



**TRABAJO DE TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS
AUDITIVAS DEL COLICULO INFERIOR Y EL PATRÓN
ELECTROENCEFALOGRÁFICO**

Matías Lorenzo Cavelli Gonçalves

Tutor de Tesis: Dr. Pablo Daniel Torterolo Minetti

*Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

.Publicada en: *Biblioteca, Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

2012

1

Dedicatoria

Este trabajo se lo quiero dedicar primero que nada a toda mi familia inclusive a aquellos que ya no están pero que siempre supieron estar y van a estar de alguna forma presentes por el resto de mi vida. Son ellos, mi familia, los que hicieron posible que hoy yo este donde estoy, en el mejor lugar donde puedo estar y con las mejores personas que puedo estar. A los amigos, los que están, los que se van, los que no importa que no estén porque de alguna forma sabes que están ahí.

Y por último a vos Natalia, mi novia, mi compañera, mi amiga, mi confidente... ¡mi familia!

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer al Dr. Pablo Torterolo por aceptar ser mi tutor de tesis de grado, por enseñarme un mundo nuevo, misterioso y fascinante. Un mundo en el cual decido ser participe, un mundo donde nunca se me negó el conocimiento y un mundo donde quiero seguir estando. Agradecer al Dr. Atilio Falconi por todo lo que me enseñó y me enseña, por todas las molestias que se toma para conmigo. A la Dra. Patricia Lagos por toda la experiencia que aporta y siempre tener la mano extendida cuando algún problema se presenta. A todos los compañeros del laboratorio que nunca me negaron el apoyo cuando lo necesité: Luciana Benedetto, Santiago Castro, Guillermo Cabrera, Claudia Pascovich, Andrea Devera, Alicia Costa, Natalia Schwarzkopf y Horacio Igarzabal. Y por último al Dr. Felipe Sierra y al Dr. Juan Carlos Valle Lisboa que aceptaron muy cordialmente ser los integrantes del tribunal para la corrección de este trabajo.

Tabla de contenidos

Resumen.....	pág. 6
Introducción.....	pág. 7
Objetivo general y específico.....	pág. 9
Objetivo general.....	pág. 9
Objetivo específico.....	pág. 10
Material y métodos.....	pág. 10
Preparación de los animales.....	pág. 10
Sistema de estimulación auditiva.....	pág. 11
Sistema de registro.....	pág. 11
Procesamiento de datos.....	pág. 13
Análisis estadístico.....	pág. 14
Análisis histológico.....	pág. 14
Resultados.....	pág. 15
Caracterización de las Neuronas del NCCI.....	pág. 15
Respuesta frente al estado del ECoG.....	pág. 22
Discusión.....	pág. 28
Propiedades de la respuesta de las neuronas del NCCI.....	pág. 28
Propiedades de la respuesta frente al estado del ECoG.....	pág. 29
Bibliografía.....	pag.30

Resumen

El sistema nervioso tiene la capacidad de procesar el pasaje de la información sensorial que se dirige hacia los centros jerárquicos de procesamiento en función del estado comportamental de los individuos.

Existen tres grandes estados comportamentales en los mamíferos: la vigilia, el sueño no REM o de ondas lentas y el sueño REM. Estos estados se clasifican mediante el estudio simultáneo de la actividad eléctrica cerebral (EEG), la actividad eléctrica muscular (EMG) y los movimientos oculares (MO). A esta forma de registro se la denomina polisomnografía. Durante las transiciones de estados como el pasaje de la vigilia al sueño o el despertar se observan importantes cambios en la actividad eléctrica cerebral. Junto a estos cambios se constatan eventos importantes en la actividad unitaria de múltiples neuronas distribuidas por todo el sistema nervioso central (SNC). Particularmente las neuronas de núcleos sensoriales pueden cambiar su respuesta a un mismo estímulo externo dependiendo del estado comportamental en que se encuentre el individuo.

El colículo inferior es uno de los principales núcleos auditivos donde converge la mayor parte de la información auditiva antes de llegar al tálamo y la corteza. Las neuronas del núcleo central del colículo inferior (NCCI) modifican su respuesta a un mismo estímulo en función del estado comportamental, así como la estimulación de este núcleo también es capaz de modificar el estado del EEG.

En este trabajo se registraron en simultaneo la actividad eléctrica cortical (ECoG) junto al registro extracelular de neuronas del NCCI en cobayos anestesiados con uretano, un anestésico capaz de generar ciclos de sincronización y desincronización del ECoG similares a los ciclos normales del sueño natural.

La mayoría de las neuronas registradas modifican su actividad espontánea y provocada por sonidos al cambiar la actividad del ECoG. Las neuronas que se activaron durante la estimulación sonora contralateral, mostraron preferentemente un aumento de la frecuencia de descarga espontánea y provocada por sonido durante la desincronización del ECoG. Las neuronas que se inhibían frente a la misma estimulación sonora, mostraron el efecto contrario; es decir, disminuyó su actividad durante la desincronización del ECoG.

En conclusión, el despertar electroencefalográfico (bajo anestesia con uretano), modifica la actividad de las neuronas de este núcleo; observándose un aumento o disminución de la actividad de cada neurona dependiendo de cómo sea su respuesta normal al estímulo sonoro contralateral.

Introducción

Durante la vigilia los individuos mantienen una interacción fluida con el medio ambiente, esto se caracteriza en los seres humanos por la conciencia de los estímulos externos e internos [40]. Durante este estado comportamental, en los mamíferos se observa un electroencefalograma (EEG) desincronizado (con actividad eléctrica de alta frecuencia y baja amplitud), actividad somato-motriz y activación del sistema nervioso simpático; a su vez, la vigilia activa se acompaña por ondas theta (4-9 Hz) en el hipocampo [45]. Experimentos seminales de Moruzzi y Magoun (1949) demostraron que la estimulación eléctrica de la formación reticular del tronco cerebral induce desincronización del EEG y despertar comportamental [23]. A partir de entonces, la formación reticular fue ampliamente considerada como la principal área responsable de la activación del EEG. Más recientemente, se reconoció que la formación reticular del tronco cerebral no juega un papel exclusivo en la activación del EEG; de hecho, el prosencéfalo basal y el hipotálamo postero-lateral se consideran parte de los sistemas activadores [40]. Además, la estimulación eléctrica o química de regiones como la amígdala o colículo superior también son eficaces en la supresión de sueño lento, así como de las oscilaciones de gran amplitud del EEG, induciendo su activación (desincronización) en animales anestesiados [12; 13].

Los estímulos auditivos funcionan como guías para el comportamiento y son de prioritaria importancia en situaciones tales como la huída o la lucha, así como aquellos que requieren la atención focalizada, la discriminación de los estímulos ambientales, etc. En el ejercicio de estas funciones, el sistema auditivo funciona para asignar prioridades a ciertos sonidos y combinaciones de sonidos.

El colículo inferior (CI) es el sitio clave de la convergencia de numerosas vías paralelas y en serie del sistema auditivo [44]. En general se acepta que existen tres subdivisiones en el colículo inferior: el núcleo central (NCCI), núcleo o corteza externa (ECI), y el núcleo o corteza dorsal (DCI) [26]. El CI está involucrado en el procesamiento de la intensidad, duración y frecuencia del sonido, así como la localización de la fuente de sonido en el espacio [7; 20; 17; 28; 33]. Además, hay numerosos ejemplos que muestran que las neuronas del CI se especializan en el procesamiento de los llamados co-específicos o los sonidos de las especies relacionadas

(responden al patrón tonal complejo). Por ejemplo, las neuronas del torus semicircularis, homólogo al CI de la rana, responden diferencialmente a las llamadas de apareamiento co-específicas [19]. Por otra parte, el CI del cobayo y murciélagos responden a la vocalización especie-específica [35; 31; 30]. Además de las funciones auditivas, el CI ejerce un control tónico sobre la expresión de respuestas defensivas; la estimulación eléctrica o química de este núcleo genera respuestas típicas de miedo como la alerta, congelamiento y huida [2; 1]. En consecuencia, en animales previamente entrenados para que apaguen la estimulación eléctrica aversiva del CI, las microinyecciones intra-coliculares de muscimol (agonista GABA-A), incrementa la latencia y disminuye la frecuencia de apagado de dicho estímulo aversivo [21]. Por otra parte, la microinyección de agonistas de los receptores NMDA en esta región produce una reacción de lucha que se caracteriza por corridas y saltos [8]. Para generar estas conductas defensivas el CI debe aumentar los niveles de excitación. De hecho, la estimulación eléctrica o química (glutamato) del CI puede provocar la activación del EEG en ratas anestesiadas con uretano [11; 14]. Por otra parte, en ratas, la liberación de óxido nítrico en el CI se ha implicado en la activación electrocortical evocada por un estímulo acústico [24].

Las neuronas del CI son principalmente neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y nitrérgicas [15; 22; 25; 27; 43]. Sin embargo, otros neurotransmisores como glicina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina y neuropéptidos hipotalámicos también están involucrados en la neurotransmisión a este nivel [18].

La corteza auditiva modula la actividad y respuesta al sonido de las neuronas coliculares [40]. El estado comportamental del animal modifica intensamente la actividad espontánea y la respuesta al sonido de las neuronas del CI [39]. Aunque existen cambios menores en la actividad neuronal al pasar de vigilia a sueño lento, es durante el sueño REM cuando la actividad cambia radicalmente en casi todas las neuronas registradas; la respuesta al sonido se enmascara por un aumento de la descarga espontánea (con disminución de la relación señal/ruido. Señal: respuesta al estímulo auditivo; Ruido: actividad espontánea neuronal). La existencia de este fenómeno hizo postular que el CI es la principal área de control auditiva durante el sueño REM [39], ya que no se han descrito cambios importantes a niveles inferiores de la vía (revisado por Velluti R.A., 1997. [42]). Esta disminución de la relación señal-ruido se mantiene a nivel talámico [16].

Con base en estos antecedentes, en este laboratorio se ha explorado la hipótesis que el CI tiene la capacidad intrínseca de modular la vigilia. Con el fin de explorar dicha hipótesis se

utilizaron dos aproximaciones experimentales. Por una parte, se utilizaron cobayos anestesiados con uretano. Este preparado se caracteriza en presentar diferentes patrones del EEG con características fisiológicas; es decir, períodos con un EEG sincronizado (similar al sueño No REM) y desincronizado (similar al sueño REM o a la vigilia). Se utiliza esta preparación para estimular eléctrica y químicamente el CI y estudiar la respuesta del EEG, el hipocampo y la respuesta autónoma (de forma indirecta a través de la frecuencia cardíaca) de los animales. Estos resultados mostraron que la estimulación eléctrica y química del CI genera desincronización cortical, aumento de la frecuencia cardíaca y aumento del ritmo theta hipocámpico [4; 5]. Por otra parte, se utilizaron cobayos implantados de manera crónica para el estudio polisomnográfico y así analizar si la inhibición del CI (mediante microinyecciones con muscimol) modifica el tiempo de vigilia. Estos resultados arrojaron que la inhibición química del CI disminuye el tiempo de vigilia a expensas de un aumento del tiempo que el animal permanece en sueño lento [4; 6]. Los resultados obtenidos de estos experimentos sugieren fuertemente que el CI regula el estado de vigilia [6].

Orientados por los resultados obtenidos por nuestro laboratorio fue que se decidió explorar la actividad unitaria de las neuronas del CI del cobayo durante los diferentes estados de sincronización y desincronización electrocortical, bajo anestesia con uretano, dado que este anestésico imita desde el punto de vista electroencefalográfico, el sueño natural [10]. En otras palabras, se procuró analizar cómo estos estados electroencefalográficos modifican el procesamiento de información auditiva a nivel del CI.

Objetivo general y específicos

Objetivo general

Conocer los mecanismos involucrados en la generación y mantenimiento de la vigilia y el sueño en mamíferos.

Objetivo específico

Investigar la relación existente entre los estados de sincronización y desincronización del ECoG (Electrocorticograma) y la actividad tanto espontánea como provocada por estímulos sonoros de las neuronas auditivas del CI del cobayo.

Material y métodos

Se utilizaron cobayos adultos de aproximadamente 500 g de peso (N= 15). Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina (URBE), en donde se mantienen en un ciclo luz- oscuridad de 12-12 horas con comida y agua ad libitum. Todos los estudios realizados en animales fueron conducidos de acuerdo a normas éticas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, (protocolo experimental N° 071140-001119-06), y conforme a las directivas de "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; 8va edición, National Academy Press, Washington D.C., 2010". Se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el número de animales y se tomaron las medidas adecuadas para minimizarles dolor, molestia o estrés.

Preparación de los animales

Los cobayos fueron anestesiados con uretano (1-1.5 g/Kg, i.p.) y posteriormente fueron fijados a un aparato estereotáctico [32] (por detalles de estos procedimientos, ver [35; 36; 37; 38; 40]). Se monitorizó continuamente el electrocardiograma, temperatura rectal y saturación de oxígeno. La cirugía consistió en una incisión sagital del cuero cabelludo hasta exponer el cráneo. Se realizaron trepanaciones de 1 mm de diámetro en los sitios del cráneo por donde se descendieron los electrodos para registros de ECoG en las cortezas y en la corteza del hipocampo.

Se realizó una trepanación bilateral en el cráneo de 3 mm de diámetro en el lugar de descenso del electrodo de registro (CI; A 0-2, L 1.5-2.5, H 2.5-6). Posteriormente se abordó el oído medio a través de la escama del temporal, donde se fijaron con acrílico dental tubos de polietileno de 4 mm de diámetro interno, donde se colocaron los parlantes para formar el circuito cerrado de estimulación sonora.

Sistema de estimulación auditiva

Los estímulos sonoros utilizados fueron “clicks” (respuesta de un parlante a un pulso rectangular de voltaje de 100 μ s. de duración) utilizados como estímulo de búsqueda de unidades y para registrar potenciales evocados; también se utilizaron “pips” (tono puro ahusado, 100 ms, 5 ms de tiempo de subida y bajada) y ruido blanco (RB) (tono compuesto de todas las frecuencias, de 100ms) para estimular el espectro de frecuencias en la vía auditiva. Estos sonidos se obtuvieron mediante generadores de ondas y audio amplificadores (TDT) y se emitieron por parlantes (Beyer DT 48) conectados a los tubos implantados en el oído medio. La intensidad de sonido emitida por el sistema de estimulación fue previamente calibrada con un decibelímetro (Radio Shack)

La intensidad y frecuencia del sonido aplicada fue adaptada para cada respuesta neuronal (vide infra). La frecuencia de presentación del estímulo fue de 1 a 2 estímulos por segundo. Los estímulos se aplicaron de forma mono o binauricular. Una caja atenuadora de sonido cubrió el sitio de registro.

Sistema de registro

Para el registro extracelular de unidades, se utilizaron micropipetas de vidrio rellenas de acetato de Na 2M con Chicago Sky-blue 2% (5 a 20 M Ω). Se desciende el electrodo en sentido dorso-ventral utilizando un micromanipulador hidráulico. Este se conecta al preamplificador mediante un alambre de plata clorurada. Un macroelectrodo indiferente de plata clorurada se colocó subcutáneo.

La señal se amplificó (X1000) y filtró (100–10000 Hz) con un preamplificador (Dagan 2400). La señal fue digitalizada (16666 Hz) y visualizada en PC utilizando el programa Spike2 versión 6.07 (Cambridge Electronic Design, Cam. U.K).

Para el registro del ECoG se colocaron electrodos bipolares de “nichrome” sobre cortezas ipsilaterales, ambos electrodos. La señal se amplifico (X 1000) y filtro (0.1-500 Hz) con un preamplificador (AM Sistem 1800). La señal fue digitalizada (1024 Hz) y visualizada en PC, en simultaneo al registro extracelular de la actividad neuronal (vide supra).

El estado del electrocorticograma, sincronizado (baja frecuencia y alta amplitud) y desincronizados (alta frecuencia y baja amplitud) y la potencia espectral de dichos registros se ejemplifican en la **Figura 1**. Tanto la desincronización provocada como la espontánea del ECoG tuvo que tener una duración mayor o igual a 30 segundos para poder tomar ventanas temporales de análisis comparables entre los dos estados electroencefalográficos.

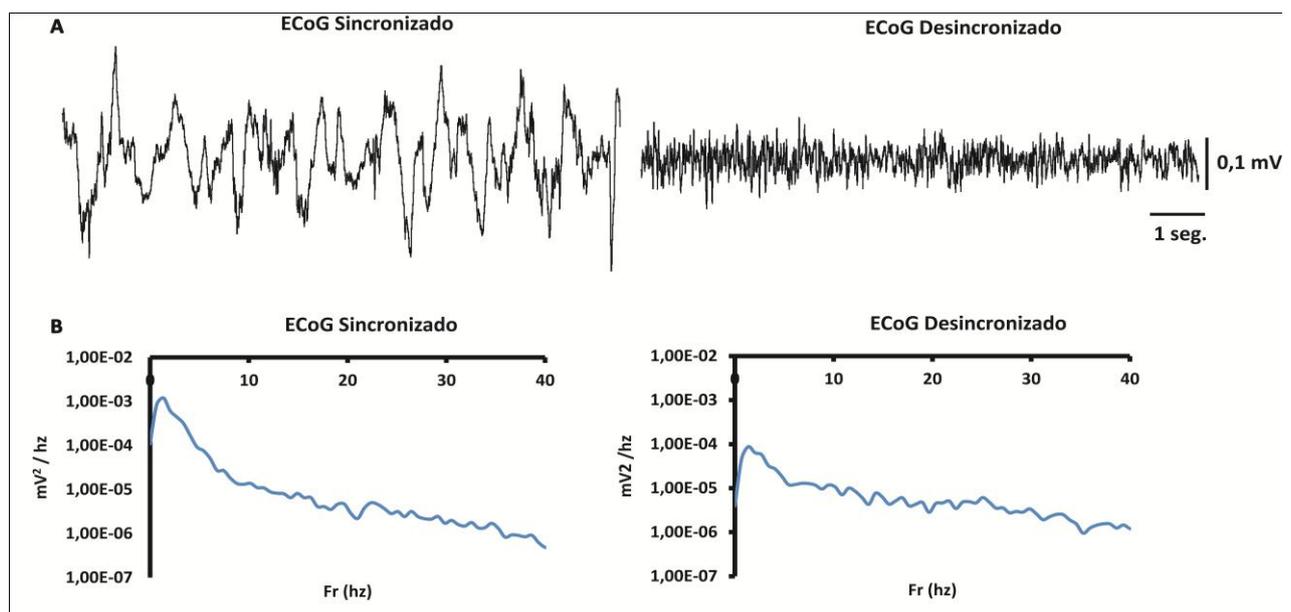


Figura 1: Trazados crudos del ECoG representativos de los dos estados (sincronizado y desincronizado) de cobayos anestesiados con uretano y registrados con electrodos bipolares sobre el hemisferio derecho. **A.** A la izquierda se observa 10 segundos del registro crudo de la actividad eléctrica cortical cuando el ECoG está sincronizado y a la derecha cuando esta desincronizado. Filtrado entre 0,5 y 500 hz. **B.** Gráficos de espectros de frecuencias. Análisis de la potencia espectral hallado a través de la transformada rápida de Fourier en ventanas de 40 segundos para cada estado; sincronizado y desincronizado respectivamente, correspondientes a los mismos registros crudos mostrados en **A.** Resolución de 0,65 hz. Se observa un claro incremento de la potencia espectral sobre la banda delta (0,5 a 4 hz) cuando el ECoG se encuentra sincronizado.

Procesamiento de datos

Los potenciales de acción extracelulares previamente discriminados así como el instante de aplicación del sonido se analizaron como procesos puntuales. Se realizaron distintos procesamientos (vide infra) y en varios intervalos sucesivos de sincronización y desincronización.

Descarga espontánea. Se calculó la frecuencia de descarga espontánea y desvío estándar en ventanas de 30-60s de actividad estable.

Respuesta al sonido. Se analizaron los siguientes parámetros:

1. Umbral de la respuesta neuronal a su frecuencia característica (FC). Esta es definida como la intensidad mínima (dB) a la FC que provoca respuesta al menos en el 50% de los casos. En neuronas con actividad espontánea el umbral es definido como la intensidad mínima que provoca un aumento de la frecuencia de descarga por encima de la frecuencia de descarga espontánea en un 50% de los casos.

2. Tipos monoaurales de respuesta ("On", "Sostenida", "Off", etc.). Estas fueron determinadas para la estimulación contralateral basados en el histograma periéstímulo (PSTH, ancho del "bin", 1 ms) computado a la FC a una intensidad de 10 dB por encima del umbral.

3. Tipos biaurales de respuesta (excitatoria-excitatoria, EE; Excitatoria-inhibitoria, EI, Excitatoria-no respuesta, E0; la primera letra corresponde a la respuesta contralateral. Fue determinada por el PSTH a la FC, a una intensidad de 10 dB por encima del umbral a la FC.

4. Latencia de respuesta. Se determinó por el PSTH a una intensidad de 10 dB por encima del umbral a la FC. Es el tiempo entre el comienzo del estímulo sonoro y la aparición de la respuesta biológica.

5. Frecuencia de descarga provocada. Fue computada del PSTH a la FC, a una intensidad de 10 dB por encima del umbral. Fue expresado como el promedio de frecuencia de descarga durante la respuesta al sonido (ventana de 100 ms desde el comienzo de la respuesta) y sustrayendo la frecuencia de descarga espontánea.

6. Duración de la descarga provocada. Fue computada del PSTH a la FC, a una intensidad de 10 dB por encima del umbral a la FC. Se determinó el tiempo de duración de la respuesta.

Análisis estadístico

Los precedentes son un pool de análisis estándar en la electrofisiología del CI que permitió identificar y clasificar qué tipo de neurona se registró (definida funcionalmente). Nuestro principal objetivo fue observar que cambios presenta la frecuencia y patrón de descarga espontánea y provocada por sonidos de las neuronas del CI frente a los estados espontáneos así como los provocados de sincronización y desincronización del ECoG. Para esto se contrastaron las respuestas antes y después de los eventos de desincronización cortical bajo el test estadístico de Mann Withney [39; 36], la hipótesis nula se rechazó con un $P < 0.05$. Otros análisis estadísticos realizados se detallan en los Resultados.

Análisis histológico

Chicago Sky-Blue fue utilizado para identificar el final de un trayecto exitoso en la cual se registraron varias unidades; a posteriori nos aseguramos que las neuronas registradas en cada tanda de registro se encontraban en la zona centro-ventral del CI donde se localiza el NCCI. El Chicago Sky- Blue fue inyectado con una corriente DC, catódica de 10 μ A por 20 minutos.

Los animales se perfundieron luego de la eutanasia (pentobarbital 50 mg/kg, i.p.) con 500 ml de solución salina heparinizada seguido por 1 litro de una solución de 4% paraformaldehído. Se removió el encéfalo y fue inmerso en una solución de post-fijación por 48 horas que consiste en 4% paraformaldehído. Cortes coronales fueron realizados en el vibrátomo Campden UK. (50-100 μ m). Las secciones procesadas fueron analizadas empleando un microscopio óptico Olympus BH2 para localizar la marca dejada por el Chicago Sky-Blue (ver **Figura 2**).

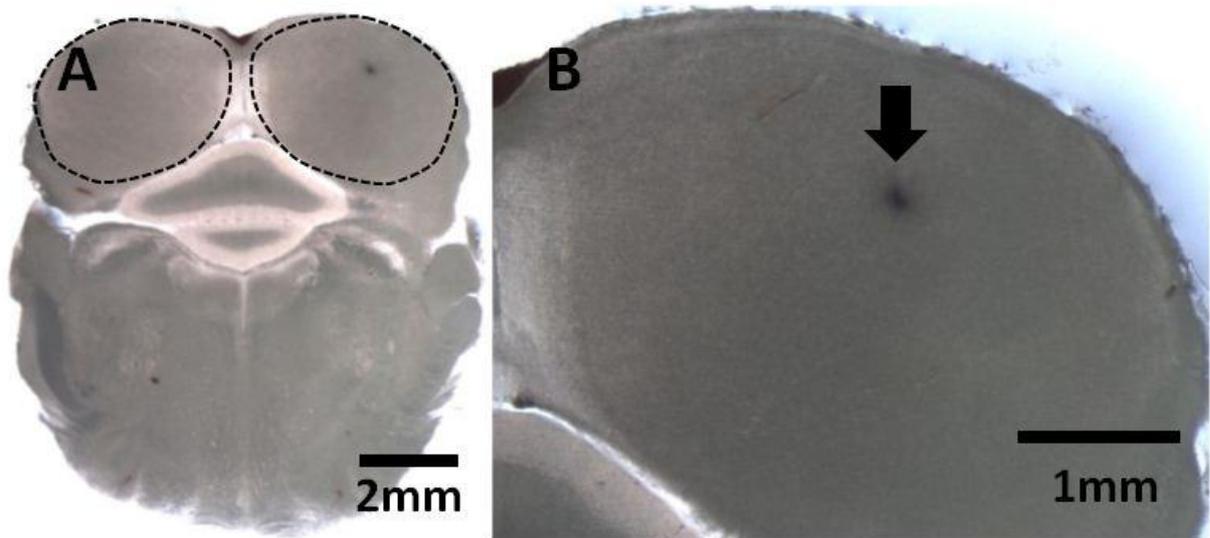


Figura 2: A. Corte coronal del mesencéfalo o cerebro medio de cobayo donde se pueden apreciar en el sector dorsal los dos colículos inferiores como estructuras esféricas, indicados por las líneas punteadas. B. A mayor aumento el CI derecho, se puede observar la marca dejada por la inyección iontoforética del Chicago Sky-Blue, flecha negra, con coordenadas: Anterior (A) a Bregma 0,8mm, lateral (L) 2mm y una profundidad (P) de 3900 μm . Las neuronas N^o: 28, 29, 30 y 31 fueron registradas en este CI con coordenadas: A=0mm, L=2mm y profundidades de 4110, 4650, 5000 y 5150 μm respectivamente.

Resultados

Caracterización de las Neuronas del NCCI

Se lograron caracterizar un total de 50 neuronas dentro del NCCI. La posición de las neuronas se identificó por la reconstrucción del registro luego de la inyección de Chicago Sky-Blue. Una foto representativa de la posición final del electrodo de registro que fue marcada por la inyección del colorante, se muestra en la **Figura 2**.

Cuarenta y ocho de las 50 neuronas registradas reaccionaron con un aumento en su frecuencia de descarga frente a la estimulación sonora con “pips” contralaterales a la FC, las restantes 2 neuronas reaccionaron con una inhibición frente al estímulo sonoro. La inhibición se observa como una disminución significativa en la frecuencia de descarga frente a dicho estímulo.

De las 48 que respondieron de forma excitatoria durante la estimulación sonora contralateral 12 de ellas también lo hicieron frente a la estimulación sonora ipsilateral con un aumento de descarga (Tipo: E-E) y 2 con una inhibición (E-I), mientras que las restantes 34 no mostraron respuesta (E-O). Algunas de estas neuronas mostraron diferencias significativas frente a la estimulación sonora simultánea de los dos oídos, facilitando o inhibiendo la respuesta biaural (E-Of y E-Oi). De las neuronas de tipo Inhibida una mostró también una inhibición a la estimulación ipsilateral (I-I) mientras que la otra no respondió (I-O). En la **Figura 3** se ejemplifican como son los cambios en la respuesta relacionados a la estimulación biaural. Para detalles sobre resultados de cada neurona ver **Tabla 1**.

El tipo de respuesta al “pip” contralateral se clasificó a través del PSTH (de las siglas en inglés “Post-Stimulus Time Histogram”) de cada neurona durante un período de actividad constante de entre 30 y 60 segundos. Los diferentes tipos de respuestas se ejemplifican en la **Figura 4** y los resultados de cada neurona se pueden ver en la **Tabla 1**. Del total de las neuronas del NCCI, la frecuencia de descarga espontánea promedio fue de $4,359 \pm 8,945$ espigas/s (media \pm desvío est.). Sin embargo, el 30% no presentó descarga espontánea, solo respondiendo frente a la estimulación sonora. Un 52% mostró una frecuencia de descarga espontánea promedio de entre 0,1 y 10 espigas por segundo y el restante 18% una actividad espontánea mayor a 10 espigas por segundo. En cuanto a la latencia de respuesta al estímulo (pip contralateral), la latencia promedio fue de $23,4 \pm 21,2$ ms (media \pm desvío est.), la latencia mínima fue de 9,8 ms para la neurona N° 14 mientras que la máxima fue de 117 ms para la neurona N° 16 (**Tabla 1**). La caracterización de las neuronas se realizó cuando el ECoG se encontraba sincronizado dado que es el estado más estable y de mayor duración durante el registro.

Como era esperable encontramos una correlación positiva entre la FC de las neuronas del NCCI y la profundidad en el eje dorso-ventral a la que fueron registradas. Se observa que las neuronas con FC más alta se encuentran localizadas preferentemente en zonas más ventrales del colículo y las FC más bajas en zonas más dorsales (**Figura 5**.)

Neurona Nº:	FC (hz):	UFC Ate (dB Absolutos):	Profundidad (µm):	Respuesta Biaural:	Respuesta al Pip Contralateral:	Latencia (ms):	Fr de Respuesta (espigas/s):	Fr de Inhibición post respuesta. (espigas/s):	Fr espontánea (espigas/s):
1*	1340	71,4	3950	E-0	Sostenida	44	24	0	0
2*	1968	57,12	4100	E-0	On	23	33,5	0	0
3*	1402	83,64	4000	E-0	Sostenida	28	63,72	0,1	0,1
4	1602	69,36	3750	E-0_f	On	30	30	0	0
5	4600	70,7	4500	E-0_i	Pausada	15	30,55	0,1	0,65
6	4600	71,71	4500	E-0	On	19	17,9	0,1	0,1
7*	4935	38,38	5730	E-0	Sostenida	22	51,85	0	0,15
8*	9090	60,42	5440	E-0	On+Sosteni.	10	48,61	2	8,5
9*	3555	44,44	4200	E-E	On+Sosteni.	13	42,5	5,5	12
10*	8233	64,89	5580	E-0	On	13,5	34,92	0	0,08
11*	9880	61,48	5600	E-0	Pausada	10	19,1	6,77	6,9
12	1150	64,26	4000	E-E_l	On+Sosteni.	20	32,55	0	0,95
13	7450	51,5	5400	E-0_l	sostenida	12,5	33	1,33	18
14	10500	63,6	6320	E-E	sostenida	9,8	14,3	1,16	1,2
15*	8320	56,65	5500	E-0	On+soste.	13	21,75	8,5	6,75
16	305	52,25	3990	E-0	off	117	23	0	0
17	320	45,6	4040	E-0_F	sostenida	93	11	0	0
18*	1330	56,1	5300	I-I	Inhibida	13	-4,5	55	57
19	1400	64,26	4040	E-E	Pausada	18,5	147	0	0
20	1444	71,4	4200	E-E	Pausada	20	50	0	0
21	1422	63,24	4750	E-0	sostenida	12	16	8	13
22	8267	72,1	5010	E-0	Sostenida	11	16,3	10	14,7
23	10200	53	5800	E-0	On+Soste	10	66,65	1	2,35
24	340	56,05	4090	E-0	Soste+Off	39	23	1,32	2
25	2020	59,16	5050	E-0	Sostenida	40	5,85	1,5	1
26	1300	69,36	4800	E-0	Sostenida	21	10,15	0,1	0,1
27	1110	79,56	4400	E-0_l	Pausada	17	45	0	0
28	810	69,36	4110	E-I	On+Soste	15	49,83	7	4,17
29	1500	86,7	4650	E-0	On+Soste	12	56,5	3,6	11,5
30	1600	71,4	5000	E-0_f	Pausada	12,5	14,99	8,5	1,67
31	1760	77,52	5150	E-0_i	Sostenida	10	42	8,66	11
32	16700	52,17	5820	E-0	On+Sost	23	22	0	0
33	19200	54,98	5960	E-0_i	On	16	54	0	0
34*	1900	54,06	5100	E-0	On	15	38,1	0,8	1,9
35*	1980	76,5	3500	E-E	Sostenida	19	13,84	0,93	1,36
36	2130	72,42	4000	E-E_i	Sostenida	20	57,18	2,8	2,98
37*	10700	68,9	5620	E-E_f	On+Sost	12,5	21,19	0,33	0,14
38	6300	4200	4200	E-E_f	Off	70	22,5	0	0
39*	15500	56,6	6110	E-0	Pausada	10	35	0	0
40*	2250	56,1	4000	E-E	On+sost	17	22,6	0	0
41*			4500	I-O	Inhibida	67	-6,1	6,8	6,7
42*	7000	48,41	4650	E-E	On+Sost	23	19,84	0	0
43*	6150	44,29	5000	E-I	On+Sost	12	11,3	4,9	5,9
44*	1490	62,22	5050	E-0	Sostenida	19,5	28,5	1,3	1,5
45*	1885	73,44	5150	E-0	On+Sost	34	45	14	14
46*	1915	79,56	5300	E-0	On+Sost	11	43	2	3
47*	2200	76,5	4150	E-0	On	17	42,8	0	0
48*	2221	71,4	4500	E-0	On- Sost	15	13,93	1,6	1,4
49	7244	61,8	5200	E-0	On- Sost	13	32,2	1,33	3
50*	10000	60,5	6700	E-E	Pausada	13	13,13	1,5	2,2

Tabla 1: Caracterización electrofisiológica de las neuronas del NCCI. La tabla muestra las 50 neuronas registradas dentro de este núcleo, la frecuencia característica (FC) de cada neurona, el umbral en dB a la que la neurona responde un 50% de las veces que es estimulada, la profundidad a la que fueron registradas, como varía su respuesta con la estimulación biaural, la forma en la que responde a la estimulación contralateral, el tiempo que demora en aparecer la respuesta al “pip” contralateral, el promedio de la Fr de respuesta, Fr de inhibición y la Fr espontánea de descarga respectivamente. (*) Son las neuronas que presentaron eventos de desincronización del EEG durante el registro.

PSTH: Ejemplos de tipos de respuesta biauricular

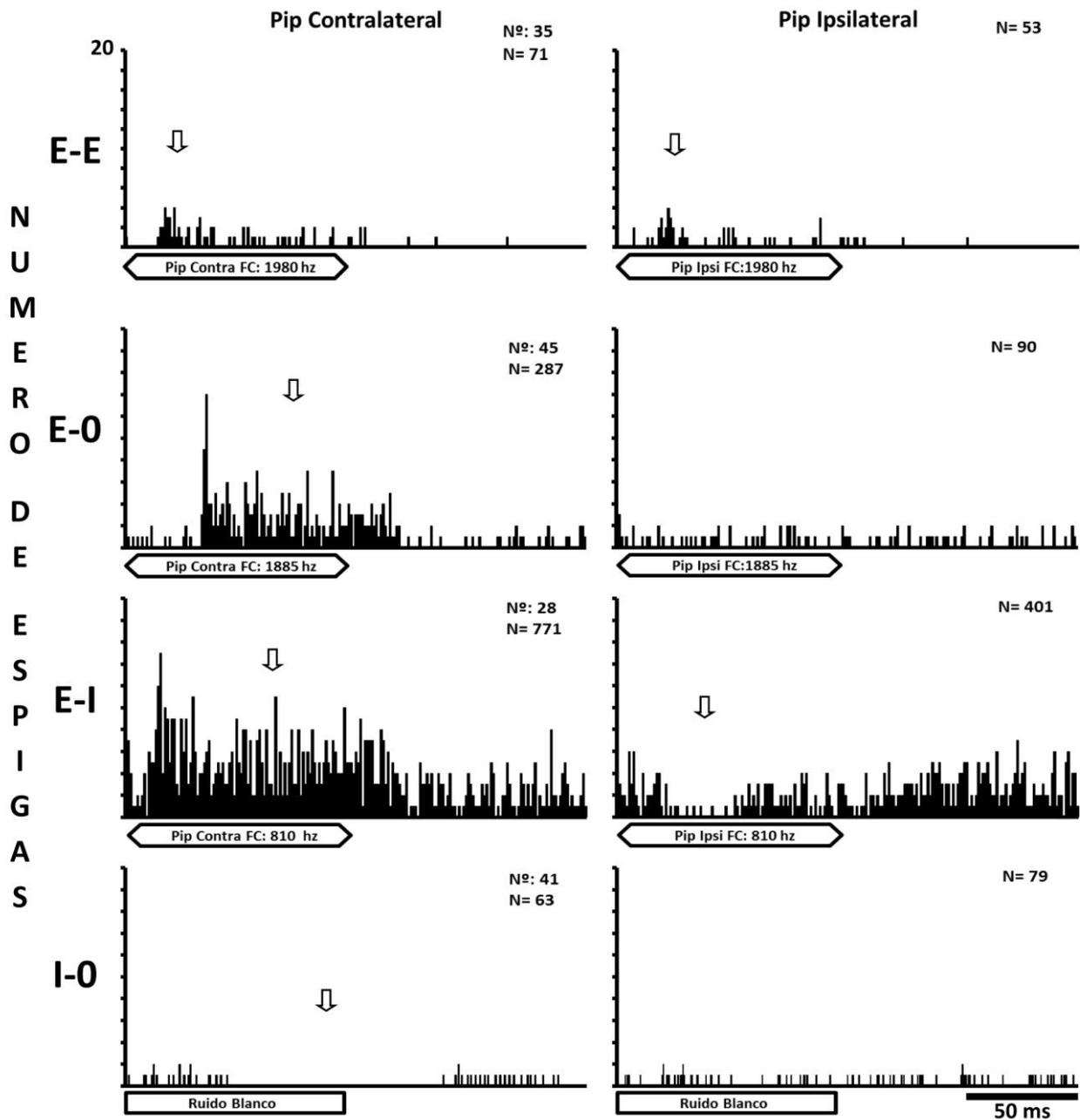


Figura 3: Clasificación de las neuronas del núcleo central del Colículo Inferior frente a la estimulación contralateral e ipsilateral. A la izquierda se encuentran las respuestas normales de cuatro neuronas distintas frente a la estimulación contralateral a la FC 10 dB por encima del umbral de respuesta. A la derecha se ve la respuesta frente a la estimulación ipsilateral a la FC y la misma intensidad de estímulo en dB de las mismas neuronas del NCCI. La neurona Nº: 41 solo fue estimulado mediante ruido blanco (RB) sobre ambos oídos, dado que no se encontró una respuesta clara al “pip”. Se observa el claro cambio en la respuesta de estas neuronas al mantener el estímulo pero cambiando la vía de estimulación auditiva. N= Numero de espigas en el PSTH. Las flechas muestran donde se observa la respuesta a la estimulación sonora en el PSTH.

PSTH: Ejemplos típicos de patrones de respuesta

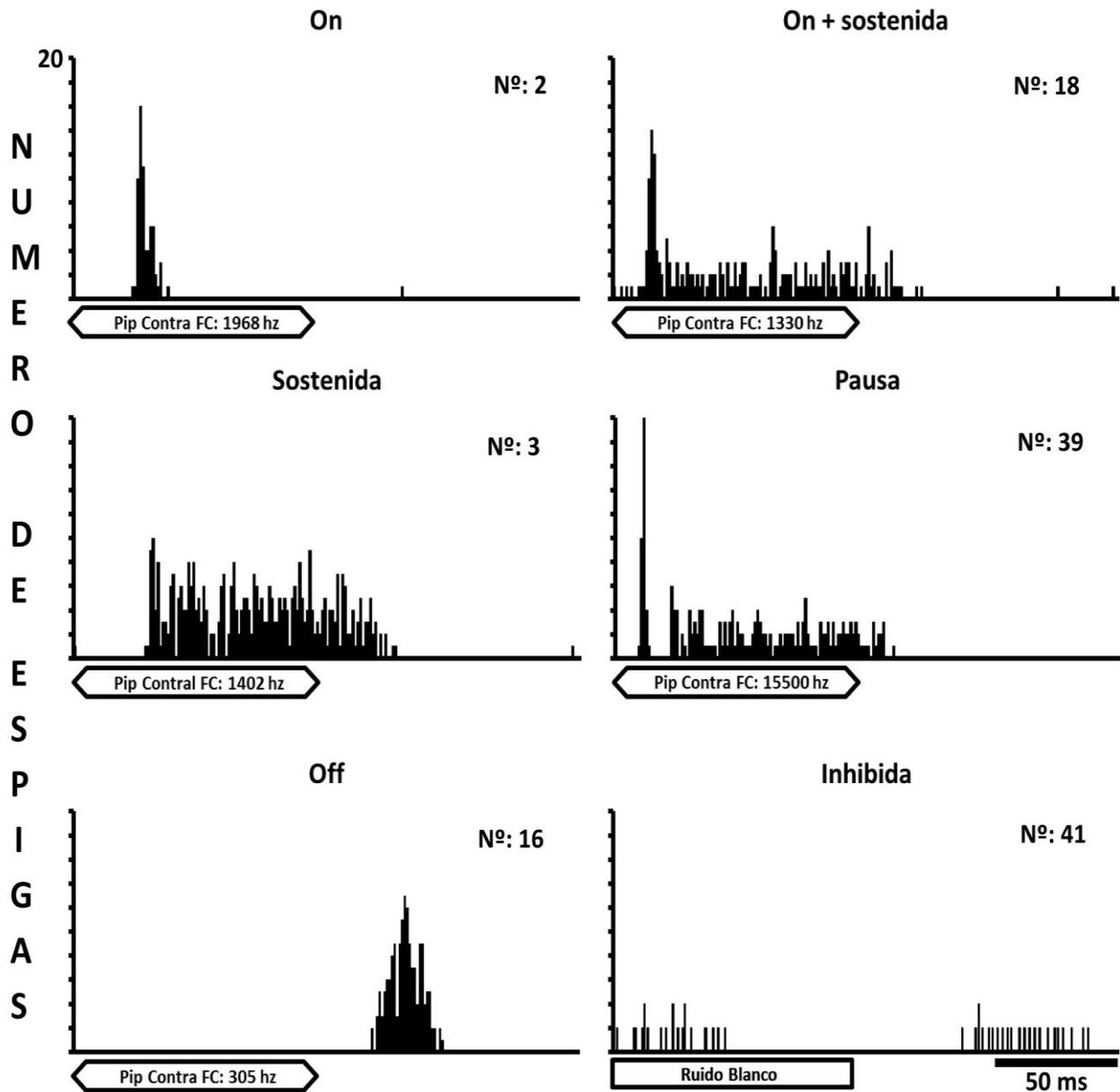


Figura 5: Histogramas post-estímulo (PSTH) típicos presentes en neuronas del CI. Todos fueron obtenidos a partir de estimulación sonora contralateral 10 dB por encima del umbral de respuesta a la FC, menos la neurona de tipo inhibida que solo fue estimulada con ruido blanco dado que no presentó una respuesta clara al “pip” contralateral. Por detalles de estas neuronas ver **Tabla 1**.

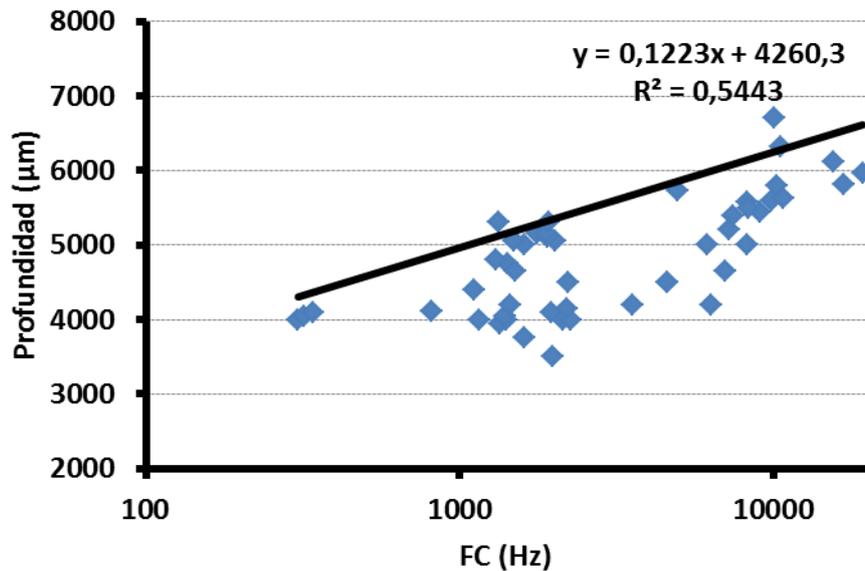


Figura 5: Profundidad en función de la frecuencia característica de las neuronas del NCCI. Se observa una correlación positiva entre las variables con $R^2 = 0,5407$. Ecuación de la recta: $Y=0,1219x + 0,5407$ y una significancia estadística por el test de Pearson de $p= 1,77 \times 10^{-09}$

Se encontraron diferencias significativas entre los umbrales de respuesta de las neuronas del CI cuando son estimuladas con su frecuencia característica que cuando son estimuladas con un ruido blanco compuesto de todas las frecuencias, generado con el fin de estimular todo el espectro de frecuencias existentes en la vía auditiva. Como se muestra en la **Figura 6**, estas neuronas presentan umbrales más bajos cuando son estimuladas a su FC. De estos estudios también se desprende que el rango de mayor sensibilidad de estas neuronas (el grupo de neuronas con menor umbral) del NCCI se encuentra cercano a los 2 KHz.

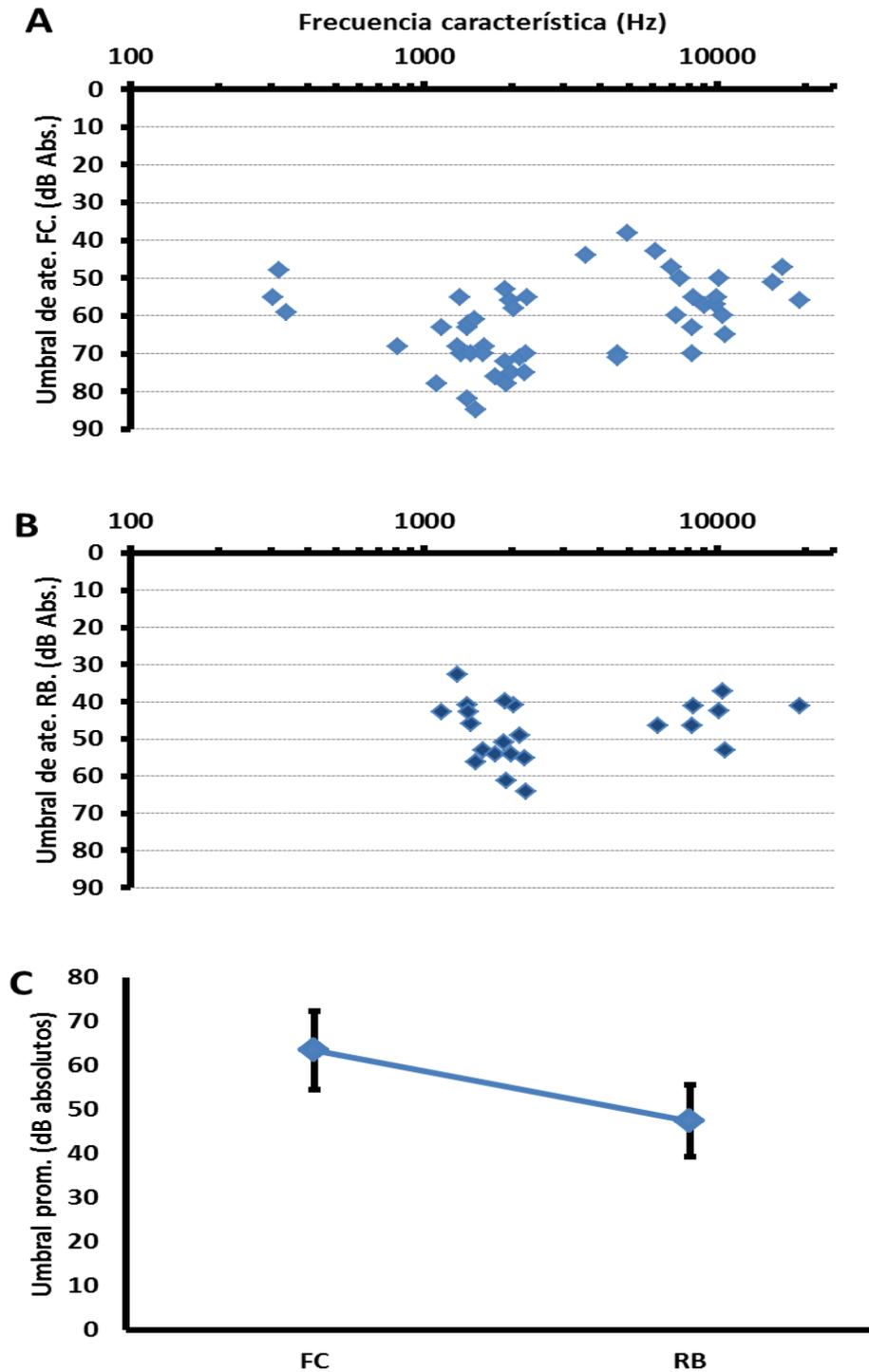


Figura 6: Audiogramas de las neuronas del NCCI. **A.** Umbral de respuesta a la frecuencia característica (FC). **B.** Umbral de respuesta de algunas neuronas del grupo **A** frente a la estimulación con ruido blanco (RB) también contralateral. **C.** A la izquierda el promedio del umbral absoluto de atenuación frente a la estimulación a la FC y a la derecha el umbral promedio bajo estimulación con ruido blanco (RB). Las barras corresponden al desvío estándar y la significancia estadística se halló con el test de rangos Wilcoxon $p=0,0000396$. El umbral se graficó como la atenuación dada a una estimulación máxima de 100 dB.

Respuesta frente al estado del ECoG.

De las 50 neuronas caracterizadas en el NCCI, 24 de estas neuronas mostraron algún evento de desincronización espontánea o provocada por la breve estimulación de los miembros posteriores del animal (“pinch”). A 8 neuronas solo se le registró la actividad durante la desincronización espontánea, otras 5 durante la provocada por el “pinch” y a 11 se lograron registrar durante ambos eventos (**Tabla 2**).

De las 24 neuronas con cambios en el registro del ECoG, 20 mostraron cambios significativos en la frecuencia de descarga en el registro simultáneo de la actividad neuronal en el NCCI, mientras que las restantes 4 no mostraron cambios significativos en su respuesta y actividad espontánea durante los eventos de desincronización del ECoG, si bien el registro crudo puede sugerir cambios en la actividad eléctrica neuronal.

Como se puede observar en la **Figura 7**, hasta los pequeños eventos de desincronización (de aproximadamente 10 segundos) logran cambios en la actividad de algunas neuronas del CI. En este caso se logra observar dos pequeños eventos consecutivos de desincronización del ECoG en concomitancia con el aumento de la frecuencia de descarga de la neurona. El aumento de la frecuencia se observa durante los dos periodos de desincronización y una vez sincronizada la corteza se restituyen los valores anteriores de frecuencia de descarga de la neurona como se puede observar a simple vista en la **Figura 7A**.

Durante la actividad neuronal espontánea (sin estímulo sonoro) también se observan cambios en la frecuencia instantánea de descarga neuronal del CI. En la **Figura 8A y B** se muestran los cambios en la actividad de la neurona N°3 donde se observa un franco aumento de la frecuencia espontánea de esta neurona durante la desincronización también espontánea del ECoG. En este caso y a diferencia de la neurona N°8 el aumento de la actividad aquí se logra observar a simple vista en el registro crudo extracelular como un aumento en el número de espigas. En la parte **B** de la misma figura se puede evidenciar el aumento de los intervalos inter-espiga de corta duración durante el evento de desincronización.

Neurona Nº	Desincronización Espontánea.	Desincronización Por "Pinch"
1	no R.	
2	no R.	
3	Aumenta	
7	Aumenta	Aumenta
8	Aumenta	Aumenta
9	Aumenta	
10	Aumenta	
11	Aumenta	
15	Aumenta	
18	Disminuye	
34	Aumenta	Aumenta
35	Aumenta	Aumenta
37	no R	Aumenta
39	no R	no R
40	no R	no R
41	Disminuye	Disminuye
42	no R	Aumenta
43		Aumenta
44		Aumenta
45	Aumenta	Aumenta
46		Aumenta
47	Aumenta	Aumenta
48		Aumenta
50		Aumenta

Tabla 2: Forma de respuesta a los eventos de desincronización cortical espontánea y provocada por "Pinch". El aumento o disminución de la actividad se validó mediante el test no paramétrico Mann Withney para un $p < 0,05$. no R, no responde. Con y sin estimulación sonora.

La desincronización generada por un estímulo somatosensorial también genera cambios en la actividad de las neuronas del NCCI. En este caso de un total de 16 neuronas registradas durante la desincronización generada por el "pinch", 14 de estas también mostraron cambios

significativos en su respuesta espontánea o provocada por estímulo sonoro de la actividad neuronal. En la **Figura 8C, D y E** se observa un aumento en la actividad tanto espontánea como provocada de esta neurona frente a la desincronización cortical generada por el "pinch" en la pata trasera. Es interesante notar que no solo cambia la frecuencia de descarga de la neurona sino que también parece cambiar la forma de la respuesta al pip contralateral. La neurona N°44 tiene una respuesta de tipo "sostenida" cuando la corteza se encuentra sincronizada (**Figura 8. C. y Tabla 1**), sin embargo al cambiar el patrón electroencefalográfico cambia la forma de la respuesta junto al aumento de la frecuencia de disparo de la neurona. Durante este estado el patrón temporal de descarga es de tipo "On+Sostenida". Este cambio de la forma de respuesta al "pip" contralateral suele durar algunos segundos más luego de la re-sincronización de la corteza en las neuronas que se observa este fenómeno.

Las diferentes respuestas a la desincronización espontánea como provocada se encuentran documentadas en la **Tabla 2**. Estos cambios se grafican en la **Figura 9**. La mayoría de neuronas aumentan su frecuencia de descarga frente a un evento de desincronización electrocortical, algunas no parecen responder, mientras que un grupo bastante menor disminuye su actividad de manera significativa.

Es interesante aclarar que las neuronas que mostraron una disminución en su frecuencia de descarga durante la desincronización del ECoG también son aquellas que mostraron una respuesta de tipo "inhibida" frente a la estimulación sonora contralateral.

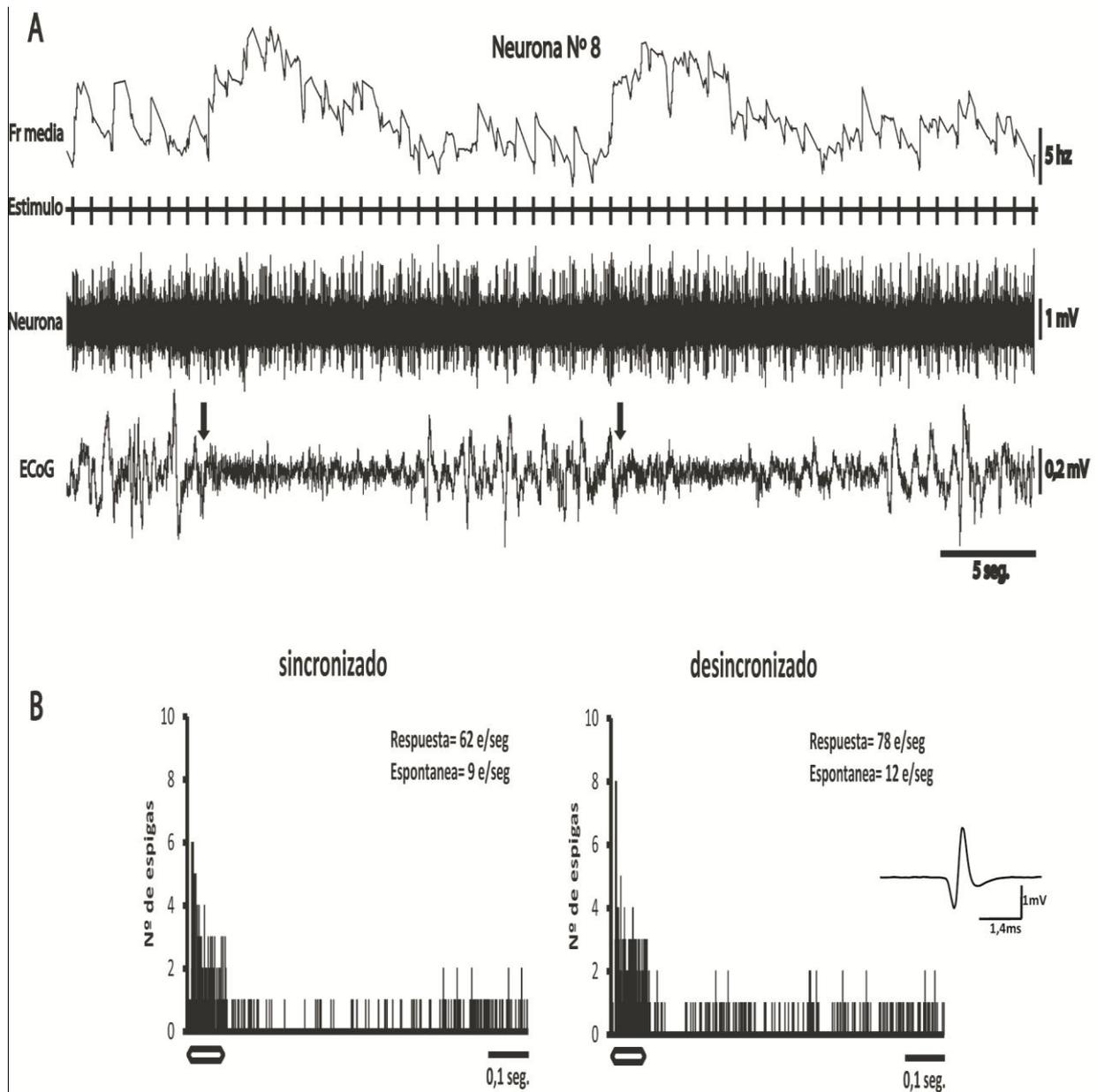


figura 7: Registro simultáneo de la actividad eléctrica neuronal y electroencefalográfica durante los eventos de sincronización y desincronización del ECoG. **A.** De arriba a abajo se muestran: procesamiento de la Fr media (cada 2 seg.) de descarga de la neurona N°8 del NCCI; registro del momento de la presentación del estímulo sonoro (“pip” contralateral a la FC 10 dB por encima del umbral de respuesta); registro crudo de la actividad neuronal; y el ECoG. Las flechas sobre el registro del ECoG muestran el comienzo de los eventos de desincronización cortical donde disminuye la amplitud y aumenta la frecuencia de las ondas componentes del registro. En el registro crudo de la neurona es difícil observar cambios en la actividad neuronal pero cuando vemos la frecuencia media de descarga graficada arriba observamos dos picos de frecuencia máxima durante los eventos de desincronización. **B.** PSTH de dos ventanas temporales distintas a las de **A.**, pero consecutivas, donde se encontró diferencias significativas entre la actividad de la misma neurona durante los distintos estados del ECoG, $p = 0,048$. A la derecha se graficó la forma promedio (123 espigas) de la espiga generada por la neurona N°8.

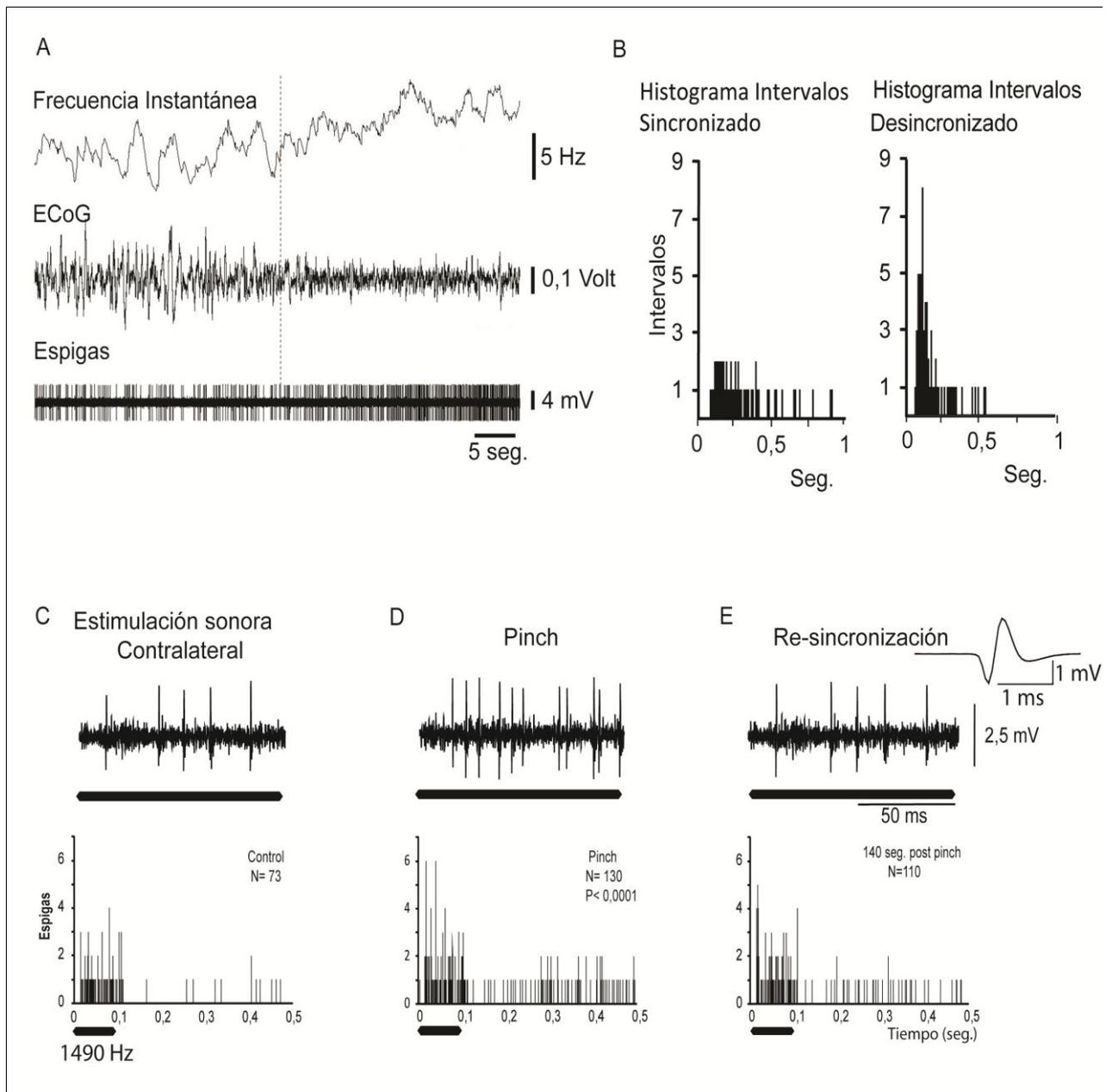


Figura 8. Efectos de la Sincronización-Desincronización sobre las neuronas coliculares. **A.** Registro crudo sin estimulación sonora. Se muestra la frecuencia instantánea de descarga de la neurona N^o3 de NCCI, registro de ECoG y registro extracelular de la descarga de la misma neurona respectivamente. Esta neurona tiene una frecuencia característica (FC) de 1402 Hz responde a “pip” contralaterales, su respuesta biauricular es de tipo E-0 y responde aumentando la descarga instantánea como provocada frente a la desincronización del ECoG. **B.** Histogramas de intervalos de espigas (INTH) del mismo registro con el ECoG sincronizado y desincronizado. **C, E y D.** Corresponden a los Histogramas post-estímulo (PSTH) sonoro y registro crudo (arriba) de la neurona N^o44 (FC: 1490 Hz) cuando el ECoG se encuentra sincronizado y desincronizado mediante un estímulo “pinch” y cuando el ECoG se vuelve a sincronizar respectivamente. A la derecha se muestra el promedio de 98 espigas consecutivas de esta neurona. La significancia estadística fue calculada con el “test” de Mann Withney comparando **D** vs **C** y **D** vs **E**. N número de espigas.

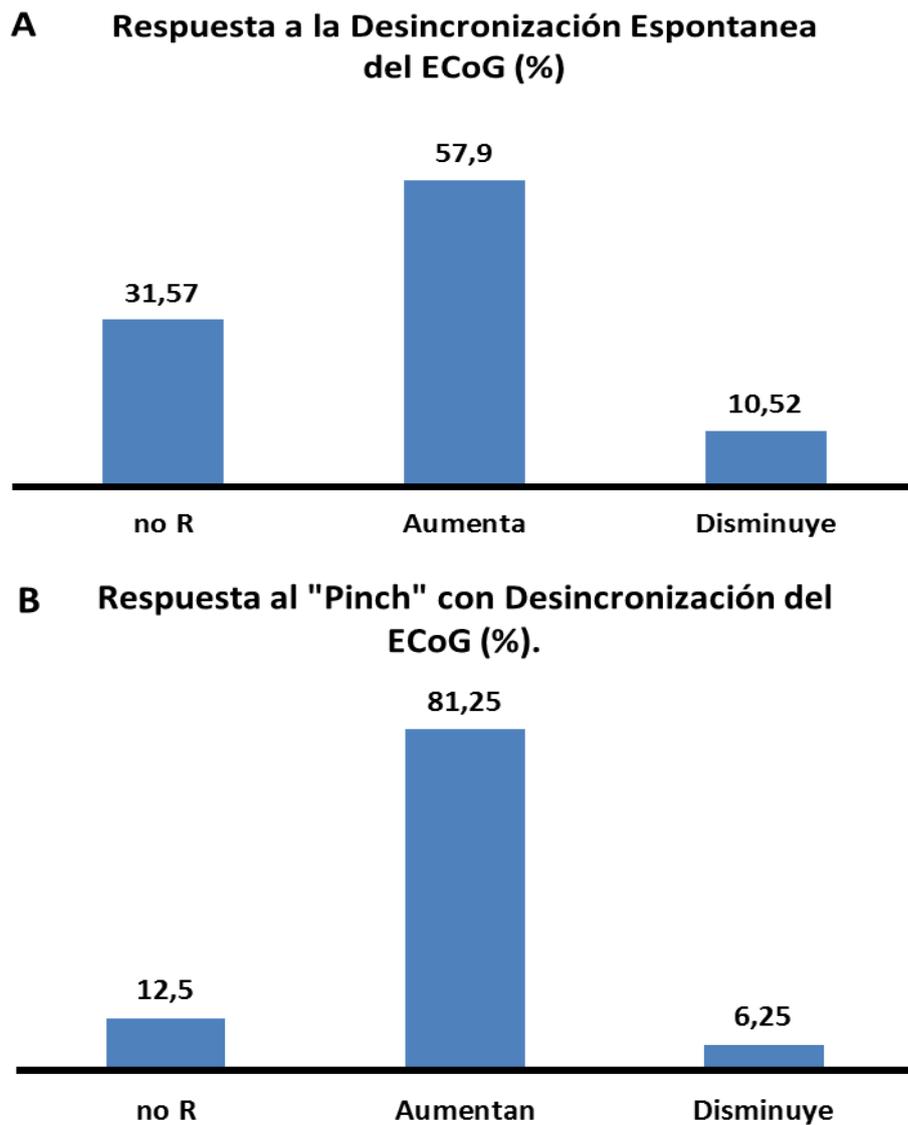


Figura 9: Porcentaje de las neuronas registradas durante eventos de desincronización del ECoG y sus formas de respuesta en relación a la frecuencia de descarga de espigas. Con y sin estimulación sonora. **A.** Respuestas frente a la desincronización espontanea del ECoG. **B.** Respuesta frente a la desincronización provocada por "pinch". La mayoría de las neuronas respondieron con un aumento de la descarga de espigas frente a la desincronización del ECoG para cualquiera de los dos grupos. Entre un 6 y un 10% de las neuronas respondieron con una disminución de la descarga durante la desincronización y entre un 12 y un 31% no mostraron cambios significativos en su descarga. Los cambios tomados como significativos son aquellos con un $p < 0,05$ para el test Mann Withney. No R: no responde.

Discusión

Propiedades de la respuesta de las neuronas del NCCI

Los tipos de respuestas de las neuronas del NCCI frente al estímulo auditivo son los mismos encontrados en trabajos anteriores [29, 38, 34]. Cualitativamente se observan las mismas variantes en la respuesta de estas neuronas, clasificadas normalmente a través del PSTH (**Tabla 1 y Figura 4**) si bien existen diferencias en la cantidad de espigas en su actividad espontánea y provocada durante los diferentes estados del ciclo sueño y vigilia [29, 38] y la actividad normal bajo distintos anestésicos [34].

Está establecido que las neuronas del NCCI están dispuestas en láminas paralelas de iso-frecuencia donde las láminas más ventrales son las que contienen a las neuronas con frecuencia característica más elevada [22, 25, 26]. En este trabajo encontramos una correlación positiva entre la profundidad a la que se registraron las neuronas y la frecuencia característica de estas; las neuronas más profundas en el eje dorso-ventral fueron las de mayor FC. Cabe destacar que el número de neuronas que responden de manera óptima a frecuencias altas fue bastante menor al citado en otros trabajos [34] quizás por el escaso número de unidades registradas o por muestreo diferencial favoreciendo el registro de unidades ubicadas más dorsales, dado que el método de búsqueda utilizado hace que primero localicemos a las de menor FC y recién al atravesar todo el CI se comiencen a registrar neuronas de FC más altas. Esta diferencia también se observa en los audiogramas a la FC (**Figura 4A**) donde el grupo de neuronas con menor umbral se encuentra cercano a los 2Khz, diferente al encontrado en el trabajo de Syka y colaboradores [34], donde el grupo de menor umbral se localiza entre los 15 y 20 KHz.

Encontramos una interesante diferencia entre los umbrales de las mismas neuronas cuando son estimuladas con sonido a su FC que cuando son estimuladas con un ruido blanco (que incluye a la frecuencia característica de la neurona). Pensamos que el aumento en el umbral de respuesta de las neuronas frente al ruido blanco se podría explicar por el fenómeno de inhibición lateral, común en los sistemas sensoriales. La estimulación sonora con un ruido blanco tiene como fin estimular prácticamente toda la vía auditiva y como es sabido la vía auditiva al igual que otros sistemas sensoriales presenta tonotopía, esto podría hacer que cada neurona de la vía auditiva estuviera siendo inhibida por sus neuronas vecinas disminuyendo así la probabilidad de descarga de las neuronas del CI cuando son estimuladas de esta forma (RB).

Propiedades de la respuesta frente al estado del ECoG

Existe un intercambio fluido de información entre los receptores sensoriales y los centros jerárquicos que transfieren, modulan y analizan esa información sensorial. Esa información puede ser manejada por los sistemas sensoriales de distinta manera dependiendo del estado comportamental de los individuos, por ejemplo: si están en sueño lento o durante la vigilia. La fisiología sensorial en su conjunto presenta modificaciones durante las distintas etapas del sueño [42]. Particularmente se ha dejado en claro que las neuronas del NCCI modifican su descarga durante los distintos estados comportamentales y durante la anestesia [38, 41] y que posiblemente el CI sea el principal núcleo que controle el pasaje de la información auditiva hacia niveles jerárquicamente superiores durante el sueño REM.

No solo el estado comportamental modifica la actividad del colículo sino que también los cambios en la actividad del colículo (por estimulación química o eléctrica) pueden desencadenar cambios comportamentales instantáneos en animales crónicos (registros ECoG durante el sueño o la vigilia) o bajo anestesia, así como modificar los ciclos normales de sueño y vigilia [2, 3, 4, 5, 6, 8], lo que hizo postular al CI como núcleo activador [5, 40] dado que la estimulación de este genera despertar electrocortical en animales anestesiados y su inhibición promueve un aumento del tiempo que los animales pasan en sueño de ondas lentas.

En este trabajo demostramos que no solo existen diferencias en la actividad de las neuronas en los diferentes estados comportamentales [36, 39] sino que también durante los cambios electrocorticales observados en animales anestesiados con uretano. Se observaron cambios importantes en la descarga de las neuronas, que mayoritariamente se presentan como un aumento en la actividad espontánea de las neuronas del NCCI. También aumenta la respuesta al estímulo sonoro en algunas de estas neuronas.

El anestésico uretano (a ciertas dosis) es capaz de generar ciclos de sincronización y desincronización del EEG similares en algunos aspectos a los observados durante los ciclos normales de sueño lento y sueño REM [10]. Los anestésicos modifican la actividad normal de las neuronas del CI y existen diferencias inclusive entre los resultados obtenidos para distintos

anestésicos [34]. Si bien para animales anestesiados la actividad neuronal es diferente a los estados comportamentales naturales, en nuestro laboratorio obtuvimos datos preliminares sobre la potencia espectral de las cortezas y la coherencia electrocortical que favorecen a la idea de que el uretano mantiene la actividad del ECoG con características similares al sueño REM, durante la fase de desincronización, y al sueño lento durante la sincronización [9].

Las neuronas del NCCI presentan un aumento de su actividad espontánea durante el pasaje de sueño lento al sueño REM lo que hizo postular que este aumento del “ruido” sobre la “señal”, hace que durante el sueño REM la información sonora que llega al receptor se pierda en el CI, y llegue alterada a niveles superiores de la vía [36, 39]. En los resultados aquí presentados se observan aumentos en la actividad espontánea de las neuronas durante los eventos de desincronización aunque en este caso muchas veces también se observa un aumento de la actividad neuronal provocada por el estímulo sonoro. Como mencionamos anteriormente esta desincronización mantiene las características electroencefalográficas del sueño REM, y la sincronización las del sueño lento [9].

La actividad sensorial es capaz de modular o desencadenar distintos estados comportamentales así como los estados comportamentales son capaces de modular el pasaje y el procesamiento de la información sensorial. Esta estrecha interacción es necesaria para integrar y adecuar las respuestas comportamentales al ambiente externo así como adecuar el ingreso y procesamiento local de información a la fisiología normal del estado comportamental en el cual se encuentre el individuo. Los resultados aquí expuestos avalan esta idea y dejan de manifiesto una estrecha relación no solo entre el estado comportamental y las respuestas de las neuronas del NCCI, sino más específicamente entre la actividad eléctrica de los centros jerárquicos de procesamiento (las cortezas) y la actividad de las neuronas del NCCI.

Bibliografía

- [1] Brandao M.L., Borelli K.G., Nobre M.J., Santos J.M., Albrechet-Souza L., Oliveira A.R. and Martinez R.C., Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum, *Neurosci Biobehav Rev* 29 (2005) 1299-1311.
- [2] Brandao M.L., Tomaz C., Borges P.C., Coimbra N.C. and Bagri A., Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus, *Physiol Behav* 44 (1988) 361-365.
- [3] Cabrera G, Rodriguez Z, Lagos P, Falconi A y Torterolo P Efectos de la inhibición o lesión del colículo inferior sobre la vigilia y el sueño. XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Mayo 2010, Piriápolis, 2010.
- [4] Cabrera G, Vanini G, Torterolo P (2007). Efectos electrográficos y comportamentales de la estimulación e inhibición del colículo inferior. *Actas de Fisiología* 11: 133. [5]
- [5] Cabrera G, Lagos P, Torterolo P ¿Tiene el colículo inferior un rol en el mantenimiento de la vigilia? , Primer Congreso IBRO-LARC de Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica (NeuroLatAm 2008) y del IX Congreso de la SNU, Buzios, Brasil, 2008.
- [6] Cabrera G., Lagos P., Rodriguez Z., Lopez C., Vanini G., Chase M., H., Falconi A. and Torterolo P. (2011), Waking-promoting function of the inferior colliculus, En Preparación.
- [7] Caird D., Processing in the colliculus. In: A.e. al (Ed.), *Neurobiology of Hearing: The central auditory system*, Raven Press, New York, 1991.
- [8] Cardoso S.H, Coimbra N.C. and Brandao M.L., Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus, *Behav Brain Res* 63 (1994) 17-24.
- [9] Cavelli M., Castro S., Igarzábal O., Schwarzkopf N., Gutiérrez M., Falconi A., Lagos P. y Torterolo P., Análisis de la coherencia electroencefalográfica durante la vigilia y el sueño de la rata: Resultados preliminares. Terceras Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Agosto 2011, Montevideo, Uruguay, 2011.
- [10] Clement E.A., Richard A., Thwaites M., Ailon J., Peters S. and Dickson C.T., Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia, *PLoS One* 3 (2008) e2004.
- [11] Dringenberg H.C., Sparling J.S, Frazer J. and Murdoch J., Generalized cortex activation by the auditory midbrain: Mediation by acetylcholine and subcortical relays, *Exp Brain Res* 174 (2006) 114-123.
- [12] Dringenberg H.C. and Vanderwolf C.H., Cholinergic activation of the electrocorticogram: an amygdaloid activating system, *Exp Brain Res* 108 (1996) 285-296.

- [13] Dringenberg H.C., Vanderwolf C.H. and Noseworthy P.A., Superior colliculus stimulation enhances neocortical serotonin release and electrocorticographic activation in the urethane-anesthetized rat, *Brain Res* 964 (2003) 31-41.
- [14] Dringenberg H.C., Yahia N., Cirasuolo J., McKee D. and Kuo M.C., Neocortical activation by electrical and chemical stimulation of the rat inferior colliculus: intra-collicular mapping and neuropharmacological characterization, *Exp Brain Res* 154 (2004) 461-469.
- [15] Druga R. and Syka J., NADPH-diaphorase activity in the central auditory structures of the rat, *Neuroreport* 4 (1993) 999-1002.
- [16] Edeline J.M., Manunta Y. and Hennevin H., Auditory thalamus neurons during sleep: changes in frequency selectivity, threshold, and receptive field size, *J Neurophysiol* 84 (2000) 934-952.
- [17] Ehret G., Schreiner C. E., Spectral and intensity coding in auditory midbrain. In: J.A. Winer, Schreiner, C. E., (Ed.), *The inferior colliculus*, Springer, New York, 2005, pp. 312-345.
- [18] Faingold C.L., Gehlbach, G. and Caspary, D.M., Functional pharmacology of inferior colliculus neurons. In: B. Altschuler., Clopton. and Hoffman (Ed.), *Neurobiology of Hearing: The central auditory system*, Raven Press, New York, 1991.
- [19] Hoke K.L., Burmeister S.S, Fernald R.D., Rand A.S., Ryan M.J. and Wilczynski W., Functional mapping of the auditory midbrain during mate call reception, *J Neurosci* 24 (2004) 11264-11272.
- [20] Malmierca M.S., The structure and physiology of the rat auditory system: an overview, *Int Rev Neurobiol* 56 (2003) 147-211.
- [21] Melo L.L., Cardoso S.H. and Brandao M.L., Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, *Physiol Behav* 51 (1992) 557-562.
- [22] Merchan M., Aguilar L.A., Lopez-Poveda E.A. and Malmierca M.S., The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine, *Neuroscience* 136 (2005) 907-925.
- [23] Moruzzi G. and Magoun H.W., Brain stem reticular formation and activation of the EEG, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1 (1949) 455-473.
- [24] Nistico G., Bagetta, G., Iannone, M., Del Duca, C., Evidence that nitric oxide is involved in the control of electrocortical arousal., *Ann N Y Acad Sci* 738 (1994) 191-200.
- [25] Oliver D.L., Winer, J.A., Beckius, G.E. and Saint Marie, R.L., Morphology of GABAergic neurons in the inferior colliculus of the cat, *J Comp Neurol* 340 (1994) 27-42.

- [26] Oliver D.L., Neuronal organization of the inferior colliculus. In: Springer (Ed.), *The inferior colliculus.*, New York, 2005, pp. 69-115.
- [27] Ottersen O.P. and Storm-Mathisen J., Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique, *J Comp Neurol* 229 (1984) 374-392.
- [28] Palmer A.R., Lagner G., Temporal coding in the auditory midbrain. In: J.A. Winer, Schreiner, C. E. (Ed.), *The inferior colliculus*, Springer, New York, 2005, pp. 377-410.
- [29] Pedemonte M., Torterolo P. and Velluti R.A., In vivo intracellular characteristics of inferior colliculus neurons in guinea pigs, *Brain Res* 759 (1997) 24-31.
- [30] Portfors C.V., Sinex, D. G., Coding of communication sounds in the inferior colliculus. In: J.A. Winer, Schreiner, C. E. (Ed.), *The inferior colliculus.*, Springer, New York, 2005, pp. 411-425.
- [31] Portfors C.V., Combination sensitivity and processing of communication calls in the inferior colliculus of the Moustached Bat *Pteronotus parnellii*, *An Acad Bras Cienc* 76 (2004) 253-257.
- [32] Rapisarda C. and Bacchelli B., The brain of the guinea pig in stereotaxic coordinates, *Arch Sci Biol (Bologna)* 61 (1977) 1-37.
- [33] Rees A., Kuwada S., Temporal coding in auditory midbrain. In: J.A. Winer, Schreiner, C. E. (Ed.), *The inferior colliculus.*, Springer, New York, 2005, pp. 346-376.
- [34] Syka J., í Popelár S., Kvas E.; ák Astl J., Response properties of neurons in the central nucleus and external and dorsal cortices of the inferior colliculus in guinea pig, *Exp Brain Res* (2000) 133:254–266.
- [35] Suta D., Kvasnak E., Popelar J. and Syka J., Representation of species-specific vocalizations in the inferior colliculus of the guinea pig, *J Neurophysiol* 90 (2003) 3794-3808.
- [36] Torterolo P., Morales-Cobas G., Zurita P., Falconi A. and Velluti R.A., Inferior colliculus unit firing is different during sleep and wakefulness than under barbiturates, *J Sleep Res* 7 (1998) 278.
- [37] Torterolo P., Pedemonte M. and Velluti R.A., Intracellular in vivo recording of inferior colliculus auditory neurons from awake guinea-pigs, *Arch Ital Biol* 134 (1995) 57-64.
- [38] Torterolo P., "Neuronas auditivas del coliculo inferior, registro intracelular in vivo". PEDECIBA, Vol. Master, Universidad de la Republica, Montevideo-Uruguay, 1995.
- [39] Torterolo P., Falconi A., Morales-Cobas G. and Velluti R.A., Inferior colliculus unitary activity in wakefulness, sleep and under barbiturates, *Brain Res* 935 (2002) 9-15.

- [40] Torterolo P. and Vanini G., [New concepts in relation to generating and maintaining arousal], *Rev Neurol* 50 747-758.
- [41] Torterolo P., Zurita P., Pedemonte M. and Velluti R.A., Auditory cortical efferent actions upon inferior colliculus unitary activity in the guinea pig, *Neurosci Lett* 249 (1998) 172-176.
- [42] Velluti R.A., Interactions between sleep and sensory physiology, *J Sleep Res* 6 (1997) 61-77.
- [43] Vincent S.R. and Kimura H., Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, *Neuroscience* 46 (1992) 755-784.
- [44] Winer J.A., Schreiner C. E., The central auditory system: a functional analysis. In: Winer, J. A., Schreiner, C. E. (Eds.), *The inferior colliculus, The inferior colliculus*, (2005) 1-68.
- [45] Zepelin H., Siegel J. M., Tobler, I, *Mamalian Sleep*. In: Elsevier-Saunders (Ed.), *Principles and practices of sleep medicine*, Kryger, M. H. et al, Philadelphia, 2005, pp. 91-100.