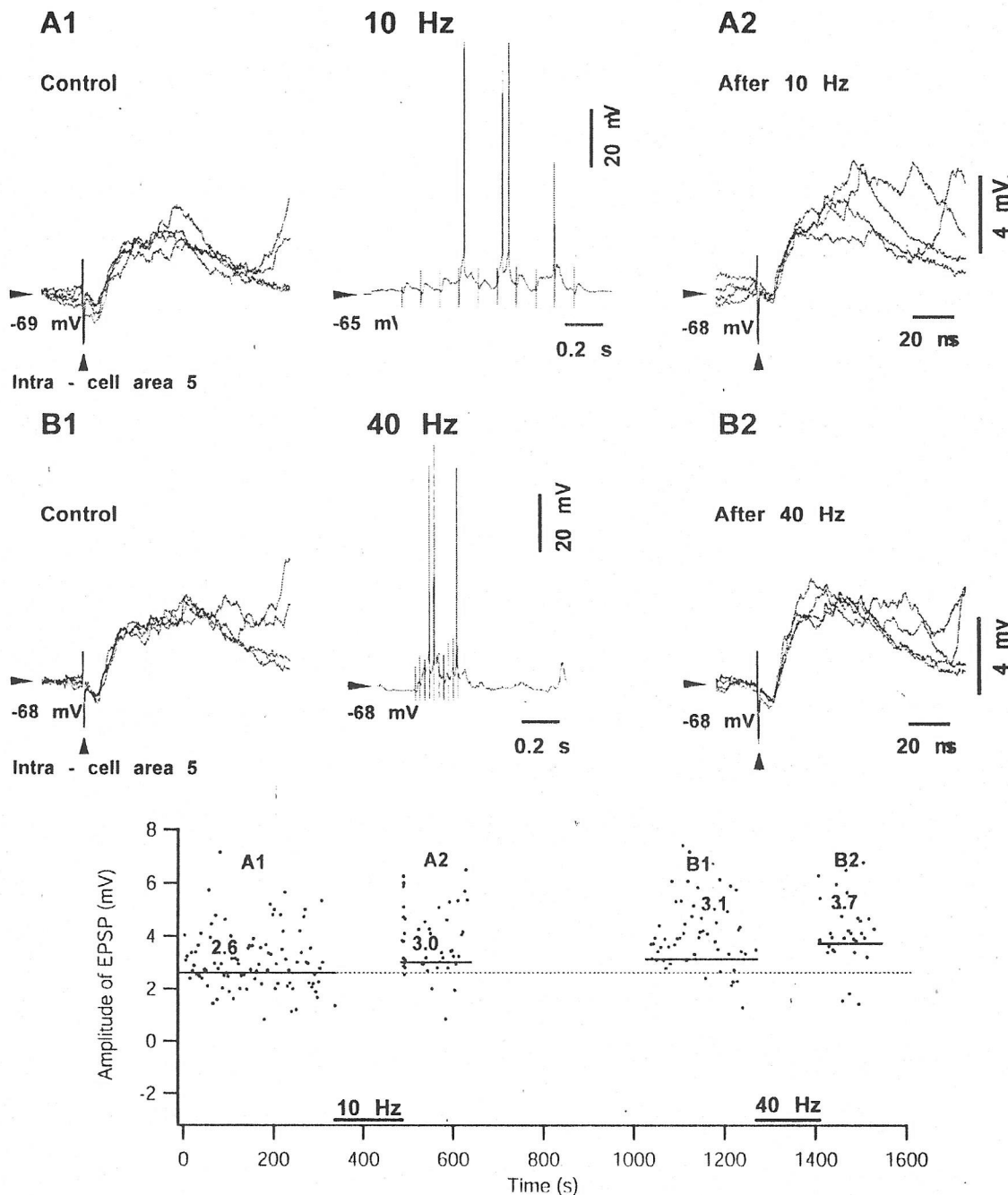


Figura 20. Facilitación progresiva por trenes de condicionamiento de frecuencias en aumento. Registro bajo barbitúricos. Estímulos individuales y trenes de condicionamiento se aplicaron cada 3 s. El panel superior muestra las respuestas a estímulos control individuales (la inflexión negativa inicial es un reflexión del potencial presináptico), antes y después del condicionamiento a 10 Hz. El panel medio tiene el mismo arreglo, pero el condicionamiento fue aplicado a 40 Hz. El gráfico de más abajo muestra la evolución temporal de las respuestas sinápticas evocadas.

Potenciación de respuestas sinápticas por trenes de condicionamiento repetitivos a distintas frecuencias

En esta serie de experimentos, trenes de estímulos condicionantes fueron aplicados a distintas frecuencias, en aumento y decremento. Es decir, de bajas frecuencias a altas frecuencias y luego de altas frecuencias a bajas frecuencias (fig. 21). Los resultados de la figura 21 muestran una facilitación progresiva del PEPS evocado al estimular desde 10 Hz hasta 70 Hz, y una depresión continua de la respuesta al estimular desde 70 Hz hasta 10 Hz. Si la estimulación condicionante se iniciaba con frecuencias más altas, potenciación de la respuesta se indujo sólo con los primeros trenes de condicionamiento y luego esta fue deprimida por los subsiguientes trenes de condicionamiento (fig. 21).

La aplicación de protocolos condicionantes de frecuencias en incremento (10 Hz hasta 500 Hz) y luego en decremento (500 Hz hasta 10 Hz), mostró dos resultados:

- a) Cuando el protocolo de condicionamiento se aplicaron con frecuencias en decremento, los PEPSs evocados se vieron deprimidos gradualmente desde altas a bajas frecuencias (300 Hz a 10 Hz).
- b) Cuando los trenes de condicionamiento se aplicaron con frecuencias en incremento, los PEPSs evocados aumentaron gradualmente en amplitud para las frecuencias iniciales (10 Hz-100 Hz) y luego permanecieron prácticamente invariables al estimular a frecuencias más altas (120 Hz- 500 Hz).

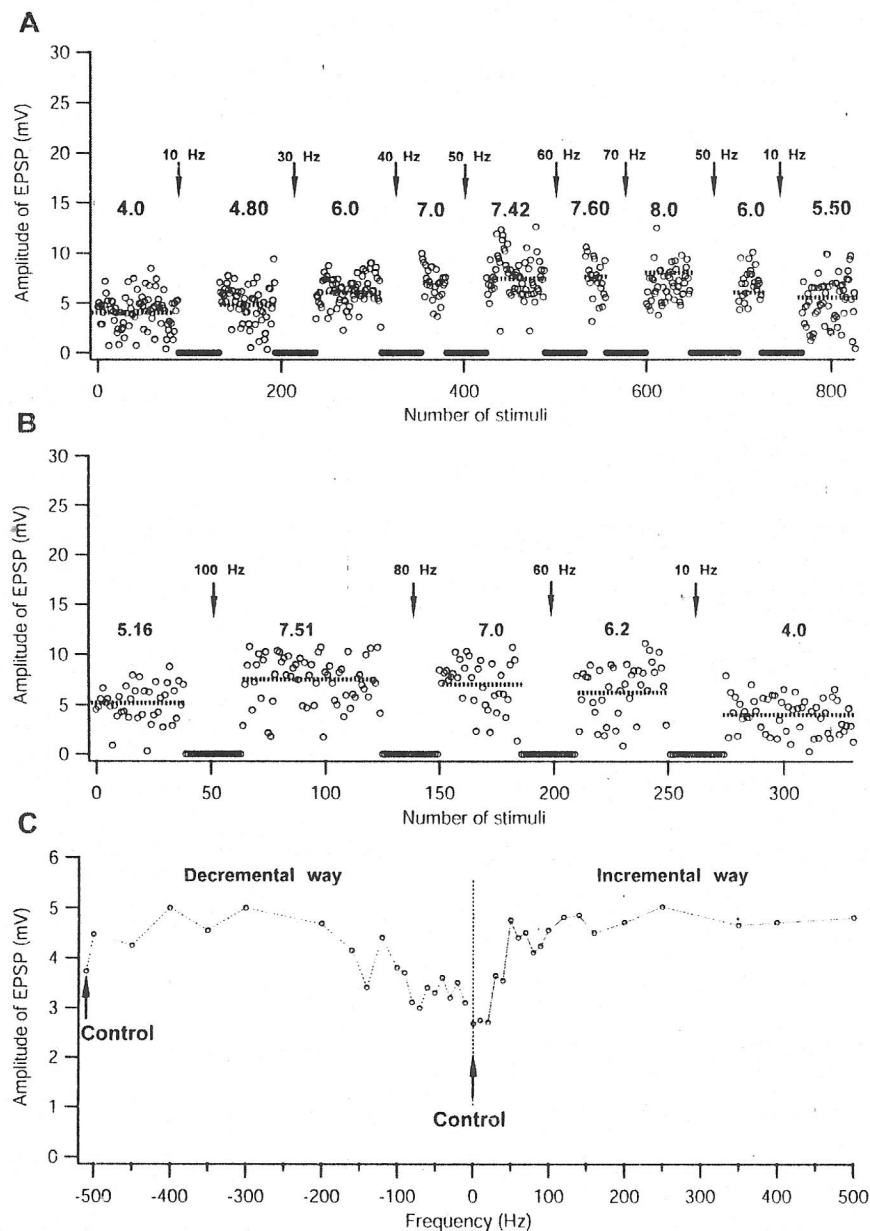


Figura 21. Potenciación y depresión de los PEPs evocados por estimulación contralateral con frecuencias en aumento y en decremento. Preparación bajo barbitúricos. A-C, tres neuronas distintas. A-B, los gráficos representan las amplitudes de los PEPs evocados al estimular vías corticales contralaterales, con frecuencias en aumento (A) o en decremento (B). Nótese el aumento en la amplitud de las respuestas producido por frecuencias en aumento (A), y la depresión por frecuencias en decremento (B). C, el gráfico muestra la amplitud de las respuestas en relación con la frecuencia de estimulación. Frecuencias negativas representan protocolos de frecuencias en decremento y frecuencias positivas protocolos de frecuencias en aumento. Nótese la saturación de las respuestas a partir de 150 Hz.

Finalmente, se comparó el efecto de todas las frecuencias ensayadas sobre las respuestas sinápticas evocadas para un subconjunto de las neuronas estudiadas ($n = 25$). La figura 22 muestra un progresivo aumento en la amplitud de los PEPSs evocados después de trenes de condicionamiento para las frecuencias iniciales, desde 10 Hz hasta 160 Hz. Para frecuencias mayores se produjo saturación de la respuesta sináptica, pues no fueron observados mayores cambios en las respuestas evocadas.

La potenciación de la respuesta sináptica que se obtiene al estimular una vía contralateral podría bien no ser directa, es decir, debido a proyecciones de neuronas de la corteza contralateral sobre la corteza ipsilateral (vía córtico-cortical); sino debido a una proyección polisináptica de la corteza contralateral sobre un núcleo talámico de relevo, y de aquí sobre la corteza ipsilateral (vía córtico-tálamo-cortical). Para descartar esta posibilidad se realizaron experimentos en que se lesionó electrolíticamente el núcleo lateral posterior del tálamo, en el mismo hemisferio donde se hicieron los registros intracelulares. En estos casos se obtuvo los mismos resultados que cuando no se lesiona el tálamo, sugiriendo que la vía estudiada y la potenciación de la respuesta sináptica obtenidas son debido a una proyección directa de la corteza contralateral sobre la corteza ipsilateral.

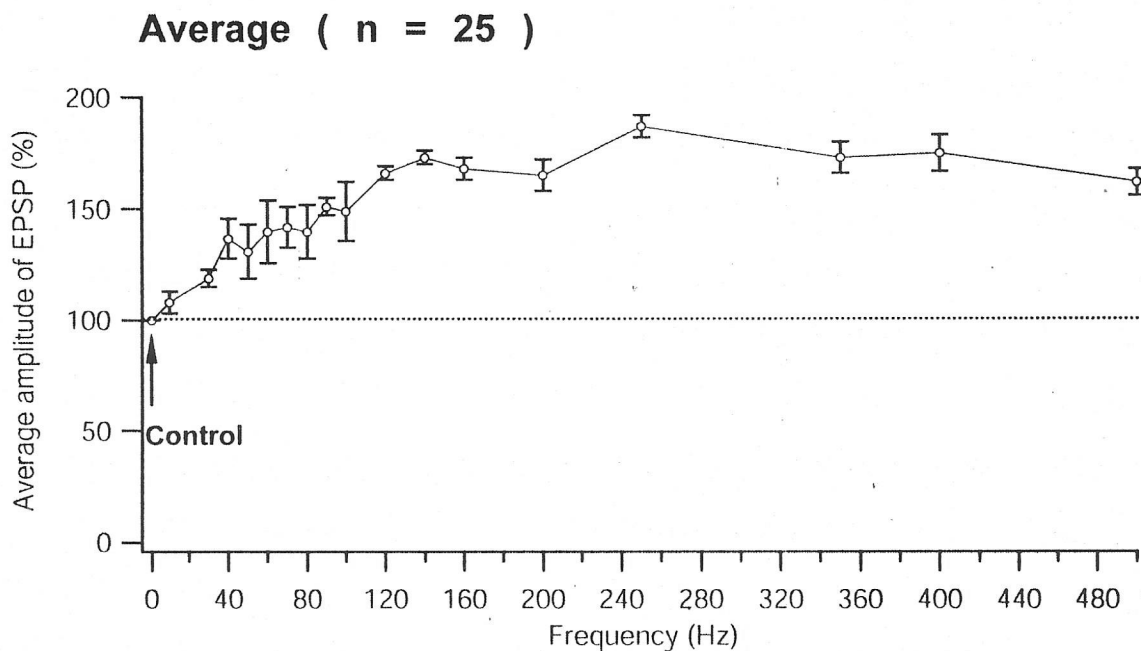


Figura 22. Cambios promedio en la amplitud de los PEPSs evocados a distintas frecuencias. Se muestra la amplitud media de los PEPSs en relación a la frecuencia de los trenes de condicionamiento, para varias neuronas ($n = 25$, 17 RS, 5 FRB, y 3 IB). La amplitud de las respuestas fue medida después la aplicación del condicionamiento a distintas frecuencias y se expresa como porcentaje del control. Nótese el progresivo aumento en la amplitud de las respuestas hasta 150 Hz, luego de lo cual la respuesta no varía mucho.

Corteza ipsilateral

Base de datos

Neuronas corticales ($n = 30$) fueron registradas en regiones corticales asociativas y motoras de la corteza. Al igual que en el apartado anterior, las neuronas presentaron valores de V_m estables a lo largo del registro y respuestas constantes a la estimulación cortical ipsilateral. Todas las neuronas registradas fueron identificadas electrofisiológicamente por sus patrones de descarga ante pulsos cuadrados de corriente positiva. De las 30 neuronas registradas 25 fueron RS, 2 FRB y 3 IB.

Las neuronas que mostraron respuestas a la estimulación cortical ipsilateral abarcaron todas las capas corticales ya que se encontraron en su mayoría a profundidades entre 0.3-2.3 mm de la corteza. Esta amplia distribución que abarca diversas capas corticales (II-VI) es consistente con la distribución ubicua de las proyecciones corticales locales (DeFelipe & Farinas, 1992).

Contrariamente a lo que ocurre al estimular vías corticales contralaterales, donde las proyecciones son masivas y localizadas, y generan en todos los casos PEPSs (Cissé et al. 2003); la estimulación de vías intracorticales generalmente produce respuestas compuestas, de tipo polisináptico. Esto se debe a la activación directa de fibras excitatorias, las cuales gatillan un PEPSs temprano seguido de una respuestas inhibitoria por la activación de redes neuronales GABAérgicas colaterales (Pouille & Scanziani,

2001; Berger & Luscher, 2003). Un ejemplo de tales respuestas se puede ver en las figuras 25 y 29, en que un PEPS temprano fue truncado por un PIPS tardío. Este tipo de respuestas son las más comunes que se obtienen al estimular vías intracorticales, pero debido a la múltiple composición de su origen, dificultan el análisis de los resultados. Por este motivo en el presente trabajo se investigaron preferencialmente respuestas simples, generalmente monosinápticas.

Cambios plásticos mixtos al estimular vías corticales ipsilaterales

Trenes de pulsos de estimulación produjeron resultados mixtos en las respuestas sinápticas evocadas en vías corticales ipsilaterales. Salvo para la frecuencia de 1 Hz, que no produjo ningún cambio en la respuesta, todas las demás frecuencias fueron capaces de inducir cambios, aunque siempre en baja proporción (tabla 2). Sin embargo, estos cambios no mostraron una tendencia específica, pues facilitación y depresión ocurrieron en proporciones similares, aunque en general predominó la depresión de las respuestas sinápticas.

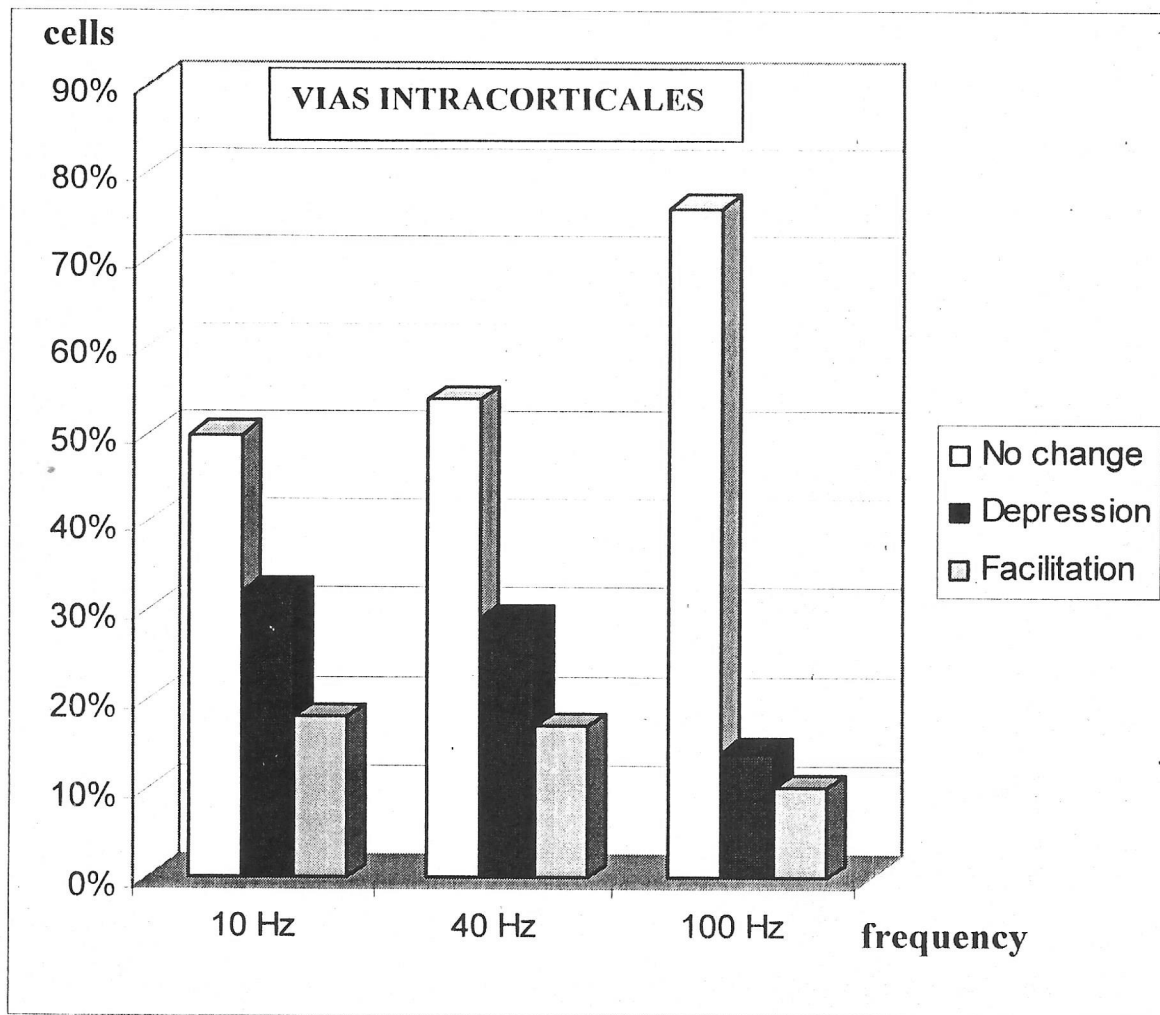
El estudio de las vías ipsilaterales corticales se mostró particularmente difícil desde el punto de vista técnico. Pues a diferencia de las proyecciones corticales contralaterales o las fibras tálamocorticales, las vías intracorticales son bastante difusas en su proyección, y no muestran focalización en sus blancos sinápticos. Por este motivo la estimulación de vías intracorticales produjo en general respuestas polisinápticas o de gran versatilidad. Un ejemplo de un caso extremo de esto se puede ver en la figura 23. Nótese que durante el control las respuestas a la estimulación muestran gran

variabilidad. La multiplicidad de respuestas está conformada por: a) un PIPS de variable amplitud, b) un PEPS que en ocasiones generó un potencial de acción o bien, c) una combinación de ambos, es decir un PEPS seguido de un PIPS.

Tabla 2. Plasticidad sináptica en vías intracorticales

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1	0	-10	0		5/7
2	0	0	0		5/7
3	0	227	-75	0	5/7
4	0	-13	-17	0	5/7
5	0	34			5/7
6	0	22	0		5/7
7	0	0	0	0	5/7
8	0			-43	5/7
9	0	0	0		5/7
10	0	0	0	0	5/7
11	0	0	0		5/7
12	0	-14			5/7
13	0	-25	15	-17	5/7
14	0	-15		0	5/7
15	0	0	0	0	5/7
16		0	0	0	5/7
17		0	0	0	5/7
18		-7	-8	0	5/7
19		0	-30	0	5/7
20		-21	55	10	5/7
21		0	0	0	5/7
22		-22	-14	0	5/7
23		231	-44		4/6
24		29			4/6
25		0	0	0	4/6
26		0	-30	-9	4/6
27		0	17	0	4/6
28				0	4/6
29		-6	20	26	4/6
30		0	0	0	4/6
No cambio	100%	50%	54%	76%	
Depresión	0%	32%	29%	14%	

Table 2



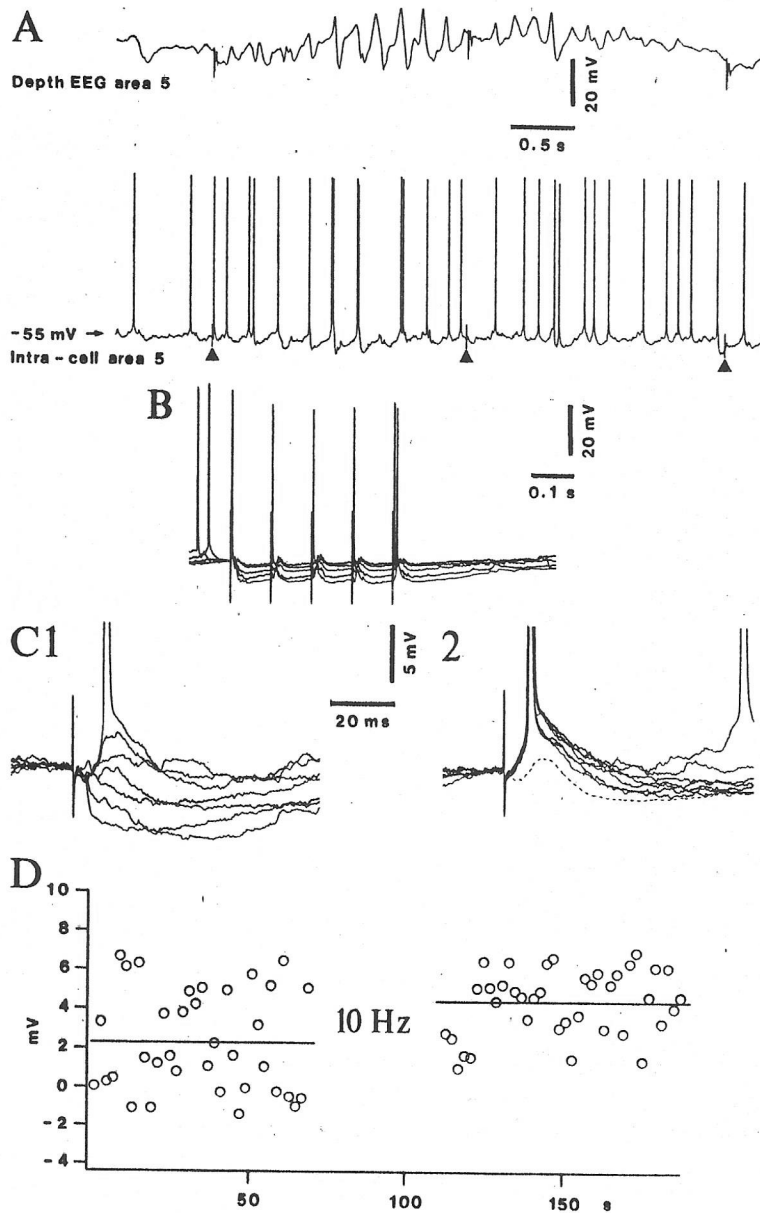


Figura 23. Cambio de respuestas evocadas por estimulación cortical, después de la estimulación de vías corticales a 10 Hz. Registro realizado bajo barbitúrico. Registro intracelular y EEG del área 5 se muestran en la parte superior. A, tres estímulos individuales en el área 5. B, superposición de respuestas al protocolo de condicionamiento. C, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales en el área 5, antes (C1) y después (C2) del protocolo de condicionamiento. La línea punteada en C2 representa el promedio de C1. D, el gráfico muestra la amplitud de cada respuesta al ser aplicado un estímulo individual. Nótese la gran variabilidad de respuestas en el control (C1).

un PEPS que en ocasiones generó un potencial de acción o bien, c) una combinación de ambos, es decir un PEPS seguido de un PIPS.

Después del protocolo de condicionamiento se observa que las respuestas inhibitorias desaparecieron, siendo reemplazadas por PEPSs, que en la mayoría de casos generaron potenciales de acción (fig. 23). De modo que en este ejemplo parece más adecuado hablar de *selección* de la respuesta excitatoria, más que de potenciación de la misma. Una explicación alternativa y no excluyente de lo ocurrido es una depresión significativa de las respuestas inhibitorias, de modo que lo único que se hace evidente son las respuestas excitatorias.

En algunas ocasiones fue posible evocar respuestas regulares, de corta latencia, probablemente monosinápticas. Como se indicó, los análisis se llevaron a cabo preferencialmente en este tipo de respuestas. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 24 en que la estimulación cortical ipsilateral produjo PEPSs de moderada amplitud (2-7 mV) sin evidencia de PIPSs. En este caso el protocolo de condicionamiento a 10 Hz produjo una moderada reducción de la amplitud de la respuesta (~20%) la cual permaneció durante por lo menos un minuto (fig. 24). Nótese que esta reducción en amplitud no parece afectar mayormente el área bajo la curva de la respuesta (514.7 mV*ms en el control, 455.1 mV*ms después del condicionamiento) pues esta disminuye poco más de un 10%.

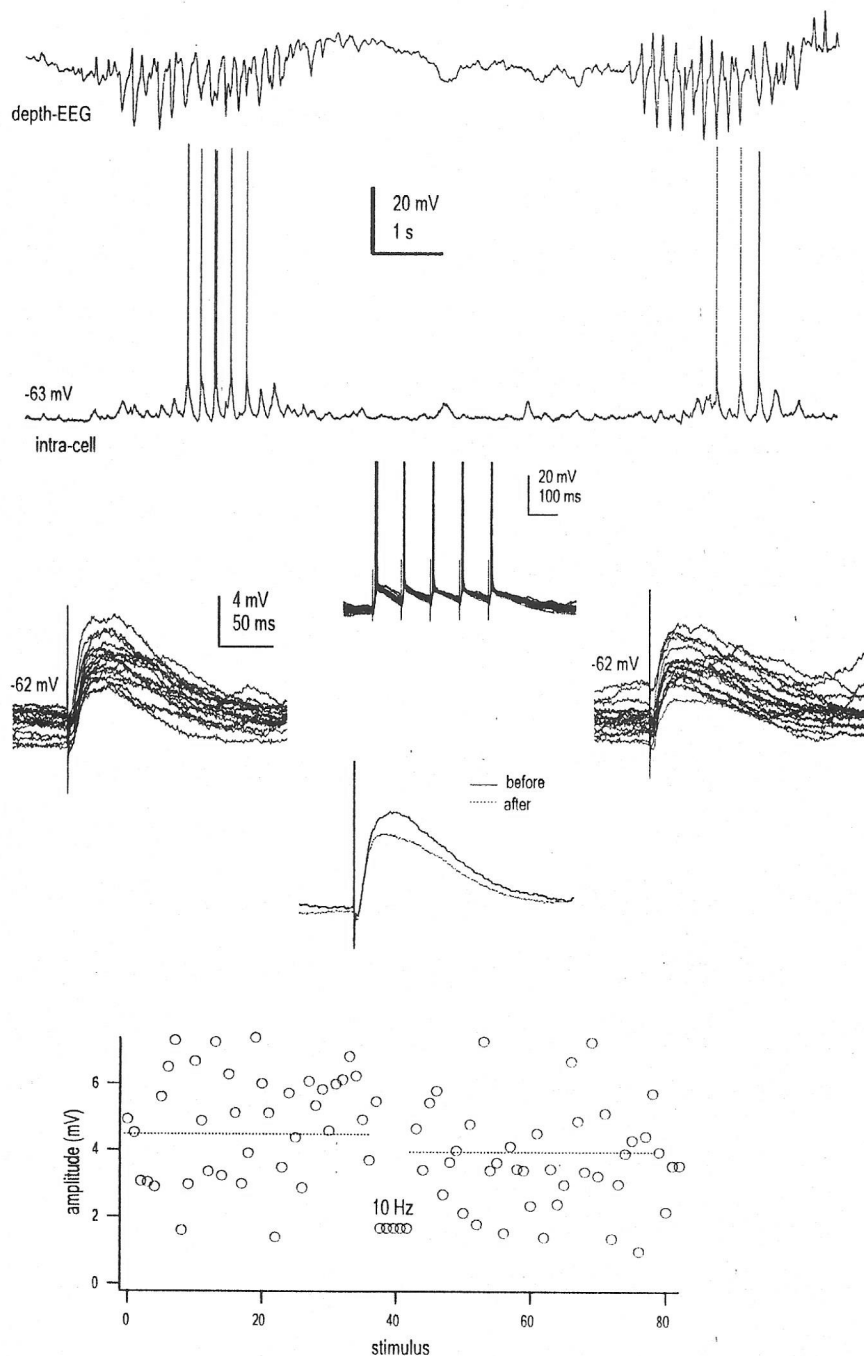


Figura 24. Ausencia de cambios en las respuestas evocadas por estimulación cortical, después de la estimulación de vías corticales a 10 Hz. Registro realizado bajo barbitúrico. Registro intracelular y EEG del área 5 se muestran en la parte superior. Más abajo, superposición de respuestas al protocolo de condicionamiento, y a estímulo individuales antes y después del condicionamiento. Los promedios de las respuestas ($n = 30$) muestran una pequeña, aunque no significativa ($p > 0.1$), depresión de las respuestas. La línea punteada representa el promedio para cada caso.

No sólo la estimulación a bajas frecuencias produjo depresión de las respuestas sinápticas en las vías intracorticales. La figura 25 muestra una neurona que fue estimulada a alta frecuencia (100 Hz) localmente por un electrodo cercano, ubicado en el área 5 de la corteza. La respuesta a estímulos individuales fue más bien compleja, formada por una hiperpolarización inicial, probablemente mediada por receptores GABA_A que luego dio paso a un EPSP, para finalizar en una prolongada hiperpolarización, debido a la activación de receptores GABA_B (Contreras et al., 1996; Steriade, 1997). En este caso la amplitud del EPSP fue afectada negativamente después del protocolo de condicionamiento. Sin embargo, el efecto de depresión sobre la respuesta sináptica fue de corta duración, ya que a los pocos segundos (~10 s) de aplicado el condicionamiento, la respuesta recuperó los valores que presentaba en el control. Por este motivo, al comparar promedios obtenidos de 50 respuestas la ausencia de cambios fue evidente.

Potenciación y depresión de respuestas sinápticas por trenes de condicionamiento repetitivos a distintas frecuencias

Trenes repetitivos de distintas frecuencias fueron aplicados a neuronas corticales registradas en diversas áreas. A diferencia de la unicidad de resultados obtenidos al estimular vías corticales contralaterales, la activación de vías intracorticales produjo variedad de resultados cuya dependencia pareció residir en casos particulares más que en leyes generales. Sin embargo, algunos principios generales fueron extraídos a partir de los datos obtenidos.

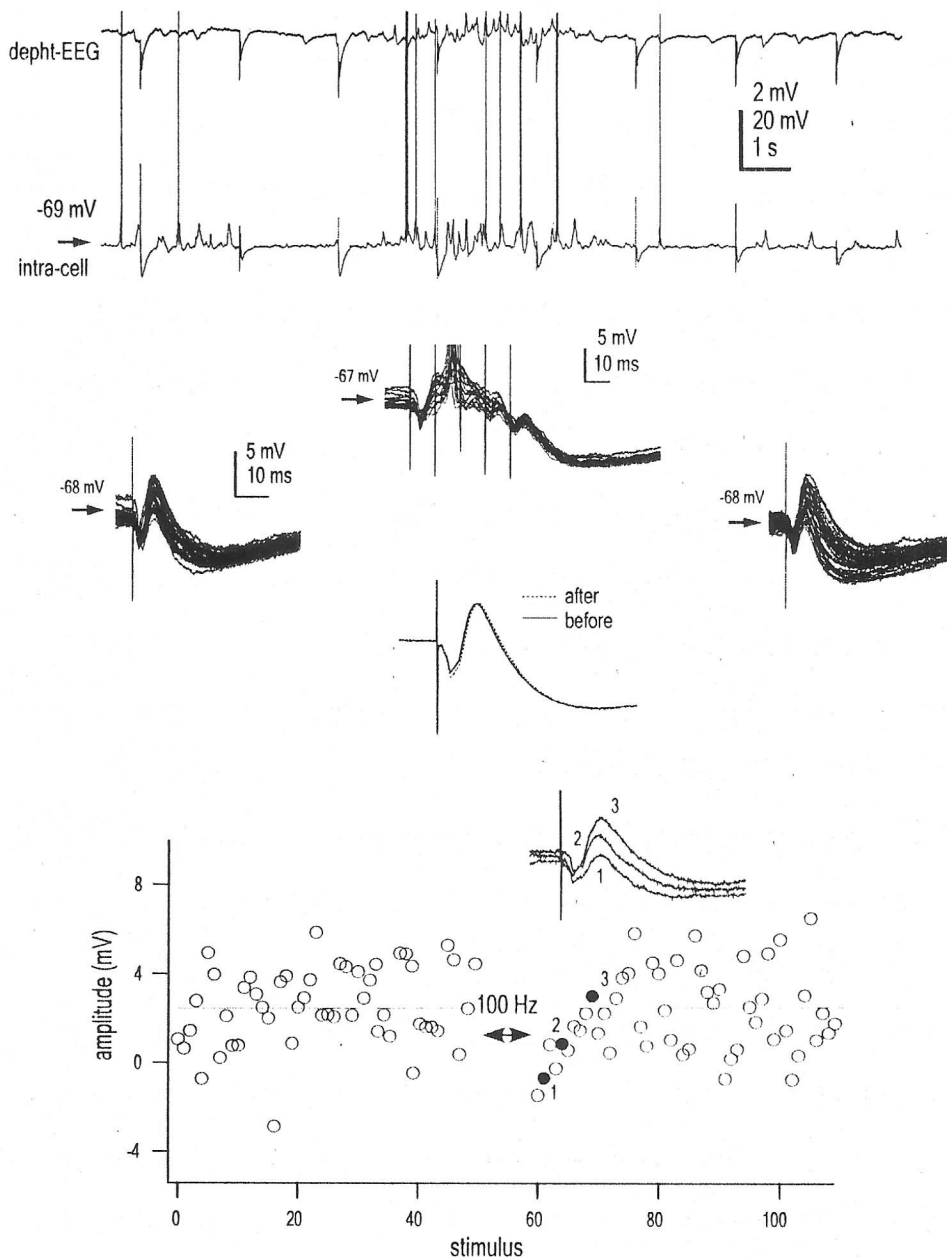


Figura 25. Depresión de respuestas evocadas por estimulación cortical ipsilateral, después de la estimulación de vías ipsilaterales a 100 Hz. Registro realizado bajo barbitúrico. A, Registro intracelular de una neurona del área 5 muestra la respuesta a estímulos a baja frecuencia en la misma región cortical. B, Superposición de las respuestas sinápticas evocadas durante el protocolo de condicionamiento. Nótese la progresiva depresión de la respuesta. Más abajo, superposición de respuestas individuales antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento. C, Promedio de todas las respuestas individuales antes y después del protocolo de condicionamiento. Nótese la ligera depresión de la respuesta sináptica.

Los anestésicos utilizados no produjeron diferencias en cuanto a la expresión de plasticidad sináptica en las vías intracorticales. La figura 26 muestra una neurona que fue registrada en un animal anestesiado con ketamina-xylazina y los cambios en las respuestas sinápticas son evidentes. En dicha célula, altas frecuencias (40-100 Hz) produjeron potenciación de la respuesta, mientras que bajas frecuencias (10 Hz) indujeron depresión. Como se mencionó con anterioridad, este es un caso particular para esta neurona y no una regla general.

Por otra parte, el orden en que se aplicaron los trenes de estimulación a distinta frecuencia no tuvo un mayor efecto en los cambios de las respuestas sinápticas. De modo que trenes de frecuencias en incremento (fig. 27) o en decremento (fig. 26) se mostraron capaces de producir cambios en las respuestas sinápticas. La figura 27 muestra una neurona en que trenes de condicionamiento fueron aplicados a frecuencias en incremento y la figura 26 es de una célula en que los trenes son de frecuencias en decremento, y en ambos casos hay cambios en las respuestas sinápticas.

La figura 27 muestra una neurona en la que todas las frecuencias evaluadas fueron capaces de inducir plasticidad sináptica, sin revelar un patrón fijo en la dirección del cambio. Así pues, bajas (10 Hz) y altas (80 Hz) frecuencias fueron capaces de inducir potenciación en un caso; en otro caso bajas (20 Hz) y altas (40 Hz) frecuencias resultaron en depresión de las respuestas evocadas.

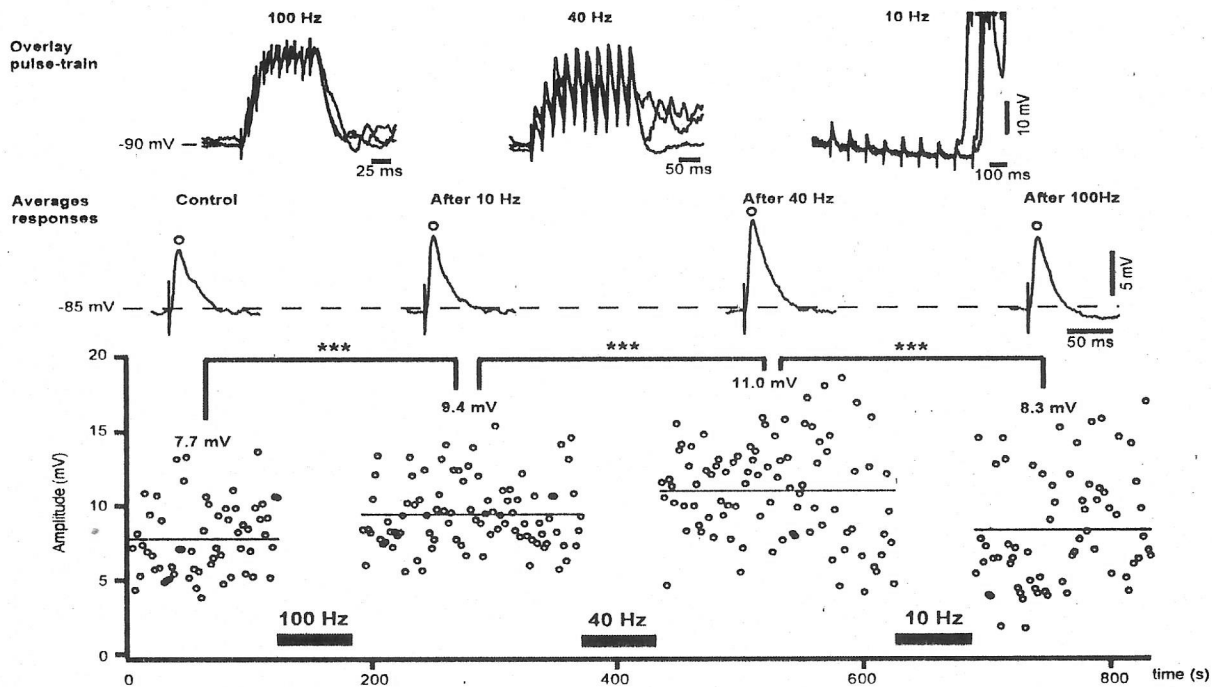


Figura 26. Facilitación y depresión de respuestas sinápticas evocadas por estimulación intracortical de frecuencias en incremento. Preparación bajo ketamina-xylazina. Los trazos superiores muestran respuestas superpuestas para cada protocolo de condicionamiento (100 Hz, 40 Hz y 10 Hz) aplicado en la corteza ipsilateral local. Más abajo, las respuestas promedio a estímulos individuales antes y después de cada protocolo de condicionamiento. Los círculos blancos señalan el punto donde la amplitud fue medida. El gráfico final refleja la evolución temporal de la amplitud de las respuestas a medida que se aplicaron los distintos protocolos de condicionamiento. Las líneas horizontales muestran el promedio de amplitud para cada caso. T-test: *** $p < 0.001$

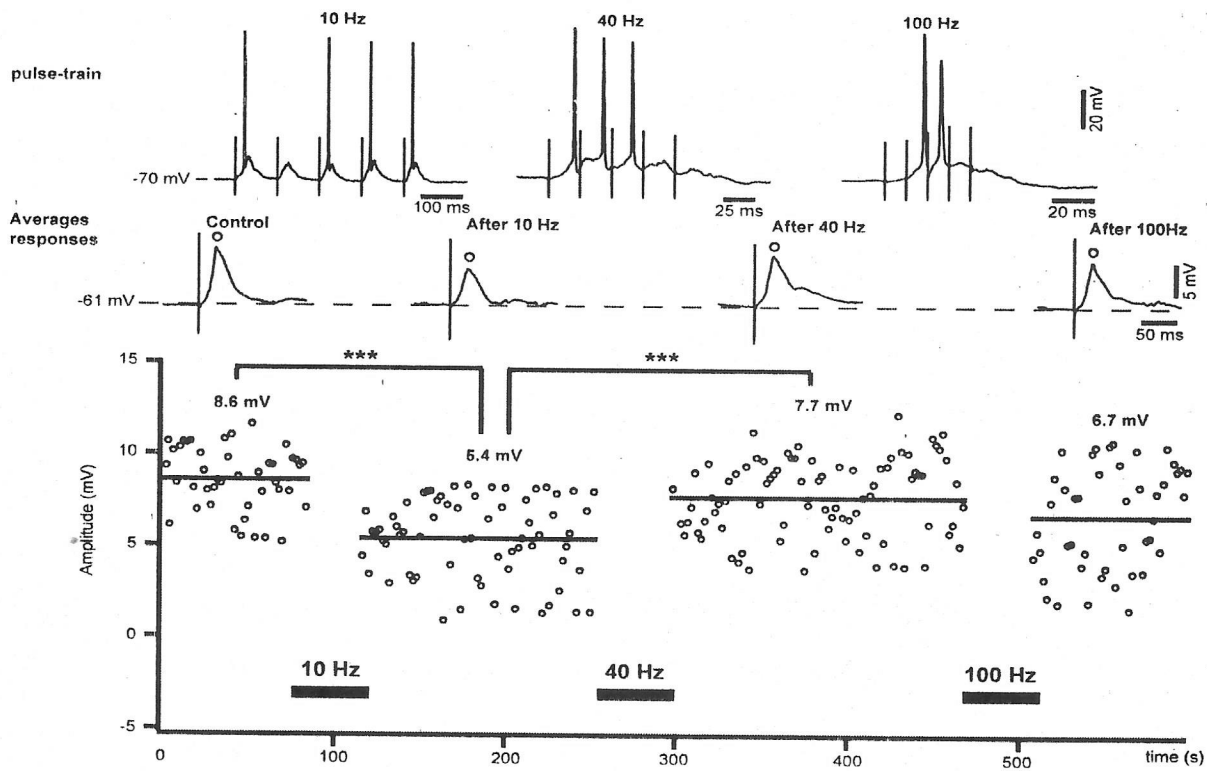


Figura 27. Facilitación y depresión de respuestas sinápticas evocadas por estimulación intracortical de frecuencias en decremento. Preparación bajo barbitúricos. Los trazos superiores muestran respuestas superpuestas para cada protocolo de condicionamiento (10 Hz, 40 Hz y 100 Hz) aplicado en la corteza ipsilateral local. Más abajo, las respuestas promedio a estímulos individuales antes y después de cada protocolo de condicionamiento. Los círculos blancos señalan el punto donde la amplitud fue medida. El gráfico final refleja la evolución temporal de la amplitud de las respuestas a medida que se aplicaron los distintos protocolos de condicionamiento. Las líneas horizontales muestran el promedio de amplitud para cada caso. T-test: *** $p < 0.001$

Estos resultados muestran la enorme variedad de resultados obtenidos al estimular vías intracorticales, a pesar de mantener condiciones relativamente homogéneas como estimulación con baja intensidad o utilizando las mismas frecuencias y mismos protocolos en todos los casos.

Un resultado interesante fue la ausencia de cambios en algunos casos, independientemente de la frecuencia de estimulación utilizada. La neurona presentada en la figura 28 fue estimulada desde una región cortical cercana a la zona de registro, a distintas frecuencias. Nótese el que en este experimento los cambios en las respuestas evocadas brillan por su ausencia, ya que ninguna frecuencia fue capaz de gatillar cambios en las respuestas sinápticas.

Respecto a la duración del cambio en las respuestas sinápticas, se indicó que en general este fue de corta duración, presumiblemente del orden de unos pocos segundos (fig. 25). Sin embargo hubo un número de casos en que los cambios se extendieron por períodos de decenas de segundos. Un ejemplo de tales casos se muestra en la figura 29 en que una neurona fue condicionada con un protocolo de baja frecuencia (10 Hz). El resultado es una potenciación de la respuesta excitatoria inicial, en donde una contribución de la depresión del PIPS tardío no puede ser descartada. La potenciación del PEPS se evaluó en el tiempo haciendo un seguimiento de las respuestas sinápticas después del condicionamiento, revelando que después de cerca de 100 segundos, la respuesta excitatoria inicial recupera los valores presentes en el control. Estos resultados

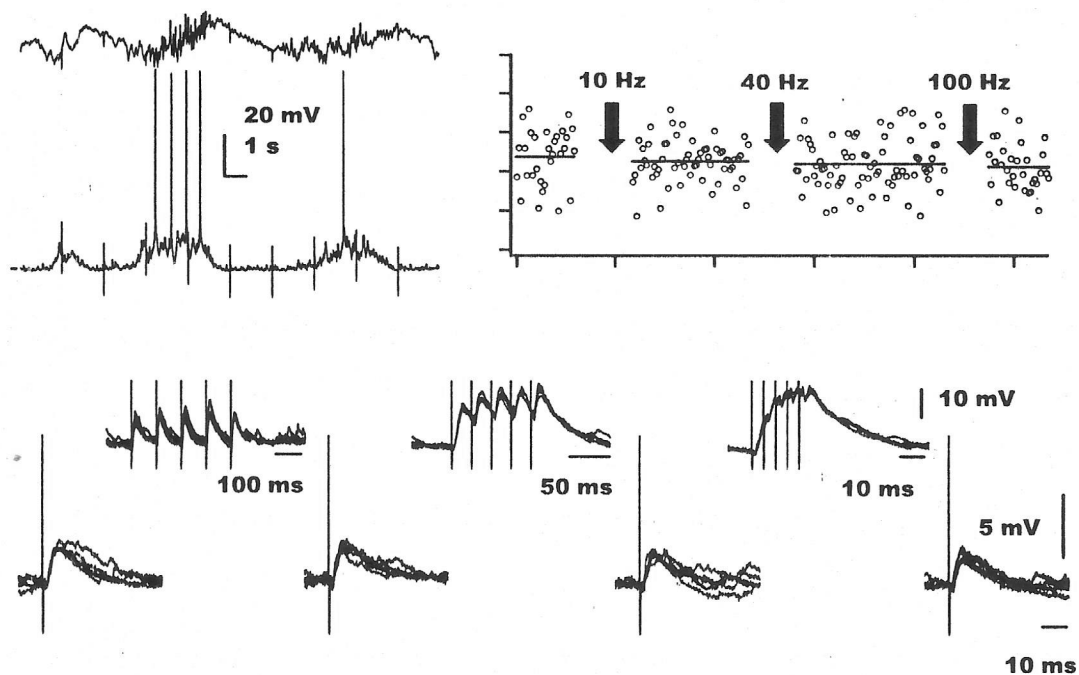


Figura 28. Ausencia de cambios en las respuestas sinápticas evocadas por estimulación intracortical de distintas frecuencias. Preparación bajo ketamina-xylazina. Arriba izquierda, actividad espontánea de una neurona registrada en el área 4 junto con el EEG de la misma región. El gráfico derecho refleja la evolución temporal de la amplitud de las respuestas a medida que se aplicaron los distintos protocolos de condicionamiento. Las líneas horizontales muestran el promedio de amplitud para cada caso. Más abajo, sobreposición de respuestas a estímulos individuales o trenes de condicionamiento de distintas frecuencias. Nótese la ausencia de cambios en las respuestas sinápticas después de los protocolos de condicionamiento.

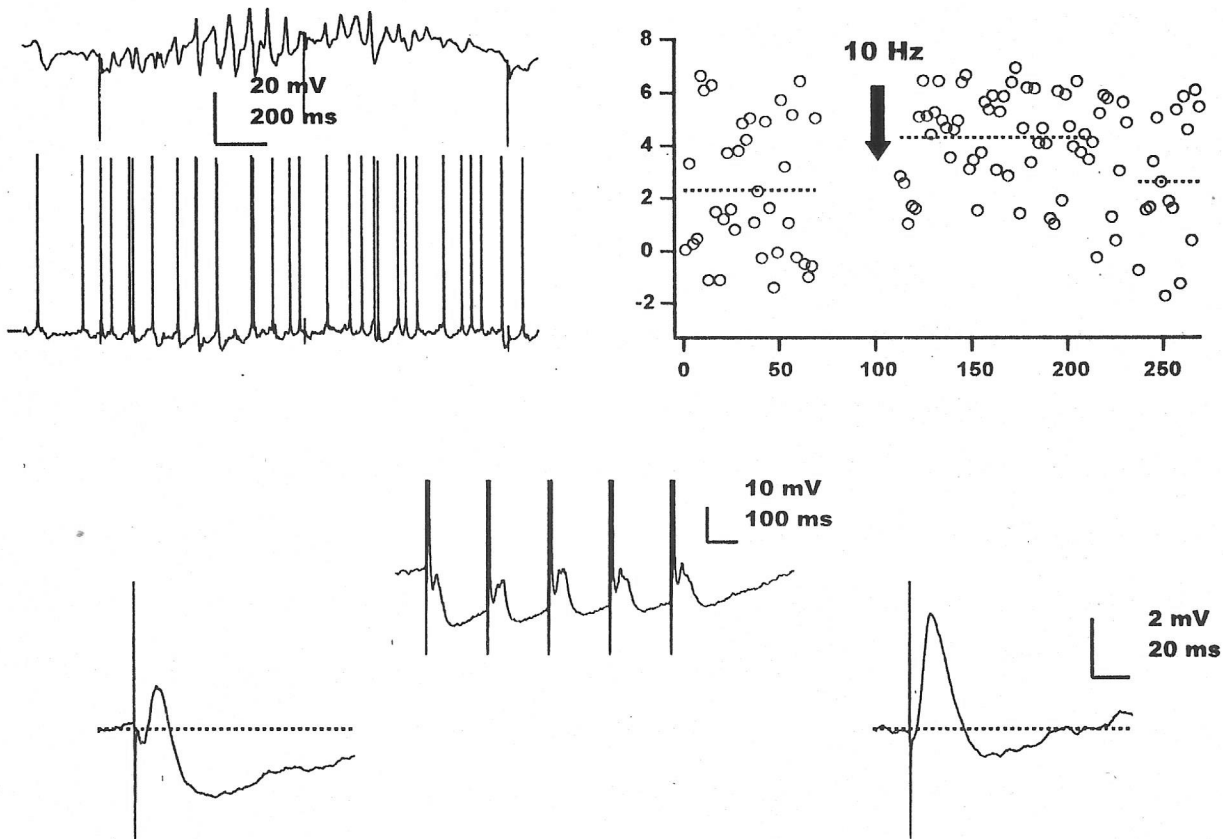


Figura 29. Duración de la potenciación de respuestas sinápticas evocadas por estimulación intracortical. Preparación bajo barbitúricos. Arriba izquierda, actividad espontánea de una neurona registrada en el área 4 junto con el EEG de la misma región. El gráfico derecho refleja la evolución temporal de la amplitud de las respuestas. Nótese que la potenciación permaneció por 3-4 minutos. Las líneas horizontales muestran el promedio de amplitud para cada caso. Más abajo, promedios de respuestas a estímulos individuales o trenes de condicionamiento de distintas frecuencias. Nótese la potenciación de la respuesta excitatoria inicial después del condicionamiento.

muestran que los cambios producidos en las respuestas evocadas en las vías corticales fueron de corta duración, presentando una recuperación al cabo de 10-100 segundos.

Tálamo

Base de datos

Neuronas corticales ($n = 26$) fueron registradas en regiones corticales asociativas y motoras de la corteza. Al igual que en apartados anteriores, la neuronas presentaron V_m estables a lo largo del registro y respuestas constantes a la estimulación de núcleos talámicos específicos. Todas las neuronas fueron identificadas electrofisiológicamente por sus patrones de descarga ante pulsos cuadrados de corriente positiva. De las 26 neuronas registradas 15 fueron RS, 6 FRB, 3 IB y 2 FS (*fast spiking*). Los resultados obtenidos en esta sección se resumen en la tabla 3.

Inducción preferencial de potenciación a altas frecuencias (100 Hz) y depresión a bajas frecuencias (10Hz) en las vías tálamocorticales.

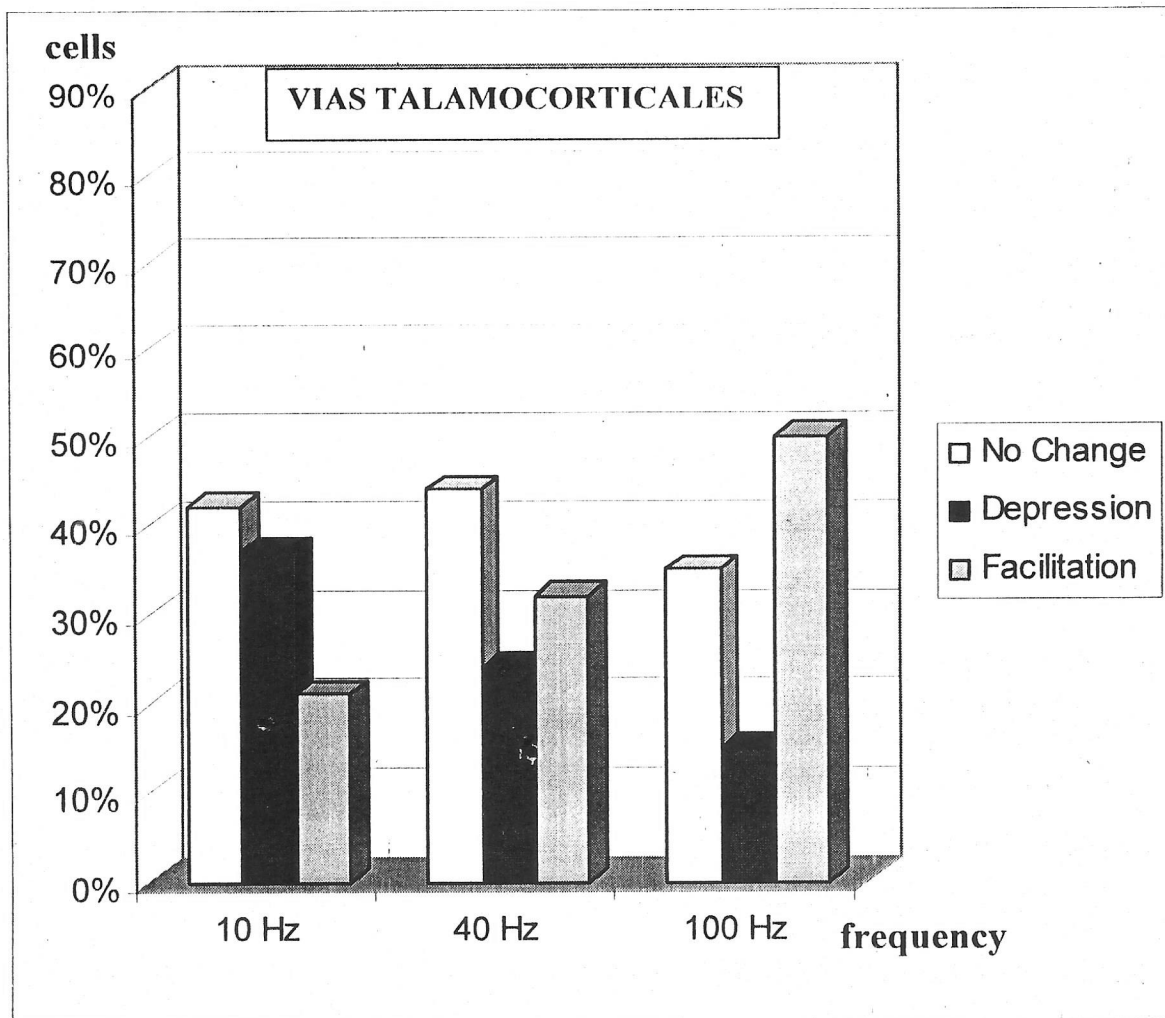
El fenómeno de las “respuestas en aumento” ha sido largamente estudiado en diversos sistemas. En rebanadas *in vitro*, (Castro-Alamancos, 1996; Castro-Alamancos & Connors, 1996a, b), en preparaciones de cerebro intacto *in vivo* (Steriade et al., 1998b; Timofeev & Steriade, 1998; Timofeev et al., 2002) y en modelos computacionales *in silico* (Bazhenov et al., 1998a, b). Debido a estos estudios se ha mostrado que bajas frecuencias, como las de los husos sinápticos (10 Hz) son adecuadas para inducir una facilitación de corta duración, en las respuestas tálamocorticales evocadas en la corteza.

Se esperaba por tanto que dicha frecuencia ejerciera un efecto preferencial de facilitación sináptica en la mayoría de los casos.

Tabla 3. Plasticidad sináptica en vías tálamocorticales

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1	0	0	0	0	5/7
2	0	0	25	0	5/7
3	0	18	0	-30	5/7
4	0	0			5/7
5	0	0	0	0	5/7
6	0	0	12	17	5/7
7	0	0	0	0	5/7
8	0	0			5/7
9	0	0	0	0	5/7
10	0	-14	0	12	5/7
11		-13	0		5/7
12		-23			4/6
13		56	-58	9	4/6
14		20	0		4/6
15		0	7	-17	4/6
16		60	150	100	4/6
17		-12	-43	0	4/6
18		-25	0	11	4/6
19		-12	8	19	4/6
20		47		81	4/6
21		-29			4/6
22		-23	-93	20	4/6
23		0	15	120	4/6
24		-55	-33	48	4/6
25			37	17	4/6
26			-21	0	4/6
No cambio	100%	42%	44%	35%	
Depresión	0%	37%	24%	15%	
Potenciación	0%	21%	32%	50%	

Table 3



Tal supuesto no fue corroborado experimentalmente pues estimulación a 10 Hz produjo facilitación sináptica en sólo algunos casos (25%) y aún más, no fue la frecuencia preferencial de inducción de facilitación, ya que altas frecuencias (100 Hz) se mostraron más efectivas en la inducción de cambios en las respuestas sinápticas evocadas.

La estimulación de vías tálamocorticales generó comúnmente activación antidrómica de fibras corticotálámicas, lo cual permitió identificar las neuronas

registradas en tales casos como corticotálamicas, grandes piramidales ubicadas en la capa VI (DeFelipe & Farinas, 1992). Uno de tales casos es ejemplificado en la figura 30 en que una neurona cortical del área 5 fue invadida antidrómicamente por activación de fibras corticotálamicas al estimular el núcleo talámico lateral-posterior. Dicha activación antidrómica es evidente por la aparición de un potencial de acción antidrómico de muy corta latencia (ver inserto, fig. 30). Seguida la activación antidrómica, hay una activación sináptica, que se sobrepone con la fase repolarizante del potencial de acción antidrómico. La aplicación del protocolo de condicionamiento a baja frecuencia (10 Hz) produce “respuestas en aumento” en esta célula, las cuales culminan en respuestas supraumbrales a partir del tercer estímulo en el tren (fig. 30). Luego del protocolo de condicionamiento, la respuesta sináptica permanece potenciada por lo menos durante 1 minuto (fig. 30).

La idea de que las “respuestas en aumento” es condición necesaria y suficiente para la aparición de plasticidad sináptica, al menos de mediana duración, en las vías tálamocorticales no encontró apoyo experimental. La figura 31 muestra un ejemplo en que después del condicionamiento a 10 Hz, la respuesta sináptica fue potenciada. Nótese sin embargo, que en este caso el protocolo de condicionamiento no produjo “respuestas en aumento” (fig. 31), sino que la amplitud de las respuestas se presentó variable, aumentando y disminuyendo a medida que ocurría el tren. A pesar de la ausencia de “respuestas en aumento” durante el tren de condicionamiento, las respuestas sinápticas se vieron potenciadas durante cerca de 30 segundos. De este modo se descarta la idea de *necesidad* de las “respuestas en aumento” para que ocurra potenciación, pues se muestra

que fue posible observar potenciación en ausencia de aquellas. Por otro lado, también hubo casos en que el condicionamiento produjo “respuestas en aumento”, pero no hubo potenciación en la respuesta sináptica. De este modo se descarta la condición de *suficiencia* de estas para producir potenciación. Por lo tanto, la presencia de “respuestas en aumento” no es una condición necesaria ni suficiente para la inducción de plasticidad en esta vía.

Otro punto importante a hacer notar es la independencia de los cambios plásticos, de la anestesia utilizada en las preparaciones. La figura 31 muestra una neurona registrada en ketamina-xylazina y la figura 31 una célula registrada durante barbitúricos. En ambos casos el mismo protocolo produjo efectos similares. De modo que los cambios plásticos de las respuestas sinápticas mostraron dependencia de la anestesia utilizada sólo en el caso de las vías corticales contralaterales. Tal fenómeno será tratado más adelante (ver Discusión).

De manera similar a lo observado en vías intracorticales, hubo casos en las vías tálamocorticales donde los protocolos de condicionamiento fallaron en evocar cambios en las respuestas sinápticas, a pesar de la variedad de frecuencias ensayadas. Una de tales neuronas se presenta en la figura 32. Dicha célula fue estimulada a una frecuencia relativamente alta (40 Hz) y sólo un leve aumento, aunque no significativo ($p > 0.1$), fue el resultado de tal protocolo.

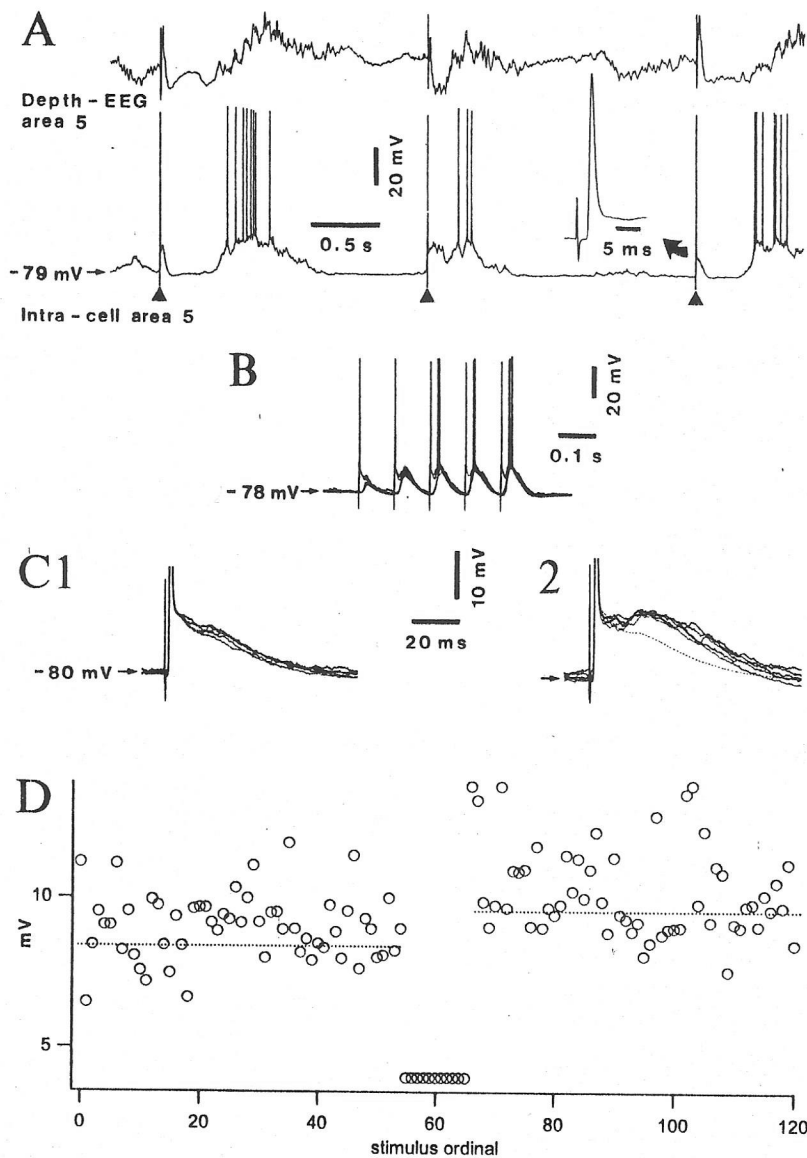


Figura 30. Facilitación de respuestas evocadas por estimulación talámica, después de la estimulación de vías tálamicocorticales a 10 Hz. Registro realizado bajo ketamina-xylazina. Registro intracelular y EEG del área 5 se muestran en la parte superior. A, tres estímulos individuales en el núcleo talámico latero posterior (LP). B, superposición de respuestas al estimular con un protocolo de condicionamiento de 5 estímulos a 10 Hz, nótese la inducción de “respuestas en aumento”. C, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales en el núcleo LP, antes (C1) y después (C2) del protocolo de condicionamiento. La línea punteada en C2 representa el promedio de C1. D, el gráfico muestra la amplitud de cada respuesta al ser aplicado un estímulo individual. Nótese que estimulación en LP induce un potencial de acción antidrómico, lo que identifica a la neurona como una corticotalámica piramidal de la capa VI.

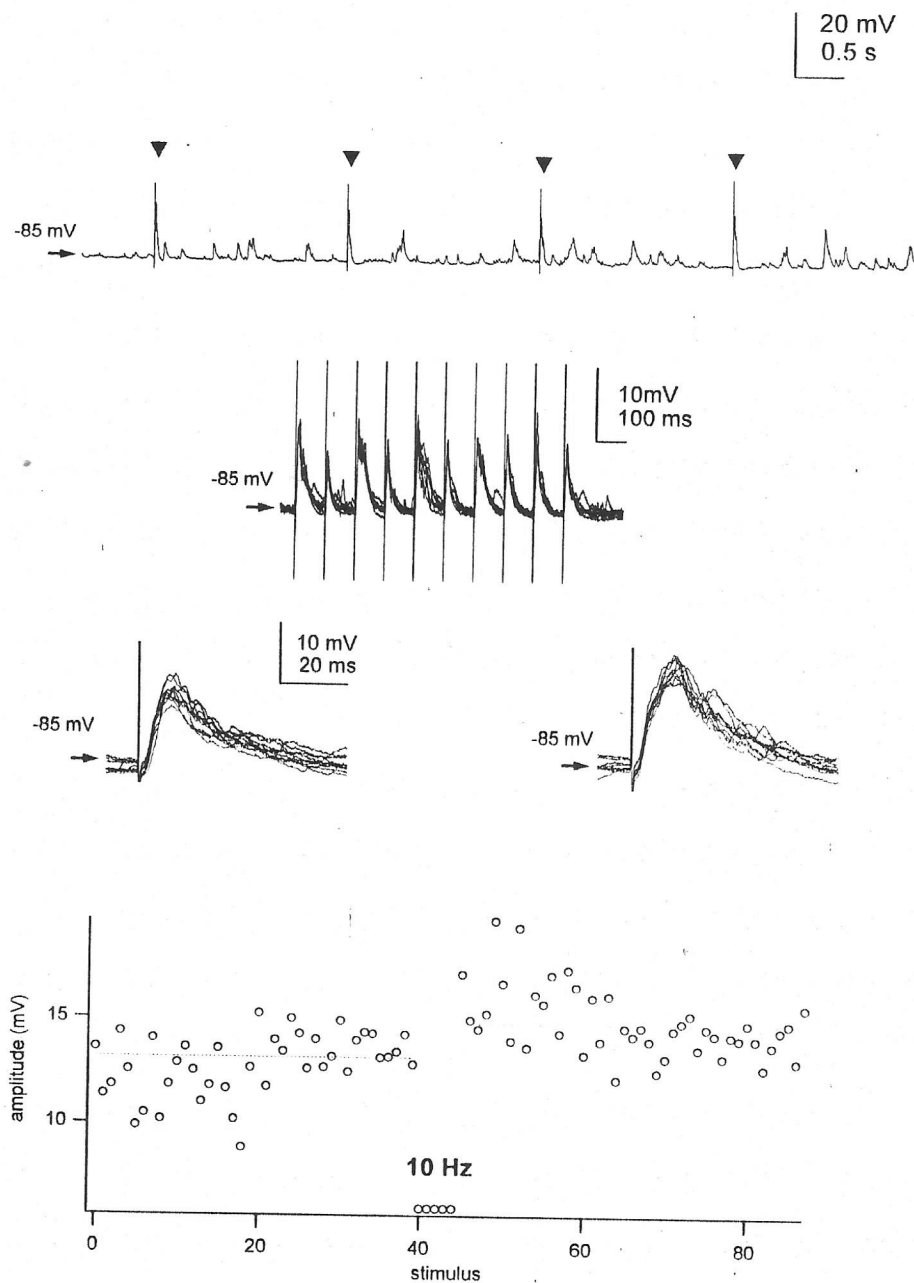


Figura 31. Facilitación de respuestas evocadas por estimulación talámica, después de la estimulación de vías tálamocorticales a 10 Hz. Registro realizado bajo barbitúricos. Registro intracelular de una neurona del área 7 se muestran en la parte superior. Más abajo, sobreposición de respuestas al estimular con un protocolo de condicionamiento de 10 estímulos a 10 Hz, nótese la ausencia de "respuestas en aumento". Más abajo, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales en el núcleo LP, antes y después del protocolo de condicionamiento. El gráfico final muestra la amplitud de cada respuesta al ser aplicado un estímulo individual.

La aplicación de protocolos condicionantes de frecuencias en incremento (10-100 Hz) mostró que los PEPSs evocados aumentaron gradualmente en amplitud a medida que la frecuencia de estimulación incrementaba. Estos resultados mostraron que altas frecuencias ejercieron mayores cambios en las respuestas sinápticas en esta vía, y dicho cambio fue en general potenciación de la respuesta. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la figura 33, en que una neurona cortical fue condicionada con trenes de estímulos de frecuencias en incremento (10-100 Hz). Nótese que a medida que aumenta la frecuencia de estimulación hay un aumento en la amplitud de la respuesta evocada, de modo que al final de todos los protocolos la respuesta ha aumentado cerca de un 80% respecto al control.

Vías heterosinápticas

Aunque negativo, posiblemente el resultado más consistente obtenido en esta sección es la ausencia de cambios en las respuestas evocadas al estimular vías aferentes distintas, independientemente de la frecuencia de estimulación (tablas 4-5). Si el control se realiza en la corteza y el condicionamiento en el tálamo, no hay cambio en la respuesta sináptica evocada por la estimulación cortical. Del mismo modo, el recíproco de este enunciado también es válido: respuestas evocadas por estimulación talámica no se vieron afectadas al ser condicionadas con estímulos corticales. A continuación se muestran un par de casos que ejemplifican estos resultados.

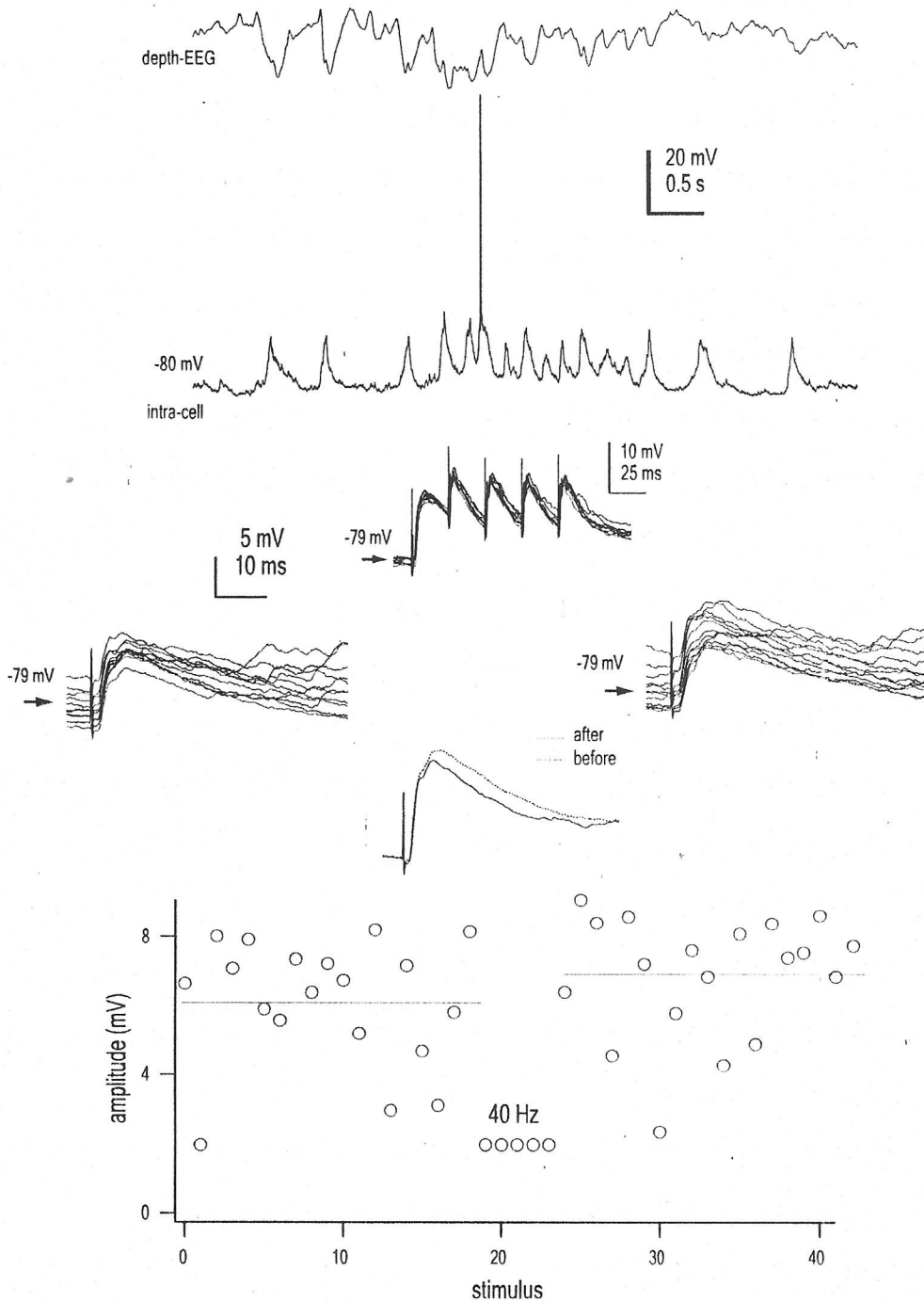


Figura 32. Ausencia de cambios en las respuestas sinápticas evocadas por estimulación talámica. Preparación bajo barbitúricos. Arriba, actividad espontánea de una neurona registrada en el área 7 junto con el EEG de la misma región. Más abajo, superposición de respuestas a trenes de condicionamiento, así como estímulos individuales. Los promedios superpuestos de las respuestas antes y después del protocolo de condicionamiento mostraron una leve potenciación, aunque no significativa ($p > 0.1$). El gráfico final muestra el curso temporal de la amplitud de la respuesta. Las líneas horizontales reflejan el promedio en cada caso.

Tabla 4. Plasticidad sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento cortical y control talámico

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1	0	0	0		5/7
2	0	0	0		5/7
3	0	0	0	0	5/7
4		0	0	0	5/7
5		0	0		4/6
No cambio	100%	100%	100%	100%	
Depresión	0%	0%	0%	0%	
Potenciación	0%	0%	0%	0%	

Table 4

Tabla 5. Plasticidad sináptica en vías héterosinápticas. Condicionamiento talámico y control cortical

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1		0	0		5/7
2	0	0	0	0	5/7
No cambio	100%	100%	100%	100%	
Depresión	0%	0%	0%	0%	
Potenciación	0%	0%	0%	0%	

Table 5

La figura 34 presenta una neurona en la cual el control se realizó estimulando la corteza ipsilateral a una frecuencia de 0.5 Hz. Luego de coleccionar 50 respuestas se aplicó el protocolo de condicionamiento a 10 Hz desde el tálamo. La estimulación talámica produjo una activación antidrómica (inserto, fig. 34) de la célula en cuestión, lo cual la identifica como una neurona corticotalámica de la capa VI. Puede apreciarse además que

la estimulación talámica produjo “respuestas en aumento”. Después del condicionamiento se volvieron a coleccionar respuestas obtenidas por estimulación cortical ipsilateral y se compararon en su amplitud con las del control. El tren de condicionamiento aplicado en el tálamo no produjo cambio alguno en los PEPSs evocados por estimulación cortical. Este mismo protocolo se repitió para otras frecuencias e invirtiendo el orden de las vías aferentes estimuladas y el resultado fue siempre similar. Otro ejemplo se muestra en la figura 35. Esta vez la estimulación control se realizó en el tálamo y el condicionamiento se aplicó en la corteza proximal. Luego del protocolo de condicionamiento de 40 Hz en la corteza, las respuestas excitatorias inducidas por estimulación talámica no sufrieron ningún cambio.

Estos resultados muestran la cuasi-ausencia de interacción entre vías aferentes que proyectan sobre la corteza, ya que no es posible inducir cambios plásticos en las sinápsis corticales cuando se estimulan vías heterosinápticas. Estos datos muestran el nivel de independencia de vía aferentes heterosinápticas en la corteza y sugieren que los mecanismos de plasticidad sináptica, al menos de corta y mediana duración, están compartimentalizados y localizados específicamente en las sinapsis activadas durante los procesos de estimulación.

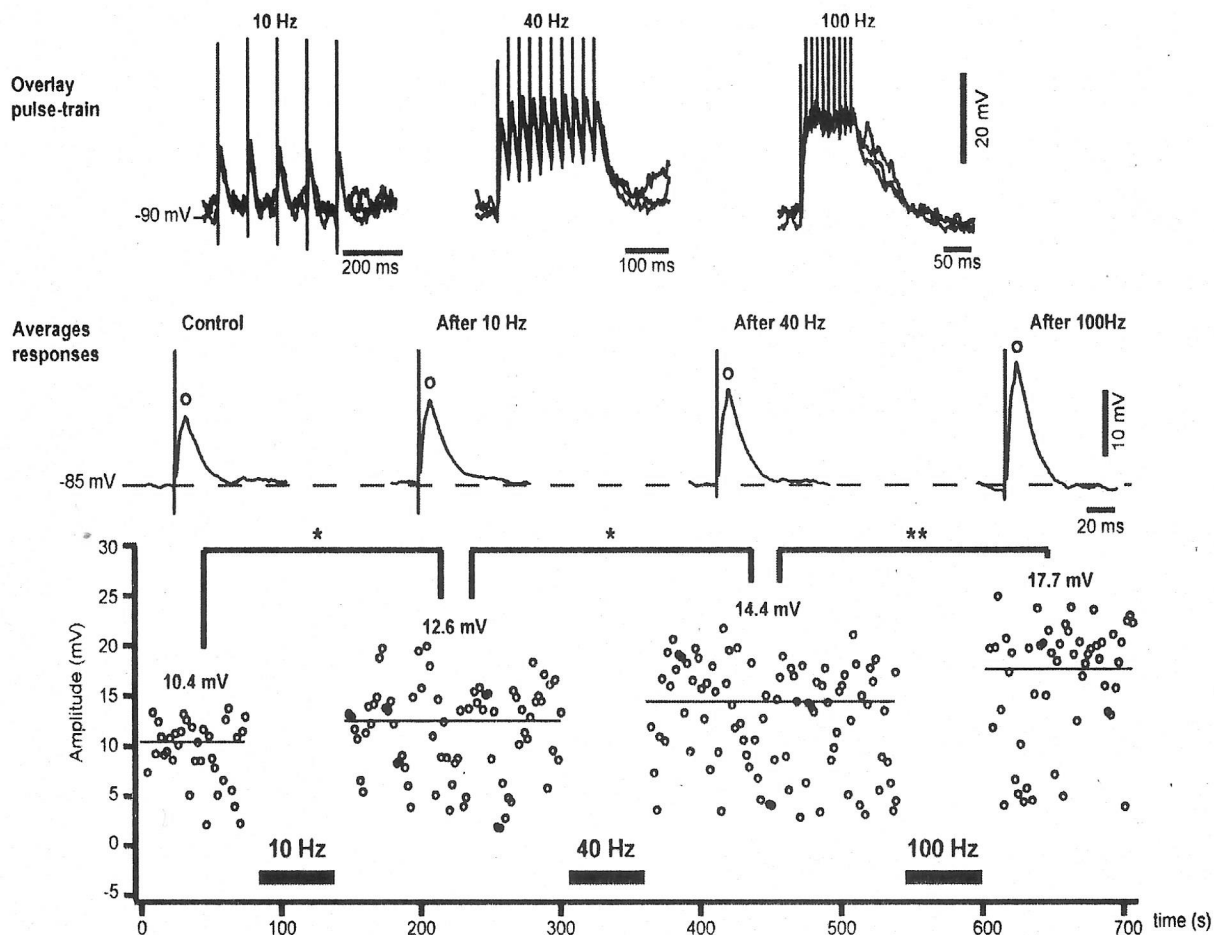


Figura 33. Facilitación progresiva de respuestas sinápticas evocadas por estimulación talámica a frecuencias en incremento. Preparación bajo barbitúricos. Los trazos superiores muestran tres trazos superpuestos de las respuestas evocadas por los trenes de condicionamiento (10 Hz, 40 Hz y 100 Hz) aplicados en vías tálamo-corticales. El panel medio muestra los promedios de las respuestas antes y después de cada tren de condicionamiento. Los círculos blancos indican el punto donde la amplitud fue medida. El gráfico final muestra la amplitud de respuestas individuales durante el experimento. Las líneas horizontales indican el promedio en cada caso. T-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

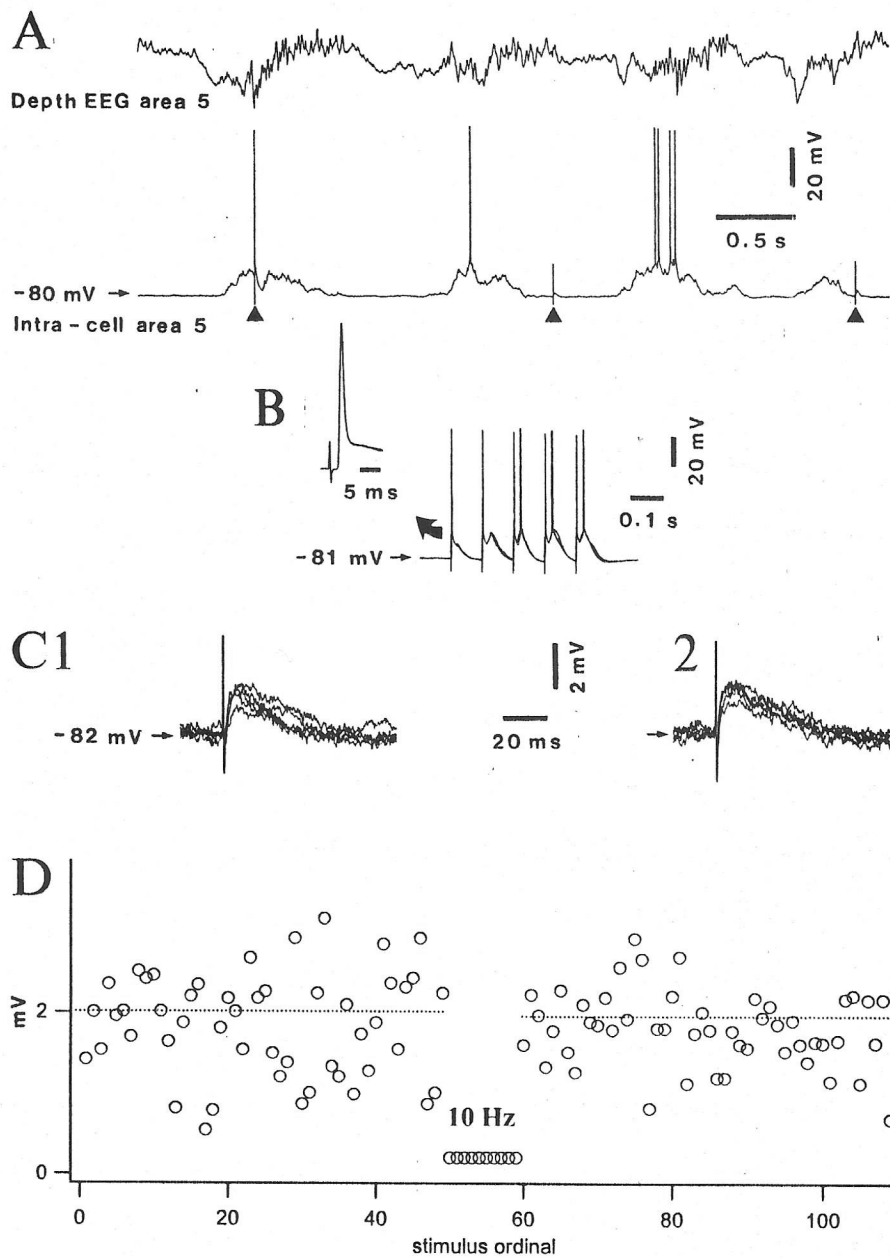


Figura 34. Ausencia de cambios plásticos al estimular vías heterosinápticas. Registro realizado bajo ketamina-xylazina. A, Registros intracelular y EEG del área 5 se muestran en la parte superior. Neurona corticotálámica identificada por activación antidrómica desde el núcleo LP. B, sobreposición de respuestas al protocolo de condicionamiento aplicado en el núcleo LP, el inserto muestra un potencial antidrómico a mayor escala. C, superimposición de respuestas evocadas por estímulos individuales en el área 5 de la corteza, antes (C1) y después (C2) del protocolo de condicionamiento. D, el gráfico muestra la amplitud de cada respuesta al ser aplicado un estímulo individual. En la corteza. Nótese la ausencia de cambios después del protocolo de condicionamiento.

Áreas corticales

Otro resultado negativo y altamente consistente fue encontrado en esta sección. En forma contraria a lo que se podría esperar, no se encontró ningún tipo de diferencia en cuanto a plasticidad sináptica en las dos áreas corticales aquí evaluadas (tablas 1-2). Esto se refiere a la probabilidad de inducir un cambio, al tipo de cambio (potenciación o depresión) y a la duración del cambio. Ya que las dos regiones corticales evaluadas no mostraron diferencias entre sí, este estudio no se extendió hacia otras regiones de la corteza.

3.1.2. Sueño Natural

Todos los experimentos hasta aquí descritos se realizaron en animales anestesiados, bajo el supuesto fundamental de que los anestésicos pueden reproducir las características (sino todas, al menos la mayoría) del sueño natural. Claramente, ningún anestésico puede reproducir *todas* las características del sueño natural. Por este motivo se repitieron los experimentos en preparaciones crónicas, donde los animales transitan por diversos estados de vigilancia, entre ellos el sueño natural.

Base de datos

Debido a la extrema dificultad técnica que presentan los registros intracelulares en preparaciones crónicas, esta sección se realizó con la intención de corroborar, al menos *en principio*, que los resultados obtenidos en preparaciones agudas son válidos o extendibles a la situación fisiológica que corresponde al sueño natural.

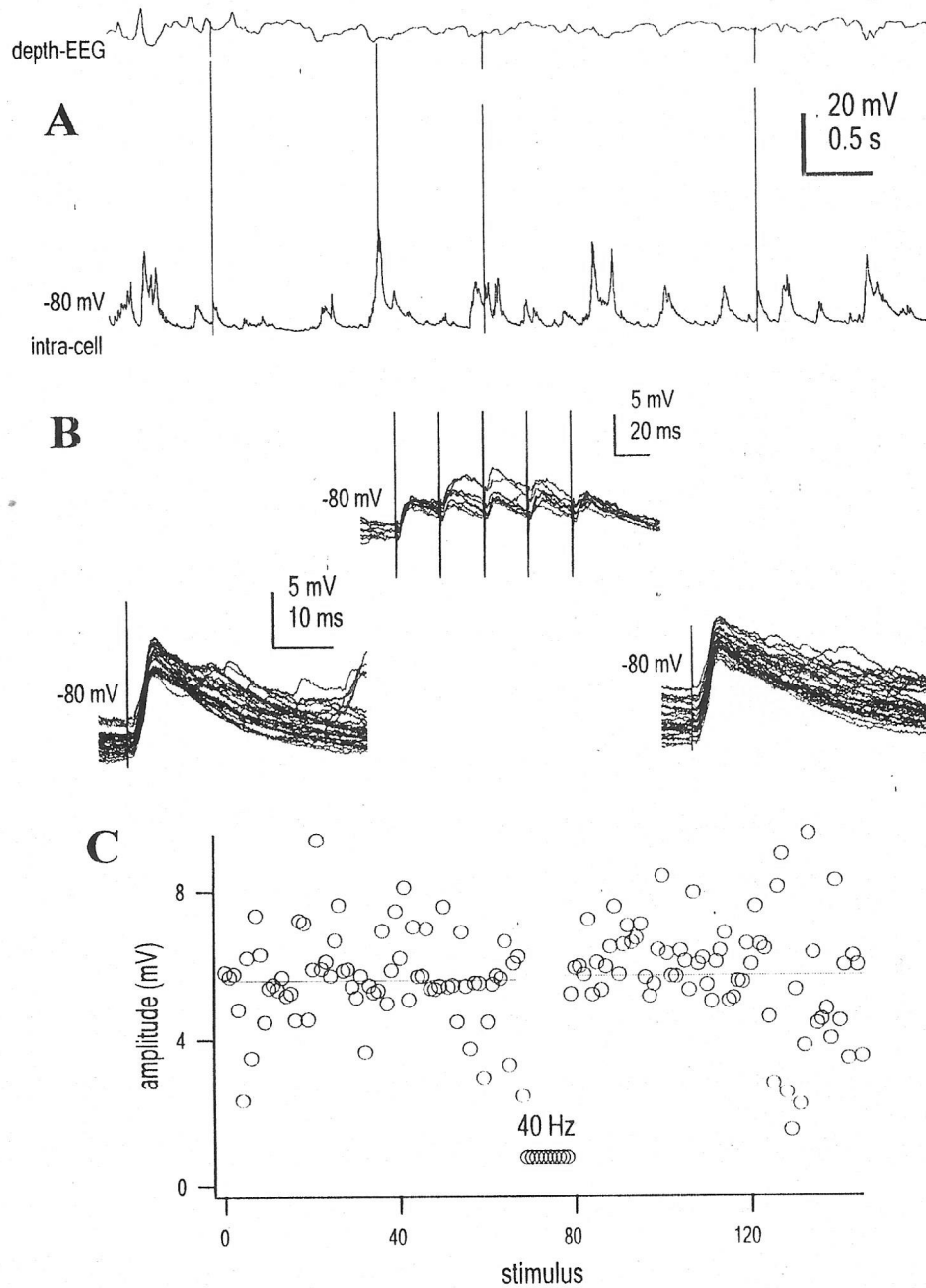


Figura 35. Ausencia de cambios plásticos al estimular vías heterosinápticas. Registro realizado bajo barbitúrico. A, Registros intracelular y EEG del área 4 se muestran en la parte superior. B, superposición de respuestas al protocolo de condicionamiento aplicado en el núcleo VL. Más abajo, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales en el área 4 de la corteza, antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento. D, el gráfico muestra la amplitud de cada respuesta al ser aplicado un estímulo individual. En la corteza. Nótese la ausencia de cambios después del protocolo de condicionamiento.

Neuronas corticales ($n = 5$) fueron registradas en regiones corticales asociativas de la corteza (áreas 5 y 7, tablas 6-8). Las neuronas presentaron valores de V_m estables a lo largo del registro y respuestas relativamente constantes a la estimulación aferente. Las neuronas registradas fueron identificadas electrofisiológicamente por sus patrones de descarga ante pulsos cuadrados de corriente positiva. De las 5 neuronas registradas 4 fueron RS y 1 FRB. Todas las neuronas fueron registradas a profundidades entre 1.6-2.3 mm de la corteza. Esta distribución sugiere que las neuronas pertenecen a capas profundas de la corteza, probablemente V/VI.

Los resultados de los experimento se dividen en dos etapas. La primera parte consistió en registrar neuronas corticales y aplicar los mismos protocolos de estimulación que se describieron para las preparaciones agudas. Se encontró que los mismos protocolos podían producir un efecto similar al descrito para animales anestesiados. La siguiente etapa, fue evaluar si los períodos de sueño podían *per se* inducir cambio plásticos en las respuestas sinápticas.

Estimulación cortical

Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 36, en que se puede ver una neurona piramidal (área 5) registrada simultáneamente con la actividad de la red cortical en el EEG (área 7). Se puede apreciar en el EEG la presencia de prominentes husos (asteriscos, fig. 36), los cuales son indicadores de etapas tempranas de sueño (equivalente a la etapa 2 de humanos). Este es un patrón muy similar al que se reportó en preparaciones agudas de animales anestesiados con barbitúricos (figuras 23,

32, 37). De modo que, y como se había descrito anteriormente (Grenier et al., 2001), desde el punto de vista del EEG, la utilización de un anestésico como un barbitúrico induce un estado similar al sueño natural. Los resultados de esta sección están resumidos en la tabla 6.

Tabla 6. Plasticidad sináptica en sueño natural: Vías intracorticales

Cell	1 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz	área
1	0	0	50		5/7
2		-50	0	0	5/7
3				0	5/7
No cambio		100%	50%	100%	
Depresión		50%	0%	0%	
Potenciación		0%	50%	0%	

Table 6

Interesante, es el hecho de que el registro intracelular muestra que la neurona no despliega husos en forma sincrónica con el EEG, de hecho, no muestra en absoluto la presencia de husos (fig. 36). En su lugar, el registro intracelular despliega una clara oscilación lenta, caracterizada por períodos de hiperpolarización (flechas, fig. 36) y ausencia de descarga de potenciales de acción. Este resultado no es tan inesperado como se podría pensar, pues se ha descrito que no todas las neuronas corticales siguen la actividad del EEG, esto es válido sobretudo para neuronas en preparaciones crónicas, de sueño natural (Grenier et al., 2001), pero también se ha descrito para preparaciones agudas, donde el sueño se induce por anestésicos (Steriade et al., 1998b; Timofeev & Steriade, 1998; Timofeev et al., 2002).

Otro aspecto interesante es el hecho de que la neurona muestra una actividad sináptica mucho mayor que las neuronas registradas bajo anestésicos, así como una mayor frecuencia de descarga durante los períodos activos. Estos resultados también han sido ya reportados y no presentan novedad alguna (Grenier et al., 2001). En su lugar, la comparación de los presentes registros con los de la literatura permite asegurar la buena calidad de los mismos.

La neurona de la figura 36 se identificó como una RS debido a su patrón de descarga (frecuencia máxima ~ 70 Hz) y la duración de sus potenciales de acción (duración media ~ 0.6 ms). La estimulación de una región cortical cercana produjo en la neurona un PEPS que generó un potencial de acción en todos los casos. Luego de aplicar el protocolo de condicionamiento (5 estímulos a 10 Hz) los estímulos fallaron en generar un potencial de acción en todos los casos y por tanto la probabilidad de descarga disminuyó, debido probablemente a una depresión en la respuesta excitatoria subyacente a los potenciales de acción. Ya que la mayoría de los estímulos generaron un potencial de acción la amplitud del PEPS no pudo ser calculada, sin embargo la pendiente de la respuesta subumbral muestra una considerable disminución después del protocolo de condicionamiento (~ 1.3 mV/ms en el control vs. ~ 0.6 mV/ms después del condicionamiento), lo cual sugiere una depresión del 50% en los PEPSs después del protocolo de condicionamiento.

Por tanto, para esta neurona, el protocolo de condicionamiento produjo una caída de la pendiente inicial del PEPS y de la probabilidad de descarga (fig. 36).

El siguiente ejemplo es de otra neurona cortical que fue estimulada desde la corteza proximal, pero a una frecuencia de 40 Hz (fig. 27). En este caso se puede apreciar en el EEG la presencia de claras oscilaciones lentas (flechas, fig. 37), que son coincidentes con hiperpolarizaciones de la membrana neuronal en algunos casos. También se puede observar en el registro intracelular un período de husos bastante claro, que no se refleja en el EEG (asterisco, fig. 37). Dicha neurona fue estimulada a baja frecuencia (0.5 Hz, fig. 37) para coleccionar muestras de la respuesta control.

A pesar de la baja intensidad de la estimulación ($\sim 200 \mu\text{A}$), la respuesta sináptica generada mostró múltiples componentes sugiriendo un origen polisináptico (fig. 37) y en acuerdo con lo que se ha descrito para vías intracorticales (Pouille & Scanziani, 2001; Berger & Luscher, 2003). La primera parte de la respuesta consistió una depolarización producida por un PEPS seguido de una repolarización (a, fig. 37), el siguiente componente fue un segundo PEPS que tuvo lugar durante la fase de repolarización de la membrana (b, fig. 37), finalmente, un PIPS más prolongado hiperpolarizó la membrana hasta -75 o -80 mV (c, fig. 37). Vale notar que debido a su frecuencia (40 Hz) el protocolo de condicionamiento sólo generó la primera parte de la compleja respuesta sináptica. Una leve, pero sostenida depolarización dio luego paso al PIPS final una vez que terminó el tren de estímulos condicionamientos (fig. 37).

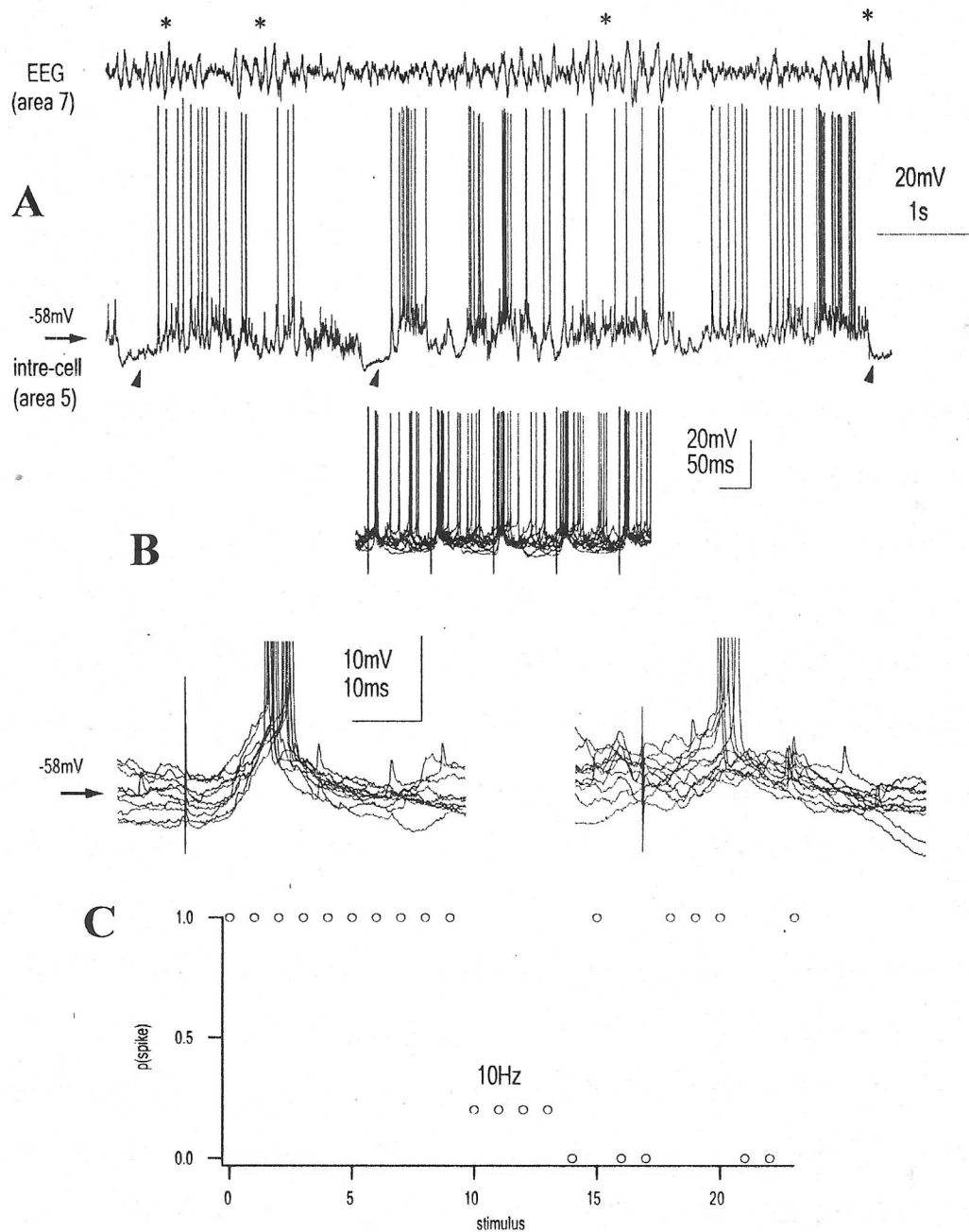


Figura 36. Depresión de respuestas sinápticas evocadas por estimulación cortical local durante sueño natural. Registro realizado en preparación crónica. A, Registros intracelular (área 5) y EEG (área 7). Asteriscos señalan husos en el EEG y flechas oscilación lenta en el registro intracelular. B, superposición de respuestas al protocolo de condicionamiento aplicado en una región cortical cercana. Más abajo, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales, antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento. Nótese presencia constante de potenciales de acción en el control. C, el gráfico muestra la probabilidad de evocar un potencial de acción por cada estímulo individual.

El protocolo de condicionamiento produjo una facilitación selectiva del PIPS que concluye la respuesta sináptica (c, fig. 37). Este es un resultado interesante, pues sugiere que puede haber una potenciación específica de solo uno de los componentes dentro de una respuesta polisináptica. Resultados similares fueron obtenidos en preparaciones agudas, de animales anestesiados, donde elementos específicos de respuestas neuronales compuestas fueron afectados selectivamente dejando intactos otros (fig. 37). La potenciación del PIPS tardío duró ~20 s y luego la respuesta neuronal recuperó los valores iniciales. Estos resultados de activación de vías intracorticales en preparaciones crónicas, se mostraron consistentes con lo encontrado en preparaciones agudas, donde altas (40 Hz) y bajas (10 Hz) frecuencias fueron capaces de inducir cambios plásticos en las respuestas sinápticas evocadas (figs. 26-28).

Estimulación talámica

La figura 38 muestra una neurona registrada junto con el EEG de una región cortical cercana. Nótese en el EEG la presencia de ritmos delta (asteriscos, fig. 38), marcadores de sueño lento, que solo en el primer caso tienen un correlato en el registro intracelular. Se muestra además hacia el final del EEG una deflexión negativa (flecha, fig. 38) que está muy bien representada en la neurona como una depolarización de la membrana y un aumento considerable en la frecuencia de descarga. Los resultados de esta sección se resumen en la tabla 7.

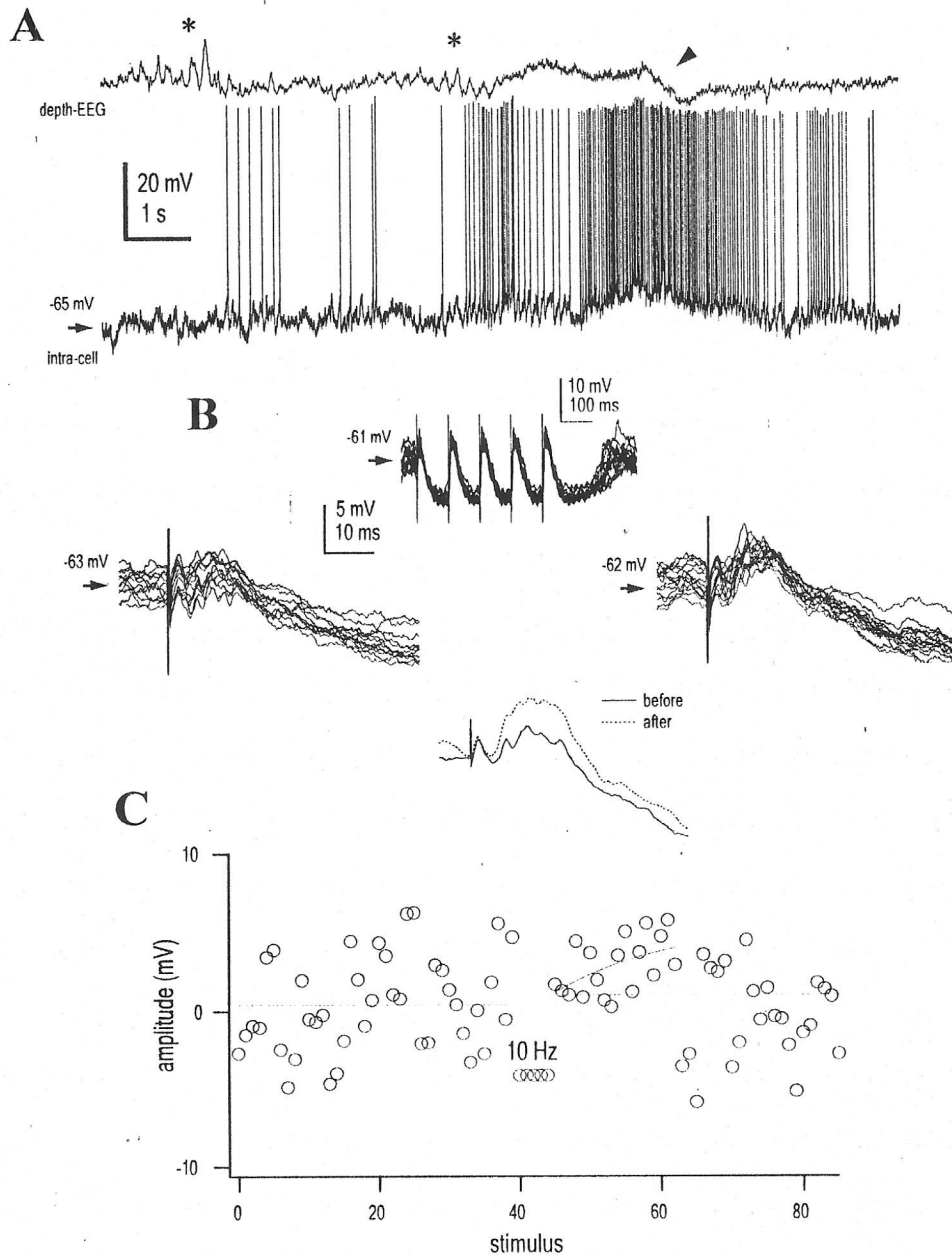


Figura 38. Potenciación selectiva de respuestas sinápticas evocadas por estimulación talámica durante sueño natural. Registro realizado en preparación crónica. A, Registros intracelular (área 5) y EEG (área 7). Ritmos delta (asteriscos) e inflexión negativa en el EEG (flecha). B, superposición de respuestas al protocolo de condicionamiento aplicado en el núcleo talámico LP, nótese las “respuestas en aumento”. Más abajo, superposición de respuestas evocadas por estímulos individuales, antes (izquierda) y después (derecha) del protocolo de condicionamiento. La superposición de los promedios muestra una potenciación selectiva de los primeros componentes de la respuesta. C, el gráfico muestra la amplitud de la primera respuesta para cada estímulo individual. Nótese la corta duración (20 s) de la facilitación.

La estimulación del núcleo talámico lateral posterior (LP) produjo una respuesta depolarizante compleja que fue seguido de una hiperpolarización lenta, pero sostenida (fig. 38). Tal tipo de respuestas es consistente con una activación secuencias de fibras tálamocorticales excitatorias, cuyas respuestas son luego truncadas por la activación colateral de redes de interneuronas, en su mayoría inhibitorias. La colección de muestras tomadas para el control mostró que la estimulación talámica produjo una respuesta muy variable en amplitud, que oscilaron entre valores positivos y negativos (fig. 38). El protocolo de condicionamiento produjo respuestas en aumento, que facilitaron la respuesta sináptica a partir del segundo estímulo del tren condicionante. Después del condicionamiento a 10 Hz, todas las respuestas depolarizantes se vieron facilitadas, sin ser modificada sin embargo la hiperpolarización final (fig. 38). Tal potenciación se mantuvo por cerca de 20 s, para luego retornar a los valores del control. Este resultado también es consistente con lo que se describió en preparaciones agudas en que la estimulación a 10 Hz desde el tálamo ocasionalmente indujo facilitación de las respuestas sinápticas (figs. 30, 31, 33).

Estos experimentos muestran que, al menos *en principio*, los resultados obtenidos con los protocolos de condicionamiento y las preparaciones agudas (de sueño inducido por anestésicos) aquí utilizadas pueden ser extrapolables casos fisiológicos, donde el sueño es natural y espontáneo.

Sueño Natural

La última parte de esta sección consistió en evaluar el efecto de períodos espontáneos de sueño natural sobre las respuestas sinápticas inducidas por estimulación cortical. Para esto se registró una neurona cortical durante la vigilia y se recolectó como control un grupo de respuestas a la estimulación cortical proximal a baja frecuencia (1 Hz). Luego, se detuvo la estimulación y se continuó el registro hasta que el animal presentara un ciclo de sueño completo. Una vez concluido el ciclo de sueño y que el animal estuvo despierto nuevamente, se reinició la estimulación a baja frecuencia y se colectó otro grupo de respuestas para ser comparadas con las primeras. Los resultados de esta sección están resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Plasticidad sináptica en sueño natural: Sueño Natural

Cell	1 Hz	área
1	0	5/7
2	0	5/7
3	-100	5/7
No cambio	66%	
Depresión	33%	
Potenciación	0%	

Table 8

Las figuras 39-43 muestran el único caso (de 3 estudiados) en que un ciclo de sueño (12 minutos) produjo un cambio en la respuesta sináptica inducida por estimulación cortical. Para identificar claramente el estado de vigilia y disminuir la posibilidad de error, se presentan cuatro parámetros evaluados, a saber: la actividad

eléctrica de la corteza (EEG), la actividad eléctrica intracelular (intra), la actividad eléctrica de los músculos oculares (EOG) y la actividad eléctrica general de los músculos esqueléticos (EMG). Con estos cuatro parámetros es fácilmente identificable el estado de vigilia que el animal presenta.

La figura 39 presenta una neurona del área 5 registrada durante un período de vigilia. El estado del EEG de una región vecina (área 7) mostró actividad de alta frecuencia y baja amplitud, característica de la vigilia. La oscilación patente hacia la mitad del registro es análoga al conocido ritmo α de la corteza visual o ritmo μ de la corteza somatosensorial, de entre 5 y 15 Hz (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1987). El registro intracelular mostró una continua actividad neuronal, evidente por la masiva descarga de potenciales de acción en forma espontánea. Nótese los cambios en el potencial de membrana neuronal, típicos de los registros en preparaciones crónicas. Dicha célula fue estimulada desde una región cortical vecina a baja frecuencia (0.5 Hz), lo que es evidente por los artefactos de estimulación. Consistente con un estado de vigilia, movimientos oculares fueron detectados ocasionalmente en el EOG, así como movimientos musculares voluntarios en el EMG. A pesar de las continuas fluctuaciones en el potencial de membrana celular, una distribución del mismo mostró la estabilidad del registro en una distribución gaussiana continua.

WAKING (BEFORE)

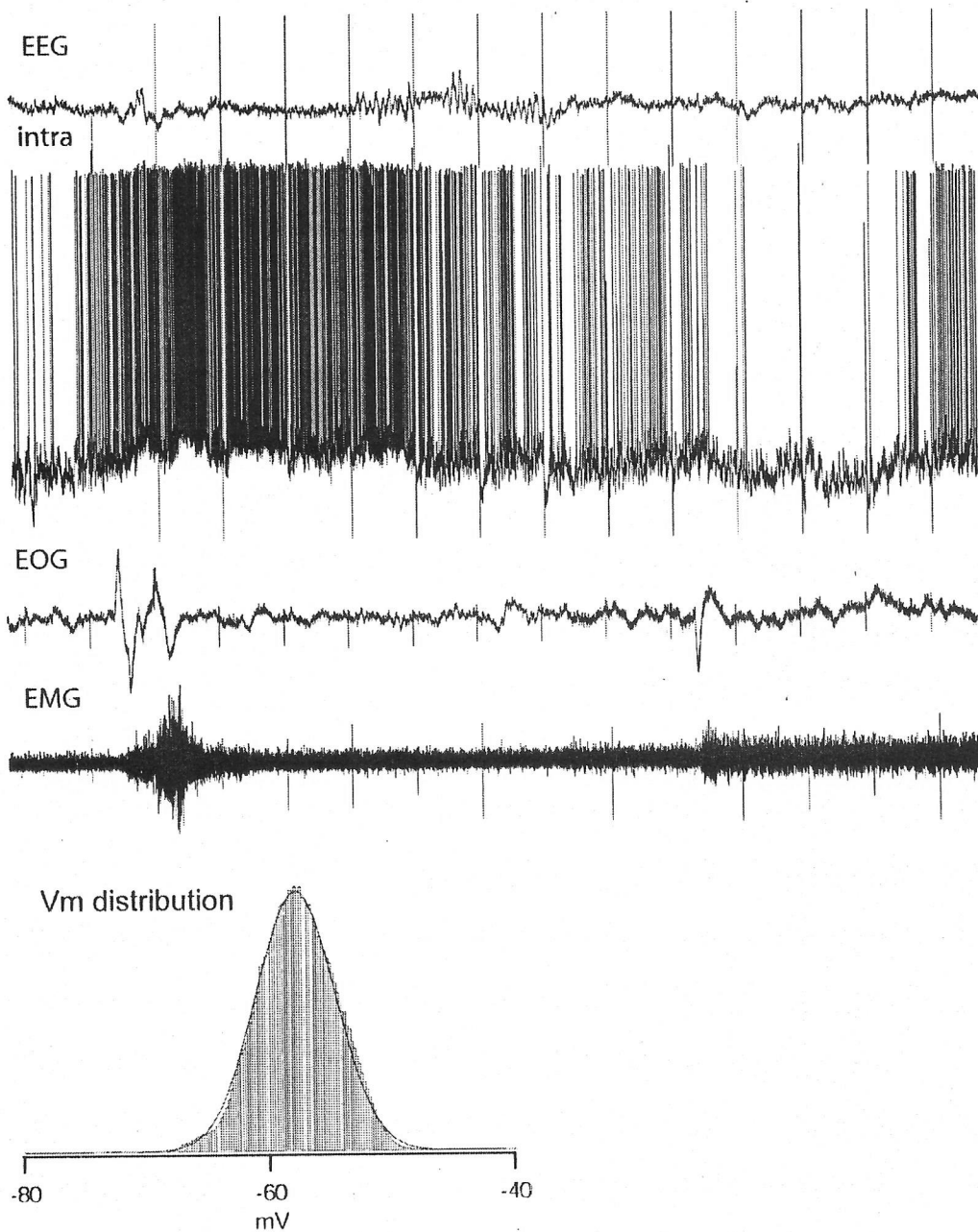


Figura 39. Identificación del estado de vigilia. Período inicial. Cuatro trazos muestran respectivamente la actividad eléctrica de la corteza (EEG), la actividad eléctrica intracelular (intra), la actividad eléctrica de los músculos oculares (EOG) y la actividad eléctrica general de los músculos esqueléticos (EMG). Nótese la ausencia de ritmos lentos y de gran amplitud en el EEG, descarga continua y fluctuaciones de potencial en el registro intracelular, movimientos oculares en el EOG, acompañado de movimientos musculares en el EMG. La distribución del potencial de membrana es discreta y gaussiana a pesar de las continuas fluctuaciones, centrada alrededor de -58 mV. Las líneas verticales son artefactos de estimulación de la corteza local.

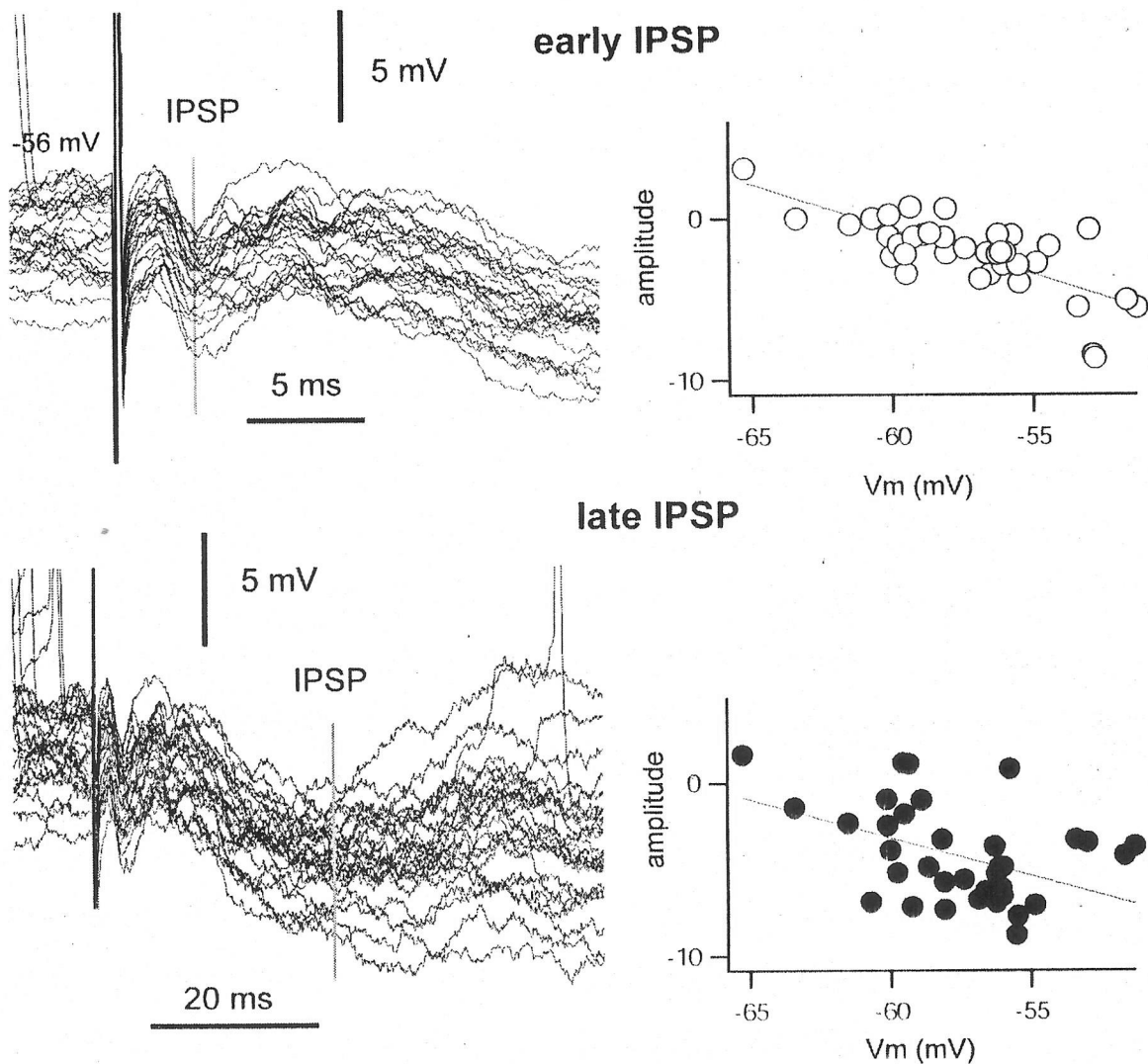


Figura 40. Identificación de respuestas a la estimulación cortical durante el primer período de vigilia. La estimulación de vías intracorticales generó una respuesta compleja, formada por dos PIPSS, uno temprano (early IPSP) y otro tardío (late IPSP), separados por una repolarización de la membrana. Se muestran superposiciones de respuestas evocadas a dos escalas temporales para facilitar la identificación de cada respuesta. La línea gris vertical indica el punto donde se midió la amplitud de las respuestas. Los gráficos de la derecha representan la dependencia de potencial de cada respuesta. La línea en cada gráfico representa el mejor ajuste lineal para cada caso. El primer PIPSS revirtió alrededor de los -61 mV, mientras que el segundo cerca de -66 mV

SLOW WAVE SLEEP

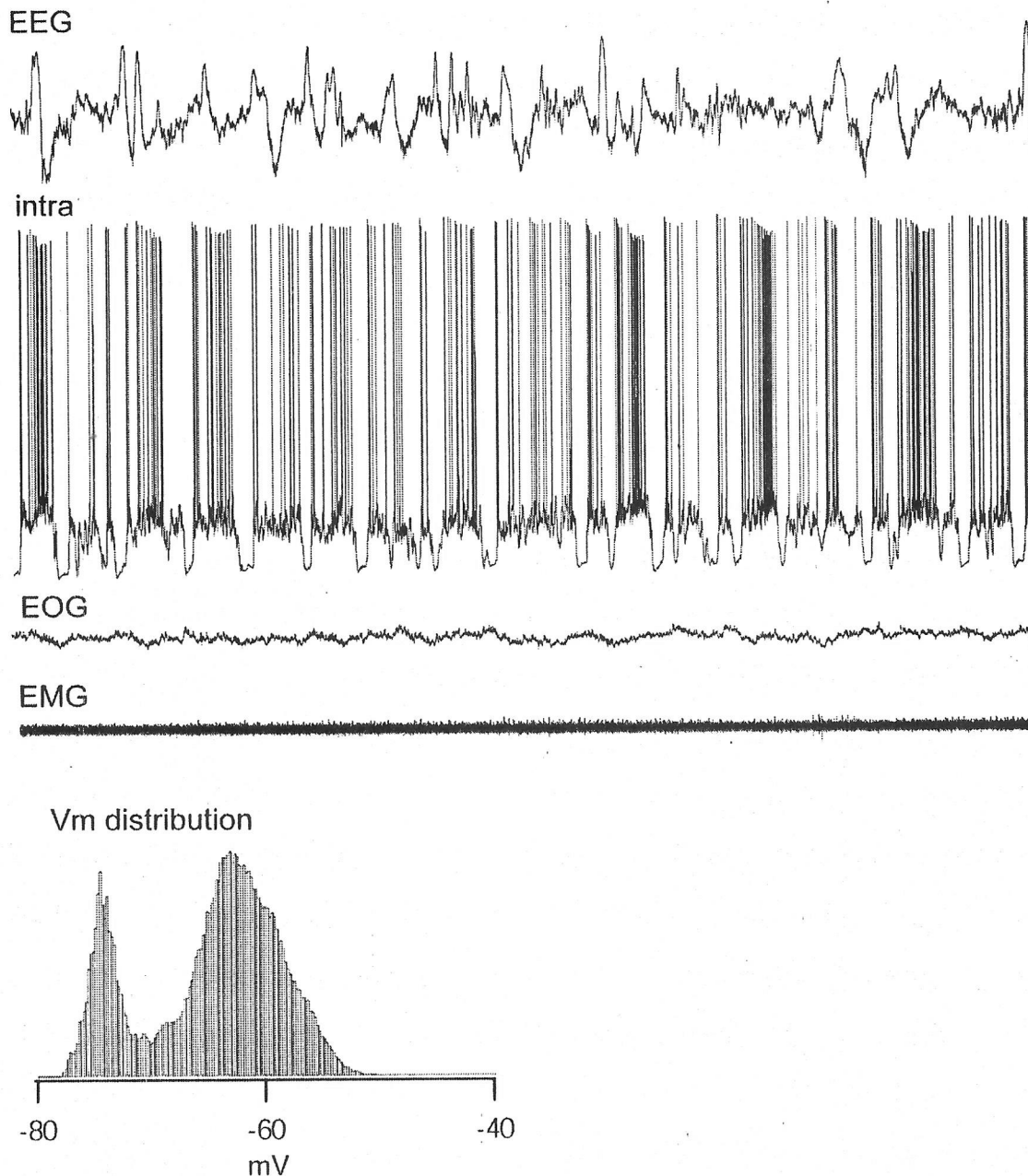
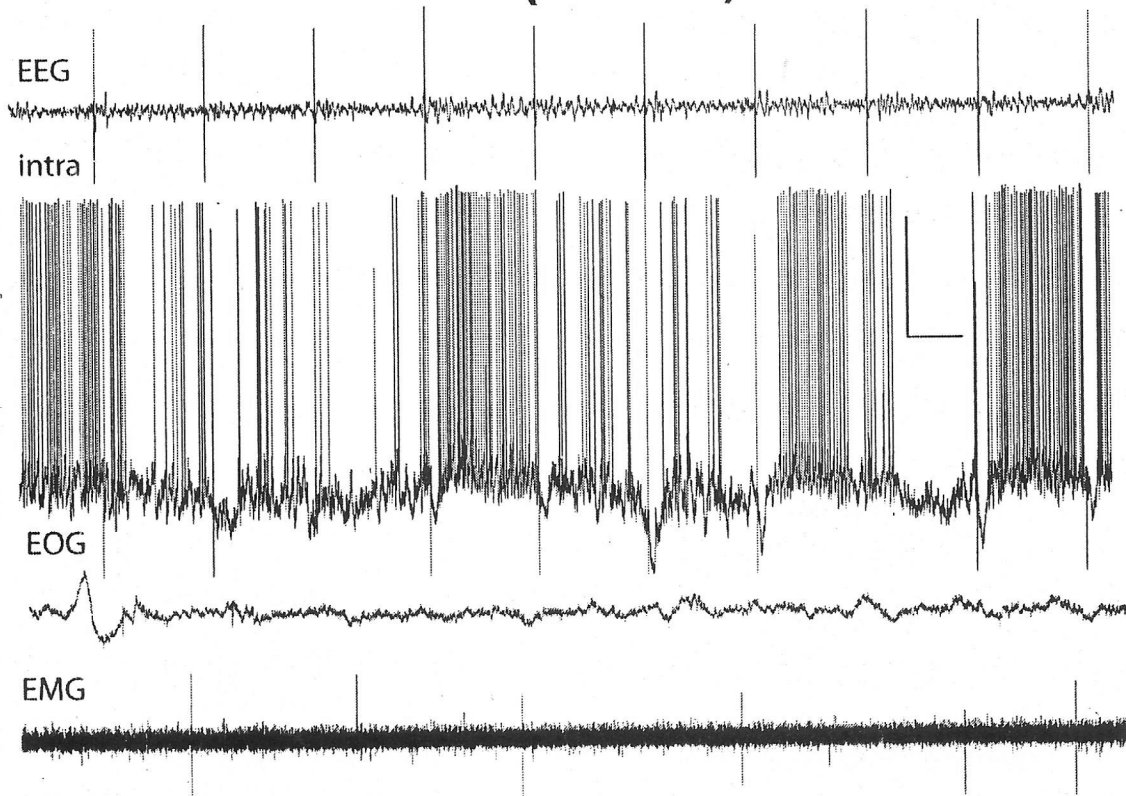


Figura 41. Identificación del estado de vigilia. Sueño lento intermedio. Cuatro trazos muestran respectivamente la actividad eléctrica de la corteza (EEG), la actividad eléctrica intracelular (intra), la actividad eléctrica de los músculos oculares (EOG) y la actividad eléctrica general de los músculos esqueléticos (EMG). Nótese la presencia de ritmos lentos y de gran amplitud en el EEG, característicos de la oscilación lenta del sueño, descarga cíclica, interrumpida por profundas hiperpolarizaciones en el registro intracelular, ausencia de movimientos oculares en el EOG, y de movimientos musculares en el EMG. La distribución del potencial de membrana es bimodal y discreta. El máximo del primer modo alrededor de -74 mV, corresponde a las fases hiperpolarizantes, mientras que el segundo modo, a -62 mV, representa las fases depolarizantes, activas. Nótese ausencia de estimulación

WAKING (AFTER)



Vm distribution

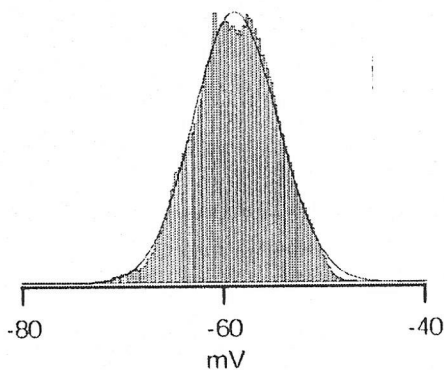


Figura 42. Identificación del estado de vigilia. Período tardío. Cuatro trazos muestran respectivamente la actividad eléctrica de la corteza (EEG), la actividad eléctrica intracelular (intra), la actividad eléctrica de los músculos oculares (EOG) y la actividad eléctrica general de los músculos esqueléticos (EMG). Nótese la ausencia de ritmos lentos y de gran amplitud en el EEG, descarga continua y fluctuaciones de potencial en el registro intracelular, movimientos oculares en el EOG, ausencia de movimientos musculares en el EMG. La distribución del potencial de membrana es discreta y gaussiana a pesar de las continuas fluctuaciones, centrada alrededor de -58 mV. Las líneas verticales son artefactos de estimulación de la corteza local.

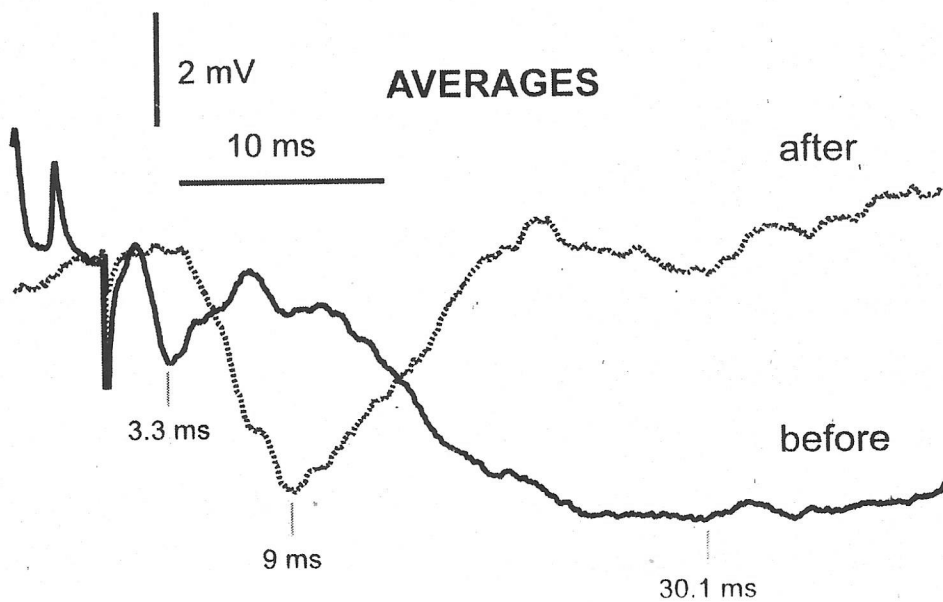
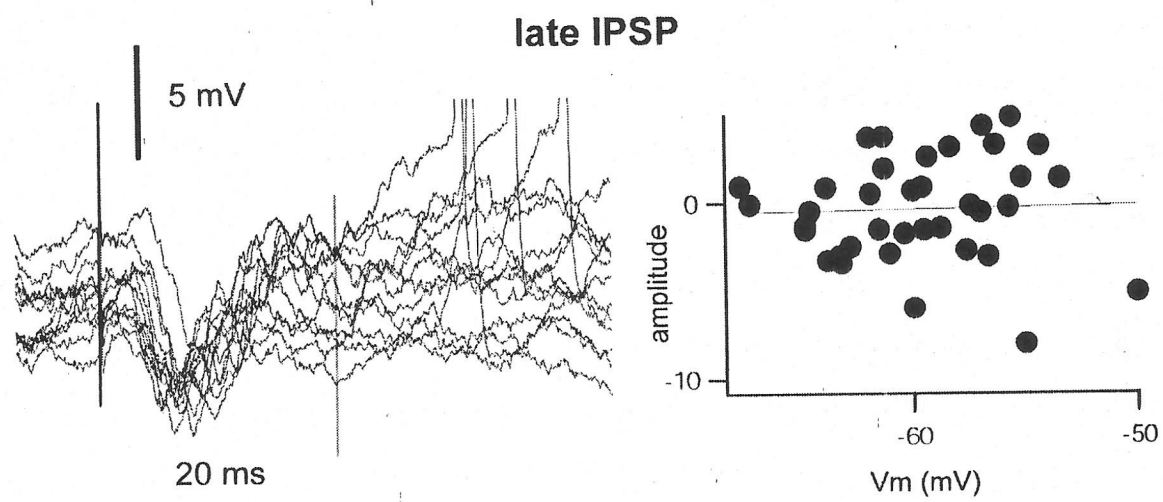
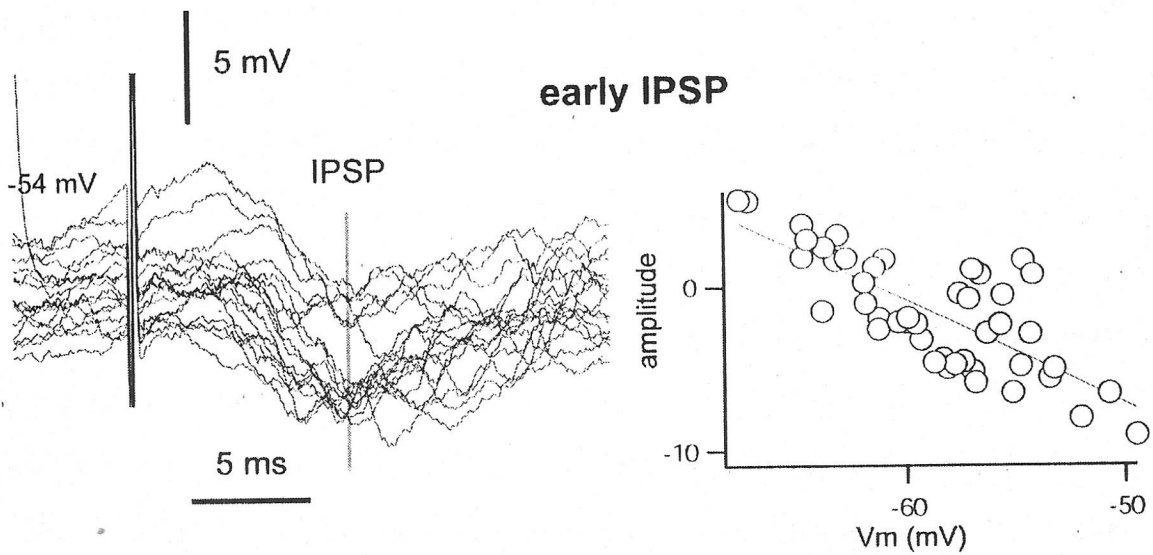


Figura 43. Identificación de respuestas a la estimulación cortical durante el segundo período de vigilia. La estimulación de vías intracorticales generó una respuesta de un solo componente, formada por un PIPS (early IPSP). Se muestran superposiciones de respuestas evocadas a dos escalas temporales para facilitar la identificación de cada respuesta, y compararlas con la figura 48. Las líneas verticales muestran el punto donde la amplitud de las respuestas fue medida. Nótese que el PIPS temprano (fig. 48) desapareció y en su lugar otro PIPS ocurrió, con distinta latencia (early IPSP). La dependencia de potencial de la respuesta la identificó como un PIPS, que revirtió cerca de -61 mV. El PIPS tardío (fig. 48) también fue modificado y en su lugar la membrana mostró un retorno al potencial de reposo. La amplitud medida en el punto del PIPS tardío mostró variaciones considerables, pero no una tendencia que indicara la existencia de una respuesta. Las líneas de los gráficos representan el mejor ajuste lineal para cada grupo de puntos. Los trazos finales son el promedio ($n = 30$) de las respuestas evocadas antes y después de un período de sueño lento (12 minutos). Nótese la modificación dramática de las respuestas después del período de sueño. Las barras verticales indican los puntos donde las respuestas alcanzaron máxima amplitud en cada caso, y donde fueron medidas.

La estimulación cortical vecina evocó respuestas compuestas, caso común para la activación de vías intracorticales. La respuesta consistió en un PIPS inicial (early IPSP, fig. 40) seguido de una repolarización, para luego concluir en un PIPS más acentuado y prolongado (late IPSP, fig. 40). Ambas respuestas fueron identificadas como PIPSS debido a sus potenciales de reversión, consistentes con conductancias de cloruro en la corteza (Xiang et al., 1998, 2002). El potencial de reversión para el PIPS temprano fue ~ -61 mV y para el PIPS tardío ~ -66 mV (fig. 40). Mientras que la amplitud máxima fue alcanzada por el primer IPSP a ~ 3 ms y por el segundo IPSP a ~ 30 ms

A medida que el registro continuó, el estado de vigilancia cambió. Luego de unos minutos de registro en estado de vigilia, el inicio de un período de sueño lento se hizo evidente (fig. 40). La estimulación se detuvo, pero el registro continuó. El EEG presentó actividades de baja frecuencia y gran amplitud, características definitorias del período de sueño lento. Al mismo tiempo, el registro intracelular desplegó períodos de hiperpolarizaciones prolongadas, donde la ausencia de descarga de potenciales de acción fue evidente. Nótese que la presencia de los períodos de hiperpolarización prolongada parece estabilizar el registro intracelular, ya que las fluctuaciones del potencial de membrana se hacen menos evidentes. La distribución del potencial de membrana mostró dos grupos discretos, el más negativo correspondiente a los períodos de hiperpolarización y el más depolarizado a la fase activa de la oscilación lenta. Nótese que en esta neurona el potencial de membrana durante la fase activa de la oscilación lenta es ligeramente más hiperpolarizado que durante los estados de vigilia (ver figs. 39, 41, 43).

Una vez completado el ciclo de sueño lento (12 minutos), una nueva transición hacia la vigilia se presentó en el registro y la estimulación cortical antes detenida fue reiniciada. Al igual que en el primer caso de vigilia, los parámetros registrados permitieron identificar claramente el estado del registro. El EEG mostró actividad de alta frecuencia y baja amplitud, característica de la vigilia. Períodos oscilatorios del α/μ , de entre 5 y 15 Hz, se hicieron nuevamente patentes. El registro intracelular mostró una masiva descarga de potenciales de acción, así como continuas fluctuaciones en el potencial de membrana neuronal. La célula fue nuevamente estimulada desde una región cortical vecina a baja frecuencia (0.5 Hz), lo que es evidente por los artefactos de estimulación. Consistente con un estado de vigilia, movimientos oculares fueron detectados ocasionalmente en el EOG, así como una activación de las regiones musculares en el EMG. A pesar de las continuas fluctuaciones en el potencial de membrana celular, una distribución del mismo mostró la estabilidad del registro en una distribución gaussiana continua, similar a la del primer estado de vigilia. Estos resultados muestran que desde el punto de vista macroscópico por lo menos, los dos estados de vigilia aquí presentados fueron equivalentes, presentando similares características.

La reactivación de la estimulación cortical mostró que las respuestas evocadas habían cambiando. El cambio ocurrido durante el período de sueño lento no fue una potenciación o depresión de la respuesta registrada en el primer período de vigilia, sino que la nueva respuesta fue radicalmente distinta a la inicial. La nueva respuesta consistió

en un PIPS (early IPSP, fig. 43). La respuesta fue identificada como un PIPS debido a su potencial de reversión, ~ -61 mV, similar al del PIPS temprano de la respuesta original, salvo que la amplitud máxima fue alcanzada a ~ 3.3 ms por este y a ~ 9 ms por aquel (fig. 43). La fase correspondiente al PIPS tardío de la respuesta inicial fue completamente abolida después del período de sueño natural, y en su lugar la neurona recuperó sus condiciones de reposo (fig. 43). Al final de la figura 43 se muestra el promedio de las respuestas evocadas durante los estados de vigilia para varios estímulos ($n = 30$), antes y después del período de sueño lento. Nótese el dramático cambio de la respuesta después de un período de sueño natural.

En otras dos células se evaluó el mismo protocolo y no se encontraron cambios en la respuesta sináptica después de un período de sueño natural (resultado no mostrado), sugiriendo que el resultado aquí presentado no es la norma de lo que ocurre durante sueño lento. Es decir que sólo en algunos casos los períodos de sueño alteran las propiedades de las respuestas sinápticas.

3.2. Integración sináptica

Según los resultados obtenidos hasta el momento, era claro que sólo podía inducirse plasticidad sináptica cuando se estimulan vías homosinápticas, esto es, realizar el control, el condicionamiento en la misma vía. Dado el constante resultado negativo de ausencia de cambios en la respuesta sináptica cuando se estimulan vías aferentes heterosinápticas (tablas 4-5, figs. 34, 35), se decidió estudiar la interacción de dichas

respuestas cuando se estimulan vías heterosinápticas. En otras palabras, lo que se hizo fue evaluar la integración en neuronas corticales de respuestas sinápticas provenientes de distintas vías aferentes.

Para realizar este estudio sobre la integración cortical se decidió utilizar el conocido protocolo de estimulación pareada, que consiste simplemente en la aplicación de dos estímulos separados por distintos intervalos temporales. Esto permitió evaluar el curso temporal de la interacción de dos vías aferentes que arriban sobre la misma neurona produciendo respuestas distintas. Como se indicó antes, las vías elegidas aferentes fueron tálamocortical y corticocortical ipsilateral.

Neuronas corticales ($n = 37$) fueron registradas en regiones corticales asociativas y motoras de la corteza, mientras que células tálamocorticales ($n = 6$) en el núcleo VL y LP del tálamo. Al igual que en apartados anteriores, las neuronas presentaron V_m estables a lo largo del registro (30-150 minutos), y respuestas constantes a la estimulación de núcleos talámicos y áreas corticales cercanas. Todas las neuronas fueron identificadas electrofisiológicamente por sus patrones de descarga ante pulsos cuadrados de corriente positiva.

Respuestas a estimulación cortical y talámica

Se registraron sólo neuronas corticales que mostraran respuesta a la estimulación cortical y talámica. Un ejemplo de tales respuestas se muestra en la figura 44, en que una neurona corticotálamica fue identificada por invasión antidrómica (inserto, fig. 44).

Dicha neurona mostró dos tipos de respuesta a la estimulación talámica, por una lado, activación antidrómica (~ 1.3 ms de latencia) durante la fase activa de la oscilación lenta (sobre -68 mV) y por otro, activación sináptica (~ 8.5 ms de latencia) durante la fase hiperpolarizante (bajo -68 mV). Nótese que durante la fase depolarizante de la oscilación lenta el PEPS de larga latencia también está presente, salvo que en la mayoría de casos genera un potencial de acción. Durante la fase silente de la oscilación lenta, la estimulación talámica no genera un potencial de acción antidrómico que llegue hasta el soma y en su lugar se ve un potencial M.

La misma neurona mostró además activación monosináptica de un PEPS (~ 1.2 ms de latencia) al ser estimulada la corteza. Todas las neuronas registradas en esta parte del estudio mostraron este tipo de respuestas, es decir, activación sináptica desde el tálamo y la corteza.

Selección de vías independientes

El siguiente paso consistió en seleccionar sólo los casos en que la estimulación talámica y cortical activaron vías independientes. Esto amerita una doble explicación.

Es necesario obtener respuestas de vías independientes porque eso garantiza que no haya un período refractario entre la activación de las vías. Si ambos estímulos activan un subconjunto de fibras axonales comunes, habrá un intervalo temporal en que la estimulación de una vía no producirá respuesta si la otra ha sido previamente estimulada.

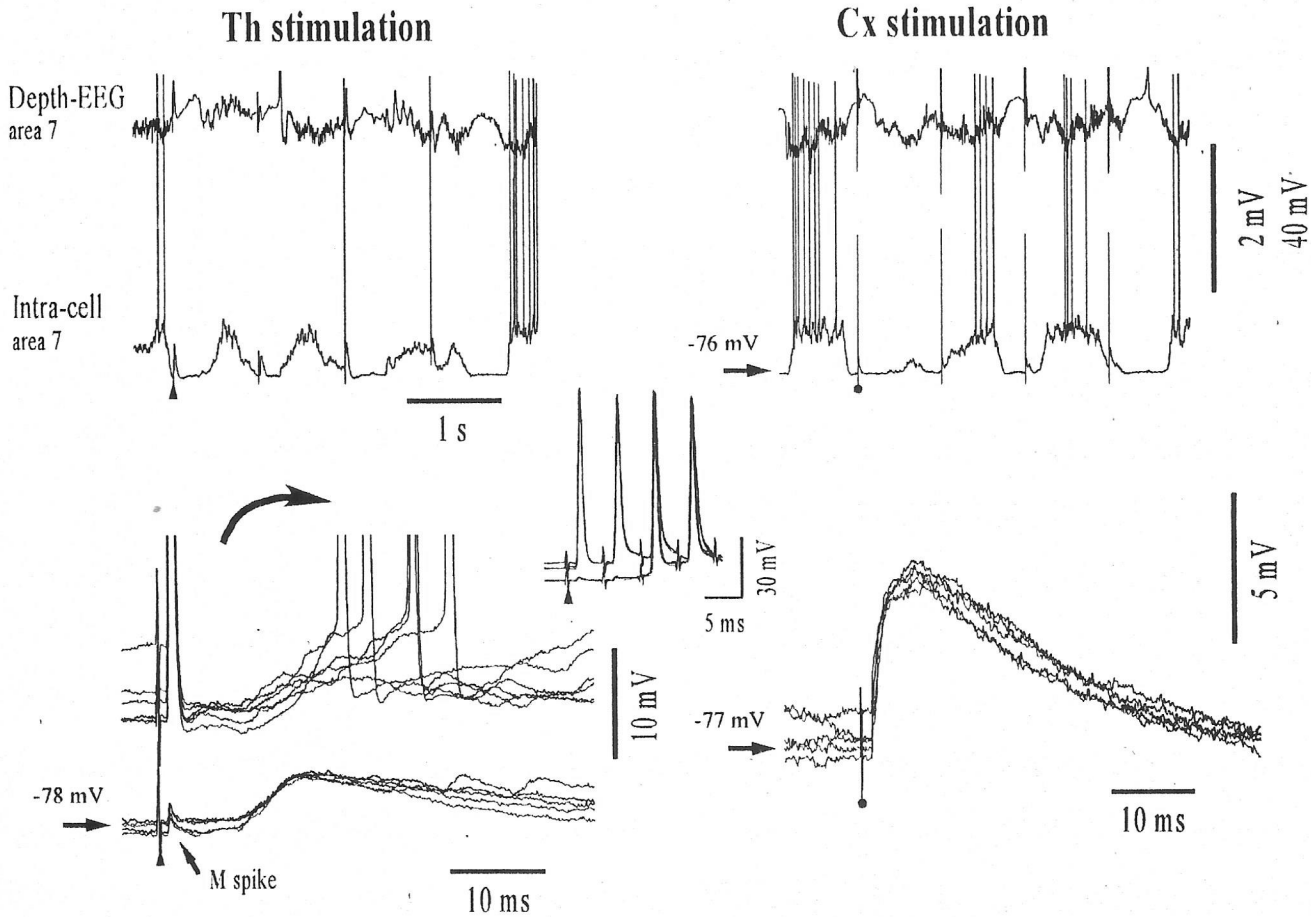


Figura 44. Respuestas de una neurona corticotalámica a estimulación talámica y cortical proximal. Registro bajo ketamina-xylazina. A, EEG y registro intracelular en el area 7 de la corteza. Respuestas a estimulación cortical proximal (Cx) y en el núcleo talámico LP (Th). B, Superposición de respuestas a estimulación talámica (Th) y cortical (Cx). Nótese que la estimulación cortical genera un potencial antidrómico cuando la neurona está depolarizada, mientras que cuando está hiperpolarizada genera un potencial M (M spike) y un PEPS de gran latencia. Estimulación cortical induce un PEPS de corta latencia. C, Identificación del potencial antidrómico por medio de estimulación a alta frecuencia (200 Hz).

Por otro lado, es posible que la estimulación cortical active fibras tálamocorticales y viceversa, esto se debe básicamente a que la técnica de estimulación se basó en macroelectrodos transcorticales. En conclusión, fue necesario seleccionar para análisis sólo los casos en que se activaron vías independientes.

El método para determinar si las vías activadas eran independientes o no fue muy simple. Se sabe que la estimulación simultánea de dos vías independientes no genera necesariamente una respuesta que sea la sumatoria aritmética de las dos respuestas individuales, sin embargo la pendiente inicial de la activación de la respuesta tiene que serlo (Pouille & Scanziani, 2001; Berger & Luscher, 2003).

La figura 45 muestra un ejemplo de la aplicación de este método. La estimulación talámica (TH) generó una respuesta muy similar a la inducida por estimulación cortical (CX). La estimulación de ambas vías en forma simultánea (TH+CX) produjo una respuesta un poco mayor, pero claramente más rápida en su fase inicial. Se realizó un ajuste lineal a los dos primeros milisegundos de cada respuesta y se encontró que la pendiente de la respuesta conjunta tiene un valor similar (89%) a la sumatoria de las pendientes de las respuestas individuales, lo cual muestra que las vías activadas son independientes.

Este tipo de metodología se usó sólo en casos en que las respuestas fueron similares (fig. 45), pero en un gran número de casos no fue necesario, pues las respuestas tenían latencias muy distintas o eran cualitativamente distintas, como el caso

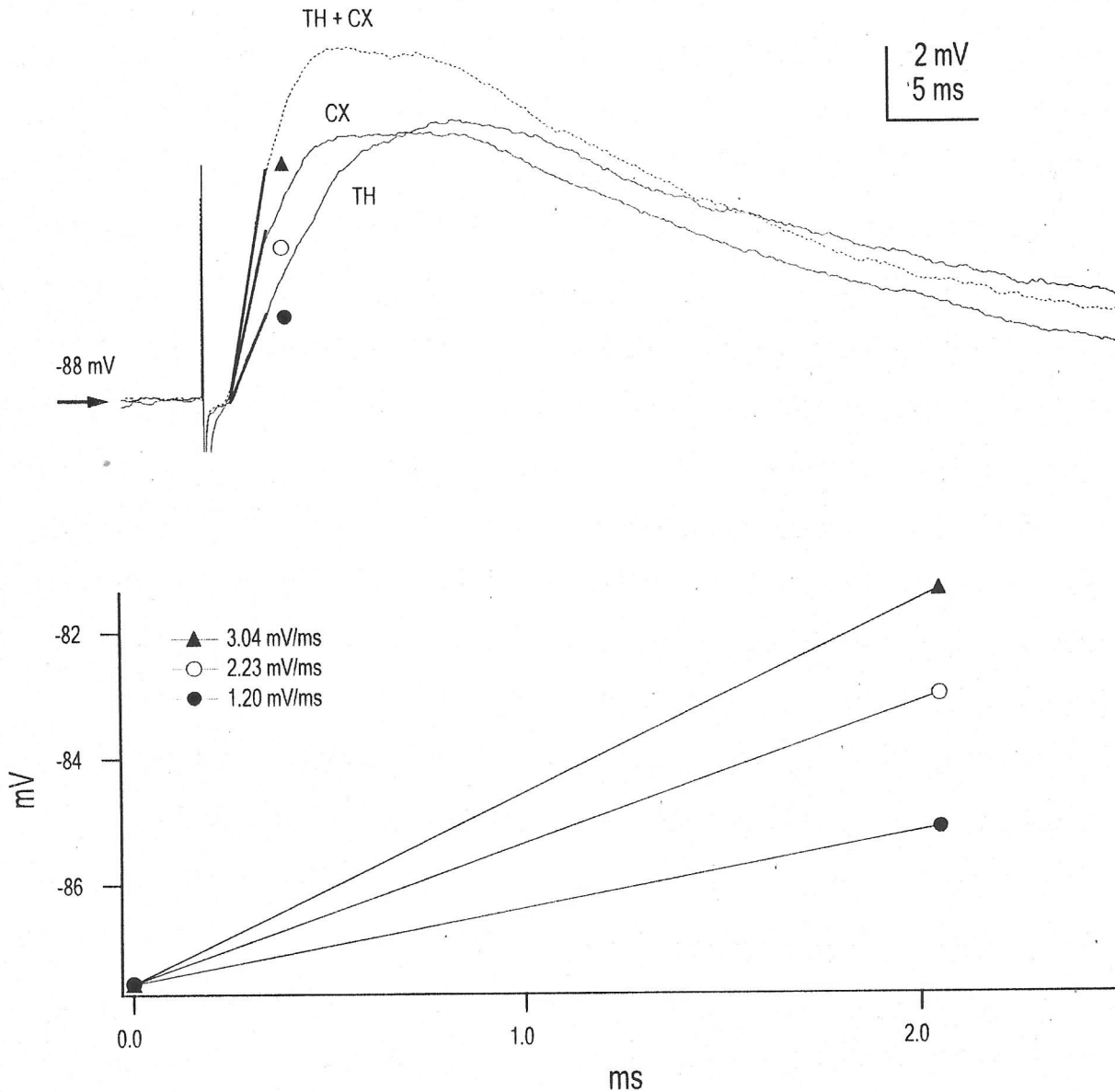


Figura 45. Selección de vías aferentes independientes. Arriba, la estimulación talámica (TH) generó una respuesta muy similar a la inducida por estimulación cortical (CX). La estimulación de ambas vías en forma simultánea (TH+CX) produjo una respuesta un poco mayor, pero claramente más rápida en su fase inicial. Ajuste lineal a los dos primeros milisegundos de cada respuesta (línea negra gruesa). Abajo, gráfico muestra la sobreposición de todos los ajustes lineales realizados y los valores de sus pendientes. La pendiente de la respuesta conjunta tiene un valor similar (89%) a la sumatoria de las pendientes de las respuestas individuales, lo cual muestra que las vías activadas son independientes.

de activación antidrómica (fig. 52).

Identificación de las respuestas

Una vez seleccionada los casos que correspondían a vías independientes, se procedió a identificar las respuestas producidas por la estimulación de cada vía. Para esto, básicamente se evaluó la dependencia de potencial de las respuestas, lo que permitió identificarlas como PEPSs, PIPSs o una mezcla de ambos.

La latencia y la activación inicial de la respuesta permiten también indicar si la respuesta es polisináptica o monosináptica, directa o mediada por otras sinapsis, sin embargo para el presente estudio bastó con identificar cualitativamente como PEPS o PIPS.

El ejemplo de la figura 46 muestra un caso de una célula en la que la estimulación talámica indujo PEPSs de larga duración. La célula fue estimulada a distintos potenciales de membrana, lo que permitió calcular la dependencia de potencial de la respuesta. Una regresión lineal sobre los puntos obtenidos muestra que el potencial de reversión es cercano a cero (~ -10 mV), lo que identifica la respuesta como un PEPS. En la misma célula, la estimulación cortical indujo una respuesta compleja, como suele ocurrir en esta vía. La dependencia de potencial de la segunda respuesta mostró un potencial de reversión (V_{rev}) de ~ -77 mV. Este valor es similar al que se encuentra en rebanadas *in vitro* para el cloruro (Xiang et al., 1998, 2002), lo cual identifica la respuesta como un PIPS.

De este modo fue posible identificar las respuestas y conocer su dependencia de potencial, lo que indica la amplitud esperada para cada valor de potencial de membrana.

Cambios en la resistencia de entrada

Las respuestas sinápticas son producto de la activación de receptores que producen (entre otros efectos) el cierre y/o la apertura de canales iónicos. Evidentemente, esto tiene un efecto en la resistencia de entrada (R_{in}) neuronal. Para evaluar el efecto sobre la R_{in} de las respuestas sinápticas obtenidas en el presente estudio se registraron las respuestas inducidas por estimulación a diferentes potenciales de membrana, como se muestra en la figura 46.

Luego, se escogieron arbitrariamente intervalos temporales a lo largo de la respuesta. A modo de ejemplo, en la figura 47 se eligieron tres intervalos, a saber: control, es decir 20 ms antes de la estimulación (triángulo, fig. 47), 50 ms (círculo) y 100 ms (cuadrado) después de la estimulación. Para cada punto se graficó el potencial de membrana en función de la corriente inyectada, una regresión lineal sobre los puntos permitió obtener la R_{in} en cada momento, pues esta no es más que la pendiente de la recta ajustada (recuérdese que la ley de Ohm indica que la resistencia (R) es igual a la razón entre el cambio de potencial (ΔV) y la corriente (I)).

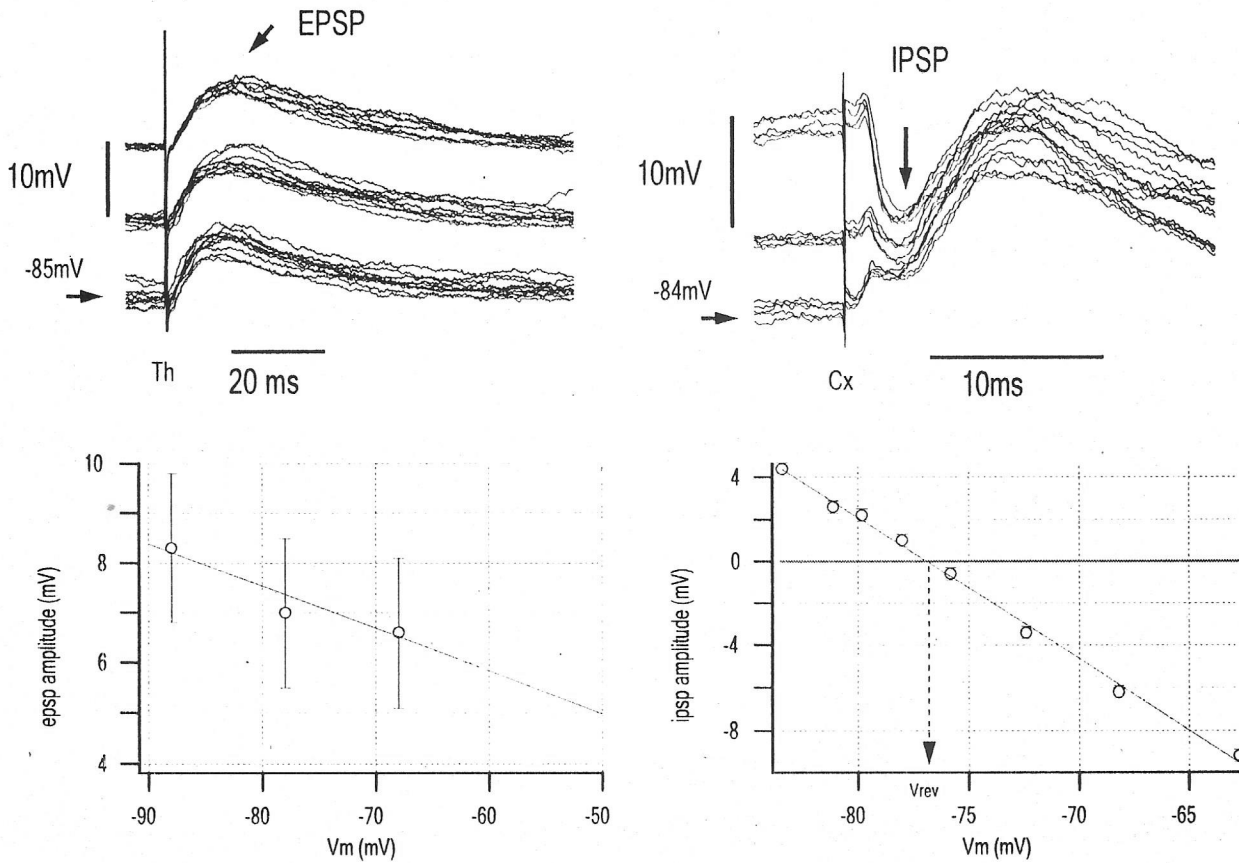


Figura 46. Identificación de las respuestas evocadas. PEPSs y PIPSs fueron evocados en la misma neurona por estimulación talámica y cortical, respectivamente. La estimulación talámica se aplicó en el núcleo LP y la estimulación cortical en una región cercana a la de registro (area 5). Los gráficos de abajo muestran la dependencia de potencial de cada respuesta. Cada punto corresponde al promedio de 30 respuestas y las barras representan una desviación standard. La línea de cada gráfico representa el mejor ajuste lineal al grupo de puntos, de donde se estimó el potencial de reversión de las respuestas (PEPS -10 mV, PIPS -76 mV).

Seleccionando intervalos regulares y adecuados se puede abarcar toda la duración de la respuesta. Una vez normalizados todos los valores obtenidos por el valor control (antes del estímulo), se construye un gráfico como el de la figura 47 que muestra la evolución temporal de la R_{in} para la neurona en cuestión. Se puede observar una clara correlación entre la evolución de la respuesta sináptica y la R_{in} (fig. 47). Nótese que para el caso ejemplificado la R_{in} cayó un 90% en los primeros 10 ms para recuperarse alrededor de los 200ms.

Pulsos pareados en vías homosinápticas

El protocolo de pulso pareado fue aplicado en una etapa inicial en vías homosinápticas, es decir condicionamiento y control en vías intracorticales o tálamocorticales.

PEPSs evocados por estimulación cortical mostraron una variedad de resultados al ser pareados los estímulos. Sin embargo, en todos los casos respuestas monosinápticas fueron aparentes, pues tanto la latencia (1.8 ± 0.5 ms, $n = 10$), como el tiempo de amplitud máxima (8.0 ± 3.2 ms, $n = 10$) fueron pequeño y poco variables. En algunos casos (22%, 2 de 9), los pulsos pareados produjeron facilitación de la respuesta a intervalos cortos como 10 y 20 ms (100 y 50 Hz). En otros casos (33%, 3 de 9), el protocolo indujo una moderada depresión (~30%) en la amplitud de las respuestas evocadas, mientras que en los casos restantes (44%, 4 de 9), no se apreciaron cambios en amplitud a ningún intervalo estudiado (tabla 9). Por tanto, la interacción entre proyecciones intracorticales ocurrió en una ventana temporal estrecha, pues luego de 50

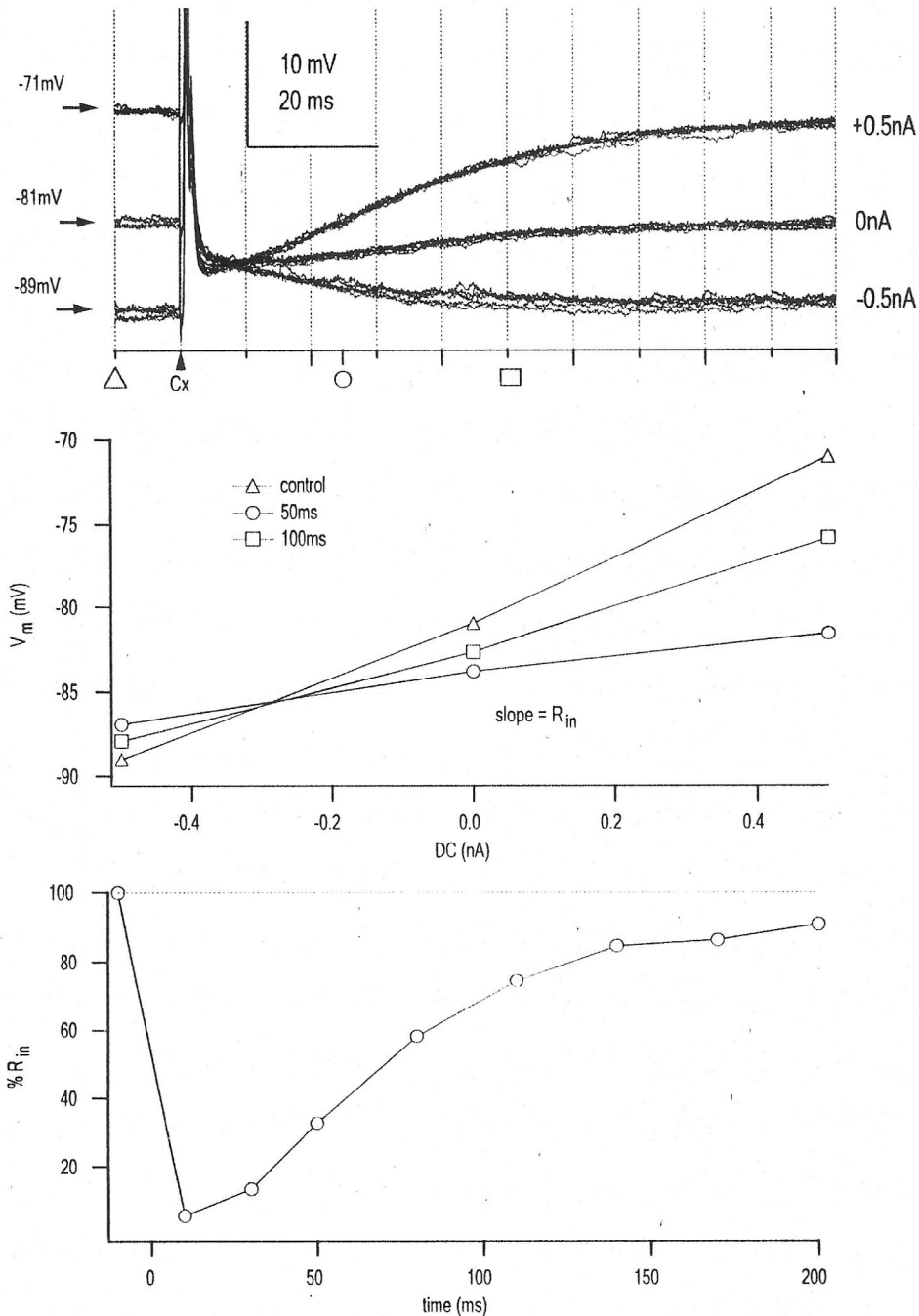


Figura 47. Cambios en la resistencia de entrada inducidos por estimulación. Panel superior, respuestas sinápticas fueron evocadas por estimulación intracortical y registradas a distintos potenciales de membrana. Triangulo indica el momento de estimulación. Panel medio, para múltiples intervalos temporales se graficó la relación entre corriente inyectada y cambio en el potencial de membrana. La distribución de puntos fue ajustada por regresión lineal, la pendiente de la cual se consideró la resistencia de entrada para cada intervalo temporal. Panel inferior, cambios en la resistencia de entrada después de la estimulación expresados como porcentaje de la resistencia inicial.

ms la influencia del primer estímulo en el segundo ya había desaparecido (fig. 48).

Por otro lado, las respuestas evocadas por estimulación talámica en neuronas corticales mostraron resultados complejos. El primer estímulo del par generó en todos los casos un PEPSs simple (latencia 3.5 ± 1 ms, tiempo de amplitud máxima 8.8 ± 1.1 ms, $n = 10$) mientras que el segundo produjo un potencial polisináptico (fig. 48B). La primera parte del cual correspondió al PEPS inicial, pero deprimido (tabla 10), y la segunda parte a un PEPS (latencia 18.4 ± 0.9 ms, $n = 10$), ausente en la primera respuesta, que a intervalos mayores generó “respuestas en aumento”. Así pues, todas las neuronas mostraron facilitación de la segunda respuesta a intervalos mayores, de entre 60-110 ms (9-15 Hz). Un ejemplo de esto se ilustra en la figura 48B, donde un PEPS compuesto fue evocado por estimulación talámica. Este tipo de respuestas se seguían comúnmente de activación de la red cortical, lo cual se expresa como una depolarización luego de 100-150 ms (asterisco, fig. 48B). La amplitud de la segunda respuesta ocurrida

Tabla 9. Integración sináptica en vías homosinápticas: Corteza

Cell	Amplitud(%)
1	300
2	100
3	-30
4	-20
5	-20
6	0
7	0
8	0
9	0

Promedio	+126%
----------	-------

Table 9

Tabla 10. Integración sináptica en vías homosinápticas: Tálamo

Cell	Amplitud(%)
1	-10
2	-50
3	-80
4	-40
5	-50
6	-60
7	-100
8	-100
9	-50
10	-20
11	-60
Promedio	-58%

Table 10

al estimular la vía tálamo cortical fue máxima a intervalos de 100 ms (105 ± 15 ms, $n = 6$) y produjo un aumento de ~200% en la misma comparada con el primero (resultado no mostrado). Estos resultados son consistentes con los mecanismos descritos para la generación de respuestas en aumento en la red tálamo cortical al estimular a 10 Hz (Steriade et al., 1998).

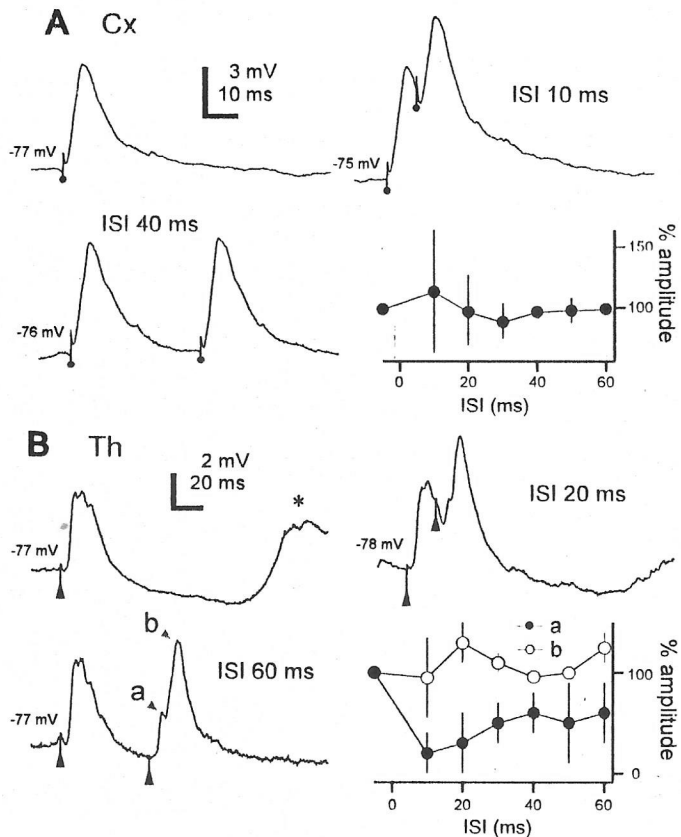


Figura 48. Interacción de las respuestas sinápticas inducidas por estimulación de vías homosinápticas. Dos neuronas distintas (A-B), ambas registradas bajo barbitúricos. A, neurona cortical del area 4 estimulada localmente mostró generación de PEPSs. Los tres paneles muestran los promedios ($n = 20$) de las respuestas a estímulos individuales y pareados. El gráfico muestra el cambio en amplitud en porcentaje, como función del intervalo entre los estímulos, para varias neuronas ($n = 8$; media \pm SD). B, Efecto del protocolo de pulso pareado al estimular vías tálamicocorticales. Los tres paneles muestran los promedios ($n = 20$) de las respuestas a estímulos individuales y pareados. El gráfico muestra el cambio en amplitud en porcentaje, como función del intervalo entre los estímulos, para varias neuronas ($n = 10$).

Condicionamiento talámico y control cortical

El protocolo de pulso pareado se realizó utilizando un estímulo como referencia y desplazando el otro a distintos intervalos temporales positivos. El primer estímulo se consideró como condicionante y el segundo como control.

Cuando la estimulación condicionante se realizó en el tálamo, se observó en la mayoría de casos (11 de 13) que la respuesta al estímulo control estaba disminuida durante toda la duración de la respuesta a la estimulación condicionante (talámica). Un ejemplo se muestra en la figura 49, en que la estimulación cortical indujo un PEPS monosináptico de pequeña amplitud (3-4 mV), mientras que la estimulación talámica produjo un PEPS de gran amplitud (~20 mV).

Como se mencionó anteriormente, las respuestas sinápticas presentan una clara dependencia de potencial, la cual era conocida para todos los casos. Esto permitió estimar la amplitud de las respuestas para valores específicos de potenciales de membrana y comparar el resultado con los valores obtenidos durante el protocolo de pulso pareado. Es decir que se comparó el valor estimado (teórico) con el valor medido (experimental). Aún considerando la dependencia de potencial de las respuestas sinápticas, se observó que la estimulación talámica condicionante produjo una disminución de la amplitud y el área de la respuesta a la estimulación cortical control (fig. 49, tabla 11).

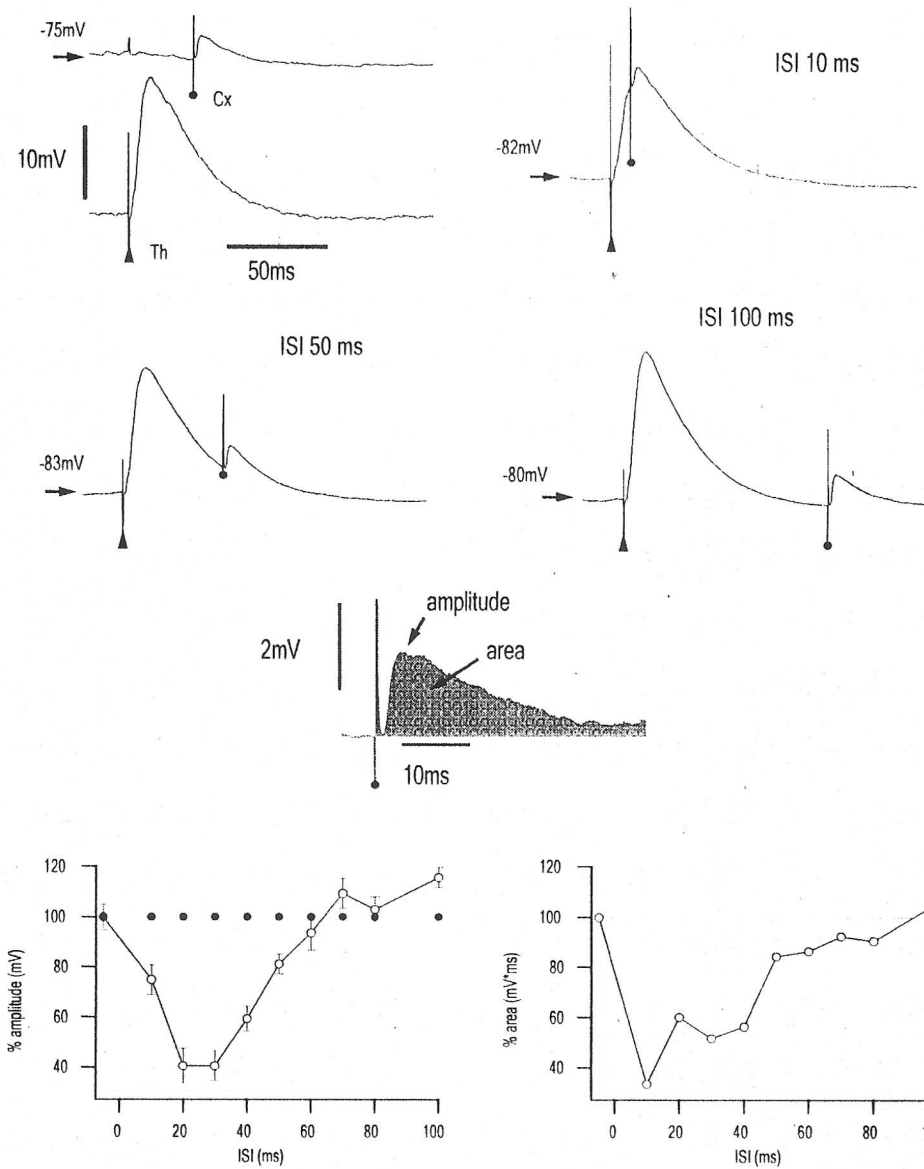


Figura 49. Estimulación talámica reduce la amplitud y el área de la respuesta a estimulación cortical. A, Promedios ($n=30$) de las respuestas a estimulación. El panel superior izquierdo muestra las respuestas control. La estimulación cortical indujo un pequeño PEPS, mientras que la estimulación talámica produjo un PEPS mayor. En los otros paneles, ambos estímulos se combinaron a distintos intervalos (ISI), donde el estímulo talámico fue condicionante. B, Los gráficos muestran la evolución de la amplitud (izquierda) y el área (derecha) de la respuesta inducida por el estímulo condicionado. Los círculos negros (●) muestran el valor calculado (control) y los círculos blancos (○) el valor obtenido cuando se combinaron los estímulos.

Para el ejemplo de la figura 49, la caída en la amplitud de la respuesta fue de hasta un 60% y se recuperó solo después de 60 ms, es decir, hacia el final de la respuesta a la estimulación talámica (condicionante). Nótese que el cambio en amplitud se calcula con respecto al valor de la respuesta control y no respecto al V_m en reposo. Por otra parte, el área de la respuesta sigue un destino similar al de la amplitud salvo que se recupera más tarde, alrededor de los 100ms.

Así pues, los resultados de estos experimentos mostraron en forma consistente que la estimulación talámica condicionante produjo una disminución de la respuesta a la estimulación cortical control que tuvo una duración equivalente a la de la respuesta a la estimulación condicionante, en otras palabras una depresión heterosináptica de corta duración.

Tabla 11. Integración sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento talámico y control cortical

Cell	Amplitud(%)	área(%)	área
1	-50	-70	5/7
2	-30		5/7
3	-30		5/7
4	-60		5/7
5	-100		5/7
6	-55	-80	5/7
7	-55		5/7
8	-35		4/6
9	-50	-85	4/6
10	-50	-75	4/6
11	0		4/6
Promedio	-51%	-77%	

Table 11

Condicionamiento cortical y control talámico

En la siguiente serie de experimentos se aplicó el mismo protocolo, salvo que se invirtió el orden de los estímulos, es decir que el estímulo cortical fue condicionante y la estimulación talámica control. En este arreglo se encontraron resultados equivalentes a los de la sección anterior, a saber: la estimulación cortical condicionante produjo en la gran mayoría de casos (13 de 15) una disminución en la amplitud y área en la respuesta al estímulo talámico control. Tal disminución permaneció durante toda la respuesta a la estimulación condicionante (cortical).

La figura 50 muestra un caso en que la estimulación cortical y talámica generaron respuestas depolarizantes, de similar amplitud pero distinta forma. Al aplicar el protocolo de pulso pareado, en que el estímulo cortical fue condicionante, se observó una disminución en la amplitud de la respuesta a la estimulación talámica control (tabla 12). En este caso la disminución máxima de la amplitud de la respuesta fue de un 40%, pero la disminución del área de la respuesta fue de hasta un 80%. Nótese además que la recuperación de la amplitud de la respuesta tomó cerca de 100 ms, que es casi el doble de la duración de la respuesta a la estimulación control.

Tabla 12. Integración sináptica en vías heterosinápticas. Condicionamiento cortical y control talámico

Cell	Amplitud(%)	área(%)	área
1	-30	-75	5/7
2	-20	-85	5/7
3	-30	-60	5/7
4	0		5/7
5	-55		5/7
6	-20	-35	5/7
7	-35		5/7
8	-35		4/6
9	-60	-75	4/6
10	-40	-65	4/6
11	-60		4/6
12	0		4/6
Promedio	-38%	-63%	

Table 12

Por tanto, los resultados de estos experimentos mostraron en forma consistente que la estimulación cortical condicionante produjo una disminución de la respuesta a la estimulación talámica control que la duración generalmente equivalente, pero a veces mayor, que la de la respuesta a la estimulación condicionante. En otras palabras, una depresión heterosináptica de corta duración, exactamente como en el caso anterior.

La figura 51 muestra un resumen de los resultados anteriores, en que se promediaron las respuestas para la mayoría de las neuronas registradas (n = 10 en cada panel). Los paneles de la columna izquierda muestran la evolución temporal de la

amplitud de la respuesta y la columna derecha la evolución temporal del área de la respuesta.

Nótese que cuando la estimulación cortical es condicionante, la amplitud de la respuesta tarda alrededor de 100 ms en recuperar su valor (fig. 51), mientras que cuando la estimulación talámica es condicionante, la recuperación toma cerca de la mitad de ese tiempo, alrededor de 50 ms. Se puede ver también que el área de la respuesta sigue una evolución muy similar al de la amplitud, salvo que la disminución en esta última es mucho más acentuada. Para el caso de la estimulación cortical condicionante la amplitud de la respuesta cayó cerca de un 50%, mientras que el área de la respuesta alrededor de 70% (fig. 51). Algo similar se observó con la estimulación talámica condicionante en que la amplitud cayó cerca de un 50% y el área alrededor de 60%. En ambos casos la caída del área fue mayor que la de la amplitud, esto es esperable, pues como se indicó anteriormente, la amplitud se normalizó por su dependencia de potencial, mientras que el área se comparó con la respuesta individual, pues no siempre se pudo conocer su dependencia de potencial.

Estos resultados en su conjunto muestran que en la gran mayoría de los casos, la estimulación de vías heterosinápticas genera una depresión de corta duración.

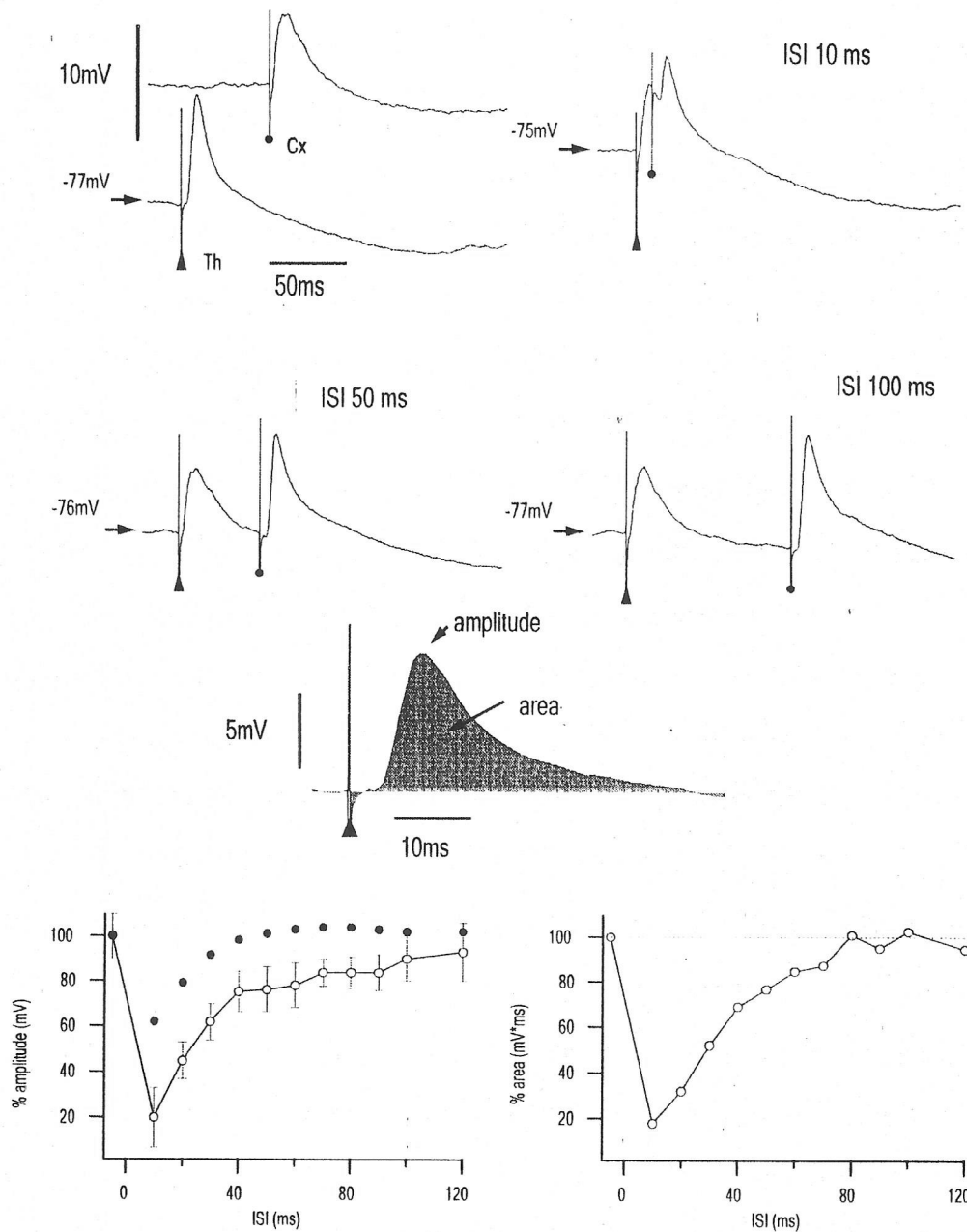


Figura 50. Estimulación cortical reduce la amplitud y el área de la respuesta a estimulación talámica. A, Promedios ($n=30$) de las respuestas a estimulación. El panel superior izquierdo muestra las respuestas control. La estimulación cortical indujo un PEPS, mientras que la estimulación talámica produjo un PEPS seguido de una hiperpolarización lenta. En los otros paneles, ambos estímulos se combinaron a distintos intervalos (ISI), donde el estímulo cortical fue el condicionante. B, Los gráficos muestran la evolución de la amplitud (izquierda) y el área (derecha) de la respuesta inducida por el estímulo condicionado. Los círculos negros (●) muestran el valor calculado (control) y los círculos blancos (○) el valor obtenido de las respuestas cuando se combinaron los estímulos.

Cambios en la R_{in} durante el protocolo de pulso pareado

Como se mostró, el estímulo condicionante produce una disminución en la respuesta al estímulo control. Interesante es el hecho de que este resultado es independiente del origen del estímulo condicionante, lo que sugiere que el mecanismo podría ser postsináptico.

No es posible explicar este resultado por un período refractario debido a la estimulación de vías aferentes que activan un subconjunto común de fibras, pues como se indicó antes, se seleccionaron para análisis sólo los casos en que se activaban vías independientes.

La primera y más obvia idea fue comparar la evolución temporal de la respuesta sináptica y la R_{in} . La racional de esta propuesta *ad hoc* fue que un estímulo cualquiera produce la activación de conductancias iónicas, las cuales producen una caída en la impedancia neuronal. Dicha caída podría pues, ser responsable de la disminución de la respuesta sináptica durante la estimulación condicionante. Inicialmente se analizaron los casos en que la estimulación talámicas fue condicionante, en todos los casos (6 de 6) se encontró que la simple explicación propuesta tenida cabida en los resultados. Se observó que la R_{in} y la amplitud de la respuesta seguían un curso temporal similar.

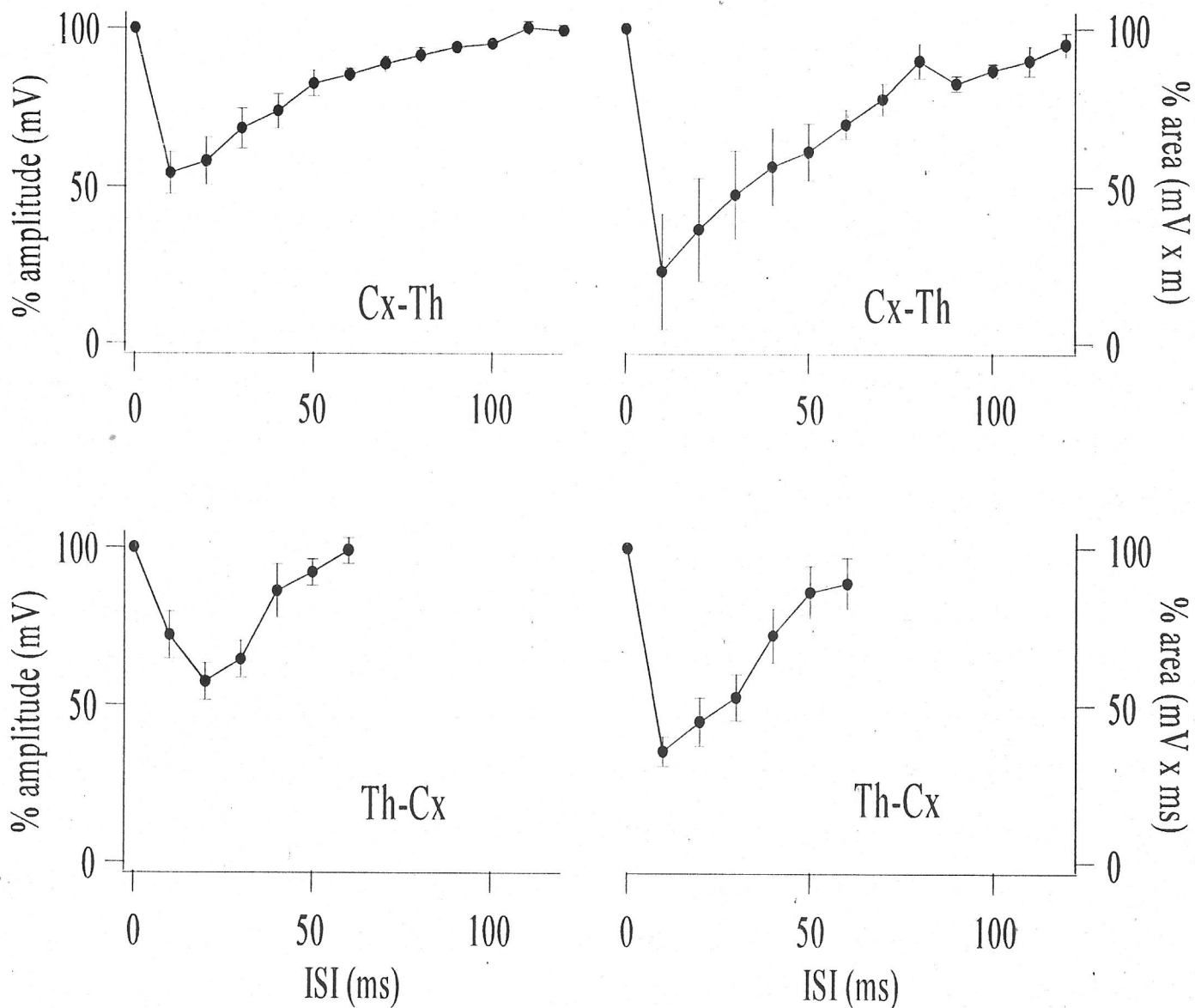


Figura 51. Curso temporal de la amplitud y área de las respuestas evocadas. Cada panel representa el promedio ($n = 10$) obtenido de varias células, expresado como porcentaje de la respuesta control. En los paneles superiores los estímulos condicionantes (primero) son corticales y los condicionados (segundo) son talámicos. En los paneles inferiores el estímulo condicionante es talámico y el condicionado es cortical. Nótese un mayor efecto en el área de depolarización que sobre la amplitud en ambos casos.

La figura 52 muestra una neurona corticotalámica, identificada por invasión antidrómica desde el tálamo (inserto, fig. 52) y activación monosináptica desde la corteza. Nótese que, como en casi todos los demás casos, la activación antidrómica se siguió de una activación sináptica que generó ocasionalmente potenciales de acción (fig. 52).

La aplicación del protocolo de pulso pareado produjo resultados similares a los descritos en las secciones anteriores. La estimulación talámica condicionante produjo una caída de la respuesta sináptica de cerca de un 40%, el área de la respuesta fue dramáticamente afectada, mostrando una caída de hasta un 80% (fig. 52). Nótese que después de 50 ms del estímulo condicionante la amplitud y el área de la respuesta sináptica no están completamente recuperadas (80-90% del control). Al graficar la evolución de la R_{in} durante la estimulación condicionante, se observó una clara relación con la evolución de la amplitud de la respuesta sináptica a la estimulación control.

Esta correlación entre la R_{in} y amplitud de la respuesta sináptica no es una *prueba*, pero sugiere que el mecanismo propuesto es (por lo menos parcialmente) válido para explicar el fenómeno de depresión heterosináptica observado.

Posteriormente, se analizaron de la misma manera los casos en que la estimulación cortical fue condicionante. Con sorpresa se observó que en cerca de la mitad de los casos (3 de 7) la disminución en la amplitud de la respuesta sináptica no estaba asociada a una caída en la R_{in} .

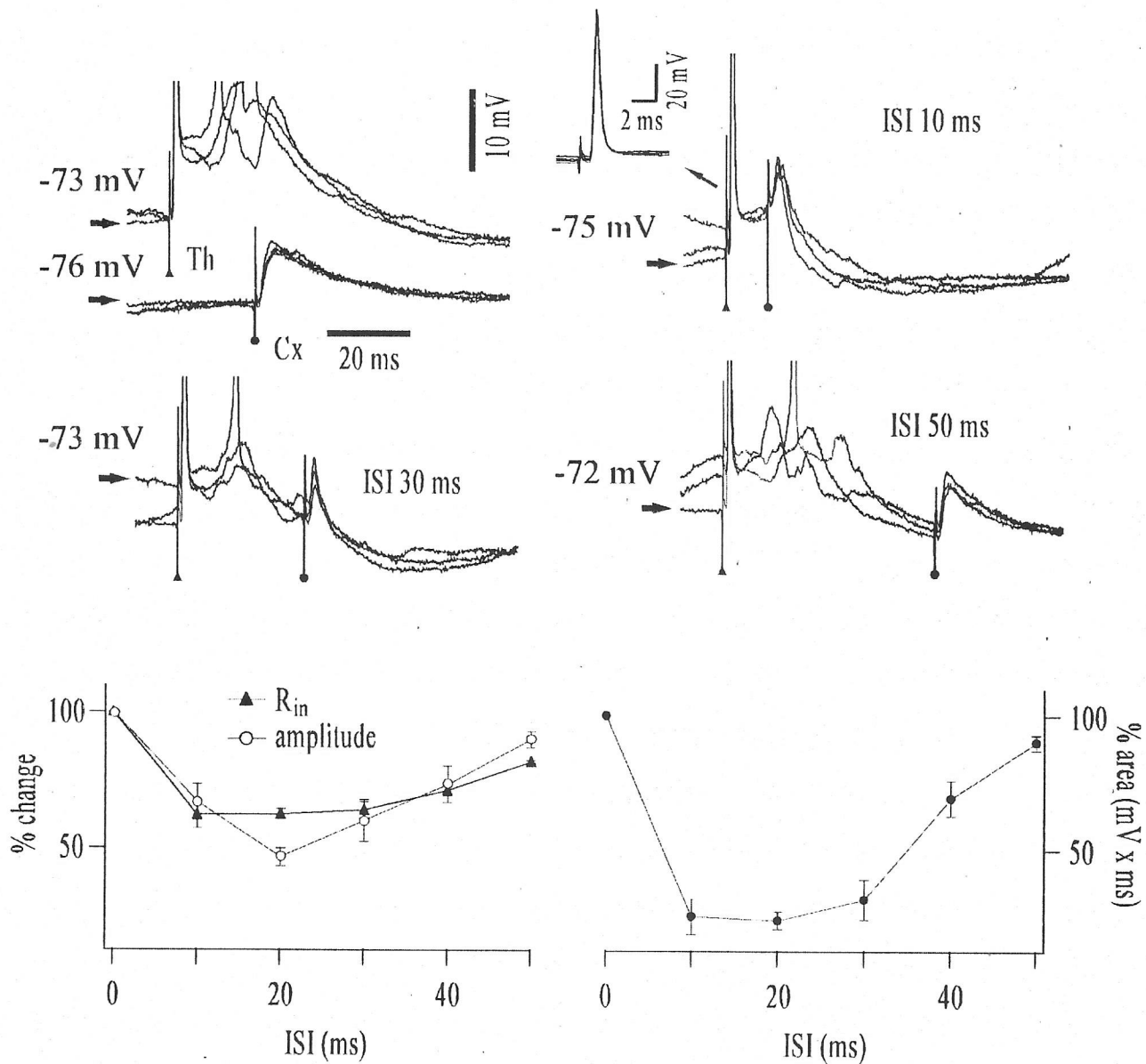


Figura 52. El efecto del estímulo talámico condicionante se correlaciona con una disminución de la R_{in} . Paneles superiores, superposición de respuestas individuales. Estimulación cortical indujo un PEPS, mientras que la estimulación talámica produjo un potencial antidrómico seguido de una depolarización compleja. En los otros paneles, los estímulos fueron combinados a distintos intervalos (ISI), donde el estímulo talámico fue condicionante. Paneles inferiores, el gráfico izquierdo muestra la evolución de la R_{in} (triángulos) cuando se aplica el estímulo condicionante y de amplitud (círculos) de la respuesta al estímulo condicionando. Nótese que ambos siguen un curso similar. El panel derecho muestra el cambio en el área de la respuesta sináptica para los distintos intervalos en que se combinaron los estímulos.

El ejemplo de la figura 53 muestra una neurona cortical activada sinápticamente desde la corteza y desde el tálamo. Ambos estímulos produjeron similares PEPSs de gran amplitud (~ 20 mV). Nótese que la forma de las respuestas es diferente y que, como en la mayoría de los casos, la estimulación cortical genera una respuesta de activación más rápida (fig. 53).

Al igual que en los casos anteriores, el protocolo de pulso pareado generó una depresión de la respuesta al estímulo control. La amplitud de la respuesta disminuyó cerca de un 40% y el área hasta un 80%. Nótese al alcanzar un intervalo de 50 ms la amplitud, pero sobre todo el área de la respuesta, no se han recuperado (60-80%) (fig. 53). En este caso, la estimulación condicionante no produjo una caída en la R_{in} que fuera apreciable en el registro somático (fig. 53), por lo tanto la disminución de la amplitud de la respuesta sináptica no puede ser atribuida a un cambio en la R_{in} .

De modo que para los casos en que la estimulación cortical fue condicionante, la hipótesis del cambio en la R_{in} sólo puede dar cuenta parcialmente de la depresión heterosináptica observada.

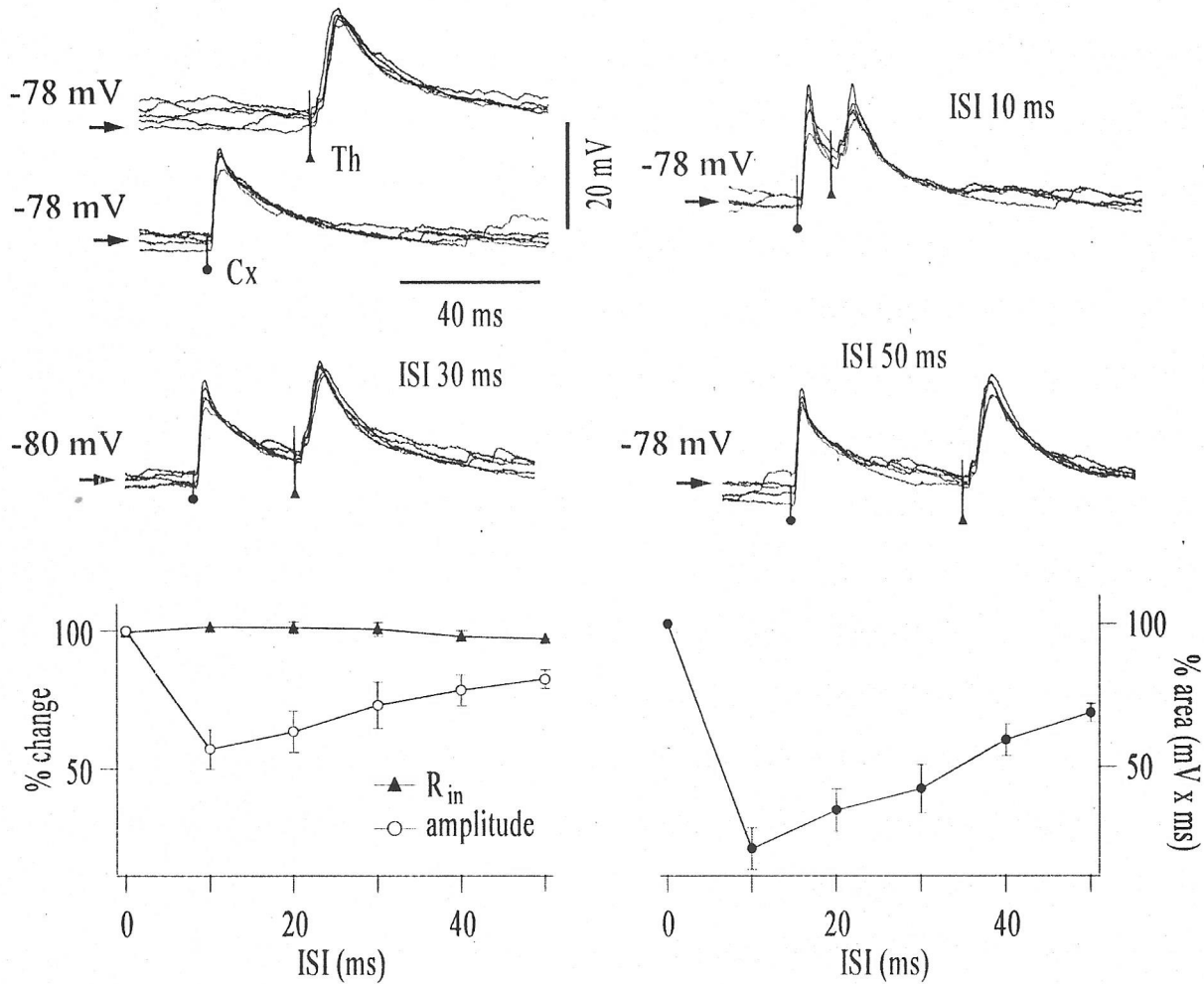


Figura 53. El efecto del estímulo cortical condicionante no siempre se correlaciona con una disminución de la R_{in} . Paneles superiores, superposición de respuestas individuales. Estimulación cortical y talámica indujeron PEPSs, de similar amplitud pero distinta velocidad. En los otros paneles, los estímulos fueron combinados a distintos intervalos (ISI), donde el estímulo cortical fue condicionante. Paneles inferiores, el gráfico izquierdo muestra la evolución de la R_{in} (triángulos) cuando se aplica el estímulo condicionante y de amplitud (círculos) de la respuesta al estímulo condicionado. Nótese la ausencia de cambios en la R_{in} . El panel derecho muestra el cambio en el área de la respuesta sináptica para los distintos intervalos en que se combinaron los estímulos.

Registros en neuronas tálamocorticales

La idea propuesta que sostiene que la disminución en la amplitud de la respuesta sináptica se debía exclusivamente a una caída en la R_{in} neuronal no fue verificada experimentalmente. Pues, si esto fuera así, se debería observar en *todos* los casos una asociación en la evolución de la amplitud de la respuesta sináptica y la R_{in} , como el de la figura 54.

Sin embargo, y como suele ocurrir en el trabajo de laboratorio, no se descartó la hipótesis (Kuhn, 1971) y simplemente se decidió buscar un mecanismo alternativo y complementario que explicara, en términos de Kuhn, las *anomalías* (Kuhn, 1971), es decir los casos en que la disminución en la respuesta sináptica no estaba asociada a una caída en la R_{in} .

Probablemente la mayor ventaja de una preparación *in vivo*, como la utilizada en estos experimentos, es que mantiene intactas y funcionales las conexiones del sistema tálamocortical. Aprovechando esta situación, se decidió registrar la actividad de neuronas tálamocorticales y evaluar el efecto sobre estas de la activación de vías corticales eferentes.

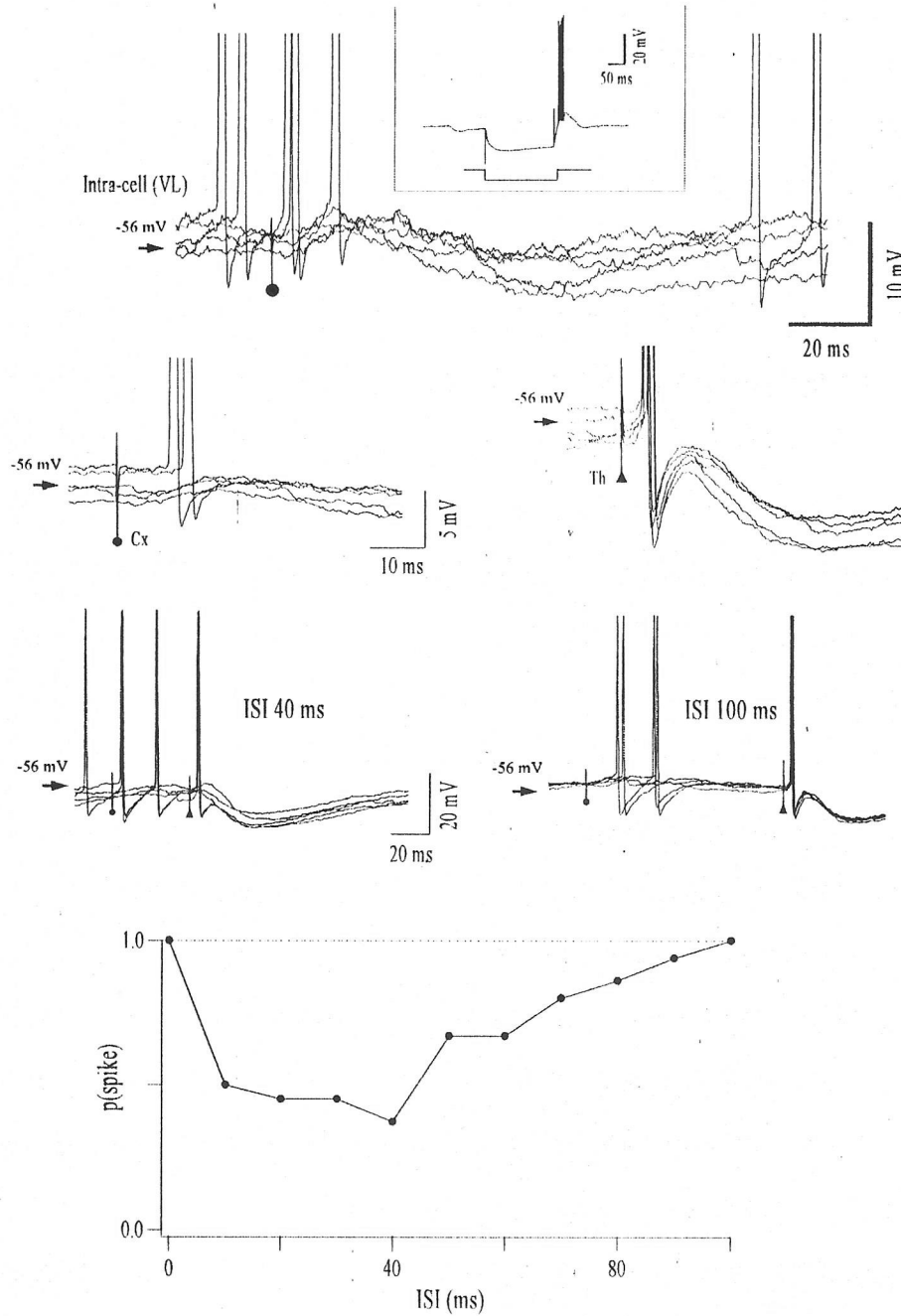


Figura 54. La estimulación cortical reduce la probabilidad de descarga en las neuronas tálamo-corticales. Neurona tálamo-cortical registrada en el núcleo VL bajo barbitúricos. El panel superior muestra respuestas a estimulación del área 4. Inserto muestra la identificación por un pulso de corriente negativa que genera una repolarización lenta y una descarga tipo *burst*. Más abajo, respuestas a estimulación cortical y talámica local. Nótese que la estimulación local genera en todos los casos un potencial de acción antidrómico. Se muestran pulsos pareados en ambas vías (talámica y cortical) a dos intervalos temporales (40 ms y 100 ms). El gráfico final muestra la caída en la probabilidad de evocar potenciales de acción por estimulación talámica cuando esta es precedida por estímulos corticales.

La lógica (nuevamente *ad hoc*) detrás de estos experimentos era que el estímulo condicionante (cortical) podría estar inhibiendo las neuronas talámicas. Esta inhibición no puede ser directa, pues todas las proyecciones aferentes de la corteza son excitatorias. De modo que tal inhibición debería ser mediada por otra estructura. El candidato ideal es el núcleo reticular del tálamo que es activado por la corteza y que envía exclusiva y masivamente proyecciones gabaérgicas sobre tálamo dorsal, inhibiéndolo (Jones 1985). De modo que al llegar el estímulo control (talámico) estas estarían disminuidas en su capacidad de responder. Si esto fuera así, se explicaría el hecho antes mencionado de que en cerca de la mitad de los casos la depresión inducida por la estimulación cortical no estaba asociada a una caída en la R_{in} neuronal.

Se encontró que de hecho, en cerca de la mitad de las neuronas tálamocorticales registradas (5 de 9), la estimulación cortical condicionante produjo una disminución en la probabilidad de descarga (generación de potenciales de acción) debida a la estimulación talámica control.

La figura 54 muestra un registro de una neurona talámica identificada por dos de sus características electrofisiológicas distintivas. Por un lado, la inyección de un pulso cuadrado de corriente negativa produce una respuesta hiperpolarizante en la membrana, la cual activa una corriente catiónica no específica y depolarizante conocida como I_h (Robinson & Siegelbaum, 2003). Esta corriente se refleja como una leve rectificación del potencial de membrana durante el pulso de corriente. Por otro lado, hacia el final del pulso cuadrado de corriente se produce un potencial de rebote que depolariza la neurona

sobre el nivel umbral y genera un tren de potenciales de acción de alta frecuencia, este evento se conoce como LTS (*low threshold spike*) y es producido por una corriente de calcio de bajo umbral de activación conocida como I_T (Huguenard, 1996). Este simple protocolo permitió identificar en todos los casos las neuronas talámicas que fueron registradas.

Para el ejemplo de la figura 54, la estimulación cortical generó una ligera pero sostenida hiperpolarización que se extendió cerca de 100 ms. Dicha hiperpolarización presentó una larga latencia de activación (10-20 ms), indicando que no era un efecto directo. Tal hiperpolarización estuvo precedida de una muy leve depolarización, que probablemente fue la respuesta directa a la estimulación (fig. 54). Mientras tanto, la estimulación talámica generó un potencial antidrómico en todos los casos (fig. 54). Cuando se aplicó el protocolo de pulso pareado, siendo el estímulo cortical condicionante, se produjo una significativa reducción en la probabilidad de descarga de la neurona ante la estimulación talámica. Dicha disminución alcanzó un valor de 50% y se recuperó alrededor de los 100 ms, valor similar a la duración de la hiperpolarización generada por la estimulación condicionante (fig. 54). Nótese que el curso temporal de la disminución de la probabilidad de descarga en el tálamo es muy similar al de la disminución de la respuesta sináptica en la corteza (ver fig. 53 y fig. 54).

Estos resultados muestran que en cerca de la mitad de los casos la estimulación cortical produce una disminución de la probabilidad de disparo de las neuronas

talámocorticales, y sugieren que esto podría dar cuenta de los casos en que la disminución de la respuesta sináptica en la corteza no está asociada a una caída en la R_{in} .

Más aún, en algunos casos ($n = 3$) la estimulación cortical fue capaz de inducir oscilaciones del tipo huso. Se sabe que esto se debe a una activación masiva del núcleo reticular del tálamo, que es el marcapaso de la oscilación del tipo huso (Pare et al., 1987; Steriade et al., 1987). En estos casos la probabilidad de descarga de las neuronas talámocorticales se vio disminuida durante toda la duración de la oscilación (1-2 s).

El ejemplo de la figura 55 muestra una neurona talámocortical, identificada por activación antidrómica desde la corteza (inserto izquierdo, fig. 55) y activación sináptica desde el tálamo (inserto derecho, fig. 55). Nótese que después de la activación antidrómica desde la corteza, sigue un huso que se extiende por cerca de 1.5 s.

La intensidad de estimulación se ajustó para que la activación talámica produjera en todos los casos un potencial de acción (fig. 55). Sin embargo, durante toda la duración del huso dicho potencial de acción fue reemplazado por un PEPS subumbral (fig. 55). Hacia el final de la oscilación, el mismo PEPS que era poco antes subumbral fue capaz de generar LTSs (fig. 55). Una vez terminada la oscilación, el PEPS fue reemplazado por potenciales de acción, al igual que en el control. El panel inferior (fig. 55) muestra la evolución temporal de este proceso. Las respuestas que en el control eran supraumbrales, son subumbrales durante la mayor parte de la oscilación. Hacia el final del huso (~ 1 s), la respuesta es un LTS y una vez terminada la oscilación (~ 1.5 s), la

respuesta recupera las características del control. Tales cambios en la respuesta no pueden ser explicados simplemente por la dependencia de potencial, pues en muchos casos los valores de V_m fueron muy similares (fig. 55).

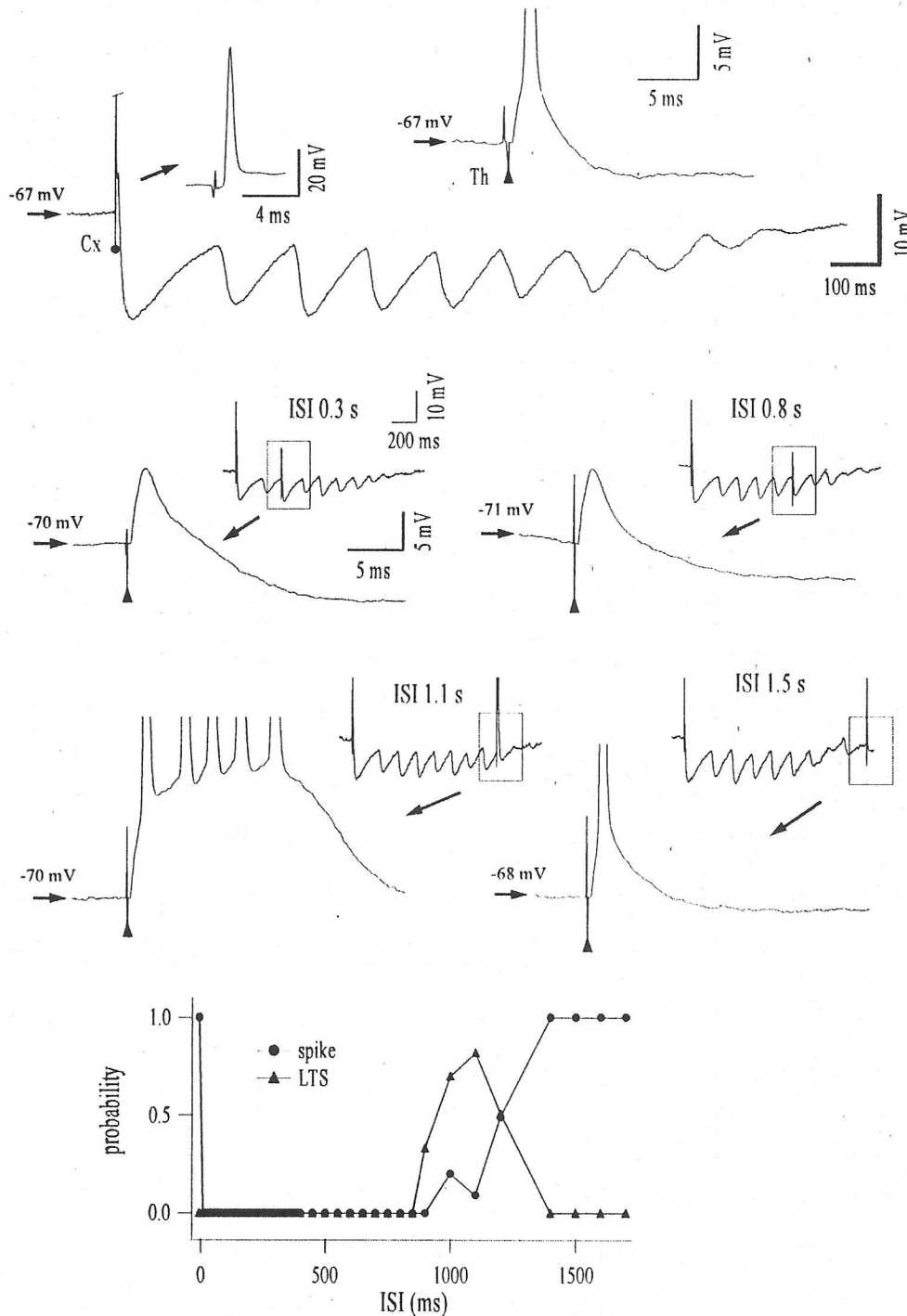


Figura 55. La estimulación cortical puede reducir la probabilidad de descarga en las neuronas tálamo-corticales por largos períodos. Neurona tálamo-cortical registrada en el núcleo VL bajo barbitúricos. El panel superior muestra respuestas a estimulación del área 4, un potencial de acción antidrómico seguido de un huso. Inserto muestra la respuesta a la estimulación talámica local, un PEPS seguido de un potencial de acción. Más abajo, efecto de pulsos parados en ambas vías (talámica y cortical) a diversos intervalos temporales. El gráfico final muestra la caída en la probabilidad de evocar potenciales de acción durante la oscilación evocada.

4. DISCUSIÓN

Un parentesis metodológico

El presente estudio se realizó con un doble objetivo. Por un lado, determinar la medida en que ciertos parámetros del sistema tálamocortical son capaces de afectar la expresión de plasticidad sináptica en la corteza. Dichos parámetros fueron: la frecuencia de un estímulo dado, las estructuras que dan origen a tal estímulo (corteza ipsilateral, corteza contralateral y núcleos talámicos), y la diversidad de regiones corticales operativas (áreas motoras 4 y 6, y áreas asociativas 5 y 7). Por otra parte, el presente estudio se encargó también de caracterizar la integración temporal que ocurre en la corteza, de señales provenientes de fuentes distintas (núcleos talámicos y redes intracorticales) que tienen distintas ubicaciones en el árbol dendrítico.

Como suele ocurrir en el trabajo de laboratorio, la tarea planeada inicialmente difirió en gran medida del resultado final obtenido. Así pues, prácticamente la segunda mitad completa del trabajo no estaba contemplada inicialmente en la propuesta del proyecto, sino que se fue construyendo *ad hoc* a partir de un resultado negativo inesperado: la ausencia de interacción entre vías heterosinápticas en términos de cambios plásticos en las respuestas sinápticas.

Sobre el modelo de estudio.

La totalidad de los resultados aquí presentados fueron obtenidos de experimentos hechos en preparaciones *in vivo*, donde la estructura y conectividad del sistema nervioso se mantuvo intacta. Más aún, las condiciones iónicas, que son de suprema importancia para cualquier estudio electrofisiológico, no fueron mayormente alteradas por el método de estudio, de modo que los resultados reportados parecen ser representantes cercanos de las condiciones fisiológicas.

Los temas de plasticidad e integración sináptica fueron estudiados sobre el trasfondo del sueño lento, estado global y unificado característico de todos los mamíferos. Dicho estado fue inducido o imitado por la aplicación de anestésicos, agentes que actúan directamente sobre el sistema nervioso central y afectan la composición iónica del medio interno. Justamente para evaluar el impacto de los anestésicos en el medio interno se emplearon dos estrategias. En una primera aproximación, los experimentos se realizaron en preparaciones agudas con diversos anestésicos (uretano, ketamina-xylazina y barbitúricos (somnotol, pentotal, tiopental)) y se compararon las diferencias obtenidas. Otra forma de abordar el problema, fue la repetición de los protocolos experimentales en un reducido número de preparaciones crónicas, donde no hay utilización de anestésicos y el sueño ocurre de forma natural y espontánea.

Los experimentos con distintos anestésicos mostraron que sólo en el caso del estudio de vías corticales contralaterales hubo dependencia de la droga utilizada como

anestésico (ver más abajo). En todos los demás casos, se obtuvieron resultados equivalentes con los distintos anestésicos, motivo por el cual los resultados obtenidos con distintos anestésicos fueron combinados y analizados como un solo grupo. Por otra parte, los experimentos en preparaciones crónicas corroboraron la idea de que los protocolos utilizados en preparaciones agudas eran adecuados para el estudio de plasticidad sináptica, pues cambios similares se observaron en ambas preparaciones, aunque no en iguales proporciones.

Las preparaciones *in vivo* muestran pues, la virtud de mantener las condiciones experimentales cercanas a las fisiológicas, pero esto mismo es su propio defecto. Así pues, en este tipo de preparaciones no es posible estudiar detalladamente los componentes iónicos de las respuestas sinápticas o intrínsecas, o determinar las propiedades de los receptores involucrados en las cascadas de transducción, así mismo la aplicación de métodos ópticos como fluoróforos o tintes sensibles a voltaje, es muy limitada. De modo que este tipo de preparaciones mantienen condiciones cercanas a la realidad, pero son pobres en cuanto a su poder resolutivo de los elementos involucrados en el tema de estudio.

Resultados generales

El presente estudio se inscribe en el contexto de la hipótesis que propone que el sueño lento es un estado favorable para la ocurrencia de plasticidad sináptica en las redes tálamocorticales. Con objeto de fundamentar dicha idea, se diseñó un modelo de estudio en que por un lado, el sueño lento fue emulado por anestésicos, y por otro, las

oscilaciones presentes durante el estado de sueño lento fueron imitadas a través de la estimulación de vías sinápticas particulares a frecuencias similares a las de los grandes ritmos oscilatorios presentes de manera espontánea.

Esta estrategia permitió evaluar en un sistema *in vivo* la plasticidad de los circuitos tálamocorticales, ante estímulos de variable frecuencia y origen anatómico. Los resultados obtenidos son relevantes para la comprensión de la funcionalidad fisiológica de los ritmos presentes en el sueño lento y apoyan la idea de este como un estado favorable para la ocurrencia de cambios plásticos en la corteza cerebral. La discusión de los resultados girará en torno a los cambios plásticos observados tanto en estados de anestesia como de sueño lento. El contraste que se puede hacer con respecto a la vigilia no se considera relevante en este punto; ya que, como se explicó en la Introducción, la vigilia y el sueño lento (más no el sueño REM) son estados enteramente distintos. Sin ir más lejos, la condición fundamental que se postula como motor de plasticidad en el presente trabajo, que son los ritmos lentos del sueño lento, están ausentes durante la vigilia. Por tanto es difícil realizar una comparación entre estos estados. De modo que, siendo este un tema interesante, no será aquí abordado por no constituir parte de los objetivos del trabajo como fuera este planteado.

En cuanto al sueño lento, se estableció con sorpresa que no existe una banda de frecuencia preferencial y que adicionalmente, las vías corticales contralaterales exhiben una distinción para la inducción de cambios plásticos en la corteza. Estos resultados serán discutidos en detalle más adelante, pero aquí se especulará sobre su significado en

el contexto del sueño lento. Así pues, las vías intracorticales mostraron ser especialmente robustas y constantes, en el sentido de que ante grandes perturbaciones en sus circuitos (como son los trenes de estímulos condicionantes utilizados) mostraron una baja capacidad de cambio; esto es, una mínima expresión de cambios plásticos en las respuestas sinápticas. Estos resultados son sugerentes y apoyan la idea de la existencia de microcircuitos en la corteza. Dichos microcircuitos son relativamente autónomos y muestran fuertes conexiones internas, lo cual les permite mantener una suerte de identidad (Silberberg et al.2002). Estos circuitos están constituidos por neuronas piramidales (excitatorias) e interneuronas (inhibitorias), ubicadas en una restringida vecindad anatómica (Silberberg et al.2002). Sin embargo, las reglas de plasticidad interna de estos circuitos, así como el flujo de transmisión sináptica en los mismos no pueden ser evaluados por la metodología aquí utilizada.

El origen anatómico de las proyecciones y entradas sinápticas mostró ser clave en la expresión de cambios plásticos en la corteza. De este modo, las vías corticales contralaterales dieron evidencia de ser las más favorables para la inducción de plasticidad sináptica, y más aún, estos cambios siempre fueron en el mismo sentido: facilitación. Estos sorprendentes resultados sugieren que la actividad de un hemisferio cerebral puede ser modulada por la del otro. Experimentos realizados en humanos han mostrado la existencia de sincronización de actividad de grupos neuronales corticales distantes (entre ambos hemisferios) durante tareas cognitivas (Rodríguez et al. 1999). Como se describió también en la Introducción, durante el sueño lento los ritmos lentos están sincronizados a gran escala a través de la corteza y el tálamo (Contreras et al.

1996b, Amzica & Steriade 1995). Es posible que el principio de coordinación de actividad entre los dos hemisferios sea más general de lo que se ha contemplado. Por lo pronto, los resultados del presente trabajo muestran que durante el sueño lento, las vías corticales contralaterales pueden modular poderosamente la actividad ipsicortical.

Como se comentó anteriormente, el comportamiento de un cerebro vivo es muy distinto al de una rebanada o un cultivo celular. En el modelo de estudio aquí utilizado, el circuito entero del cerebro permanece intacto y las condiciones experimentales son muy similares a las fisiológicas. Es por este motivo que varios de los resultados aquí presentados difieren con lo que se ha reportado *in vitro*.

A pesar de haber probado varios protocolos de condicionamiento (aumentando intensidad del estímulo, número de estímulos, depolarizando la célula), no fue posible encontrar uno que indujera cambios plásticos consistentes con alta eficacia. Sólo para el caso particular de vías corticales contralaterales, fue obvia la expresión de potenciación sináptica, a medida que se aumentaba la frecuencia en los trenes de condicionamiento. Sin embargo, se mostró que en este caso la plasticidad sináptica inducida es una propiedad de la vía aferente, y no del protocolo de estimulación. De no ser así, las vías intracorticales y tálamocorticales hubieran mostrado resultados similares a las vías contralaterales, lo cual no fue el caso.

La estimulación a distintas frecuencias de vías corticales y talámicas nunca produjo un cambio en las respuestas (sea esta facilitación o depresión) en más del 50-

60 % de los casos. Esto sugiere, que en la red tálamocortical *in vivo*, hay solo una fracción (que puede alcanzar la mitad) de la población que es susceptible de ser afectada en sus propiedades sinápticas en un momento dado (tablas 1-3). De modo que la mayor parte de las conexiones en el sistema mantienen su identidad, a pesar de introducir grandes perturbaciones como lo es el protocolo de condicionamiento utilizado. Este es un resultado que contrasta con estudios *in vitro*, donde ciertos protocolos son capaces de evocar cambios estereotipados en las respuestas sinápticas con alta eficiencia. Es el caso típico de los protocolos de LTP en el hipocampo o de LTD en la corteza. Así por ejemplo estímulos de alta frecuencia (> 100 Hz) se usan comúnmente para inducir potenciación y estímulos de baja frecuencia para inducir depresión (< 1 Hz). El hecho de que esto no ocurra en condiciones *in vivo* sugiere no sólo que hay una mayor variabilidad en este caso, sino que existe una suerte de control o restricción de la propia red tálamocortical (cuando su estructura está intacta y operacional) en cuanto a la fracción de la población que expresa plasticidad sináptica.

Las oscilaciones presentes durante el sueño lento presentan patrones de frecuencia específicos, y en algunos casos (como los husos o la oscilación lenta) sus bases celulares son conocidas. Esto permitió imitar dichos ritmos mediante la estimulación eléctrica de vías aferentes específicas. Por ejemplo, con intención de imitar la oscilación lenta se estimularon vías intracorticales a muy baja frecuencia (1 Hz), mientras que para imitar los husos se estimularon núcleos tálamicos de relevo a baja frecuencia (10 Hz). Este marco inicial fue posteriormente extendido y múltiples vías aferentes fueron estimuladas en múltiples rangos de frecuencia (1, 10, 40 y 100 Hz) con

objeto de determinar la existencia de una banda preferencial para la inducción de plasticidad sináptica en la corteza.

La oscilación lenta cortical

La oscilación lenta, imitada por estimulación a muy baja frecuencia (1 Hz) mostró un resultado negativo y consistente en todos los casos evaluados. Independientemente de la vía aferente estimulada y el área cortical registrada, la estimulación en el rango de la oscilación lenta no produjo cambios en las respuestas sinápticas evocadas en ningún caso.

Este es un resultado que contrasta con lo obtenido en preparaciones *in vitro*, donde la estimulación a muy baja frecuencia (1 Hz y menores) es protocolo común para la inducción de depresión de larga duración (LTD) (Bortolotto et al., 1999; Feldman et al., 1999; McCaffery et al., 1999; Otani et al., 2003). Estudios en hipocampo y neocorteza han mostrado que LTD puede ser inducido con alta eficiencia al estimular por períodos prolongados (10-15 minutos) a baja frecuencia (1 Hz) (Bortolotto et al., 1999; McCaffery et al., 1999). El LTD inducido de esta manera ocurre sólo en las sinapsis estimuladas, por lo que es llamado homosináptico. Experimentos en la región CA1 de hipocampo y la capa III de la corteza visual han mostrado que la inducción de LTD requiere la activación de receptores de NMDA. Otros experimentos han mostrado además la neuromodulación de LTD por algunos neuromoduladores (acetilcolina, noradrenalina) (Kirkwood et al., 1999). Estos resultados muestran las diferencias existentes entre preparaciones *in vivo* e *in vitro*. En condiciones *in vivo*, como las de este

estudio, las neuronas corticales están sometidas a un constante bombardeo del árbol dendrítico, lo cual genera la activación de múltiples conductancias (Steriade et al., 2001; Destexhe et al., 2003; Higley & Contreras, 2003). Debido a la alta tasa de descarga sináptica basal (20 Hz, (Steriade et al., 2001)), es esperable que los receptores de NMDA estén tónicamente estimulados. Condiciones distintas a las que ocurren en rebanadas, donde la única estimulación de tales receptores es controlada por las condiciones experimentales.

Por otro lado, la ausencia de cambios plásticos en las respuestas sinápticas al estimular a tan baja frecuencia, sugiere que la oscilación lenta no está directamente ligada a procesos de facilitación o depresión de las respuestas sinápticas, sino que probablemente juega un papel modulador, agrupando oscilaciones más rápidas (como husos, ritmos delta y banda gamma) como ha sido propuesto con anterioridad.

Los husos talámicos

El valor de 10 Hz está centrado en el rango de frecuencia de los husos. Una interpretación de este hecho es que durante el sueño lento, cuando en el tálamo se generan los husos y neuronas tálamocorticales descargan sobre la corteza, una fracción de estas sinápsis es potenciada en el proceso (Timofeev et al. 2002). Ahora bien, los husos son ritmos que implican coherencia espacial y temporal a gran escala, de modo que hay grandes poblaciones neuronales descargando en forma sincrónica en el rango de frecuencia de 10 Hz. Por tanto, el número de sinápsis corticales que estarían siendo potenciadas en el proceso es significativamente alto.

Dicha especulación no fue corroborada por los resultados experimentales, que mostraron que sólo una pequeña fracción (20%, tabla 3) de las neuronas corticales mostraba potenciación luego de la estimulación a 10 Hz. Más aún, los resultados mostraron que altas frecuencias eran más favorables para la inducción de cambios plásticos en esta vía, sobre todo potenciación (tabla 1).

La idea de que los husos podrían ser la mejor frecuencia para generar condiciones de potenciación en las vías tálamocorticales no sólo se vio refutada por el hecho de que altas frecuencias (100 Hz) son más efectivas en la inducción de facilitación sináptica, sino también por el hecho de las “respuestas en aumento”, asociadas a los husos naturales, no fueron ni necesarios ni suficientes para la generación de potenciación en neuronas corticales. Por un lado fue posible obtener potenciación en dicha vía sin la presencia de “respuestas en aumento” (figs. 30,31) y por otro, la presencia de dichas respuestas, no fue sinónimo de potenciación de las respuestas sinápticas.

Ausencia de una frecuencia preferencial para la inducción de plasticidad sináptica.

Fuera de la oscilación lenta (1 Hz), que produjo resultados negativos consistentes, en los otros rangos de frecuencia evaluados no se encontraron resultados disociables de la vía aferente activada. Es decir, que no se encontró una frecuencia preferencial que produjera el mismo claro y constante resultado en todas las vías estimuladas y áreas corticales registradas.

Tres vías aferentes fueron estudiadas en su propensión de expresión de plasticidad sináptica: las vías intracorticales ipsilaterales, las vías tálamocorticales y las vías corticales contralaterales. De dichas vías, para la multitud de frecuencias ensayadas, sólo la última mostró resultados consistentes.

La alta propensión a expresar facilitación de las respuestas sinápticas de las vías corticales contralaterales fue una propiedad de la vía aferente y no de los trenes de estimulación, pues los mismos protocolos fallaron en producir cambios consistentes en vías intracorticales y tálamocorticales. De modo que la vía aferente que expresó mayor propensión a cambios plásticos fue la vía contralateral cortical.

Curso temporal de los cambios plásticos.

Se ha descrito que los cambios plásticos que ocurren a nivel sináptico tienen tres escalas distintas. Plasticidad de corta duración permanece por algunos segundos, mientras que la de mediana duración lo hace por algunos minutos. Finalmente, cambios de larga duración permanecen por horas o incluso días.

Todos los cambios plásticos aquí reportados son del rango de corta y mediana duración. Los cambios más cortos registrados corresponden a vías intracorticales, que permanecieron por unos pocos segundos (10-20). Por otro lado, los cambios más largos registrados corresponden a vías contralaterales (hasta 1 hora). Este hecho sugiere que los mecanismos responsables de estos cambios difieren en ambos casos, pues se sabe que plasticidad de corta duración puede ocurrir por una facilitación de la probabilidad de

liberación de neurotransmisor, mientras que la plasticidad de mediana duración requiere la activación de receptores de NMDA y kinasas como la CaMKII (Hook & Means, 2001).

Debido a la consistencia de los resultados obtenidos, fue en la vía contralateral cortical que se decidió estudiar el curso temporal de los cambios plásticos. De tal manera se determinó que la expresión de plasticidad no es siempre inmediata, es decir que no se expresa directamente después de los trenes de condicionamiento, sino que en algunos casos se desarrolla en forma progresiva hasta alcanzar un máximo valor (fig. 19).

Facilitación de respuestas sinápticas en las vías corticales contralaterales.

En cuanto a las vías aferentes estudiadas, sorpresivamente las vías corticales contralaterales presentaron los resultados más consistentes y reproducibles. Los resultados del estudio de plasticidad sináptica al estimular la corteza contralateral se resumen en los siguientes:

- a) El protocolo de condicionamiento produce facilitación homosináptica de los PEPSs evocados en la abrumadora mayoría de casos (98%). Dicha potenciación no requiere de estimulación a altas frecuencias ya que frecuencias en el rango de los husos (10 Hz) son capaces de ejercer un efecto.
- b) El aumento en la amplitud de la respuesta producido por el protocolo de condicionamiento es similar para altas (40-100 Hz) y bajas (10-20 Hz) frecuencias, siendo en el primer caso ~21% y en el segundo ~24%.

- c) La potenciación producida fue de mediana duración, ya que permaneció por períodos de 2-4 minutos hasta 20-30 minutos.

En el hipocampo, la estructura cerebral donde se ha estudiado la plasticidad sináptica por excelencia, potenciación de las respuestas sinápticas se induce de un múltiple número de maneras, generalmente por la aplicación de trenes de 50-100 estímulos a 100 Hz o mayores frecuencias (Bliss & Løvmø 1973; Bliss & Collingridge 1993; Rose & Dunwiddie 1986). Este es el así llamado protocolo theta-burst, uno de los favoritos para el estudio de facilitación sináptica. La frecuencia entre trenes en dicho protocolo debe ser al menos de 1 Hz, de otra manera puede fallar en inducir facilitación de la respuesta sináptica (Larson et al. 1986).

El protocolo de condicionamiento utilizado en este estudio muestra que la estimulación de las fibras del cuerpo calloso a través de la corteza contralateral, puede producir potenciación de las respuestas sinápticas cuando los trenes son de relativamente bajas frecuencias (10-20 Hz) y están separados hasta por 2-3 s.

Estudios anteriores han mostrado que la estimulación en el rango de frecuencia de las oscilaciones tipo huso (~10 Hz) produce respuestas en aumento en sistemas tálamo-corticales *in vivo* (Ferster & Lindström 1985; Morin & Steriade 1981; Morison & Dempsey 1943; Steriade et al. 1998b), *in vitro* (Castro-Alamancos & Connors, 1996), e incluso *in computo* (Bazhenov et al. 1998). Estudios *in vivo* han mostrado además que las “respuestas en aumento” pueden ser inducidas en el tálamo de animales decorticados

(Steriade & Timofeev 1997; Timofeev & Steriade 1998), en áreas corticales después de la lesión de núcleos talámicos específicos (Morin & Steriade 1981; Steriade & Yossif 1974), y en preparaciones agudas de corteza aislada (Timofeev et al. 2002). A frecuencias más bajas que 10 Hz, “las respuestas en aumento” no pueden ser eficazmente generadas, ni a nivel intracelular (Steriade & Timofeev 1997), ni a nivel de potenciales de campo (Morin & Steriade 1981). De modo que desde un punto de vista sistémico, tanto la red talámica como la cortical poseen por sí mismos mecanismos para producir cambios plásticos en sus respuestas sinápticas.

Un resultado importante de la presente sección es que *todas* las frecuencias de condicionamiento (10-200 Hz) produjeron potenciación sináptica en la gran mayoría de los casos (39 de 40). Esta potenciación homosináptica contrasta en forma marcada con el también consistente resultado de depresión obtenido al estimular vías heterosinápticas (tálamo y corteza) a frecuencias mayores a 20 Hz (intervalos < 50 ms). La presencia de una prominente potenciación inducida por la estimulación de la corteza contralateral puede ser adscrita, al menos parcialmente a la presencia del receptor NMDA de glutamato en las sinapsis callosas (Sanja et al. 2001); y al hecho de que frecuencias de estimulación de 100 Hz (o mayores) activan dicho receptor permitiendo influjos masivos de Ca^{2+} en la región postsináptica, condición necesaria para la inducción de potenciación sináptica (Artola & Singer 1990; Herron et al. 1986). Consistente con esta misma idea, los mismos protocolos de condicionamiento utilizados en preparaciones de animales anestesiados con barbitúricos, no produjeron cambios en las respuestas evocadas en preparaciones realizadas con ketamina-xylazina. Ketamina es un compuesto cuyas

propiedades como bloqueador del receptor NMDA están bien descritas (Davies et al., 1988; Orser et al., 1997). De modo que la potenciación de respuestas sinápticas en vías corticales contralaterales parece residir fundamentalmente en la activación del receptor de NMDA (Corbett, 1990). Esto sugiere además que en tal caso, la facilitación en dicha vía es un evento de orden postsináptico (Corbett, 1990).

La duración de los cambios plásticos al estimular la corteza contralateral fue de variable duración (2-30 minutos). Es esperable que una variedad de mecanismos celulares estén implicados en este proceso.

Como se indicó, la banda gamma es prominente en el EEG durante la vigilia y el sueño REM, pero es mínima durante el sueño lento. Sin embargo, es bastante común la presencia de actividades en el rango de 40 Hz en los registros intracelulares (Steriade et al., 1998a), sugiriendo que esta actividad existe durante el sueño lento, pero no está sincronizada a través de grandes territorios. El hecho de que esta banda de frecuencia no presenta sincronía a gran escala durante el sueño lento sugiere que esta vía de potenciación podría ser una forma de "sintonía fina" para redes discretas en la corteza y no grandes grupos neuronales. Es importante el hecho de que esta forma de potenciación permanece aún en el caso de lesiones talámicas, pues muestra que el diálogo es directo entre las cortezas contralaterales homotópicas. Este es un punto interesante, pues es 40 Hz el rango de frecuencia al cual se sincronizan poblaciones neuronales en la corteza durante la vigilia y el sueño REM cuando ocurren eventos cognitivos (Rodríguez et al., 1999; Hobson et al., 2000; Varela et al., 2001).

Cambios múltiples al estimular vías intracorticales.

Más difíciles de interpretar fueron los resultados obtenidos al estimular la corteza ipsilateral. A pesar de haber registrado la mayor cantidad de neuronas en este caso (tabla 2), no parece ser posible determinar un patrón claro. Un punto importante aquí, que puede arrojar luces al respecto es la neuroanatomía del sistema. Las proyecciones talámicas alcanzan la corteza en las capas III-IV mayoritariamente, sobre las dendritas distales de las grandes neuronas piramidales (Jones, 2002a, b). Todas estas sinápsis son excitatorias, de modo que el resultado final es una activación masiva de neuronas piramidales, en algunos casos también reclutando redes inhibitorias locales (Timofeev et al., 1996; Steriade et al., 1998b). Es por este motivo que muy raramente se obtiene una respuesta cortical inhibitoria al estimular el tálamo. Por otro lado, las neuronas de una región cortical que proyectan sobre su homóloga contralateral, son también piramidales y por tanto forman sinápsis excitatorias. Consistente con este último punto, todos los casos aquí registrados de estimulación contralateral produjeron respuestas depolarizantes. En resumen, en los resultados aquí presentados las vías contralaterales y talámicas no produjeron una activación significativa de la red intracortical inhibitoria.

Por el contrario, cuando se estimuló la corteza ipsilateral, muchas veces se activó la red de interneuronas inhibitorias (figs. 25,29). Es bien sabido que las propiedades de las interneuronas corticales son bien distintas a las de las grandes piramidales, tanto a nivel electrofisiológico como morfológico (Gupta et al., 2000; Buzsaki, 2001; Galarreta & Hestrin, 2001; McBain & Fisahn, 2001). Está bien documentado también el hecho de

que las interneuronas corticales forma una verdadera red unida eléctrica y metabólicamente a través de conexinas (Galarreta & Hestrin, 2001). Es bien posible que las reglas de plasticidad que siguen este grupo de neuronas sean distintas al de las neuronas piramidales de la corteza. Lo que se sugiere aquí, es que la diversidad de resultados y falta de un patrón claro obtenidos al estimular la corteza ipsilateral se debe al hecho de que en algunos casos (si es que no todos) hubo una activación significativa de la red inhibitoria intracortical.

Por ejemplo, el caso de la figura 23 muestra respuestas que varían mucho ante el mismo estímulo, en algunas ocasiones PEPSs, produciendo ocasionalmente potenciales de acción. Sin embargo, en otras ocasiones se activan interneuronas y eso se refleja como PIPSs en el registro intracelular. Después del protocolo de condicionamiento a 10 Hz, se nota claramente que no sólo hay una potenciación del PEPS, sino que hay una depresión del PIPS. Esto sugiere que la misma estimulación tuvo efectos distintos en las neuronas piramidales que en la red inhibitoria intracortical.

Este tema es de suma importancia, pues a pesar de que las interneuronas conforman poco más que el diez por ciento de la población cortical, están distribuidas estratégicamente y hacen sinápsis muy potentes sobre los somas y montículos axónicos de las neuronas piramidales inhibiéndolas (DeFelipe et al., 1985; DeFelipe & Jones, 1985). La idea puramente especulativa que surge de esto es que las reglas de plasticidad sináptica pueden ser diferentes para la red de neuronas inhibitorias que para las grandes piramidales (Gupta et al., 2000).

Experimentos en rebanadas y modelo computacionales han mostrado que potenciación y depresión de sinápsis en el sistema nervioso central deben ser fenómenos balanceados, de modo de mantener un equilibrio dinámico. Dicho proceso es una forma de plasticidad homeostática y consiste en que la potenciación o depresión de ciertas sinapsis particulares en el árbol dendrítico, conduce a cambios opuestos en otros sitios dendríticos. Como resultado, ocurre sólo un pequeño cambio en el peso sináptico total, a pesar de que la fuerza de las sinapsis particulares ha sido modificada. Por este motivo, es esperable que el mismo protocolo de condicionamiento produzca efectos distintos, dependiendo de la región del árbol dendrítico estimulada. Ya que todo cambio plástico está acompañado de una compensación en otros sitios sinápticos, es posible una variedad de resultados como facilitación, depresión o ausencia de cambios.

Finalmente, se ha postulado la probabilidad de liberación de neurotransmisor como el factor principal que determina la dirección de cambios en la plasticidad de corta duración (facilitación o depresión) (Thomson et al., 1995; Thomson & Destexhe, 1999; Thomson, 2000). Esto también puede tener un papel importante en la diversidad de resultados obtenidos al estimular vías intracorticales, pues se sabe que la probabilidad de liberación de neurotransmisor en la corteza no es homogénea. Esto se discutirá en mayor detalle más adelante, en el tema de integración sináptica de pulsos pareados.

A pesar de la múltiple variedad de respuestas posibles obtenidas al estimular vías intracorticales, estas mostraron la mayor resistencia a expresar cambios plásticos en sus

respuestas. Esta tendencia se acentuó a medida que la frecuencia de condicionamiento se incrementó (tabla 2). Así pues, 100 Hz, la frecuencia con mejores resultados para inducir cambios plásticos en vías tálamocorticales (depresión y facilitación) y contralaterales (facilitación) fue la menos efectiva en vías intracorticales, ya que poco más del 20% de las células estimuladas mostraron algún cambio en sus respuestas sinápticas.

Cambios múltiples al estimular vías tálamocorticales.

La estimulación de vías tálamocorticales con trenes de condicionamiento mostró que 10 Hz no es una frecuencia preferencial para la potenciación de esta vía, y por el contrario, altas frecuencias (100 Hz) parecen serlo (tabla 3). El hecho de que sea potenciación el resultado favorecido con trenes condicionante de alta frecuencia puede ser interpretado como la presencia de una baja probabilidad de liberación de neurotransmisor en las sinapsis tálamocorticales, lo que explicaría que estas se potencian con altas frecuencias. Esta idea es consistente con evidencia morfológica que muestra que las vesículas de terminales tálamocorticales son pocas y su organización sugiere una baja probabilidad de liberación de neurotransmisor. Como se indicó, sinápsis de este tipo son capaces de mostrar facilitación a medida que se aumenta la frecuencia de estimulación, sugiriendo que este es el caso de las vías tálamocorticales. Así pues, incrementos progresivos en la frecuencia de los trenes de condicionamiento produjeron facilitación sináptica en mayor número de células (tabla 3).

Ausencia de cambios plásticos al estimular vías heterosinápticas.

El resultado más consistente, aunque negativo, en el tema de plasticidad sináptica fue la ausencia de interacciones entre entradas sinápticas de origen distinto (tablas 4-5). La estimulación condicionante de vías talámicas (o corticales) no tuvo efecto en las respuestas sinápticas evocadas por sus pares corticales (o talámicos), sugiriendo una independencia en el manejo de señales de entrada en el árbol dendrítico. La ausencia de interacciones plásticas entre estímulos provenientes de vías aferentes distintas es acorde con la idea de que los eventos de plasticidad son específicos para la sinápsis donde ocurren, y dependen de la actividad de la misma (Bailey et al., 2000; Colbert, 2001). Así pues, sólo pueden ser facilitadas o deprimidas sinápsis que han sido sometidas a los trenes de condicionamiento y no sinápsis lejanas. Estos resultados muestran que hay una segregación en el árbol dendrítico de neuronas piramidales en cuanto al manejo de las señales de entrada. Esto ha sido también reportado en estudios *in vitro* en que se ha mostrado que el impacto de un PEPS depende fundamentalmente de la ubicación de la sinápsis donde ocurre, en el árbol dendrítico. Mientras las sinápsis están más alejadas del soma, los PEPSs sufren una mayor depresión, debido a filtraje dendrítico (Magee, 2000; Magee & Cook, 2000). Sin embargo, también se sabe que la presencia de conductancias activas en las dendritas puede amplificar, atenuar o compensar los efectos de la caída electrotonica en la amplitud de los PEPSs que arriban a sinapsis lejanas de soma (Magee, 2000; Magee & Cook, 2000; Reyes, 2001).

El constante resultado negativo obtenido en esta sección motivó el interés de estudiar interacciones de entradas sinápticas que llegan a distintas regiones del árbol dendrítico de neuronas corticales. Ya que los protocolos de condicionamiento y

estímulos control estaban distanciados por intervalos largos (1-3 s), se decidió estudiar la interacción a intervalos cortos, para determinar el tipo de interacción entre señales provenientes de distintas fuentes, que alcanzan sinápsis distintas en la misma neurona.

Similitud en la expresión de plasticidad sináptica en áreas corticales distintas.

Interesante también es el caso de ausencia de diferencias en plasticidad entre dos áreas corticales distintas (tablas 1-3). Esto sugiere que los mecanismos muy básicamente aquí descritos son válidos para la corteza en general, sin embargo no es posible descartar que haya diferencias en otros niveles, como el de redes discretas dentro de regiones corticales específicas (Hobson et al., 2000) que sean afectados en forma diferencial por los ritmos oscilatorios del sueño lento. Sin embargo, esto no puede ser evaluado por la metodología aquí empleada. Sólo es posible decir que los patrones de cambio que presentaron ambas regiones, ante los mismos protocolos de estimulación fueron similares.

Estos resultados contrastan con reportes *in vitro* en los que áreas granulares somatosensoriales y agranulares motoras mostraron distinta propensión a generar cambios plásticos. Así pues, la corteza somatosensorial fue capaz de expresar LTP, pero no la corteza motora. Las respuestas sinápticas en estos dos casos fueron sin embargo distintas. Las respuestas en la corteza somatosensorial mostraron facilitación progresiva durante el condicionamiento, mientras que en la corteza motora fueron estables durante la estimulación. Estos resultados han demostrado que *in vitro*, regiones corticales distintas expresan propiedades diferentes. En dichos experimentos se estimuló

localmente en regiones intermedias de la corteza (capas II/III) y a baja intensidad (10-50 μ A). Probablemente bajo dichas condiciones experimentales, la activación ocurrida por estimulación implica redes intracorticales pequeñas o microcircuitos (Silberberg et al., 2002; Wang et al., 2002). Como se indicó más arriba, la metodología utilizada en los experimentos aquí reportados implicó la activación de grandes grupos neuronales y por tanto, la actividad de microcircuitos no puede ser evaluada en forma adecuada. Esto puede dar cuenta de las diferencias obtenidas experimentalmente en estos casos.

El caso del sueño natural.

Los experimentos realizados en preparaciones agudas fueron repetidos en preparaciones crónicas, mostrando que los protocolos de condicionamiento utilizados generaban resultados cualitativamente similares. Esto permitió considerar que los anestésicos son un modelo válido para el estudio de sueño natural, pues son estados similares no sólo en sus características electrográficas, sino también en los resultados que generan.

Sin embargo, el resultado más importante de esta sección fue que un período de sueño natural es por sí mismo (en ausencia de estimulación) capaz de afectar las respuestas sinápticas. Lo cual demuestra la ocurrencia de cambios plásticos durante el sueño lento. Hay que mencionar que los cambios ocurridos en este caso son dramáticos y no constituyen una simple depresión o facilitación de la respuesta sináptica, sino una transformación de la misma. Este resultado es sin embargo, consistente con estudios de registros extracelulares y de potenciales de campo *in vivo* que han mostrado cambios en

los patrones de descarga de grupos específicos neuronales durante y luego de períodos de sueño. Los resultados aquí presentados, son un correlato del mismo tópico, desde el punto de vista intracelular, mostrando que las propiedades sinápticas también son moduladas (o transformadas) durante los períodos de sueño.

Al igual que lo ocurrido en preparaciones agudas, estas modificaciones plásticas son propiedad de un subconjunto de la red tálamocortical, y no afectan a toda la población. Sólo algunas de las neuronas estimuladas mostraron cambios luego de los trenes de condicionamiento. Esto es consistente con la idea ya mencionada de que en cualquier momento dado, sólo una parte de la red tálamocortical es receptiva a la expresión de cambios en sus propiedades sinápticas.

Interacción e integración sináptica de distintas entradas sobre la corteza.

Los resultados de los experimentos de integración sináptica en la corteza mostraron que:

- a) El protocolo de PP en vías intracorticales produjo una variedad de resultados, incluyendo facilitación, depresión y ningún cambio.
- b) PP de vías tálamocorticales produjeron respuestas compuestas. La respuesta al primer estímulo constituyó un PEPS simple y la respuesta al segundo estímulo un PEPS polisináptico, en que la primera parte de la respuesta corresponde al PEPS inicial deprimido.

- c) La estimulación de vías heterosinápticas (talámica y cortical, o viceversa) produjo una disminución en la amplitud de las respuestas, así como en el área de las mismas, el efecto máximo produciéndose a intervalos cortos (10-20 ms), y permaneciendo por la duración del estímulo condicionante (60-100 ms).
- d) Todas las neuronas condicionadas con estímulos talámicos mostraron una caída en la resistencia aparente de entrada, cuyo curso temporal fue paralelo al de la disminución de las respuestas sinápticas, mientras que solo en la mitad de las células condicionadas con estímulos corticales mostraron tal caída en la resistencia de entrada.
- e) La probabilidad de descarga de potenciales de acción en las neuronas talámocorticales fue disminuida por cerca de 100 ms después de la estimulación cortical condicionante, sugiriendo un mecanismo de disfacilitación en redes corticales, el cual podría dar cuenta de los casos en que la resistencia de entrada no se vio disminuida, mientras que las respuestas sinápticas fueron afectadas.

Los resultados del presente estudio fueron obtenidos en preparaciones *in vivo* mediante registros intracelulares de neuronas corticales que mostraron respuestas sinápticas debido a proyecciones intracorticales y talámocorticales. Las respuestas sinápticas fueron evocadas por estimulación de vías intracorticales o talámocorticales, que fueron pareadas a intervalos temporales distintos. En general las respuestas evocadas fueron de tipo excitatorias y de corta latencia, probablemente PEPs

monosinápticos. Los PEPSs evocados en neuronas corticales por estimulación de vías intracorticales son comúnmente seguidos de una prolongada hiperpolarización, resultado de componentes inhibitorios que se atribuyen a interneuronas GABAérgicas de redes corticales. En los experimentos aquí presentados, estimulación de baja intensidad (100-200 μ A) en la corteza permitió en la mayoría de casos evitar la activación de redes corticales inhibitorias, ya que no hubo evidencia de activación de potenciales inhibitorios durante o después de la fase repolarizante de los PEPSs evocados (figs. 24, 26, 27). Aún cuando en esos casos las condiciones de reposo de la membrana fueron bastante hiperpolarizadas ($V_m < -73$ mV), la identificación de las respuestas mediante cambios en el potencial de membrana mostraron la ausencia de PIPSs. Sin embargo, en otros casos, una secuencia típica del tipo PEPS-PIPS fue activada en las redes corticales (fig. 48). Proyecciones talámicas fueron eficientes en la activación de PEPSs simples o compuestos, que fueron seguidos en la mayoría de los casos por una activación de rebote al cabo de 100-150 ms (fig. 48), debido a la recurrencia del sistema tálamocortical. Dicha activación en algunos casos se desarrollo completamente dando origen a una oscilación del tipo huso o de otro modo fue abortiva, como ha sido ya descrito (Steriade et al., 1998b). De cualquier manera, la escala temporal de la activación de rebote (>100 ms) es mucho mayor que la de las interacciones aquí reportadas, para las vías corticales y talámicas (10-100 ms).

Cuando vías heterosinápticas aferentes fueron estimuladas con distintos trenes de condicionamiento (10 Hz, 40 Hz, 100 Hz), no se obtuvo cambios en la respuesta sináptica en ningún caso. Con la idea de aclarar este inesperado resultado se inició el

estudio de la integración de señales provenientes de vías sinápticas heterogéneas (talámicas y corticales) sobre la corteza, mediante el simple protocolo de pulsos pareados (PP). El resultado consistente e inesperado fue que en la mayoría de los casos (85-90%), el estímulo condicionante deprimió la respuesta al estímulo condicionado (tablas 11-12).

Este efecto parece estar correlacionado con una disminución en la R_{in} celular cuando se efectúa el estímulo condicionante. Cualquiera sea el estímulo condicionante (cortical o talámico), su efecto dura 50 ms en promedio. Esto sugiere que en una neurona cortical que reciba estímulos corticales y talámicos separados por menos de 50 ms (> 20 Hz), habrá una atenuación de la respuesta al segundo estímulo. Esto debido a la apertura de conductancias iónicas y consecuente reducción en la resistencia de entrada producida por el primer estímulo. Una forma de interpretar este resultado es que este es un mecanismo para mantener vías sinápticas distintas segregadas temporalmente. Nótese que sólo fue posible obtener facilitación de la respuesta sináptica en vías homosinápticas, de modo que si hay un flujo de entradas cortico-corticales, cualquier señal talámica que irrumpa en la vía en un intervalo de 50 ms producirá una respuesta atenuada. Lo mismo es válido para el diálogo talamo-cortical.

Respecto a los mecanismos celulares responsables de todos los resultados aquí presentados es difícil decir algo con certeza, pues la metodología aquí utilizada no permite enfrentar este punto. Todos los registros intracelulares presentados en este trabajo tienen las características de registros somáticos. Los potenciales de acción

registrados mostraron amplitudes y duraciones constantes en todos los casos, y *bursts* de potenciales rápidos, característicos de registros dendríticos (Nunez et al., 1993), no fueron vistos en ningún caso. Por estos motivos es posible asegurar que los registros intracelulares fueron realizados al nivel somático. Por cierto que gran parte de la integración de entradas sinápticas ocurre en las dendritas, proximales y sobre todo distales. De modo que, eventos que ocurren a nivel dendrítico no siempre tienen un reflejo fidedigno a nivel somático.

Sin embargo, tomando en cuenta las limitaciones del método de estudio, aún es posible especular respecto a los resultados. Como se indicó con anterioridad, la ubicación espacial de las sinápsis cortico-corticales y tálamo-corticales es distinta y distante en el árbol dendrítico, de modo que el efecto que se aquí se observa debe abarcar no sólo el soma, sino gran parte del árbol dendrítico. Estos resultados difieren de lo que se ha descrito *in vitro*, en que el grado de aislamiento eléctrico entre las dendritas y el soma es muy grande, y las propiedades pasivas de la membrana en general son distintas (Llinás & Paré, 1991; Grenier et al., 2001). Los resultados aquí presentados sugieren que *in vivo* el “filtro dendrítico” no es tan riguroso como lo es *in vitro*, o por lo menos no opera de modo similar. Esto se explica por el hecho de que en condiciones *in vivo* hay un constante bombardeo sináptico del árbol dendrítico y conductancias iónicas activadas debido a la continua actividad de la red tálamo-cortical (Grenier et al., 2001).

Se ha propuesto que la facilitación o depresión de respuestas sinápticas corticales se debe a cambios dependientes de calcio en la probabilidad de liberación de transmisor.

De hecho, ambos casos han sido observados en sinápsis inhibitorias y excitatorias de la corteza (Fisher et al., 1997; Zucker, 1999). En el presente estudio, la estimulación pareada de vías intracorticales produjo variedad de resultados incluyendo facilitación y depresión de las respuestas. De hecho, se ha postulado la probabilidad de liberación de neurotransmisor como el factor principal que determina la dirección de cambios en la plasticidad de corta duración (facilitación o depresión). Sinápsis de baja probabilidad de liberación mostrarán predominantemente facilitación y sinápsis de alta probabilidad de liberación mostraran fundamentalmente depresión (Thomson et al., 1995; Thomson & Destexhe, 1999; Thomson, 2000). Dicha propuesta es consistente con los resultados aquí presentados, pues se sabe que la probabilidad de liberación de neurotransmisor en la corteza es heterogénea, y consistente con eso, los resultados de protocolo de pulso pareado produjeron resultados heterogéneos.

Con respecto al PP en vías tálamocorticales, se observó depresión de la primera respuesta, sugiriendo que el mismo mecanismo que opera en el caso de vías heterosinápticas es responsable de los efectos observados en esta vía. El segundo PEPS de las respuestas compuestas ocurrió cerca de 10 ms después de la primera respuesta y dio origen a “respuestas en aumento” a intervalos más largos (a partir de los 60 ms, fig. 49B). Las “respuestas en aumento” son posibles en estos casos porque el primer PEPS de la respuesta compuesta, aunque deprimido, se suma al segundo que ocurre, lo cual mantiene e incluso aumenta la amplitud total de la respuesta.

Así pues, los resultados mostraron que todas las neuronas corticales estimuladas desde vías talámicas mostraron potenciación máxima de la segunda respuesta a los 100 ms (105 ± 15 ms), consistente con una estimulación en el rango de los husos sinápticos (10 Hz), que se utiliza comúnmente para inducir “respuestas en aumento”. Los estímulos rítmicos que producen dichas respuestas, generan facilitación durante el tren de estimulación, y ocasionalmente una actividad autosostenida en redes *tálamo-corticales* (Steriade 1999).

Estudios *in vitro* han señalado el aumento dramático que ocurre en dos PEPs distintos que llegan a la misma dendrita, separados por intervalos cortos (Wang et al. 2000; Stuart & Hausser 2001). Los presentes resultados obtenidos *in vivo* son exactamente opuestos a aquellos. Las diferencias entre estos dos grupos de resultados pueden atribuirse al menos a dos factores. Por un lado, el bombardeo dendrítico constante del árbol neuronal en condiciones *in vivo* activa múltiples conductancias, las cuales bloquean influencias sinápticas fásicas activadas por diversos estímulos, reduciendo o aboliendo las respuestas que se ven *in vitro* (Steriade et al., 2001; Destexhe et al., 2003). Por otra parte, en condiciones *in vivo* es común producir inhibición activa o disfacilitación de las neuronas involucradas en la respuesta. Tal disfacilitación remueve excitación de neuronas vecinas, haciendo que estas se alejen del umbral de descarga, y por tanto su impacto en las estructuras sobre las que proyectan no será detectado. Por ejemplo, en el estado de vigilia los niveles de actividad sináptica son mayores que durante las preparaciones bajo anestésicos debido a un aumento perisomático de la R_{in} (Steriade et al. 2001). Además, neuromoduladores provenientes del tronco del encéfalo

cierran múltiples conductancias de potasio (McCormick 1992; Metherate & Ashe 1993), lo que contribuye al mismo efecto. Estos factores sugieren que condiciones experimentales distintas *in vivo* e *in vitro* pueden conducir a resultados opuestos. Los resultados de PP son consistentes sin embargo, con experimentos realizados en rebanadas de corteza visual, donde PEPSs, aunque deprimidos, sólo fueron evocados por estimulación monosináptica, mientras que grandes PEPSs, producto de activación de múltiples fibras, produjo facilitación (Volgushev et al., 1995).

Mientras que la mayoría de las neuronas corticales evaluadas mostraron una reducción de la R_{in} asociada con una disminución de las respuestas evocadas, algunas neuronas no mostraron tal disminución en la R_{in} . En aquellos casos, la disfacilitación ocurrida se puede explicar por la activación de redes inhibitorias en la corteza debido al estímulo condicionante. De este modo, algunas neuronas de la red serían inhibidas, dejando de descargar potenciales de acción y en consecuencia, removiendo excitación de neuronas tálamocorticales, creando un período de disfacilitación. Esta interpretación especulativa es consistente con otros resultados que estímulos pretalámicos de baja intensidad no son capaces de activar descarga en neuronas talámicas durante períodos de disfacilitación (Bazhenov et al. 1998; Timofeev et al. 1996; Timofeev & Steriade 1997).

Estos resultados también son consistentes con estudios funcionales en que se ha evaluado la integración cortical de respuestas sensoriales. En ese caso, la estimulación mucho más fisiológica que la aquí utilizada, consistió en deflectar bigotes de ratas anestesiadas y registrar las respuestas neuronales de células en campo receptivo de los

bigotes. Bigotes distantes fueron deflectados a intervalos distintos a modo de un protocolo de pulso pareado, y el efecto de la primera respuesta se avaluó en el segundo. En aquel estudio también se encontró que en todos los casos la primera respuesta afectaba negativamente la segunda, debido a una disminución en su amplitud. Adicionalmente, los resultados en aquel caso se explican por la apertura de conductancias y una disminución de los niveles de excitación generada por el primer estímulo. Estos resultados son concordantes con una disminución en la R_{in} y una disfacilitación en el sistema tálamocortical, como las aquí reportadas.

Los resultados obtenidos tienen implicancias funcionales para el entendimiento del procesamiento de señales durante la sensación de múltiples cualidades del mismo objeto. En el sistema visual, el procesamiento de una cualidad disminuye significativamente, o incluso anula, el procesamiento de otra cualidad procesada simultáneamente (Hillis et al. 2002). Los resultados aquí presentados sugieren que la fuente primaria en la pérdida del procesamiento de una señal se debe a inhibición pasiva (una caída en la R_{in}), seguida de un período de disfacilitación. Ambos procesos disminuyen la capacidad de respuesta de la red tálamocortical a subsecuentes señales excitatorias. Es posible especular que mecanismos de este tipo provean las bases neuronales para la discriminación por contraste y otros fenómenos que implican la respuesta de redes neuronales extensas.

Resumen final.

La idea inicial y motor del presente trabajo, a saber, que los grandes ritmos lentos presentes durante el sueño lento sirven a propósitos de plasticidad sináptica, no fue confirmada experimentalmente.

Así pues, la imitación de los husos sinápticos mediante la estimulación de vías tálamocorticales a 10 Hz produjo facilitación de las respuestas en sólo un 20% de los casos (tabla 3), mientras que la estimulación de vías intracorticales a modo de la oscilación lenta, a 1 Hz, no produjo cambio alguno en las respuestas evocadas (tabla 2).

Por otra parte, los resultados de los protocolos de plasticidad variaron de célula a célula, y es posible decir que no hubo dos neuronas que mostraran los mismos resultados, aunque sí las mismas tendencias. Sin embargo, cuando se analizaron los resultados en términos de población, algunos patrones salieron a la luz. La tarea del presente trabajo no fue ni mucho menos explicativa, sino descriptiva, debido a la naturaleza misma del acercamiento experimental.

Interesante es el hecho de frecuencias altas, en el rango de la banda gamma (40-100 Hz) fueron las más adecuadas para producir cambios plásticos en las respuestas sinápticas. Como se indicó anteriormente, dicho rango de frecuencia está presente en la actividad intracelular neuronal, pero no está sincronizada a través de la corteza, motivo por el cual no se refleja en el EEG durante el sueño lento. Sin embargo, en las vías intracorticales, altas frecuencias fueron las menos eficientes en producir cambios

plásticos en las respuestas, de modo que este rango parece ser adecuado sobre todo para vías tálamocorticales y corticales contralaterales (tablas 1-3).

El hecho de que el rango de frecuencias de la banda gamma sea el que está asociado a tareas cognitivas en humanos es sugerente, pues la sincronización transitoria de poblaciones neuronales a nivel interhemisférico ocurre a este nivel. Esto indica un papel de las vías corticales contralaterales en el proceso de acoplamiento temporal. Además, los cambios plásticos registrados fueron en todos los casos de corta o mediana duración, evidencia de que los cambios favorecidos son de orden transitorio, más que permanente.

Si bien es cierto que las oscilaciones del sueño lento no mostraron alta eficiencia en producir cambios plásticos en las respuestas sinápticas, los períodos de sueño natural dieron evidencia de lo contrario. Más aún, en tal caso el cambio de la respuesta sináptica no consistió en una facilitación o depresión de la misma, sino una transformación completa, evidencia de los complejos cambios sinápticos que ocurren durante el sueño. De modo que el sueño natural mostró ser un estado en el que de hecho ocurren cambios plásticos en las respuestas sinápticas.

Finalmente, la integración temporal cortical de entradas en distintos sectores del árbol dendrítico dio evidencia de una restricción y segregación temporal de las mismas. Esto fue confirmado con la ausencia de cambios plásticos al estimular vías aferentes

distintas, apoyando la idea, ya conocida, de que cambios plásticos en las sinápsis son dependientes de su actividad.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP & in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Adam K, Oswald I (1977) Sleep is for tissue restoration. *J R Coll Physicians Lond* 11:376-388.
- Ambrosini MV, Giuditta A (2001) Learning & sleep: the sequential hypothesis. *Sleep Med Rev* 5:477-490.
- Amzica F (2002) In vivo electrophysiological evidences for cortical neuron-glia interactions during slow (<1 Hz) & paroxysmal sleep oscillations. *J Physiol Paris* 96:209-219.
- Amzica F, Steriade M (1995) Short- & long-range neuronal synchronization of the slow (< 1 Hz) cortical oscillation. *J Neurophysiol* 73:20-38.
- Amzica F, Steriade M (1997) The K-complex: its slow (<1-Hz) rhythmicity & relation to delta waves. *Neurology* 49:952-959.
- Amzica F, Neckelmann D (1999) Membrane capacitance of cortical neurons & glia during sleep oscillations & spike-wave seizures. *J Neurophysiol* 82:2731-2746.
- Amzica F, Steriade M (2000) Neuronal & glial membrane potentials during sleep & paroxysmal oscillations in the neocortex. *J Neurosci* 20:6648-6665.
- Amzica F, Massimini M, Manfredi A (2002) Spatial buffering during slow & paroxysmal sleep oscillations in cortical networks of glial cells in vivo. *J Neurosci* 22:1042-1053.
- Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, & concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118:273-274.

- Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.
- Bailey CH, Giustetto M, Huang YY, Hawkins RD, Kandel ER (2000) Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity & memory? *Nat Rev Neurosci* 1:11-20.
- Bal T, McCormick DA (1996) What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 17:297-308.
- Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ (1998a) Computational models of thalamocortical augmenting responses. *J Neurosci* 18:6444-6465.
- Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ (1998b) Cellular & network models for intrathalamic augmenting responses during 10-Hz stimulation. *J Neurophysiol* 79:2730-2748.
- Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ (1999) Self-sustained rhythmic activity in the thalamic reticular nucleus mediated by depolarizing GABAA receptor potentials. *Nat Neurosci* 2:168-174.
- Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski T (2000) Spiking-bursting activity in the thalamic reticular nucleus initiates sequences of spindle oscillations in thalamic networks. *J Neurophysiol* 84:1076-1087.
- Berger H (1930) Ueber das Elektroencephalogramm des Menschen. *J Psychol Neurol* 40:160-179.
- Berger RJ, Phillips NH (1995) Energy conservation & sleep. *Behav Brain Res* 69:65-73.
- Berger T, Luscher HR (2003) Timing & precision of spike initiation in layer V pyramidal cells of the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 13:274-281.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis & remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387-394.
- Bezzi P, Domercq M, Vesce S, Volterra A (2001) Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological & neuropathological implications. *Prog Brain Res* 132:255-265.

- Blitzer RD, Wong T, Nouranifar R, Iyengar R, Landau EM (1995) Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:1403-1414.
- Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y (1998) Visual input evokes transient & strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393:369-373.
- Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Collingridge GL (1999) Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP & LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 9:299-304.
- Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I, Buzsaki G (1999) High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus* 9:137-142.
- Braun AP, Schulman H (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57:417-445.
- Buzsaki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31:551-570.
- Buzsaki G (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex* 6:81-92.
- Buzsaki G (2001) Hippocampal GABAergic interneurons: a physiological perspective. *Neurochem Res* 26:899-905.
- Buzsaki G, Penttonen M, Nadasdy Z, Bragin A (1996) Pattern & inhibition-dependent invasion of pyramidal cell dendrites by fast spikes in the hippocampus in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9921-9925.
- Buzsaki G, Csicsvari J, Dragoi G, Harris K, Henze D, Hirase H (2002) Homeostatic maintenance of neuronal excitability by burst discharges in vivo. *Cereb Cortex* 12:893-899.
- Castro-Alamancos MA (1996) The augmenting response, a form of short-term plasticity in the neocortex that is modulated by behavioral state. *Mol Psychiatry* 1:424-426.
- Castro-Alamancos MA, Connors BW (1996a) Cellular mechanisms of the augmenting response: short-term plasticity in a thalamocortical pathway. *J Neurosci* 16:7742-7756.
- Castro-Alamancos MA, Connors BW (1996b) Short-term plasticity of a thalamocortical pathway dynamically modulated by behavioral state. *Science* 272:274-277.

- Castro-Alamancos MA, Donoghue JP, Connors BW (1995) Different forms of synaptic plasticity in somatosensory & motor areas of the neocortex. *J Neurosci* 15:5324-5333.
- Caton R (1887) Researches on electrical phenomena of cerebral grey matter. In: 9th Int. Congr. Med., p 246.
- Chase MH, Roth T (1990) Slow Wave Sleep: Its measurement & functional significance. In: *Slow Wave Sleep: Its measurement & functional significance* (Chase MH, Roth T, eds). Santa Monica, California: Brain research Institute.
- Chrobak JJ, Buzsaki G (1998) Operational dynamics in the hippocampal-entorhinal axis. *Neurosci Biobehav Rev* 22:303-310.
- Colbert CM (2001) Back-propagating action potentials in pyramidal neurons: a putative signaling mechanism for the induction of Hebbian synaptic plasticity. *Restor Neurol Neurosci* 19:199-211.
- Connors BW, Prince DA (1982) Effects of local anesthetic QX-314 on the membrane properties of hippocampal pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 220:476-481.
- Contreras D, Steriade M (1995) Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *J Neurosci* 15:604-622.
- Contreras D, Timofeev I, Steriade M (1996a) Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. *J Physiol* 494 (Pt 1):251-264.
- Contreras D, Destexhe A, Steriade M (1997a) Intracellular & computational characterization of the intracortical inhibitory control of synchronized thalamic inputs in vivo. *J Neurophysiol* 78:335-350.
- Contreras D, Destexhe A, Sejnowski TJ, Steriade M (1996b) Control of spatiotemporal coherence of a thalamic oscillation by corticothalamic feedback. *Science* 274:771-774.
- Contreras D, Destexhe A, Sejnowski TJ, Steriade M (1997b) Spatiotemporal patterns of spindle oscillations in cortex & thalamus. *J Neurosci* 17:1179-1196.

- Corbett D (1990) Ketamine blocks the plasticity associated with prefrontal cortex self-stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 37:685-688.
- Crick F, Mitchison G (1983) The function of dream sleep. *Nature* 304:111-114.
- Crochet S (2001) Mecanismes Monoaminergiques mesopontiques dans la genese de l'evail et du sommeil paradoxal chez le chat. In: *Neurosciences*, p 208. Lyon: Claude Bernard Lyon I.
- Csicsvari J, Hirase H, Mamiya A, Buzsaki G (2000) Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28:585-594.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Mamiya A, Buzsaki G (1999) Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat. *J Neurosci* 19:RC20.
- Davies SN, Alford ST, Coan EJ, Lester RA, Collingridge GL (1988) Ketamine blocks an NMDA receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus in a voltage-dependent manner. *Neurosci Lett* 92:213-217.
- Davis H, Davis PA, Loomis AL (1937) Changes in human brain potentials during the onset of sleep. *Science* 86:448-450.
- Davis H, Davis PA, Loomis AL (1938) Human brain potentials during the onset of sleep. *J Neurophysiol* 1:24-38.
- De Gennaro L, Ferrara M, Bertini M (2001) The boundary between wakefulness & sleep: quantitative electroencephalographic changes during the sleep onset period. *Neuroscience* 107:1-11.
- De Koninck P, Schulman H (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279:227-230.
- DeFelipe J, Jones EG (1985) Vertical organization of gamma-aminobutyric acid-accumulating intrinsic neuronal systems in monkey cerebral cortex. *J Neurosci* 5:3246-3260.
- DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological & chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.

- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D (1985) Variability in the terminations of GABAergic chandelier cell axons on initial segments of pyramidal cell axons in the monkey sensory-motor cortex. *J Comp Neurol* 231:364-384.
- Dement W, Kleitman N (1957a) Cyclic variations in EEG during sleep & their relation to eye movements, body motility, & dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 9:673-690.
- Dement W, Kleitman N (1957b) The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol* 53:339-346.
- Destexhe A, Rudolph M, Pare D (2003) The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat Rev Neurosci* 4:739-751.
- Easwaran E (1987) *The Upanishads*. Tomales, California: Nelgiri Press.
- Ebbinghaus H (1885) *Über das Gedächtnis. Untersuchungen zur Experimentellen Psychologie*. In. Leipzig.
- Edelman G, Tononi G (2000) *A universe of Consciousness*: Perseus Books Group.
- Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, & silent synapses. *J Neurobiol* 41:92-101.
- Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ (1997) Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci* 20:170-177.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.
- Galarreta M, Hestrin S (2001) Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2:425-433.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms & cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Gray CM, McCormick DA (1996) Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science* 274:109-113.

- Grenier F, Timofeev I, Steriade M (2001) Focal synchronization of ripples (80-200 Hz) in neocortex & their neuronal correlates. *J Neurophysiol* 86:1884-1898.
- Grenier F, Timofeev I, Steriade M (2003) Neocortical very fast oscillations (ripples, 80-200 Hz) during seizures: intracellular correlates. *J Neurophysiol* 89:841-852.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons & synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.
- Harvey EN, Loomis AL, Hobart GA (1937) Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. *Science* 85:443-444.
- Higley MJ, Contreras D (2003) Nonlinear integration of sensory responses in the rat barrel cortex: an intracellular study in vivo. *J Neurosci* 23:10190-10200.
- Hobson JA (1989) *Sleep*. New York: Scientific American Library.
- Hobson JA, Pace-Schott EF (2002) The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness & learning. *Nat Rev Neurosci* 3:679-693.
- Hobson JA, Pace-Schott EF, Stickgold R (2000) Dreaming & the brain: toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behav Brain Sci* 23:793-842; discussion 904-1121.
- Hobson JA, Pace-Schott, E.F. & Stickgold, R. (2000a) Dreaming & the Brain: Toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behavioral & Brain Sciences* 23:793-843.
- Hobson JA, Pace-Schott, E.F., & Stickgold, R. (2000b) Dream science 2000: A response to commentaries on Dreaming & the Brain. *Behavioral & Brain Sciences* 23:1019-1034.
- Hudmon A, Schulman H (2002) Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure & autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 71:473-510.
- Hughes SW, Cope DW, Blethyn KL, Crunelli V (2002) Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron* 33:947-958.
- Huguenard JR (1996) Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58:329-348.

- Inoue S, Honda K, Komoda Y (1995) Sleep as neuronal detoxification & restitution. *Behav Brain Res* 69:91-96.
- Jones EG (1985) *The thalamus*. New York: Plenum.
- Jones EG (2002a) Thalamic circuitry & thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1659-1673.
- Jones EG (2002b) Thalamic organization & function after Cajal. *Prog Brain Res* 136:333-357.
- Jouvet M, Michel F, Courjon J (1959) [On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep]. *C R Seances Soc Biol Fil* 153:1024-1028.
- Kandel A, Buzsaki G (1997) Cellular-synaptic generation of sleep spindles, spike-and-wave discharges, & evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J Neurosci* 17:6783-6797.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes & synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Karni A, Tanne D, Rubenstein BS, Askenasy JJ, Sagi D (1994) Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. *Science* 265:679-682.
- Kavanau JL (1997) Memory, sleep & the evolution of mechanisms of synaptic efficacy maintenance. *Neuroscience* 79:7-44.
- Kim U, McCormick DA (1998) The functional influence of burst & tonic firing mode on synaptic interactions in the thalamus. *J Neurosci* 18:9500-9516.
- Kim U, Bal T, McCormick DA (1995) Spindle waves are propagating synchronized oscillations in the ferret LGNd in vitro. *J Neurophysiol* 74:1301-1323.
- Kirkwood A, Rozas C, Kirkwood J, Perez F, Bear MF (1999) Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine & norepinephrine. *J Neurosci* 19:1599-1609.
- Kleitman N (1939) *Sleep & Wakefulness*. Chicago: University of Chicago Press.
- Kryger MH, Roth T, Dement WC (1994) *Principles & Practice of Sleep Medicine*, Second Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Kuhn TS (1971) *La estructura de las revoluciones científicas*: FCE.

- Lakatos I (1984) *Historia de la Ciencia y sus Reconstrucciones Racionales*. Madrid, España: Ed. Tecnos.
- Lakatos I (1999) *For & against method : including Lakatos's lectures on scientific method & the Lakatos-Feyerabend correspondence / Imre Lakatos & Paul Feyerabend ; edited & with an introduction by Matteo Motterlini*. Chicago: University of Chicago Press.
- Lakatos I, Cohen RS, Feyerabend PK, Wartofsky MW (1976) *Essays in memory of Imre Lakatos*. Dordrecht ; Boston: D. Reidel Pub. Co.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW (2002) Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 22:1002-1009.
- Legendre R, Pieron H (1910) Le probleme de facteurs de sommeil. Resultats d'injections vasculaires et intracerebrales de liquides insomniques. *C R Soc Biol* 68:1077-1079.
- Llinás RR, Paré D (1991) Of dreaming & wakefulness. *Neuroscience* 44:521-535.
- Llinás RR, Paré D. (1995) Conscious & pre-conscious processes as seen from the standpoint of sleep-waking cycle neurophysiology. *Neuropsychologia* 33:1155-1168.
- Llinás RR, Ribary, U. (1993) Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. *PNAS* 90:2078-2081.
- Louie K, Wilson MA (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29:145-156.
- MacNish R (1834) *The Philosophy of Sleep*. New York: D. Appleton & Company.
- Magee JC (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1:181-190.
- Magee JC, Cook EP (2000) Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 3:895-903.
- Maquet P (2001) The role of sleep in learning & memory. *Science* 294:1048-1052.
- Maquet P, Smith, C. & Stickgold, R. (2003) *Sleep & Brain Plasticity*: Oxford University Press.

- Massimini M, Amzica F (2001) Extracellular calcium fluctuations & intracellular potentials in the cortex during the slow sleep oscillation. *J Neurophysiol* 85:1346-1350.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23.
- McCaffery B, Cho K, Bortolotto ZA, Aggleton JP, Brown MW, Conquet F, Collingridge GL, Bashir ZI (1999) Synaptic depression induced by pharmacological activation of metabotropic glutamate receptors in the perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* 93:977-984.
- McCormick DA, Pape HC (1990a) Properties of a hyperpolarization-activated cation current & its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431:291-318.
- McCormick DA, Pape HC (1990b) Noradrenergic & serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431:319-342.
- McCormick DA, Bal T (1997) Sleep & arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185-215.
- McGinty D, Szymusiak R (1990) Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms & functions of slow-wave sleep. *Trends Neurosci* 13:480-487.
- Moruzzi G, Magoun H (1949) Brain stem reticular formation & activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-473.
- Niedermeyer E, Lopes da Silva F (1987) *Electroencephalography. Basic Principles, Clinical Applications & Related Fields, Second Edition.* Baltimore, Maryland: Urban & Schwarzenberg.
- Nielsen TA (2000) A review of mentation in REM & NREM sleep: "Covert" REM sleep as a possible reconciliation of two opposing models. *Behav Brain Sci* 23:851-866.
- Nunez A, Amzica F, Steriade M (1993) Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties & synaptic responses. *J Neurophysiol* 70:418-430.

- Orser BA, Pennefather PS, MacDonald JF (1997) Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesthesiology* 86:903-917.
- Otani S, Daniel H, Roisin MP, Crepel F (2003) Dopaminergic modulation of long-term synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Cereb Cortex* 13:1251-1256.
- Pace-Schott EF, Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology & subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3:591-605.
- Pare D, Steriade M, Deschênes M, Oakson G (1987) Physiological characteristics of anterior thalamic nuclei, a group devoid of inputs from reticular thalamic nucleus. *J Neurophysiol* 57:1669-1685.
- Pavlides C, Winson J (1989) Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *J Neurosci* 9:2907-2918.
- Peigneux P, Laureys S, Delbeuck X, Maquet P (2001) Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. *Neuroreport* 12:A111-124.
- Penrose R (1989) *The Emperor's New Mind*. Oxford, U.K: Oxford Press.
- Popper K (1962) *La lógica de la investigación científica*. Madrid: Editorial Tecnos.
- Popper K (1979) *Objective knowledge : an evolutionary approach*: Oxford : Clarendon Press
New York : Oxford University Press.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Rechtschaffen A (1998) Current perspectives on the function of sleep. *Perspect Biol Med* 41:359-390.
- Reyes A (2001) Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* 24:653-675.
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65:453-480.
- Roderick HL, Berridge MJ, Bootman MD (2003) Calcium-induced calcium release. *Curr Biol* 13:R425.

- Rodriguez E, George N, Lachaux JP, Martinerie J, Renault B, Varela FJ (1999) Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature* 397:430-433.
- Roffwarg HP, Muzio, J.N., & Dement, W.C. (1966) Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science* 152:604-618.
- Sanchez-Vives MV, Bal T, McCormick DA (1997) Inhibitory interactions between perigeniculate GABAergic neurons. *J Neurosci* 17:8894-8908.
- Schwindt PC, Spain WJ, Foehring RC, Chubb MC, Crill WE (1988a) Slow conductances in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro & their role in slow excitability changes. *J Neurophysiol* 59:450-467.
- Schwindt PC, Spain WJ, Foehring RC, Stafstrom CE, Chubb MC, Crill WE (1988b) Multiple potassium conductances & their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J Neurophysiol* 59:424-449.
- Searle JR (1999) The future of philosophy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:2069-2080.
- Searle JR (2000) Consciousness. *Annu Rev Neurosci* 23:557-578.
- Sejnowski TJ, Destexhe A (2000) Why do we sleep? *Brain Res* 886:208-223.
- Siegel JM (2001) The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 294:1058-1063.
- Silberberg G, Gupta A, Markram H (2002) Stereotypy in neocortical microcircuits. *Trends Neurosci* 25:227-230.
- Soderling TR (2000) CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10:375-380.
- Solms M (2000) Dreaming & REM sleep are controlled by different brain mechanisms. *Behav Brain Sci* 23:843-850; discussion 904-1121.
- Steriade M (2000) Corticothalamic resonance, states of vigilance & mentation. *Neuroscience* 101:243-276.
- Steriade M (2001) Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* 86:1-39.

- Steriade M (2003a) *Neuronal Substrates of Sleep & Epilepsy*.: Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Steriade M (2003b) *Neuronal Substrates of Sleep & Epilepsy*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993a) Thalamocortical oscillations in the sleeping & aroused brain. *Science* 262:679-685.
- Steriade M, Nunez A, Amzica F (1993b) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing & hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13:3252-3265.
- Steriade M, Timofeev I, Grenier F (2001) Natural waking & sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* 85:1969-1985.
- Steriade M, Domich L, Oakson G, Deschênes M (1987) The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J Neurophysiol* 57:260-273.
- Steriade M, Contreras D, Curro Dossi R, Nunez A (1993c) The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic & thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic & neocortical networks. *J Neurosci* 13:3284-3299.
- Steriade M, Timofeev I, Durmuller N, Grenier F (1998a) Dynamic properties of corticothalamic neurons & local cortical interneurons generating fast rhythmic (30-40 Hz) spike bursts. *J Neurophysiol* 79:483-490.
- Steriade M, Timofeev I, Grenier F, Durmuller N (1998b) Role of thalamic & cortical neurons in augmenting responses & self-sustained activity: dual intracellular recordings in vivo. *J Neurosci* 18:6425-6443.
- Steriade M, Jones, M.G., & McCormick, D.A. (1997) *Thalamus*. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd.
- Stickgold R (2001) Toward a cognitive neuroscience of sleep. *Sleep Med Rev* 5:417-421.
- Stickgold R, Hobson JA, Fosse R, Fosse M (2001) Sleep, learning, & dreams: off-line memory reprocessing. *Science* 294:1052-1057.

- Thomson AM (1988) Inhibitory postsynaptic potentials evoked in thalamic neurons by stimulation of the reticularis nucleus evoke slow spikes in isolated rat brain slices--I. *Neuroscience* 25:491-502.
- Thomson AM (2000) Facilitation, augmentation & potentiation at central synapses. *Trends Neurosci* 23:305-312.
- Thomson AM, Destexhe A (1999) Dual intracellular recordings & computational models of slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical & hippocampal slices. *Neuroscience* 92:1193-1215.
- Thomson AM, West DC, Deuchars J (1995) Properties of single axon excitatory postsynaptic potentials elicited in spiny interneurons by action potentials in pyramidal neurons in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 69:727-738.
- Timofeev I, Steriade M (1996) Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex & decorticated cats. *J Neurophysiol* 76:4152-4168.
- Timofeev I, Steriade M (1998) Cellular mechanisms underlying intrathalamic augmenting responses of reticular & relay neurons. *J Neurophysiol* 79:2716-2729.
- Timofeev I, Contreras D, Steriade M (1996) Synaptic responsiveness of cortical & thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat. *J Physiol* 494 (Pt 1):265-278.
- Timofeev I, Grenier F, Bazhenov M, Houweling AR, Sejnowski TJ, Steriade M (2002) Short- & medium-term plasticity associated with augmenting responses in cortical slabs & spindles in intact cortex of cats in vivo. *J Physiol* 542:583-598.
- Timofeev I, Bazhenov M., Sejnowski, T.J. & Steriade, M. (2001) Contribution of intrinsic & synaptic factors in the desynchronization of thalamic oscillatory activity. *Thalamus & Related Systems* 3:1-17.
- Ulrich D, Huguenard JR (1997a) GABA(A)-receptor-mediated rebound burst firing & burst shunting in thalamus. *J Neurophysiol* 78:1748-1751.
- Ulrich D, Huguenard JR (1997b) Nucleus-specific chloride homeostasis in rat thalamus. *J Neurosci* 17:2348-2354.

- Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: phase synchronization & large-scale integration. *Nat Rev Neurosci* 2:229-239.
- Vertes RPE, K.E. (2000) The case against memory consolidation in REM sleep. *Behav Brain Sci* 23:868-876.
- von Krosigk M, Bal T, McCormick DA (1993) Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science* 261:361-364.
- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H (2002) Anatomical, physiological, molecular & circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 12:395-410.
- Wilson JR, Friedlander MJ, Sherman SM (1984) Fine structural morphology of identified X- & Y-cells in the cat's lateral geniculate nucleus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 221:411-436.
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (1998) GABAA receptor-mediated currents in interneurons & pyramidal cells of rat visual cortex. *J Physiol* 506 (Pt 3):715-730.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (2002) Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer v of rat visual cortex. *J Neurophysiol* 88:740-750.
- Ylinen A, Bragin A, Nadasdy Z, Jando G, Szabo I, Sik A, Buzsaki G (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network & intracellular mechanisms. *J Neurosci* 15:30-46.
- Yuste R, Tank DW (1996) Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* 16:701-716.
- Zucker RS (1999) Calcium- & activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9:305-313.