



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Instituto de Fisiología**

**Laboratorio de Neurofisiología Integrativa**

**Efectos de la estimulación ruidosa eléctrica y optogenética sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales aisladas**

**Tesis que presenta:**

**M en C. Pedro Mabil Espinosa**

**217570141**

**Director de Tesis:**

**Dr. Elias Manjarrez López**

**Revisores la de Tesis:**

**Dr. Gonzalo Flores Álvarez**

**Dr. Jorge Flores Hernández**

**Dr. Ricardo Félix Grijalva**

**Dr. Pavel E. Rueda Orozco**

**Puebla, Pue., 7 Febrero 2021**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca durante el periodo 2015-2017**

**Agradecimientos**

Agradezco a mis padres y mis hermanas por el apoyo incondicional que me han otorgado todos estos años. De igual forma les agradezco su paciencia por todas las veces que estuve ocupado y no pude atender a sus llamados. Sin el apoyo de mi familia nunca hubiera logrado todos mis objetivos.

Al Dr. Elias Manjarrez por abrirme las puertas de su laboratorio y ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por creer en mí y darme libertad creativa para desarrollar mis habilidades técnicas que ayudaron en el laboratorio para el desarrollo de numerosos proyectos. Y por transmitirme esa fuerte convicción de superación personal constante que me permitirán abordar cualquier desafío.

Al Dr. Jorge Flores que, a pesar de no ser su estudiante directo, me acogió como parte de su laboratorio. Su serenidad y paciencia me dieron la confianza para desenvolverme profesionalmente. La experiencia en su laboratorio me permitió entender muchos conceptos fisiológicos para el desarrollo de esta tesis y lograr mis objetivos profesionales.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez y el Dr. Ricardo Félix Grijalva. Sus aportaciones me brindaron perspectivas diferentes relacionadas a mi trabajo. Sin sus observaciones y comentarios no habría logrado reforzar los puntos débiles de la investigación y de mi formación como científico.

Al Dr. Pavel E. Rueda Orozco, por proporcionarme los animales transfectados que sirvieron para una parte de los experimentos de optogenética en el protocolo de estimulación ruidosa de larga duración. Sus consejos y comentarios fueron de vital importancia para afinar detalles experimentales.

Al Dr. Oswaldo Torres Ramírez que me auxilió en los experimentos *in vitro*. Los momentos de entusiasmo y sobresalto por los resultados experimentales que pasamos, fueron muy significativos en mi formación científica.

A Anaí, que me brindó su amistad y compañerismo durante el tiempo que duró mi estancia en el laboratorio. Sus consejos sinceros para desarrollarme profesionalmente y como persona. Mi aprecio y respeto.

A Andrea por el gran aprecio y cariño que me tuvo en un periodo tan crucial de mi posgrado. Las enseñanzas de vida, tus consejos y opiniones francas; todo ello me motivo a ser una mejor persona. Gracias.

A la Dra. Naye, mentora y amiga que durante todo el trayecto de mi posgrado me apoyó en mi formación como científico, orientándome y dándome consejos que me ayudarán al fortalecimiento de mi pensamiento crítico y creativo. Muchas gracias

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Neurofisiología Integrativa: Naye, Abraham, Mayra, Victoria, Hector, Angel, Jesús, Jorge y Frida.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Neuromodulación: Lore, Oswaldo, y Vicky.

Gracias.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN	13
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	15
ANTECEDENTES	15
Origen del uso de la electricidad para tratamientos clínicos.	15
Trabajos modernos en el uso de estimulación eléctrica transcraneal	16
Mecanismos fisiológicos de la estimulación transcraneal con corriente continua	18
Excitabilidad neuronal	21
¿Qué es el ruido?	22
Ruido interno y externo en el sistema nervioso central	22
Caracterización de la resonancia estocástica	27
Optogenética	29
Sistema somatosensorial	30
Vía del lemnisco medial o vía de las columnas dorsales	32
Sistema anterolateral	36
Breve perspectiva histórica: de la estimulación eléctrica cerebral macroscópica a la microestimulación intracortical y las neuroprótesis	39
Posibles aplicaciones clínicas de la microestimulación intracortical en la corteza somatosensorial	40
Papel potencial del ruido eléctrico y óptico para mejorar la microestimulación intracortical en la corteza somatosensorial	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45

HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS	
GENERALES	48
PARTICULARES	48
CAPÍTULO 2. EFECTO DEL RUIDO ELÉCTRICO SOBRE LA CORRIENTE DE NA+ EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS WISTAR	49
INTRODUCCIÓN	49
MATERIAL Y MÉTODOS	52
Procedimientos generales	52
Detalles del ruido eléctrico aplicado a las células piramidales de ratas Wistar	55
Protocolo de estimulación de las células piramidales	56
Análisis de Datos	56
Análisis estadístico	57
RESULTADOS	58
CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA RUIDOSA EN EL AUMENTO DE LA AMPLITUD DE LA CORRIENTE DE NA+ DE CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATONES TRANSGÉNICOS	69
INTRODUCCIÓN	69
MATERIAL Y MÉTODOS	70
Procedimientos generales	70
Análisis de Datos	76
Análisis estadístico	77
RESULTADOS	78
	5

CAPÍTULO 4. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE RUIDO DE LARGA DURACIÓN EN LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES DE  $Na^+$  DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE RATAS WISTAR

83

INTRODUCCIÓN	83
MATERIAL Y MÉTODOS	87
Procedimientos generales	87
Análisis de Datos	88
Análisis estadístico	88
RESULTADOS	89
Efecto de la RNS con 2 minutos de estimulación	89
Efecto de la RNS con 5 minutos de estimulación	89
Comparación entre los estímulos de 2 y 5 minutos de RNS	91

CAPÍTULO 5. EFECTO DE LA FOTOESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA RUIDOSA DE LARGA DURACIÓN EN EL AUMENTO DE LA AMPLITUD DE LA CORRIENTE DE  $Na^+$  DE CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS WISTAR TRANSFECTADAS

96

INTRODUCCIÓN	96
MATERIAL Y MÉTODOS	97
Procedimientos generales	97
Fotoestimulación ruidosa optogenética	98
Análisis de datos	100
Análisis estadístico	101
RESULTADOS	101

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	108
Efecto del ruido eléctrico sobre la corriente de Na <sup>+</sup> en neuronas piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratas wistar	109
Efecto de la estimulación optogenética ruidosa en el aumento de la amplitud de la corriente de Na <sup>+</sup> de células piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratones transgénicos	110
Efectos posteriores a la estimulación eléctrica de ruido aleatorio de corta y larga duración en la amplitud de la corriente de Na <sup>+</sup> de las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de ratas wistar	112
Efecto de la fotoestimulación optogenética ruidosa de larga duración en el aumento de la amplitud de la corriente de Na <sup>+</sup> de células piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratas wistar transfectadas	116
Efecto de la estimulación eléctrica y optogenética ruidosa sobre la actividad eléctrica cortical de ratas wistar (estudio in vivo)	117
CONCLUSIONES	119
Conclusión general	120
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	143
Organización de la corteza cerebral	143
Neuronas de la isocorteza	145
Neuronas no piramidales	145
Neuronas piramidales	146
Neuronas piramidales invertidas	147
Morfología	147
Dendrita apical	148
Dendritas basales	149

Espinas dendríticas	149
Axón	150
Proyecciones axonales	152
Proyecciones córtico-corticales ipsilaterales	152
Proyecciones córtico-corticales contralaterales	153
Proyecciones córtico-claustrales	153
Proyecciones córtico-estriatales	154
Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa sobre la actividad eléctrica cortical de ratas wistar	155
Procedimientos generales	155
Estimulación mecánica	155
ARTÍCULOS DERIVADOS DEL TRABAJO DE TESIS	160

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1|.** *El efecto de la polarización positiva en la superficie de la corteza somatosensorial sobre la amplitud máxima (mV) del potencial evocado.*

**Figura 2|.** *Mecanismo de potenciación a largo plazo inducida por la estimulación transcraneal con corriente continua anódica.*

**Figura 3|** *Ruido externo e interno en el SNC.*

**Figura 4|** *Esquema representativo de las características de la resonancia estocástica.*

**Figura 5 |.** *Representación general de la vía Somatosensorial.*

**Figura 6.** *Receptores mediadores de los sentidos táctiles.*

**Figura 7 |.** *Somatotopía de los núcleos de las columnas dorsales (gracilis y cuneatus).*

**Figura 8 |.** *El potencial del ruido aleatorio mediante microestimulación intracortical en neuroprótesis táctiles.*

**Figura 9.** *Representación del método para analizar los efectos de RNS eléctrico en la amplitud máxima de las corrientes de  $Na^+$  producidas por un protocolo de rampa de voltaje en neuronas disociadas de ratas Wistar.*

**Figura 10 |.** *Gráficos de la amplitud pico de la corriente de  $Na^+$  versus el inverso de su latencia agrupados según un criterio de correlación.*

**Figura 11 |.** *Gráficos de la amplitud pico de la corriente de  $Na^+$ , para nueve células piramidales, y la inversa de su latencia en función del nivel de RNS eléctrico aplicado.*

**Figura. 12 |.** *Registros superpuestos de corrientes de  $Na^+$  para algunas células piramidales para tres niveles de ruido.*

**Figura 13 |.** *Gran promedio de las amplitudes y latencias inversas de las neuronas piramidales agrupadas de acuerdo al análisis de la Figura 11.*

**Figura 14.** *Efectos de la aplicación de 300 nM de TTX sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> registradas en nuestros experimentos.*

**Figura 15 |.** *Respuesta de dos neuronas piramidales ante la iluminación de luz azul con forma de pulso cuadrado.*

**Figura 16 |.** *Esquema de la disposición experimental para la RNS optogenética y la microestimulación eléctrica con rampas de voltaje*

**Figura 17 |.** *Efectos posteriores de la RNS optogenética sobre la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidas por protocolos de rampas de voltaje en neuronas piramidales disociadas de la corteza somatosensorial de Thy1-ChR2-YFP y ratones control.*

**Figura 18 |.** *Efectos de RNS optogenética en la amplitud máxima y la inversa de la latencia de las corrientes de Na<sup>+</sup> provocadas por las rampas de voltaje en ratones Thy1-ChR2-YFP.*

**Figura 19 |** *Recuperación con reducción de corrientes de Na<sup>+</sup>.*

**Figura 20 |** *Recuperación y reducción de las amplitudes máximas de las corrientes de Na<sup>+</sup> versus el tiempo de duración de los experimentos para ambos tipos de efectos a largo plazo representados en la Figura 19.*

**Figura 21 |.** *Representación de la metodología experimental*

**Figura 22 |.** *Efecto de la aplicación de RNS optogenética de larga duración (rectángulo en azul) sobre los promedios de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidos por ocho protocolos de rampa de voltaje de las neuronas piramidales de los sujetos 1, 2 y 3.*

**Figura 23 |.** *Efecto de la aplicación de RNS optogenética de larga duración (rectángulo en azul) sobre los promedios de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidos por ocho protocolos de rampa de voltaje de las neuronas piramidales de los sujetos 3 y 4.*

**Figura 24 |.** *Gran promedio de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales vs el tiempo del protocolo experimental.*

**Figura 25** | *Gran promedio normalizado de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales vs el tiempo del protocolo experimental.*

**Figura. 26**| *Capas de la corteza cerebral teñida con H & E.*

**Figura. 27**| *Neuronas piramidales de diversas localizaciones de la corteza cerebral*

**Figura. 28**| *Neuronas piramidales invertidas del ratón (A) y la rata (B) llenas de biocitina.*

**Figura. 29**| *Neuronas piramidales típicas (A) e invertidas (B) teñidas con Golgi y mostrando dendritas con sus espinas.*

**Figura.30**| *Dibujos de los distintos subtipos de neuronas piramidales invertidas dependiendo del lugar de nacimiento del axón (de izquierda a derecha).*

**Figura 31**|. *Representación esquemática de la estimulación eléctrica somatosensorial.*

**Figura 32** |. *Efecto de la estimulación eléctrica con ruido aleatorio sobre los potenciales provocados somatosensoriales.*

**Figura 33** |. *Gran promedio normalizado de los tres niveles de estimulación mecánica de los PPS de los cuatro sujetos, para diferentes periodos de tiempo.*

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** | *Parámetros de las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales registradas y la regresión lineal para los datos experimentales.*

**Tabla 2** | *Análisis estadístico por comparación de los efectos de la RNS optogenética sobre la amplitud normalizada y el inverso de la latencia de las corrientes de Na<sup>+</sup>.*

**Tabla 3** | *C<sub>m</sub> (capacitancia de membrana), R<sub>a</sub> (resistencia de acceso), RNS eléctrico (estimulación de ruido aleatorio),  $\tau$  (constante de tiempo de recuperación), PN es para neuronas piramidales y S para un sujeto.*

**Tabla 4** | *Parámetros eléctricos de las neuronas piramidales de las ratas wistar transfectadas en el protocolo experimental de largo alcance.*

## RESUMEN

La estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria de larga duración (tRNS, por sus siglas en inglés, Transcranial Random Noise Stimulation), es una técnica con potencial uso en la clínica neurológica; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos fisiológicos por los cuales dicha estimulación produce un incremento en la excitabilidad neuronal. Se ha sugerido que los canales de Na<sup>+</sup> podrían estar involucrados en dicho incremento, pero aún no está claro si este tipo de estimulación ruidosa afecta la cinética de las corrientes de Na<sup>+</sup>. Tampoco se conoce si la estimulación ruidosa de corta duración podría tener un efecto sobre la cinética de estos canales. En esta tesis usaremos indistintamente los siguientes términos: “estimulación eléctrica ruidosa” o RNS eléctrica, y por otra parte, “estimulación optogenética ruidosa” o RNS optogenética.

En este trabajo de tesis estudiamos el efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de corta (250 ms) y larga duración (2 y 5 minutos) sobre la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales aisladas de las capas V y VI de la corteza somatosensorial. Para ello, empleamos tres preparaciones animales de las cuales se disociaron dichas neuronas. La primera, consistió en la estimulación eléctrica ruidosa de corta y larga duración sobre neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratas wistar. La segunda preparación consistió en la estimulación optogenética ruidosa de corta duración (250 ms) sobre neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP. La tercera preparación animal consistió en la estimulación optogenética ruidosa de larga duración sobre neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratas wistar transfectadas con el promotor CAMK-II, ello para que las neuronas expresaran la proteína canalrodopsina-2. La idea de emplear varias preparaciones animales y dos tipos de energía ruidosa (eléctrica y óptica) fue proveer de posibles alternativas para la estimulación ruidosa, ya sea eléctrica u optogenética, que pudieran emplearse en futuras aplicaciones.

Encontramos que la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa de intensidad intermedia y de corta duración (250 ms), sobre las neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial, amplificó significativamente la relación señal-ruido de las corrientes de Na<sup>+</sup>. Ese efecto facilitador de la corriente y su latencia, tuvo características diferenciales en la cinética de los canales de Na<sup>+</sup> cuando se empleó la estimulación eléctrica. Sin embargo,

cuando se empleó la estimulación optogenética, no se encontró dicho efecto diferencial, resaltando la alta especificidad de este tipo de estimulación.

De la misma manera, encontramos que la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa de intensidad intermedia y de larga duración (2 y 5 minutos), sobre las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial, amplificó significativamente la amplitud de las corrientes de  $\text{Na}^+$  después de aplicar la estimulación. Dicho efecto se mantuvo al menos por 7 minutos después de haber estimulado.

Dado que nuestros experimentos se hicieron en células aisladas, esto implica que las propiedades intrínsecas asociadas a la cinética de las corrientes de  $\text{Na}^+$ , son un elemento relevante en el fenómeno de facilitación que produce la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa. En este contexto, nuestros resultados representan un primer paso relevante para avanzar en el estudio de los mecanismos fisiológicos de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa.

---

---

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

---

### ANTECEDENTES

#### **Origen del uso de la electricidad para tratamientos clínicos**

El entendimiento de la electricidad y el magnetismo, como fenómenos físicos, no comenzó a realizarse si no hasta después de los trabajos de James Clerk Maxwell (1831–1879) (el cual es una síntesis matemática de los experimentos de Oersted, Marie Ampere y Michael Faraday). Fue Galvani (1737-1798) quien exploró los efectos de la electricidad en un sistema biológico. En este caso, fue en el anca de rana, demostrando que la estimulación eléctrica podía inducir contracción muscular (Galvani, 1791). La primera evidencia clínica de la teoría Galvánica comenzó con Giovanni Aldini (sobrino y asistente de Galvani) quien demostró la eficacia de la estimulación de corriente transcraneal para la rehabilitación de pacientes con trastornos de la personalidad (Aldini, 1804).

También, entre 1870 y 1878, el psiquiatra alemán Rudolph Gottfried Arndt publicó los resultados de la aplicación de electricidad para tratar psicosis severas como depresión, delirio hipocondríaco y melancolía (Steinberg, 2013). Aunque a pesar de su extensión, hay con frecuencia falta de datos físicos precisos sobre la aplicación de la estimulación eléctrica. Y solo se conserva un informe de 1878 en el que incluye las reglas generales

para la estimulación eléctrica del cerebro. A pesar de sus deficiencias metodológicas y la falta de datos precisos sobre el tratamiento que impiden su comprensión, Arndt fue pionero en el campo de la estimulación eléctrica del cerebro en pacientes con psicosis y sus impactos positivos.

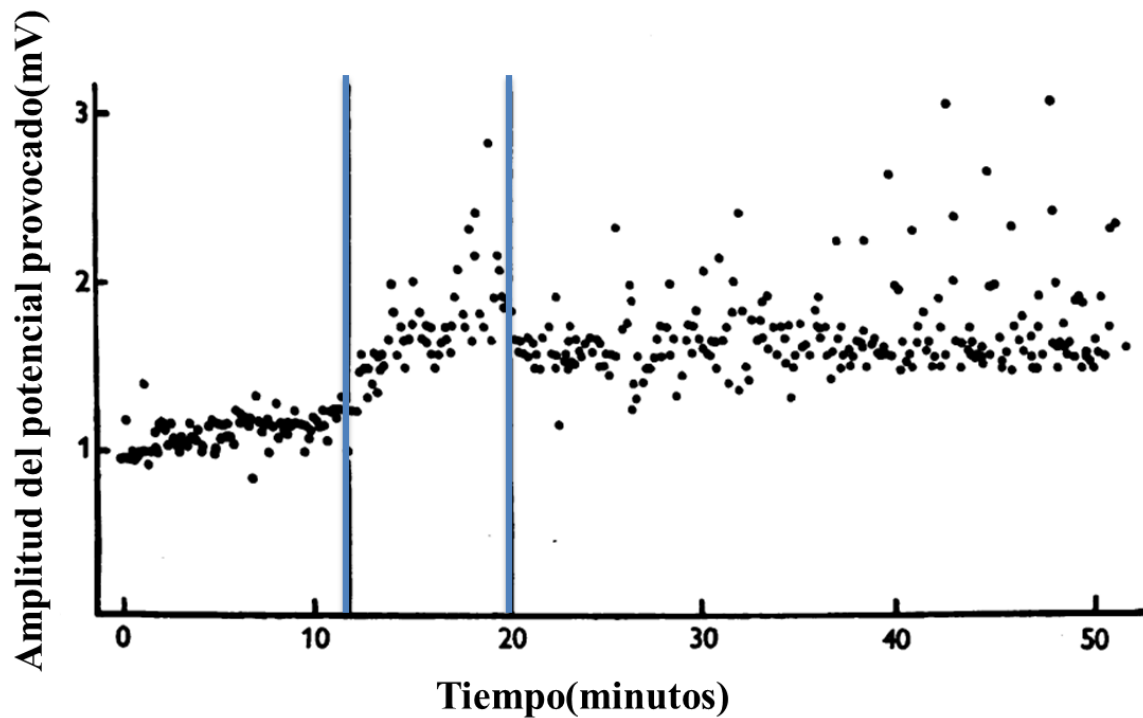
## **Trabajos modernos en el uso de estimulación eléctrica transcraneal**

La estimulación transcraneal con corriente continua es una técnica de estimulación cerebral no invasiva sin intervención farmacológica, que actúa mediante la inducción de neuroplasticidad en diferentes áreas del cerebro. Se ha empleado para modular las funciones cognitivas y de comportamiento motor en sujetos sanos y pacientes con enfermedades psiquiátricas (Ferrucci y cols., 2008; Hummel y cols., 2005; Nitsche y cols., 2003a; Reis y cols., 2009; Iyer y cols., 2005).

Sus orígenes se remontan a los trabajos publicados en 1964 por Bindman y cols, los cuales demostraron que los potenciales provocados somatosensoriales registrados en la corteza somatosensorial de ratas wistar anestesiadas, producidos por estímulos mecánicos periódicos, presentaron un incremento en su amplitud como consecuencia de haber aplicado un protocolo de estimulación eléctrico con corriente continua en sus cortezas somatosensoriales (Figura 1).

Otro tipo de estimulación eléctrica que modifica la excitabilidad eléctrica neuronal, es la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria (tRNS, transcranial random noise stimulation, por sus siglas en inglés), ya que aumenta la excitabilidad cerebral humana, la cognición numérica y la percepción de la identificación facial (Terney y cols., 2008; Snowball y cols., 2013; Romanska y cols., 2015). Ésta, al igual que la estimulación transcraneal con corriente continua, en modalidad anódica, induce un incremento en la excitabilidad de la actividad eléctrica cortical. Inclusive en el grupo de Walter Paulus, W. (2014), se moduló la duración del estímulo eléctrico ruidoso, a solo 4 minutos,

encontrándose que se induce una atenuación en la respuesta dependiente del nivel de oxigenación de la sangre en la corteza motora humana.



**Figura 1|.** El efecto de la polarización anódica en la superficie de la corteza somatosensorial sobre la amplitud máxima (mV) del potencial provocado. Entre el minuto 12 y el 20 se aplicó una corriente de 25  $\mu$ A a través de la corteza somatosensorial. Se expuso un área de 12mm<sup>2</sup> y se retiró la pía madre (Modificado de Bindman y cols. 1964).

## **Mecanismos fisiológicos de la estimulación transcraneal con corriente continua**

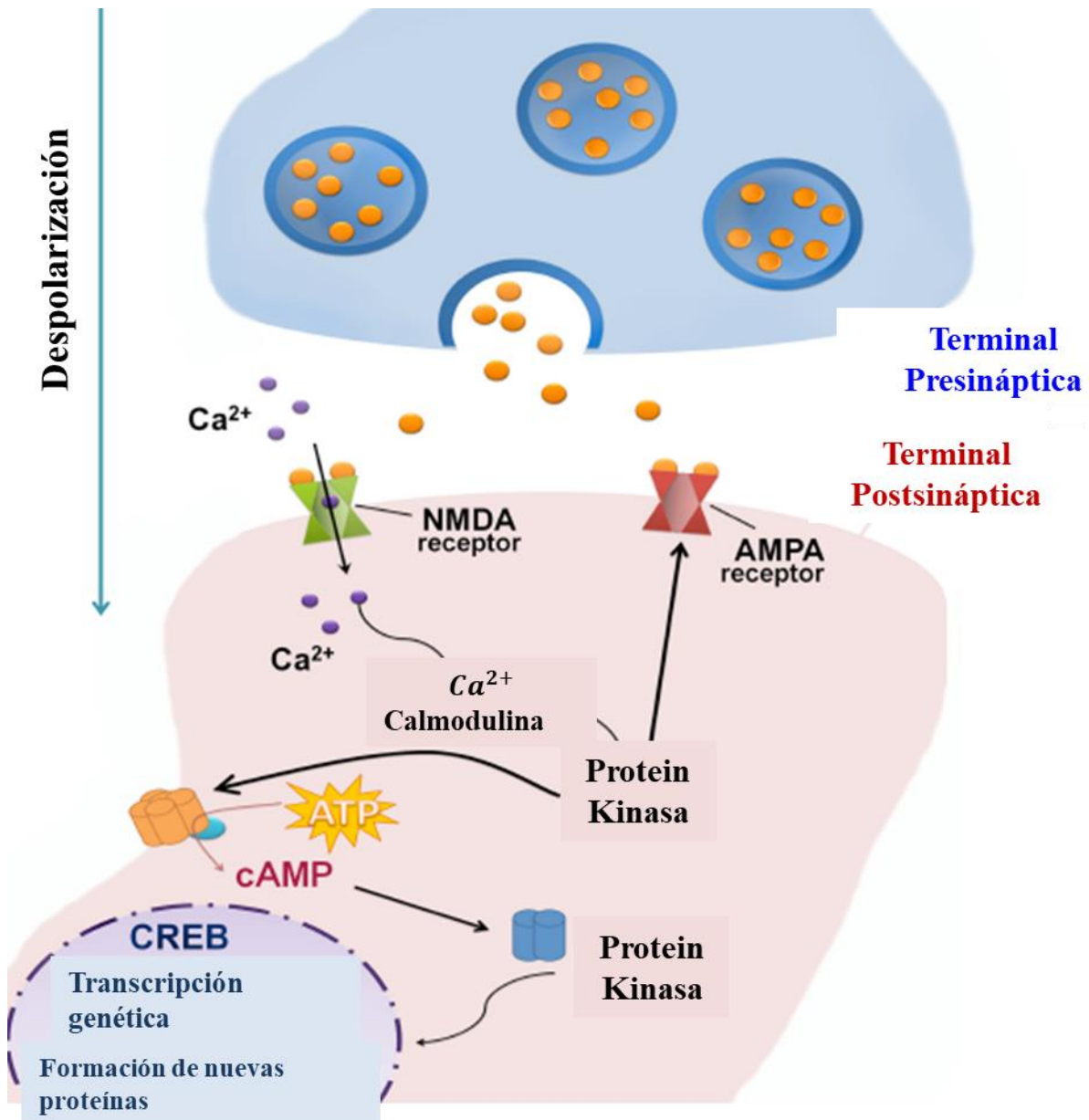
Los mecanismos fisiológicos de la neuroplasticidad que induce la estimulación transcraneal con corriente continua se han relacionado con la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Figura 2). Dichos mecanismos están mediados por dos receptores glutamatérgicos, ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y propionato de alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol (AMPA) (Traynelis y cols., 2010; Delattre y cols., 2015).

La LTP se produce cuando se aumenta la frecuencia del estímulo en la neurona presináptica ocasionando el aumento de concentración de glutamato en la brecha sináptica y por lo tanto se produce un aumento en la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  en la neurona postsináptica mediada por los receptores AMPA. Posteriormente, con una mayor concentración de iones  $\text{Na}^+$ , en la neurona postsináptica, se anula el bloqueo del ión de magnesio en el receptor NMDA. Esta situación permite una mayor entrada de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  por esos canales. El resultado neto de esos efectos es el aumento de calcio intracelular en la neurona postsináptica, lo cual activa a proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como la calmodulina y la proteína quinasa C. Ello es importante porque las proteínas quinasas modulan numerosas vías de señalización neuronal que culminan en la transcripción, traducción e inserción de nuevos receptores de glutamato (Pang y cols., 2010).

Para los procesos de LTP, la  $\text{Ca}^{2+}$  activa la proteína de unión al elemento de respuesta al monofosfato de adenosina, un factor de transcripción que controla la transcripción de genes, formación de nuevas proteínas, cambios en la conectividad entre neuronas y, en última instancia, la plasticidad sináptica (Nonaka, 2009). En contraste con la LTP, la LTD ocurre cuando una neurona recibe un estímulo de baja frecuencia. La LTD activa las fosfatasas intracelulares, enzimas que eliminan al grupo fosfato previamente unido por quinasas, y culmina con la internalización de los receptores de glutamato, disminuyendo la eficacia de la transmisión sináptica (Mulkey y cols., 1993).

La LTP y LTD se consideran los mecanismos de neuroplasticidad que conllevan cambios en la función cerebral y el mejoramiento de enfermedades neurológicas y discapacidades. Liebetanz y cols (2002), demostraron que a través de fármacos como el dextrometorfano, antagonista del receptor NMDA, se es capaz de disminuir los efectos de una estimulación anódica. Y además, la carbamazepina, bloqueadora de los canales de Na<sup>+</sup>, es capaz de abolir los efectos de la estimulación transcraneal con corriente continua anódicos. Con ello se demostró que los efectos de la estimulación transcraneal con corriente continua en humanos se elimina cuando los receptores NMDA están bloqueados. Mientras que la facilitación de la actividad del receptor de NMDA prolonga el efecto de la excitabilidad.

El papel que desempeña GABA, serotonina y dopamina en LTP inducida por la estimulación transcraneal con corriente continua anódica también se ha estudiado. Por ejemplo, la estimulación transcraneal con corriente continua anódica causa una reducción local de GABA mientras que la estimulación transcraneal con corriente continua anódica inhibitoria (catódica) reduce la actividad neuronal glutamatérgica con una reducción de GABA, (Stagg y cols., 2009). Además, el bloqueo de la recaptación de serotonina aumenta la LTP inducida por la estimulación transcraneal con corriente continua anódica e invierte la LTD en LTP (Nitsche y cols., 2009). Sin embargo, los antagonistas de los receptores dopaminérgicos D2 inhiben la plasticidad inducida por la estimulación transcraneal con corriente continua catódica y anódica en voluntarios sanos (Nitsche y cols., 2006). Con ello se demuestra la importancia de la dopamina y la serotonina en la estimulación transcraneal con corriente continua en humanos.



**Figura 2]. Mecanismo de potenciación a largo plazo inducida por la estimulación transcraneal con corriente continua anódica.** Esquema que ilustra los efectos de la estimulación transcraneal con corriente continua anódica en las sinapsis de neuronas corticales. La estimulación anódica despolariza la membrana neuronal y el glutamato es liberado por la neurona presináptica y se une a los receptores NMDA y AMPA. La continua despolarización en la membrana postsináptica, genera un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la neurona postsináptica, que puede activar proteína quinasas, como la quinasa dependiente de calcio / calmodulina (CaMK). La que a su vez, puede modular numerosas vías de

señalización neuronal que conducen a la transcripción, traducción e inserción de nuevos receptores de glutamato (Pang y cols., 2010) y después de pasar un tiempo suficientemente prolongado se activa el CREB (factor de transcripción), que sirve de mediador en la transcripción de genes y la formación de nuevas proteínas.

## **Excitabilidad neuronal**

Desde 1952, Hodgkin y Huxley llamaron excitabilidad neuronal a la propiedad funcional que tienen las neuronas para generar respuestas eléctricas ante estímulos que se reciben del medio externo. Dicha propiedad es fundamental para el procesamiento de la información en los organismos multicelulares, y las respuestas varían desde una o varias espigas hasta patrones repetitivos o irregulares de descargas eléctricas.

Las neuronas generan y transmiten información mediante cambios rápidos y transitorios en la diferencia de potencial que existe entre el medio intracelular y el medio extracelular, lo que produce señales eléctricas discontinuas en el tiempo.

Para que se generen y se propaguen dichas señales o respuestas, se necesita la presencia de canales iónicos en las membranas extracelulares de las neuronas. Los canales son proteínas integrales de membrana que forman poros para permitir el paso selectivo de iones entre el interior y exterior de las células. El flujo de los iones a través de tales poros genera una corriente eléctrica.

La variabilidad de estas respuestas está dada por las propiedades de los diferentes tipos celulares, por la morfología y la distribución de los canales iónicos en la membrana celular. Así, como por las propiedades de la red neuronal. Es importante recordar que las membranas celulares son permeables a más de un ión y existe un potencial de equilibrio para cada uno de ellos. En las neuronas las descargas eléctricas conforman el lenguaje principal del sistema nervioso, y se generan porque las células presentan cambios en su estado de potencial en reposo que en realidad es un estado de equilibrio dinámico. Por lo tanto, el mecanismo de transmisión de la información en el SN se basa en cambios

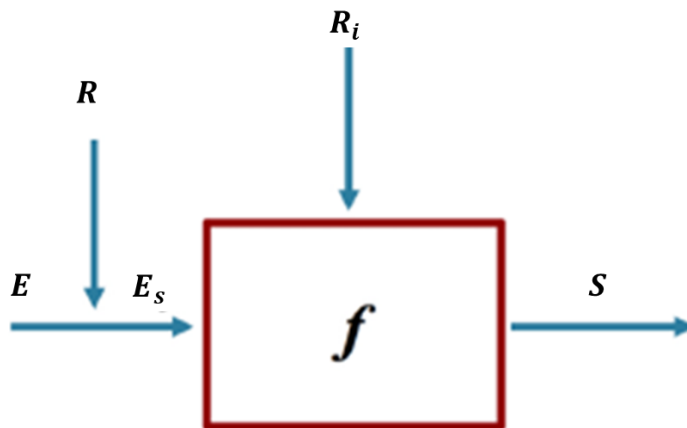
permanentes del potencial de la membrana, cambios que constituyen los potenciales de acción o los potenciales sinápticos.

## **¿Qué es el ruido?**

El ruido blanco se describe como una señal aperiódica y aleatoria, cuyo espectro de potencia es una constante, es decir, todas las frecuencias que componen su ancho de banda tienen aproximadamente el mismo valor de amplitud. Cuando la gráfica del espectro de potencia no es una constante, el ruido es coloreado (ruido Browniano, ruido rosa, ruido gris, etcétera). Una señal contiene ruido cuando una de sus variables presenta una dispersión alrededor de un valor central, que usualmente no es predecible (Segundo y cols., 1994). A pesar de que el ruido es una señal aleatoria, puede funcionar como una señal auxiliar estocástica, al actuar en “beneficio” o “detrimento” de un sistema lineal o no lineal.

## **Ruido interno y externo en el sistema nervioso central**

El sistema nervioso central (SNC) puede representarse como una caja negra o sistema con características no lineales. Este sistema, integra múltiples señales externas, las cuales pueden estar contaminadas por ruido ambiental o ruido externo. El SNC opera no solo con fuentes de ruido externo, también lo hace con ruido interno. De este modo, dicho sistema, posee entradas ruidosas, las cuales influyen en sus respuestas de salida. Además, la relación entre estas variables implica una función de transferencia u operador del sistema en presencia de fuentes de ruido externo e interno (Figura 3) (Segundo y cols., 1994).



**Figura 3| Ruido externo e interno en el SNC.** Los grupos de neuronas se representan como una caja negra o sistema no lineal. La entrada del sistema, corresponde a la sumatoria de señales ( $E$ ) y ruido ( $R$ ).  $f$  es el operador de transferencia, el cual contiene la influencia de ruido interno ( $R_i$ ). La salida del sistema ( $S$ ) es una variable estocástica (Modificado de Segundo y cols., 1994).

El ruido juega un papel importante en el entendimiento y la descripción de la naturaleza. No obstante, bajo ciertas condiciones las señales ruidosas pueden desempeñar una función constructiva en sistemas no lineales que están lejos del equilibrio (Zeng y cols., 2000; Volkov y cols., 2005).

Diversos experimentos y modelos teóricos (Benzi y cols., 1981, Fauve y Heslot, 1983; Segundo y cols., 1998, Martínez y cols., 2007) han mostrado que las múltiples fuentes de ruido contribuyen a la variabilidad celular y conductual. La variabilidad en las señales del sistema nervioso puede producirse por el ruido. Éste es capaz de permear a varios niveles del sistema nervioso, desde la percepción de señales sensoriales hasta la generación de respuestas motrices. En el sistema nervioso se han descrito diferentes tipos de ruido: sensorial, neuronal, sináptico y eléctrico (Faisal y cols., 2008).

Con respecto al ruido sensorial, se sabe que los estímulos sensoriales externos son intrínsecamente ruidosos porque son de naturaleza termodinámica y cuántica. Incluso, todas las formas de detección química se ven alteradas por el ruido termodinámico, porque las

moléculas que llegan al receptor lo hacen de manera aleatoria debido a los mecanismos de difusión. En la primera etapa de la percepción, la energía del estímulo sensorial se convierte en una señal química (por ejemplo, a través de la absorción de fotones o de la unión de moléculas de olor a su receptor) o una señal mecánica (tal como, el movimiento de las células ciliadas de la audición). Posteriormente, el proceso de transducción amplifica la señal sensorial y la convierte en una señal eléctrica, ya sea directamente o indirectamente a través de cascadas de segundos mensajeros. Cualquier ruido sensorial que ya está presente, o que se genere durante el proceso de amplificación, aumentará la variabilidad del sistema. Además, el ruido está altamente involucrado en el establecimiento de umbrales de percepción para el posterior procesamiento de la información. Se establece que un estímulo ruidoso sensorial produce eventos aleatorios en los diferentes relevos del sistema nervioso. Asimismo, a dichos eventos aleatorios que se detectan en los diferentes relevos del sistema nervioso se le conoce como ruido neuronal.

Si estimulamos a las neuronas de manera repetitiva, con señales que varían en el tiempo, como resultado obtendremos potenciales de acción que varían a través de los ensayos a los que sean sometidas. Esta variabilidad ocurre en el orden de los milisegundos o menos, lo que resulta en una precisión temporal fisiológicamente relevante para la transmisión de la información. Además, en qué medida esta variabilidad neuronal contribuye a un procesamiento significativo (en lugar de ser ruido sin sentido) es la cuestión fundamental de la codificación neural.

La variabilidad neuronal (ruido neuronal) puede exhibir características estadísticas (como la media y la varianza) que coinciden con las de procesos aleatorios. De hecho, se conoce por la teoría de la información de Shannon que cuando la codificación de la información es óptima, ésta se emplea para maximizar la transmisión de la información. Con esto, se puede demostrar que las señales neuronales pueden ocurrir al azar. Inclusive, la variabilidad neuronal no es igual en todas las neuronas. Son múltiples los factores que contribuyen a la variabilidad neuronal. Estos incluyen cambios en el estado interno, así como procesos aleatorios en las neuronas y en las redes neuronales. Pero ¿cuáles son las fuentes de ruido en las neuronas? En cada neurona, el ruido se acumula de manera aleatoria en la maquinaria celular que procesa la información, y puede ser incrementada como resultado de las

interacciones no lineales de las redes neuronales. A nivel bioquímico y biofísico hay muchos procesos estocásticos presentes en las neuronas. Estos incluyen producción y degradación de proteínas, la apertura y cierre de canales iónicos, la fusión de vesículas sinápticas y la difusión y unión de moléculas de señalización a los receptores.

Además, muchas neuronas reciben un intenso bombardeo sináptico de cientos de neuronas. Dicha actividad se denomina ruido sináptico de fondo. La manifestación clásica del ruido sináptico son las corrientes postsinápticas miniatura espontáneas que pueden registrarse en ausencia de entradas presinápticas, Kats y cols., (1970) interpretaron que estas corrientes postsinápticas miniatura son el resultado de la liberación espontánea cuántica de vesículas que contienen neurotransmisores y funcionan para la transmisión sináptica. Las corrientes postsinápticas miniatura espontáneas son causadas por eventos aleatorios en la maquinaria de transmisión sináptica, muy probablemente, por la apertura espontánea de reservorios intracelulares de calcio, el ruido presente en los canales de calcio sinápticos y la fusión y liberación espontánea de vesículas sinápticas a la membrana celular. Una vez que estas vesículas son liberadas inducen una corriente postsináptica, la cual es variable. Sin embargo, ¿cómo explicar si la variabilidad de las respuestas postsinápticas puede ser atribuida al ruido? Primero, los mismos procesos estocásticos que producen las corrientes postsinápticas miniaturas espontáneas están presentes durante la transmisión sináptica normal, y pueden alterar la amplitud de la corriente postsináptica. Segundo, la duración de la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  de la porción presináptica determina el tamaño de la corriente de calcio que provoca la liberación de vesículas y el número de vesículas que son liberadas, así como la probabilidad de liberación vesicular y la variabilidad de los potenciales de acción que resultan del ruido neuronal (Faisal y cols., 2008).

Por otra parte, el ruido eléctrico en las neuronas provoca fluctuaciones en el potencial de membrana, incluso en ausencia de entradas sinápticas (Verveen y cols., 1967; Blair y Erlanger, 1933). La fuente del ruido eléctrico es el ruido intrínseco de los canales iónicos, es decir, las corrientes eléctricas producidas por la apertura y cierre aleatorio de canales voltaje o ligando dependientes. Experimentos *in vitro* de neuronas hipocampales (Diba y cols., 2004) muestran que el ruido de los canales iónicos de las dendritas y del soma de las

neuronas producen fluctuaciones en el potencial de membrana, que repercuten en la generación de potenciales de acción, y sobre todo, en la propagación de éstos.

Como hemos mencionado anteriormente, existen múltiples estudios que demuestran la influencia del ruido externo en el SNC (Verveen y cols., 1967; Blair y Erlanger, 1933; Hänggi, 2002; Manjarrez y cols., 2002; Diba y cols, 2004; Martínez y cols., 2007). Sin embargo, ¿cómo modula el ruido externo al ruido interno? es un cuestionamiento importante para los sistemas que procesan y transmiten información. Se sabe que la fuente primaria de ruido interno en el SNC se origina por la actividad sináptica de fondo, la cual produce una alta variabilidad en las respuestas neuronales (Bindman y cols., 1964). En los sistemas neuronales no lineales, el ruido puede incrementar la detección y transmisión de señales débiles (Moss y cols., 2004). Éste fenómeno se conoce como resonancia estocástica.

En este contexto, la resonancia estocástica es un fenómeno donde la aplicación de ruido a un sistema no lineal permite la detección de señales débiles o amplifica la información contenida en una señal (Benzi y cols., 1981; Collins y cols., 1996; Simonotto y cols., 1997; Gammaitoni y cols., 1998; Manjarrez y cols., 2002; Martínez y cols., 2007). Cuando se adiciona una cantidad óptima de ruido se propicia un aumento en las respuestas del sistema, si hay un incremento en la intensidad del ruido, esto provoca que se degrade la detección de la información (Gammaitoni y cols., 1998; Manjarrez y cols., 2007; Lugo y cols., 2008).

En general, la resonancia estocástica es una actividad inducida por ruido y describe la amplificación de la respuesta del sistema a una señal debida a un nivel de ruido intermedio óptimo (Segundo y cols., 1994; Collins y cols., 1996; Simonotto y cols., 1997; Zeng y cols., 2000; Manjarrez y cols., 2002; Méndez-Balbuena I, 2015; Volkov y cols., 2005; Martínez L, 2007; Manjarrez y cols., 2007).

## Caracterización de la resonancia estocástica

Existe una extensa información sobre los mecanismos que subyacen a la resonancia estocástica. No obstante, la explicación más aceptada es la provista por Moss y cols., (2004). La resonancia estocástica resulta de la convergencia de tres componentes: el umbral, el ruido y la señal periódica. En este contexto, la información del estímulo se codifica por el sistema, de tal manera, que el estímulo deba superar un cierto umbral para que sea detectado por el sistema. Es decir, el estímulo débil (subumbral), por sí solo, resulta indetectable y no produce respuesta alguna en el sistema no lineal. Pero si se adiciona ruido intermedio óptimo, la información del estímulo será detectada con mayor probabilidad.

Cuando se administra ruido de mayor intensidad, la respuesta comenzaría a parecerse al ruido mismo, la consecuencia de esto sería la pérdida de la información de interés que se produce por el estímulo original (Figura 3A).

Además, la característica más notable de la resonancia estocástica es una amplificación de la señal de entrada debida al ruido. Sin embargo, ¿cómo cuantificar dicho fenómeno? Algunos métodos empleados para evidenciar el fenómeno de la resonancia estocástica (Gammaitoni y cols., 1998), son:

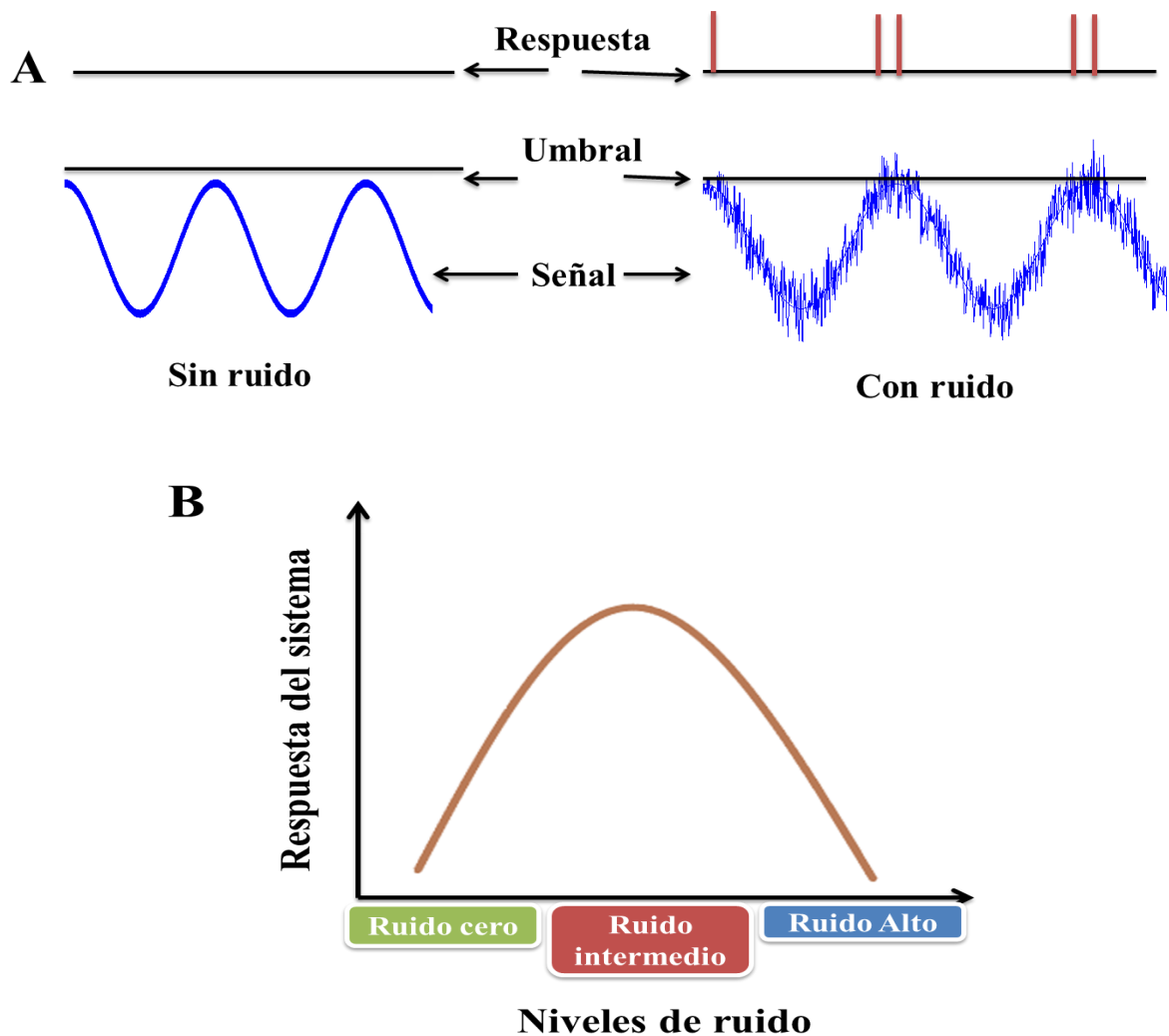
1. Amplificación del poder espectral  $\eta$ .
2. Relación señal-ruido (RSR).
3. Densidad de distribución del tiempo de permanencia,  $p(\tau)$  ; también conocida como histograma del intervalo de tiempo entre espigas.
4. Amplitud de la respuesta.

La amplificación del poder espectral mide la razón entre la integral del espectro de potencia de salida alrededor de la frecuencia de estimulación, con respecto a la integral del espectro de potencia total de la señal de entrada. La RSR se calcula a través de las densidades espectrales de la señal y del ruido alrededor de la frecuencia de la señal.

La RSR corresponde al cociente del área del espectro de la señal de salida durante la estimulación periódica y la estimulación ruidosa, con respecto al espectro de potencia de la

señal de salida con ruido solamente (Manjarrez y cols., 2002). El histograma del intervalo de tiempo entre espigas representa el disparo de una unidad que responde cuando la señal de entrada es asistida por ruido. Éste permite cuantificar el efecto del ruido en la frecuencia de disparo de las neuronas. La adición de ruido incrementa la probabilidad de disparo de la neurona en relación al periodo promedio de sincronía con la señal periódica.

Cuando se construyen las gráficas para evidenciar la resonancia estocástica, es posible observar que, para intensidades de ruido óptimo, la curva exhibe un valor máximo, y para intensidades de ruido alto, los valores decaen. El comportamiento en forma de U invertida es una característica típica de la resonancia estocástica (Figura 3B).



**Figura 4| Esquema representativo de las características de la resonancia estocástica.**  
 (A) Mecanismo por el cual el ruido mejora la respuesta de un sistema no lineal a una señal

débil. La detección de la señal está indicada como la respuesta supra-umbral. (B) Curva típica de RE donde se muestra la respuesta del sistema versus los niveles de ruido. Para el ruido de nivel bajo o alto, la respuesta del sistema es menor, con respecto a la respuesta que se observa para los niveles intermedios (óptimo), lo que resulta en una forma de U invertida (A. Modificado Moss y cols., 1998; B. Modificado de McDonnell y Abbott, 2009).

## Optogenética

La optogenética es la combinación de métodos genéticos y ópticos para controlar procesos específicos en determinadas células, con la precisión temporal y espacial necesaria para mantener intacto el funcionamiento del sistema en general.

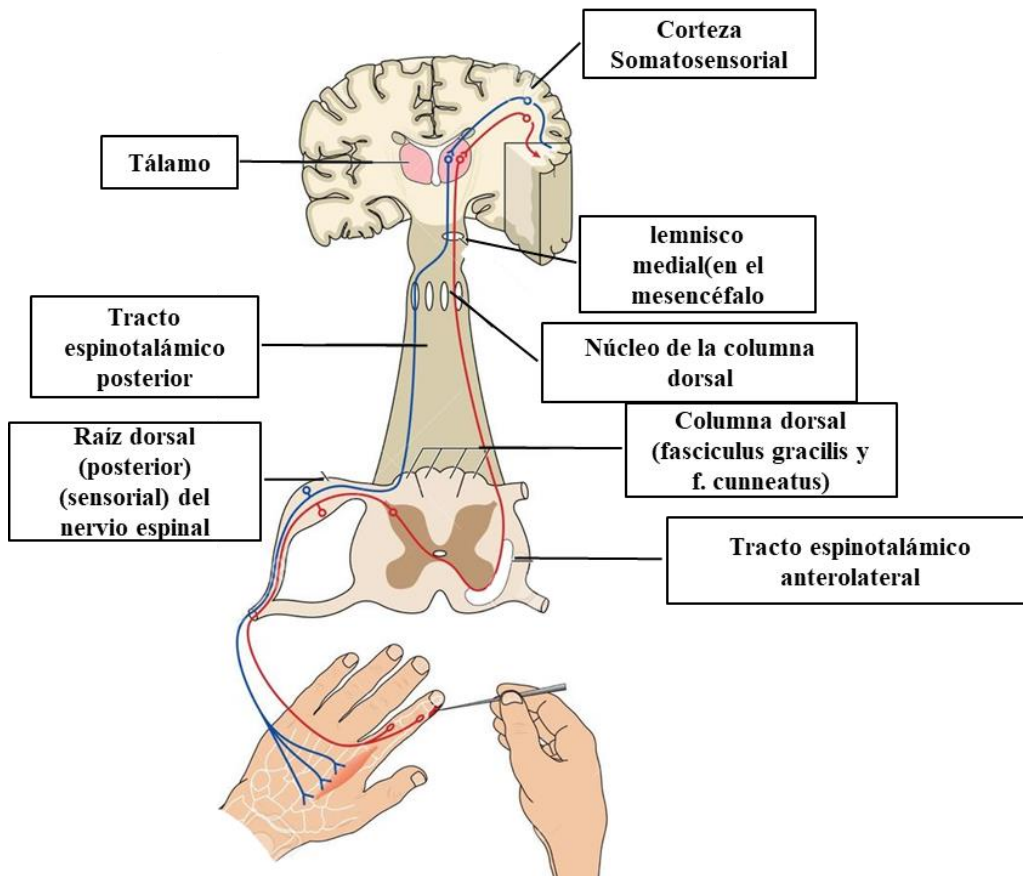
Esta técnica consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos que codifican proteínas de origen microbiano sensibles a la luz. Las cuales expresan la proteína canalrodopsina-2 bajo el promotor Thy1 (denominadas opsinas) cuya información genética proviene de unas algas fotosensibles (Hegemann, Nagel y Bamberg, 2003) llamada Channelrodopsina 2 (ChR2) de la cual esta alga se vale, para desplazarse hacia la luz. Así, las células neuronales se vuelven sensibles a la luz. Las proteínas, que actúan como interruptores, encienden o apagan las neuronas en función de los destellos de luz enviados en milisegundos mediante cables de fibra óptica.

La canalrodopsina-2 (ChR2) se usa ampliamente para la fotodespolarización rápida de neuronas; sin embargo, como requiere luz azul de alta intensidad para su activación, no es adecuada para aplicaciones *in vivo* a largo plazo. Es decir, para manipulaciones de comportamiento o fotoactivación de neuronas durante el desarrollo (Schultheis y cols., 2011).

## **Sistema somatosensorial**

El sistema somatosensorial se encarga de detectar estímulos del medio externo e interno para transmitirlos a las estructuras del sistema nervioso central donde se producirá una respuesta adecuada en el caso que sea necesario (Figura 5). El sistema somatosensorial detecta 4 modalidades sensoriales diferentes: tacto, propiocepción, temperatura y dolor. Cada modalidad tiene sus propios receptores y estructuras de relevo en el sistema nervioso central, aunque existe convergencia e integración para diferentes modalidades en distintas estructuras a lo largo del sistema.

Las señales se inician en los receptores sensoriales que se encuentran distribuidos por todo el cuerpo, los cuales se encargan de transducir a señales eléctricas los diferentes estímulos detectados. Las señales procedentes de las diferentes regiones corporales viajan por los axones de las neuronas localizadas en los ganglios de las raíces dorsales hasta entrar en el sistema nervioso central.



**Figura 5 |. Representación general de la vía Somatosensorial.** Los estímulos externos que activan a los mecanoreceptores alcanzarán a la corteza a través de dos vías principales del sistema somatosensorial: la vía de las columnas dorsales, y el sistema anterolateral (modificado de Allan Siegel tercera edición).

Estas neuronas de los ganglios de las raíces dorsales son denominadas neuronas de primer orden. Los axones de las neuronas de primer orden pueden seguir dos tipos de caminos al entrar en la médula espinal:

- pueden hacer sinapsis en las neuronas de las astas dorsales.
- pueden viajar por la médula a nivel medial y dorsal alcanzando la región más caudal y dorsal del bulbo raquídeo, haciendo sinapsis con neuronas de los núcleos de las columnas dorsales.

Las neuronas que reciben las sinapsis de los axones de las neuronas de primer orden son denominadas neuronas de segundo orden, que se pueden encontrar en las astas dorsales o

en los núcleos de las columnas dorsales. De una forma muy general, los axones de las neuronas de segundo orden alcanzan el tálamo somatosensorial, donde se encuentran las neuronas de tercer orden.

Finalmente, las neuronas de tercer orden o tálamo-corticales, envían el axón a la corteza cerebral, desde donde la información sigue rutas más complejas. Los receptores que detectan los diferentes estímulos periféricos que se encuentran distribuidos por todo el cuerpo, lo que significa que el sistema es capaz de identificar, de forma precisa, donde está localizado el estímulo en cada momento. Los receptores que activan a una sola fibra aferente conforman lo que se denomina el campo receptor de dicha fibra. El campo receptor definido de una manera general es la región corporal en la cual la presencia de un estímulo activa a una neurona del sistema. Las características del campo receptor dependen tanto de la zona corporal que ocupa como del nivel en el sistema en el que se encuentra la neurona, ya que en diferentes niveles suceden procesos complejos como convergencia, divergencia y neuromodulación que afectan a la estructura de los campos receptores. El ordenamiento del conjunto de campos receptores conforma la representación corporal ordenada espacialmente en cada uno de los niveles del sistema. A este ordenamiento espacial en cada estructura se le denomina somatotopía. La somatotopía confiere al sistema un alto grado de organización espacial, de tal manera que cada región corporal se encuentra representada en cada uno de núcleos de relevo somatosensoriales.

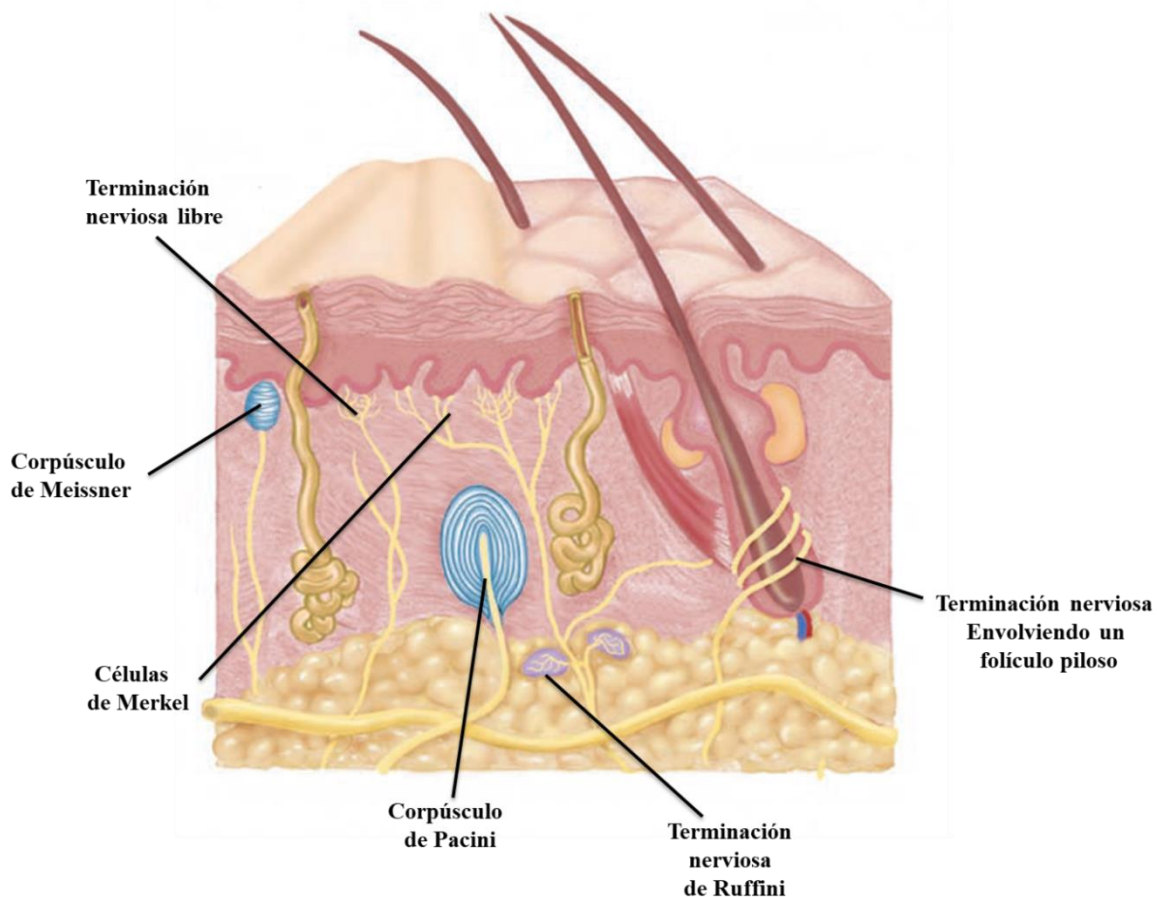
Cada modalidad alcanzará la corteza a través de dos vías principales del sistema somatosensorial: la vía de las columnas dorsales, y el sistema anterolateral.

## **Vía del lemnisco medial o vía de las columnas dorsales**

La vía del lemnisco medial o vía de las columnas dorsales se encarga de detectar y transmitir las modalidades de tacto y propiocepción desde toda la superficie corporal y los receptores musculares y tendinosos hacia el cerebro, alcanzando finalmente la corteza cerebral.

El primer nivel en la vía son las neuronas de primer orden, también llamadas neuronas aferentes primarias, que tienen un calibre grueso y están muy mielinizadas. Son las fibras llamadas  $A\alpha$  y  $A\beta$ , que se caracterizan por tener una alta velocidad de conducción (Rango de  $A\alpha$ : 70-170m/s y el rango de  $A\beta$ : 30-70m/s).

Las señales periféricas se detectan por diferentes órganos sensoriales que transducen la señal para activar las fibras primarias. Estos órganos son los siguientes: corpúsculo de Meissner, de Pacini, de Ruffini, receptores de Merkel y folículos pilosos para determinar tacto, órgano tendinoso de Golgi y husos musculares para identificar propiocepción en músculos y articulaciones (Figura 6).



**Figura 6. Receptores mediadores de los sentidos táctiles.** Folículo piloso: localizado en la epidermis y dermis. Corpúsculo de Meissner: sensible al tacto y vibración, ubicada debajo de la epidermis. Receptor de Merkel (disco de Merkel): mecano receptor sensible a estímulos de presión, ubicados profundamente en la epidermis. Corpúsculo de Pacini: receptor sensible a una hendidura rápida de la piel causada por vibración de alta frecuencia, ubicada en lo profundo de la dermis. Corpúsculo de Ruffi ubicado en la dermis y proporciona información sobre la magnitud y la dirección de estiramiento (modificado de Allan Siegel tercera edición).

Las neuronas de primer orden tienen el axón dispuesto con 2 terminaciones axonales: por un lado, se encuentra una terminación periférica que inerva a su campo receptor y por otro lado, se encuentra la rama axonal que entra en la médula espinal ascendiendo hasta llegar a los núcleos de las columnas dorsales. Las aferentes primarias se ramifican y envían colaterales axónicas en el mismo nivel de entrada hacia el asta dorsal de la médula, contactando con neuronas situadas entre la lámina III y VI. Los axones de estas neuronas decusan a nivel medular y proyectan hacia el fascículo anterolateral.

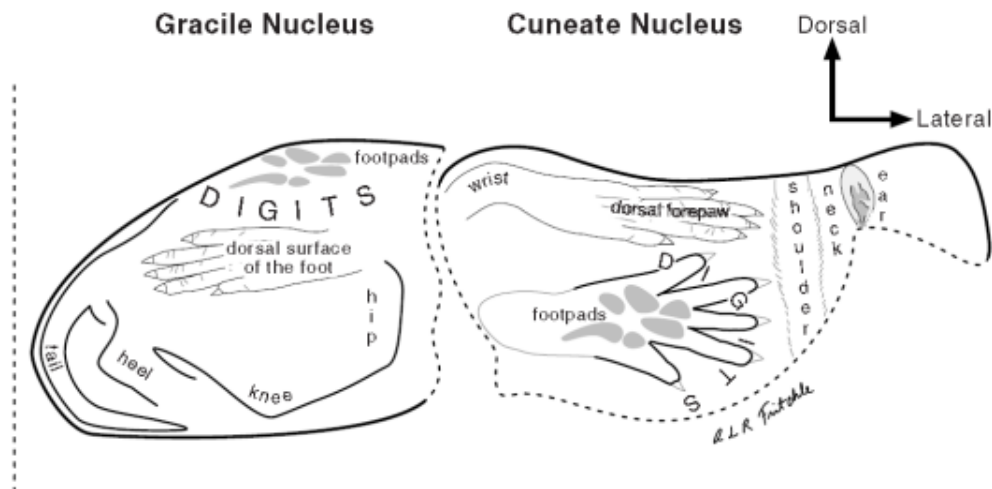
Las aferencias primarias que ascienden por la médula hacia el tronco del encéfalo lo hacen organizadas espacialmente, de forma que tienen una localización más medial las aferencias con campos receptores más caudales y una localización más lateral las aferencias con campos receptores más rostrales. Este es el inicio de la organización somatotópica que se mantiene y aparece en cada una de las estructuras del sistema. Las fibras que llevan la información procedente de las regiones corporales inferiores entran en médula a nivel de las vértebras sacras, lumbares y torácicas inferiores (T7-T12) formando la columna dorsal denominada fascículo gracilis, situada junto a la línea media. Mientras que las fibras que llevan la información de las regiones corporales superiores entran en la médula a nivel de vértebras cervicales y torácicas superiores (T1-T6) formando la columna dorsal denominada fascículo cuneatus, que se sitúa de forma lateral a la columna anterior. Las fibras que llevan la información procedente de la cara presentan su soma en el ganglio trigeminal y alcanza el tronco del encéfalo a través del nervio trigémino.

Los núcleos de las columnas dorsales están localizados en la región más caudal del bulbo raquídeo (Paxino, 2004 “The rat nervous system”, tercera edición.; Delgado y cols., 1998

“Manual de neurociencia”). Cada columna dorsal alcanza el núcleo que tiene el mismo nombre, núcleo gracilis y cuneatus, que conservan la disposición medial para el núcleo gracilis por recibir desde regiones más caudales, y más lateral para el núcleo cuneatus que recibe de regiones más rostrales. El ordenamiento espacial de los núcleos de las columnas dorsales responde a la somatotopía que tienen todos los núcleos de relevo de la vía. El núcleo gracilis recibe las fibras aferentes primarias que entran en la médula por debajo de la vértebra torácica 7 (la mitad del tronco inferior y las extremidades inferiores) (Figura 7), Nord, 1967; Maslany y cols., 1991). El núcleo cuneatus es el destino de las fibras que entran en la médula a niveles superiores de la vértebra torácica 6 (la mitad superior del tronco del animal y sus extremidades delanteras). Finalmente las fibras procedentes de la región más rostral del cuerpo alcanzan el núcleo principal del complejo trigeminal situado de forma lateral y anterior al núcleo cuneatus (Nord, 1967).

Esto significa que la primera estación de relevo para una parte de la sensibilidad cutánea (tacto y propiocepción) son los núcleos de las columnas dorsales.

En los núcleos de las columnas dorsales se realiza un procesamiento interno de la información ascendente, ya que además de neuronas de proyección tienen interneuronas de circuito local que contribuyen a la selección de señales. Y al mismo tiempo, reciben aferencias de varios núcleos del tronco del encéfalo como el núcleo rojo, el núcleo vestibular y los núcleos cocleares (Weinberg y Rustioni, 1989). Además reciben regulación cortical (Antal, 1984; Chimelli y cols., 1994; Desbois y cols., 1999).



**Figura 7 |. Somatotopía de los núcleos de las columnas dorsales (gracilis y cuneatus).** Imagen sacada del Libro “the rat nervous system” 3ºe d.

Las neuronas de segundo orden parten de los núcleos de las columnas dorsales. Sus axones decusan en el tronco del encéfalo, formando un haz de fibras llamado lemnisco medial que asciende hasta el tálamo somatosensorial.

Las señales que viajan por el lemnisco medial alcanzan el complejo ventrobasal del tálamo, que es la siguiente estructura de relevo en esta vía. El complejo ventrobasal se divide en núcleo ventral posterior lateral (VPL) que recibe señales procedentes del tronco y extremidades del animal (Emmers, 1988), y núcleo ventral posterior medial (VPM) que recibe señales desde parte de la cabeza y el rostro (Waite, 1973). De esta manera, el complejo ventrobasal tiene una organización somatotópica como todas las estructuras de la vía. Dentro del complejo ventrobasal existen neuronas de proyección hacia la corteza somatosensorial (neuronas de tercer orden) e interneuronas de circuito local que tienen la función de procesar y filtrar señales ascendentes. El complejo ventrobasal está regulado principalmente por el núcleo reticular talámico (NRT) con función inhibitoria (Pinault y Deschenes, 1998a, b) y por la corteza somatosensorial (Deschenes y cols., 1998; Veinante y cols., 2000), además de encontrarse regulado por los sistemas generales de neuromodulación (ACh, NE, 5-HT, DA etc.) (Peschanski y Besson, 1984a, b; Carstens y cols., 1990). Las neuronas tálamo-corticales envían los axones a través de la radiación

talámica hacia la corteza somatosensorial primaria haciendo sinapsis principalmente en la capa IV cortical.

## **Sistema anterolateral**

El sistema anterolateral está formado por varias vías ascendentes sensoriales encargadas de detectar y transmitir las modalidades de temperatura y dolor desde el tronco y las extremidades. El primer nivel de las vías es común y lo forman las neuronas de primer orden cuyo soma se dispone en los ganglios de las raíces dorsales. Las neuronas que detectan estas modalidades tienen fibras de tipo A $\delta$  y C, las cuales presentan una terminal axónica periférica libre, es decir, no se encuentran unidas a ningún receptor o célula especializada. Las fibras A $\delta$  presentan un menor diámetro y menor grado de mielinización que las fibras A $\alpha$  y A $\beta$ , con un rango de velocidad de conducción entre 5 y 30m/s.

Las modalidades que detectan estas fibras son temperatura y dolor de forma aguda y rápida. Las fibras C son amielínicas y el diámetro es muy fino, su velocidad de conducción es muy lenta (0.5-2m/s) y detectan las modalidades de temperatura y dolor no agudo que se transmite de forma lenta. Las neuronas de primer orden presentan una ramificación central que entra en la médula a nivel del asta dorsal, y hacen sinapsis en las láminas superficiales (Lámina I y II) aunque también entran a nivel de la lámina V.

Dentro del sistema anterolateral existen varias vías somatosensoriales que llevan las señales nociceptivas hasta el encéfalo a través de diferentes neuronas de segundo orden, estas vías son: el tracto espinotalámico, el tracto espinorreticular y el tracto espinomesencefálico.

El tracto espinotalámico, es la vía más importante que transmite la sensación de dolor en humanos (Gybels y Sweet, 1989), así como en otras especies como la ratas (Peschanski y cols., 1986; Palecek y cols., 2002). Lo forman los axones de las neuronas específicas de la nocicepción de las Láminas I y V-VII del asta dorsal, donde se localiza su soma. Estos axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden hasta alcanzar el tálamo, dejando algunas fibras colaterales en la formación reticular del tronco del encéfalo (Kevetter y Willis, 1982, 1983) y sustancia gris periacueductal (Harmann y cols., 1988). Las neuronas que lo conforman, son por tanto las neuronas de segundo orden en la vía ascendente. Los axones espinotalámicos alcanzan tanto el tálamo lateral como el tálamo

medial. Dentro las dianas del tracto en el tálamo lateral se incluyen el núcleo ventral posterolateral (VPL) y núcleo talámico posterior, mientras que entre las dianas dentro del tálamo medial se encuentran el núcleo central lateral y el núcleo submedial (Cliffer y cols., 1991; Craig y Burton, 1981; Lund y Webster, 1967; Peschanski y cols., 1983; Zemlan y cols., 1978).

El tracto espinoreticular está formado por las neuronas que hacen sinapsis en la lámina V, VII, VIII y X del asta dorsal de la médula (Chaouch y cols., 1983; Kevetter y Willis, 1982, 1983; Nahin y Micevych, 1986; Peschanski y Besson, 1984c). Son neuronas de segundo orden cuyos axones cruzan la línea media y ascienden hasta llegar a la formación reticular del tronco del encéfalo, desde donde a su vez se alcanzan los núcleos del tálamo intralaminar a través de colaterales (Kevetter y Willis, 1983).

El tracto espinomesencefálico está formado por las neuronas que hacen sinapsis en la lámina I, V y X del asta dorsal de la médula espinal (Cechetto y cols., 1985; Harmann y cols., 1988; Lima y Coimbra, 1989; Menétrey y cols., 1982; Pechura y Liu, 1986; Swett y cols., 1985; Yeziarski y Mendez, 1991). Los axones de las neuronas ascienden hasta la formación reticular del mesencéfalo y la sustancia gris periacueductal, y por la vía del haz espinoparabraquial se proyecta a los núcleos parabraquiales que es parte del sistema neuromodulador ascendente. A su vez las neuronas de estos núcleos se proyectan al núcleo amigdalino, componente principal del sistema límbico (Bernard y cols., 1989). También se alcanzan otras estructuras mesencefálicas como el núcleo intercolicular, las láminas profundas del colículo superior, núcleo pretectal anterior y posterior, y el núcleo rojo.

El tracto espinotalámico, que como hemos mencionado es el tracto más importante de transmisión de las señales nociceptivas, alcanza el tálamo donde se encuentra la neurona de tercer orden que se denomina neurona de proyección talamocortical, cuyo destino es la corteza somatosensorial primaria. El sistema anterolateral recibe un control descendente desde estructuras del tronco del encéfalo, que al mismo tiempo pueden ser activadas por el tracto espinomesencefálico y espinoreticular a través de las siguientes estructuras: el núcleo parabraquial lateral, sustancia Nigra, el núcleo del Raphe, locus coeruleus, núcleo pretectal posterior y la sustancia gris periacueductal ventrolateral (Bajic y Proudfit, 1999; Guilbaud y cols., 1977; Lee y Beitz, 1993).

Además, existe una modulación procedente de corteza somatosensorial, una vez que se percibe la información sensorial de temperatura y dolor, ya que regula o modula la respuesta de salida que se produce una vez integrada toda la información.

La información de temperatura y dolor procedente de la cara o rostro tiene el soma de la neurona de primer orden en el ganglio trigeminal y de ahí se proyecta al núcleo espinal del complejo trigeminal en el tronco del encéfalo. A partir de ese nivel de relevo se forman los diferentes tractos homólogos a los descritos anteriormente: tracto trigémino-talámico, trigémino-reticular y trigémino-mesencefálico.

Finalmente, desde el tálamo somatosensorial, la información proveniente de ambas vías (espinal-talámico y lemniscal) alcanza la corteza cerebral, en concreto el área somatosensorial primaria. En esta área se produce un procesamiento local, y la información es distribuida a otras regiones corticales y subcorticales que están implicadas en cada vía.

## **Breve perspectiva histórica: de la estimulación eléctrica cerebral macroscópica a la microestimulación intracortical y las neuroprótesis**

Aunque la estimulación eléctrica del cerebro es una técnica tan antigua como los experimentos de Galvani y Aldini (alrededor de 1800), su uso sistemático en el cerebro humano sigue siendo un desafío. Su evolución va desde macroelectrodos estimulantes colocados en el cuero cabelludo, hasta microelectrodos introducidos en capas seleccionadas de la corteza cerebral. Desde el siglo XIX, muchos investigadores coinciden en que la estimulación eléctrica del cerebro puede producir percepciones o movimientos naturales o no naturales, incluso sin la estimulación de los receptores sensoriales periféricos.

Las contribuciones pioneras en este campo de Bartholow, Hess, Penfield y Delgado, entre otros investigadores (Richer y cols., 1993), fueron el preámbulo de una nueva era en la que ahora es posible emplear microelectrodos intracorticales y tecnologías de interfaz cerebro-computadora en humanos. Sin embargo, dos artículos fueron pioneros directos.

Demostraron que la microestimulación intracortical "local" (que activa pocas neuronas corticales) podría ser suficiente para producir percepciones visuales (Salzman y cols., 1990) o táctiles (Romo y cols., 1998) que podrían correlacionarse con el movimiento visual o la discriminación táctil, respectivamente. Estos artículos motivaron una nueva investigación que muestra que la microestimulación intracortical "local" podría emplearse para informar al cerebro sobre la información "sensorial" de las extremidades robóticas en amputados y pacientes con tetraplejía, que ahora se está convirtiendo en una realidad (Berg y cols., 2013; Tabot y cols., 2013, 2015; Bensmaia y cols., 2014).

Las neuroprótesis ahora se emplean comúnmente en la investigación con animales (O'Doherty y cols., 2011, 2019; Thomson y cols., 2013; Tabot y cols., 2013, 2015; Klaes y cols., 2014; Devecioğlu y Güçlü, 2017). Son dispositivos diseñados para vincular el sistema nervioso central o periférico con el objetivo de mejorar las capacidades cognitivas, motoras o sensoriales de un organismo. Sin embargo, existen consideraciones clave al diseñar una neuroprótesis (Delhaye y cols., 2016). Además, pueden asociarse con interfaces cerebro-máquina, que utilizan la actividad neuronal registrada desde el cerebro para controlar dispositivos externos, como actuadores externos en prótesis de brazo. Por ejemplo, O'Doherty y cols., 2011 emplearon una interfaz cerebro-máquina-cerebro en primates para sugerir que las neuroprótesis podrían usar retroalimentación de microestimulación intracortical para generar percepciones somatosensoriales artificiales originadas a partir de brazos robóticos.

## **Posibles aplicaciones clínicas de la microestimulación intracortical en la corteza somatosensorial**

Se demostró que la microestimulación eléctrica intracortical de la corteza somatosensorial humana provoca sensaciones táctiles naturales (Flesher y cols., 2016; Armenta Salas y cols., 2018; Lee y cols., 2018), así como la posibilidad de percepciones que recrean la exploración activa de texturas (O'Doherty y cols., 2019). Estos hallazgos hacen de esta técnica un área de investigación prometedora con posibles aplicaciones clínicas en pacientes tetrapléjicos. Sin embargo, la estimulación máxima debe establecerse en 100  $\mu$ A para evitar daños en los tejidos neurales (Chen y cols., 2014). Por tanto, será necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan el uso práctico de la microestimulación

intracortical en un rango seguro de baja intensidad (Kim y cols., 2015a, b). Recientemente, Armenta Salas y cols., 2018 restauraron con éxito las sensaciones táctiles y propioceptivas perdidas en un paciente tetrapléjico activando directamente las neuronas somatosensoriales en el cerebro. Aplicaron microestimulación eléctrica a través de electrodos intracorticales implantados quirúrgicamente en la corteza somatosensorial. Sin embargo, el rango de intensidades de microestimulación varió de 40 a 100  $\mu$ A para provocar una variedad de sensaciones como "apretón", "golpe", "movimiento correcto", "vibración", "soplo", "movimiento hacia adelante", "pellizco", "Presionar", "movimiento ascendente" y "piel de gallina". Tal rango de microestimulación podría ser problemático en el caso de que los electrodos intracorticales y las neuronas estimuladas necesiten permanecer viables durante años. Por lo tanto, deben emplearse niveles de microestimulación de menor intensidad para garantizar una interfaz neuronal duradera con el cerebro. Esto es importante porque el rango limitado de intensidades seguras de microestimulación intracortical también limita el rango dinámico de las sensaciones evocadas (Kim y cols., 2015b).

Los resultados antes mencionados están relacionados con estudios previos con otros electrodos de estimulación (Bowling y Banissy, 2017; Lee y cols., 2018), y con microestimulación intracortical del humano (Flesher y cols., 2016), primate (Romo y cols., 2016). , 1998, 2000; Medina y cols., 2012; Kim y cols., 2015a, b; Klaes y cols., 2014; Overstreet y cols., 2016; Callier y cols., 2020) y rata (Berg y Kleinfeld, 2003 ; Pais-Vieira y cols., 2013, 2015; Devecioğlu y Güçlü, 2017; Wang y cols., 2018; Öztürk y cols., 2019; Venkatraman y cols., 2008; Sievert y Neafsey, 1986; Izraeli y Porter, 1995; Butovas y Schwarz, 2007; Azin y cols., 2011; DeCosta-Fortune y cols., 2020) corteza somatosensorial.

## **Papel potencial del ruido eléctrico y óptico para mejorar la microestimulación intracortical en la corteza somatosensorial**

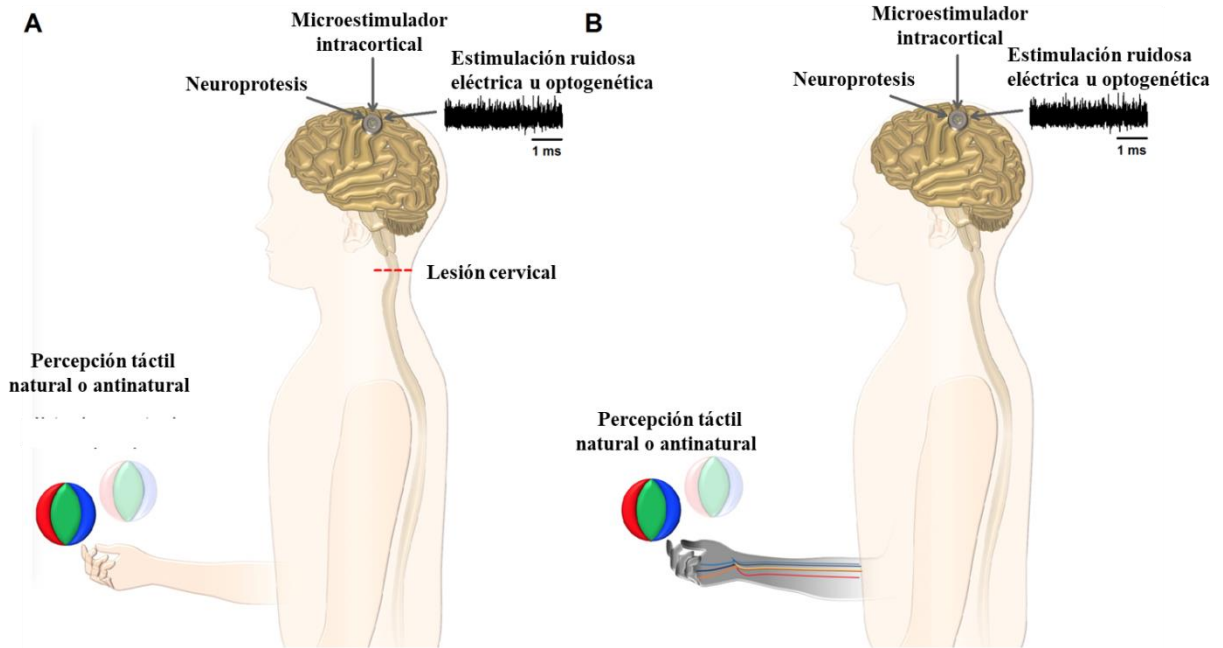
El papel potencial del ruido en la mejora de la microestimulación intracortical se demostró por primera vez en primates (Medina y cols., 2012). La aplicación de ruido eléctrico moderado a la corteza somatosensorial primaria (S1) mejora la sensación táctil artificial producida por la microestimulación intracortical en monos rhesus (Medina y cols., 2012). Por lo tanto, sugiere fuertemente que el ruido eléctrico aplicado a la corteza somatosensorial podría emplearse para mejorar la percepción táctil (Medina y cols., 2012) y el aumento de la función cerebral a través de interfaces cerebro-máquina (Lebedev y cols., 2018).

Por lo tanto, se podría administrar ruido eléctrico u optogenético a la corteza cerebral para potenciar las sensaciones protésicas generadas por la microestimulación intracortical, con la idea de que dicha estrategia se pudiera extender a sensaciones protésicas de diferentes modalidades.

Desde una perspectiva general, la tRNS, también es útil para mejorar la estimulación magnética transcraneal (TMS, transcranial magnetic stimulation, por sus siglas en inglés) en humanos (Terney y cols., 2008). Se demostró que 10 minutos de tRNS administrados continuamente en la corteza motora primaria mejoran la excitabilidad cerebral, lo que a su vez aumenta la amplitud de los potenciales provocados motores por la TMS (Terney y cols., 2008). Por lo tanto, no es necesario aumentar la intensidad de la TMS para aumentar la amplitud de los potenciales provocados motores. El ruido eléctrico administrado es suficiente para generar una mejora en la estimulación de la TMS a través de una mayor excitabilidad en el cerebro. En analogía con este esquema general, previamente administramos (Remedios y cols., 2019) estimulación eléctrica de ruido aleatorio (RNS, random noise stimulation, por sus siglas en inglés) de corta duración aplicada directamente en neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial de la rata wistar. Aplicamos rampas de voltaje para provocar corrientes de Na<sup>+</sup>. Observamos que la aplicación de RNS eléctrico produce un aumento concomitante de la amplitud pico de la corriente de Na<sup>+</sup>. De la misma manera, Huidobro y cols., 2017 aplicaron RNS optogenética en la corteza de los barriles de ratones transgénicos que expresan canalrodopsina-2 (Thy1-ChR2-YFP).

Descubrieron que la RNS optogenética incrementa los potenciales provocados somatosensoriales ocasionados por la estimulación mecánica de las vibrisas en tales animales. En un estudio posterior, estos autores encontraron que la RNS optogenética también aumenta la frecuencia de potenciales de acción de la corteza de los barriles a la estimulación somatosensorial en el mismo tipo de animales (Huidobro y cols., 2018). Recientemente (Mabil y cols., 2020), replicamos los experimentos de Remedios y cols., 2019, pero en ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP, utilizando RNS optogenética en lugar de RNS eléctrico. Encontramos que la RNS optogenética también era capaz de aumentar la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales somatosensoriales provocadas por las rampas de voltaje.

El punto principal derivado de tales estudios, es que bajos niveles de microestimulación podrían ser suficientes para producir corrientes de Na<sup>+</sup> de mayor amplitud durante la administración de ruido eléctrico u óptico a las células piramidales. Por lo tanto, estos hallazgos, junto con los de Medina y cols., (2012), apoyan la viabilidad del ruido eléctrico y óptico para potenciar las sensaciones táctiles protésicas generadas por la microestimulación intracortical (Figura 8). Por ejemplo, podría ser posible que la RNS optogenética (combinada con optogenética en neuronas piramidales humanas) pudiera agregarse a interfaces protésicas de larga duración para permitir el uso de electrodos intracorticales con niveles de microestimulación de menor intensidad. Esto significa que la luz ruidosa, o los estímulos eléctricos ruidosos, podrían emplearse para mejorar la efectividad de la microestimulación intracortical segura a intensidades eléctricas más bajas en las tecnologías de interfaz cerebro-máquina. Estudios previos apoyan esta posibilidad (Pisanello y cols., 2016; Opris y cols., 2020). La importancia de nuestra propuesta está en línea con estudios relacionados con la mejora de la calidad y el rendimiento a largo plazo de la actividad neuronal en interfaces cerebro-máquina (Nicoletis, 2003; Levedev y Nicoletis, 2006; O'Doherty y cols., 2009; Levedev y cols., 2011; Levedev y Nicoletis, 2017). Entonces, con las nuevas tecnologías de neuroprótesis y el ruido eléctrico u óptico, las sensaciones en animales provocadas por microestimulación intracortical podrían mantenerse estables a lo largo de los años (Callier y cols., 2015; Mabil y cols., 2020).



**Figura 8 | El potencial del ruido aleatorio mediante microestimulación intracortical en neuroprótesis táctiles (Tomado de Mabil et al., 2021).**

---

---

---

# CAPÍTULO 1

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

---

---

En el año 2008, Terney y colaboradores publicaron el primer trabajo sobre un incremento en la excitabilidad de la corteza motora cerebral producido por la tRNS. El experimento que realizaron estos autores consistió en lo siguiente. Primero, aplicaron pulsos sucesivos de estimulación magnética transcraneal en la corteza motora, para producir una respuesta electromiográfica promedio del músculo interóseo de la mano: Dicha respuesta electromiográfica se conoce como potencial provocado motor. Segundo, examinaron el cambio en amplitud de dicho potencial provocado motor después de la aplicación de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria durante un intervalo de 10 minutos en la misma corteza motora. Tercero, estos autores encontraron que la amplitud del potencial provocado motor se incrementó paulatinamente después de la estimulación eléctrica y dicho incremento perduró hasta por una hora. Cuartom, este incremento se interpretó como un cambio en la excitabilidad de la corteza motora producido por la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria de larga duración. Este hallazgo dio pie a un gran número de estudios en el humano; sin embargo, aún no hay estudios en la literatura que examinen si este fenómeno de incremento en la excitabilidad también ocurre con las corrientes de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales de la corteza cerebral en modelos animales.

Por ello, el propósito del presente estudio es explorar los mecanismos fisiológicos que intervienen en la facilitación de la actividad eléctrica neuronal provocada por efecto del ruido eléctrico y optogenético sobre neuronas piramidales aisladas de ratas wistar y de ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP, respectivavente.

Si el SNC se comporta como un sistema no lineal, entonces es de esperarse que exhiba fenómenos tales como la resonancia estocástica en sus respuestas sensoriales. Sin embargo, aún queda incierto el mecanismo inherente que promueve un incremento en su excitabilidad durante largos periodos después de aplicar estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria de larga o corta duración (Terney y cols., 2009).

---

---

# **CAPÍTULO 1**

## **HIPÓTESIS**

---

---

Las neuronas piramidales exhiben un incremento significativo en la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> como consecuencia de la estimulación ruidosa eléctrica y optogenética de corta y larga duración.

---

---

# CAPÍTULO 1

## OBJETIVO GENERAL

---

---

Estudiar los efectos de la estimulación eléctrica y optogenética ruidosa de corta y larga duración sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial.

### Objetivos particulares

- 1). Caracterizar los cambios en las corrientes de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial de ratas wistar, durante la aplicación de cinco niveles de estimulación eléctrica.
- 2). Estudiar cambios en la excitabilidad de neuronas piramidales aisladas ante estímulos optogenéticos de ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP.
- 3). Estudiar los efectos de largo alcance de la estimulación eléctrica ruidosa sostenida sobre la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> de la corteza somatosensorial de ratas wistar.
- 4). Estudiar los efectos de largo alcance de la estimulación optogenética ruidosa sostenida sobre la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> de la corteza somatosensorial de ratas wistar transgénicas.

---

---

## CAPÍTULO 2

# EFFECTO DEL RUIDO ELÉCTRICO SOBRE LA CORRIENTE DE $\text{Na}^+$ EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS WISTAR

---

---

## INTRODUCCIÓN

Terney y col. (2008) encontraron que la tRNS en el cerebro humano induce fuertes aumentos de excitabilidad que duran hasta 60 minutos después del estímulo. Estos autores sugirieron que tal fenómeno podría atribuirse a la apertura repetida de canales de  $\text{Na}^+$  (Chaieb y cols., 2015); sin embargo, hay una falta de conocimiento de los mecanismos neuronales subyacentes. El primer paso lógico para comprender los mecanismos a nivel celular es analizar el impacto de la tRNS en neuronas individuales y en una ventana de tiempo en la que se producen las corrientes de  $\text{Na}^+$ .

En la literatura, hay evidencias convincentes que respaldan esta idea. Bezrukov y Vodyanoy (1995, 1997), mostraron la existencia de efectos de ruido eléctrico a nivel subcelular en bicapas lipídicas artificiales. Estos autores agregaron el polipéptido alameticina a una bicapa lipídica artificial para promover la formación de canales iónicos de alameticina dependientes de voltaje. Encontraron un perfil en forma de U invertida de la magnitud de corriente a lo largo de estos canales en función del nivel de ruido eléctrico aplicado en la entrada. Gluckman y cols., (1996) mostraron que los campos eléctricos ruidosos aplicado directamente a las neuronas del hipocampo, produjo un aumento de la actividad eléctrica extracelular. En su estudio, Gluckman y cols., (1996) la señal y el ruido

que aplicaban sobre las neuronas lo hacían con los mismos electrodos (Electrodos de Ag-AgCl).

Posteriormente, Stacey y cols., (2000) realizaron un diseño experimental más detallado en el mismo tipo de cortes cerebrales. Demostraron que los registros de múltiples unidades neuronales podrían aumentar su actividad de disparo a través de entradas sinápticas en el hipocampo para un nivel particular de ruido eléctrico. En un estudio más reciente, (Onorato y cols., 2016) realizaron los registros fijación de voltaje de células completas en neuronas de cultivo de los ganglios de la raíz dorsal del ratón (DRG, dorsal root ganglia, por sus siglas en inglés) y ruido añadido (es decir, RNS eléctrico) antes o durante la despolarización. Descubrieron que el RNS eléctrico mejora el disparo del potencial de acción en neuronas del DRG y sugirieron que este aumento se produjo por la activación concurrente de los canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje, a través del fenómeno de resonancia estocástica. Sin embargo, en este estudio, los autores no realizaron experimentos de fijación de voltaje para provocar corrientes de Na<sup>+</sup> y no verificaron que las corrientes de Na<sup>+</sup> eran sensibles a TTX. Hasta donde sabemos, no hay informes en la literatura sobre la aplicación de RNS eléctrico en células aisladas. Además, el principal problema encontrado para explorar los mecanismos funcionales a nivel celular, ha sido la dificultad de ajustar directamente el nivel de ruido de las neuronas con ruido eléctrico continuo. Este problema ha sido una tarea desafiante desde hace muchos años (Segundo y cols., 1994; Faisal y cols., 2008). La raíz del problema podría ser que la estimulación eléctrica en neuronas biológicas reales podría producir ambigüedades porque activa muchos tipos de canales iónicos. Por tanto, es necesario introducir nuevos paradigmas para activar los canales iónicos con ruido de forma selectiva. La presente tesis de doctorado tuvo como objetivo examinar los efectos del RNS eléctrico de corta duración (durante 250 ms) sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales de la corteza somatosensorial. Empleamos la técnica *in vitro* de fijación de voltaje para obtener las corrientes de Na<sup>+</sup> sensibles a TTX de las neuronas piramidales aisladas de forma aguda de ratas Wistar, con bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Examinamos los efectos del ruido eléctrico de corta duración adicionado a las rampas de voltaje, con el fin de examinar la cinética de las corrientes de Na<sup>+</sup>. Nuestros resultados ayudarán en el estudio de los mecanismos fisiológicos que intervienen en el efecto de la RNS eléctrica de corta duración sobre las neuronas. Los resultados obtenidos de nuestro

trabajo serán de interés para comprender los mecanismos de la tRNS de corta duración en el cerebro humano (Antal y Herrmann, 2016; Fertoni y Miniussi, 2016).

---

---

---

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---

---

#### **Procedimientos generales**

Los experimentos se realizaron en siete ratas Wistar (Peso medio 100-150 g). Los animales se mantuvieron con luz y temperatura controlada (luces encendidas de 6 a.m a 6 p.m) con libre acceso a alimentos y agua. Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos del Consejo de las Comunidades Europeas Directiva del 24 de noviembre de 1986 (86/609 / CEE), las directrices contenida en la “Norma-Oficial-Mexicana-NOM-062-ZOO1999” y la Guía para la Atención de los Institutos Nacionales de Salud y Uso de animales de laboratorio (85-23, revisado en 1985).

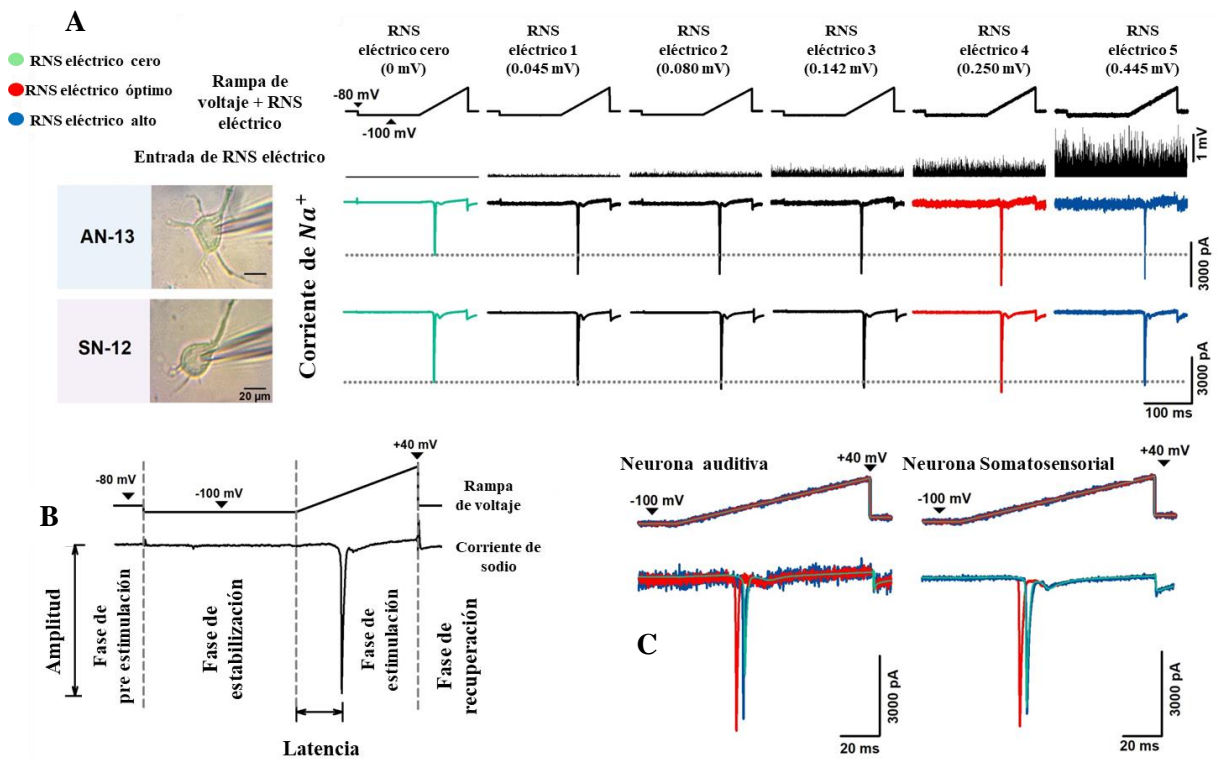
Las ratas Wistar fueron adquiridas del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética (CICUAL-Proyecto-004032) de la BUAP.

Los experimentos se realizaron con la colaboración del Dr. Jorge Luis Flores Hernández y del Dr. Oswaldo Torres Ramírez del laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la BUAP.

Obtuvimos los registros de las corrientes de Na<sup>+</sup> de 34 neuronas piramidales disociadas extraídas de la corteza somatosensorial primaria (SN, n = 16) y de la corteza auditiva (AN, n = 18), las cuales fueron aisladas de forma aguda después de seguir los métodos de disociación celular descritos previamente en la literatura (Bargas y cols., 1994; Flores Hernandez y cols., 2002). Las ratas fueron anestesiadas con halotano y posteriormente decapitadas. Sus cerebros fueron diseccionados y colocados en una solución fría de isetionato con bajo contenido de calcio (en mM): 140 isetionato de Na<sup>+</sup>, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 23 glucosa, 15 HEPES, pH = 7.4, 300-310 mOsm / L y también fueron suplementados con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido quinurénico, gaseado con O<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 350 µm de grosor, que se obtuvieron de la corteza somatosensorial o auditiva utilizando un vibratomo comercial (Campden). Las rebanadas se mantuvieron a temperatura ambiente (20–22 ° C) en solución de Earle's salina balanceada (SIGMA), y en bicarbonato de Na<sup>+</sup> (NaHCO<sub>3</sub>). Se complementaron con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, ácido quinurénico; gaseado con 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300–310 mOsm / l. Después de al menos 1 hora de incubación, cada rebanada se colocó en digestión enzimática. Empleamos una cámara de crecimiento con 40 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, Sigma) con HEPES burbujeadado con O<sub>2</sub> que contiene 0,375 mg / ml de Papaína (Calbiochem) a 35 ° C durante 15 min. Se complementó con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NGnitro-L-arginina, 1 ácido quinurénico. Después de la digestión enzimática, el tejido se lavó con solución fría de isetionato y se disoció mecánicamente con varias pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). Con este procedimiento, se logró aislar a las neuronas. Una muestra de dicha suspensión celular se colocó en un plato de Petri (poliestireno de 35 mm; Nunclon Surface, NUNC) y se usó un microscopio invertido para identificar las neuronas piramidales. La Figura 16A muestra dos neuronas piramidales, una de la corteza auditiva (AN) y una de la corteza somatosensorial (SN). Después de 10 min de incubación se lavó la suspensión con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, y rojo fenol al 1%, gasificado con O<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300–310 mOsm / l. Finalmente, aplicamos una rampa de voltaje a la célula para obtener los registros de las neuronas seleccionadas. Empleamos un amplificador Multiclamp 700

(Dispositivos moleculares, Axon Instruments Foster City, CA), controlado por el software pClamp-10 (Axon Instruments), ejecutándose en una PC conectada a una Digidata 1440A (Molecular Devices, Axon Instruments). La resistencia de los electrodos en el baño fue de 4-8 MΩ. Después de romper el sello, seleccionamos las células cuya resistencia de acceso (resistencia en serie) fue igual o menor a 30 MΩ.

Tras la disociación, observamos con un microscopio invertido las células piramidales de la corteza somatosensorial o auditiva. Seleccionamos las células de mayor tamaño que mantuvieran una forma piramidal o de pera, y que su membrana fuera visiblemente lisa y densa.



**Figura 9. Representación del método para analizar los efectos de RNS eléctrico en la amplitud máxima de las corrientes de  $Na^+$  producidas por un protocolo de rampa de voltaje en neuronas disociadas de ratas Wistar.** (A) A la izquierda, imágenes de dos células piramidales, una de la corteza auditiva y otra de la corteza somatosensorial. A la derecha, rampas de voltaje y las corrientes de  $Na^+$  para las condiciones de RNS eléctrico cero y cinco niveles diferentes de RNS eléctrico. (B) Detalles de la rampa de voltaje y cómo se midieron la amplitud máxima y la latencia de la corriente de  $Na^+$ . (C) Trazos

superpuestos de tres rampas de fijación de voltaje y corrientes de Na<sup>+</sup> para tres niveles de ruido: RNS eléctrico cero (verde), RNS eléctrico óptimo (rojo) y RNS eléctrico alto (azul).

Las neuronas registradas se estimularon con seis grupos de 10 rampas de voltaje de 100 ms de duración, de -100 a + 40 mV, con un voltaje basal de -80 mV (Figura 9B). La duración previa al pulso fue de -80 a -100 mV hasta los 125 ms. Al final de cada rampa, el voltaje vuelve al voltaje basal. Se usaron rampas de voltaje ya que tienen la ventaja de generar relaciones directas entre la fijación de voltaje y la corriente de un canal iónico. Por lo tanto, son adecuadas para el estudio de la latencia de activación de dichos canales.

## **Detalles del ruido eléctrico aplicado a las células piramidales de ratas Wistar**

Las neuronas piramidales se estimularon con RNS eléctrico de corta duración (250ms), que consistió en adicionar a la rampa de voltaje cinco diferentes niveles de ruido eléctrico. El ruido se adicionó como una señal extra a la rampa de voltaje. El primer ruido fue de  $\pm 1.1$  mV, el segundo ruido fue de  $\pm 2.2$  mV, el tercer ruido fue de  $\pm 3.3$  mV, el cuarto ruido de  $\pm 4.5$  mV y el quinto ruido fue de  $\pm 5.6$  mV.

Este RNS eléctrico se aplicó a través de la misma micropipeta con que se hicieron los registros de las corrientes de Na<sup>+</sup>. El paradigma experimental del RNS eléctrico se ilustra en la Figura 9A. El segundo conjunto de gráficas en el lado derecho de la Figura 9A, muestra la señal eléctrica ruidosa que se suma al protocolo de rampa de voltaje mostrado en la parte de arriba. El espectro de potencia de este RNS eléctrico es Browniano en el rango de frecuencia de 0 a 5000 Hz (Huidobro y cols., 2017, 2018).

## **Protocolo de estimulación de las células piramidales**

El protocolo de estimulación consistió en aplicar una serie de seis rampas de voltaje, adicionadas con un nivel distinto de RNS eléctrico descritos en la sección anterior, a cada una de las 34 neuronas piramidales. Cada nivel de RNS eléctrico se aplicó continuamente durante todo el protocolo de fijación de voltaje y se fueron presentaron en un orden aleatorio. Además, para evitar adaptación del sistema, se incluyeron intervalos de descanso de 3 segundos entre niveles de RNS eléctrico.

El método que usamos para analizar los efectos del RNS eléctrico en las amplitudes de las corrientes de  $\text{Na}^+$  provocadas por un protocolo de rampa de voltaje fue el aumento de la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  para intensidades intermedias de RNS eléctrico (Figura 9A. registros en rojo). En la Figura 9B mostramos detalles de la rampa de voltaje y cómo se midieron la amplitud máxima y la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$ . En la Figura 9C mostramos los trazos superpuestos de tres corrientes de  $\text{Na}^+$  de una neurona piramidal para tres niveles de ruido: RNS eléctrico cero (verde), RNS eléctrico óptimo (rojo) y RNS eléctrico alto (azul).

## **Análisis de Datos**

Calculamos la amplitud máxima y la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$  para todos los niveles de RNS eléctrico. Debido a que los diferentes niveles de RNS eléctrico produjeron cambios en la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$ , también usamos esta variable para analizar los efectos de RNS eléctrico en el registro de las células piramidales. Finalmente, medimos dicha latencia desde el comienzo de la rampa hasta el pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  como se ilustra en la Figura 9B. Esta medida se utilizó para cuantificar el inverso de la latencia del pico de corriente de  $\text{Na}^+$ .

## **Análisis estadístico**

Para probar alguna diferencia estadísticamente significativa en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia, las comparamos en las siguientes condiciones: RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico 1, RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico 2, RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico 3, RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico 4, RNS eléctrico cero vs RNS eléctrico 5. Usamos las pruebas de rango con signo no paramétricas por pares para examinar la significancia estadística de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> o la inversa de su latencia. Comparamos las condiciones mencionadas anteriormente de RNS eléctrico, en las 34 neuronas, bajo la hipótesis nula de que las diferencias en las medias entre tales condiciones fueron cero. Debido a las múltiples comparaciones, utilizamos un Ajuste Bonferroni. También realizamos un análisis de regresión lineal y calculamos la correlación de Pearson y su significado. Las barras de error indican la desviación estándar. Las comparaciones se consideraron significativas si  $p < 0.05$ .

---

---

---

## CAPÍTULO 2

### RESULTADOS

---

---

---

Analizamos los efectos del RNS eléctrico sobre la corriente de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX (Figura 14) de 34 células piramidales (AN, auditory neuron por sus siglas en inglés,  $n=18$  y SN, Somatosensory neuron por sus siglas en inglés,  $n=16$ ). Verificamos que todas las neuronas exhibieran una forma piramidal independientemente de su tamaño, como se ilustra en las imágenes de la Figura 9A. En particular, analizamos los efectos del RNS eléctrico en la amplitud máxima y la latencia de las corrientes de  $\text{Na}^+$  registradas en estas células disociadas. Registramos las corriente de  $\text{Na}^+$  de neuronas piramidales auditivas y somatosensoriales como se ilustra en la Figura 9A. Las imágenes inferiores a la derecha de la Figura 9A muestran los efectos sobre las amplitudes máximas de las corriente de  $\text{Na}^+$  de seis niveles de RNS eléctrico (RNS eléctrico cero, RNS eléctrico 1, RNS eléctrico 2, RNS eléctrico 3, RNS eléctrico 4, RNS eléctrico 5) provocada por las rampas de voltaje.

La Figura 9C muestra registros superpuestos de las corrientes de  $\text{Na}^+$  para estas neuronas durante las condiciones control RNS eléctrico cero (corriente verde), RNS eléctrico óptimo (corriente roja) y RNS eléctrico alto (corriente azul). De tal modo, que para estas neuronas seleccionadas, la aplicación de un nivel óptimo de ruido produce un aumento en el pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  y una reducción concomitante con su latencia (gráficas en color rojo en el panel inferior de la Figura 9C). Sin embargo, hubo casos en donde la correlación entre la amplitud pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  y la inversa de su latencia para los diferentes niveles de RNS eléctrico exhibió diferentes perfiles. Por lo tanto, analizamos en detalle dicha correlación. Sorprendentemente, este análisis de correlación sirvió como criterio de

agrupación. Descubrimos que todas las neuronas podrían ser clasificadas en tres grupos diferentes. El primer grupo, exhibió una correlación positiva, el segundo, una correlación negativa, y el tercer grupo de neuronas no mostró correlación. En la Figura 10, se ilustra una correlación entre la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  y su latencia para 15 neuronas piramidales. Cada punto corresponde a un nivel de RNS eléctrico distinto. También estamos mostrando los coeficientes de correlación  $r$  para estas 15 células piramidales. Las 34 neuronas se clasificaron en estos tres grupos (ver Tabla 3 para el análisis de correlación de Pearson). El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el valor de su significancia, entre la amplitud pico de la Corriente de  $\text{Na}^+$  y la inversa de su latencia, se utilizaron como criterios de agrupación. Grupo 1 (signo + y / o  $p < 0.05$ , denominado correlación positiva, es decir, +  $r$ ), Grupo 2 (signo - y / o  $p < 0.05$ , denominada correlación negativa, es decir, - $r$ ), Grupo 3 (+ o - signo pero  $p > 0.2$ , denominado sin correlación). Cada punto gris representa las medidas experimentales para un nivel de RNS eléctrico y la línea verde se obtuvo con regresión lineal (Remedios y cols., 2019).

La Tabla 1 muestra que hubo una correlación de Pearson positiva (+  $r$ ,  $p < 0.05$ ) entre la amplitud pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  y la inversa de su latencia para seis neuronas (AN-13, AN-14, SN-12, SN-15, SN-16 y SN-24). Además, para 10 neuronas (AN-07, AN-09, AN-15, AN-18, AN-24, SN-09, SN-11, SN-13, SN-14 y SN-23), hubo una correlación de Pearson negativa (- $r$ ,  $p < 0.05$ ) entre la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Na}^+$  y la inversa de su latencia. La Tabla 1 también muestra 10 neuronas que no presentaron correlación de Pearson (- $r$  o +  $r$ ,  $p > 0.2$ , NS) entre la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Na}^+$  y el inverso de su latencia (AN-03, AN-08, AN-12, AN-16, AN-17, AN-22, AN-23, SN-05, SN-20 y SN-22). La Figura 11 sigue los criterios de agrupación ilustrados en la Figura 10, es decir, Agrupando las neuronas de acuerdo a su tipo de correlación de Pearson, pero relacionando la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  y el inverso de su latencia contra el nivel de RNS eléctrico para todas las neuronas piramidales. En la Figura 11 mostramos los datos agrupados para todas estas neuronas separadas en los tres grupos.

En el primer grupo (correlación positiva), observamos que tanto las gráficas de amplitud corriente de  $\text{Na}^+$  y la inversa de su latencia siguen perfiles similares de funciones en forma de U invertidas en relación con el nivel de RNS eléctrico (Figura 11A). Es decir, en este

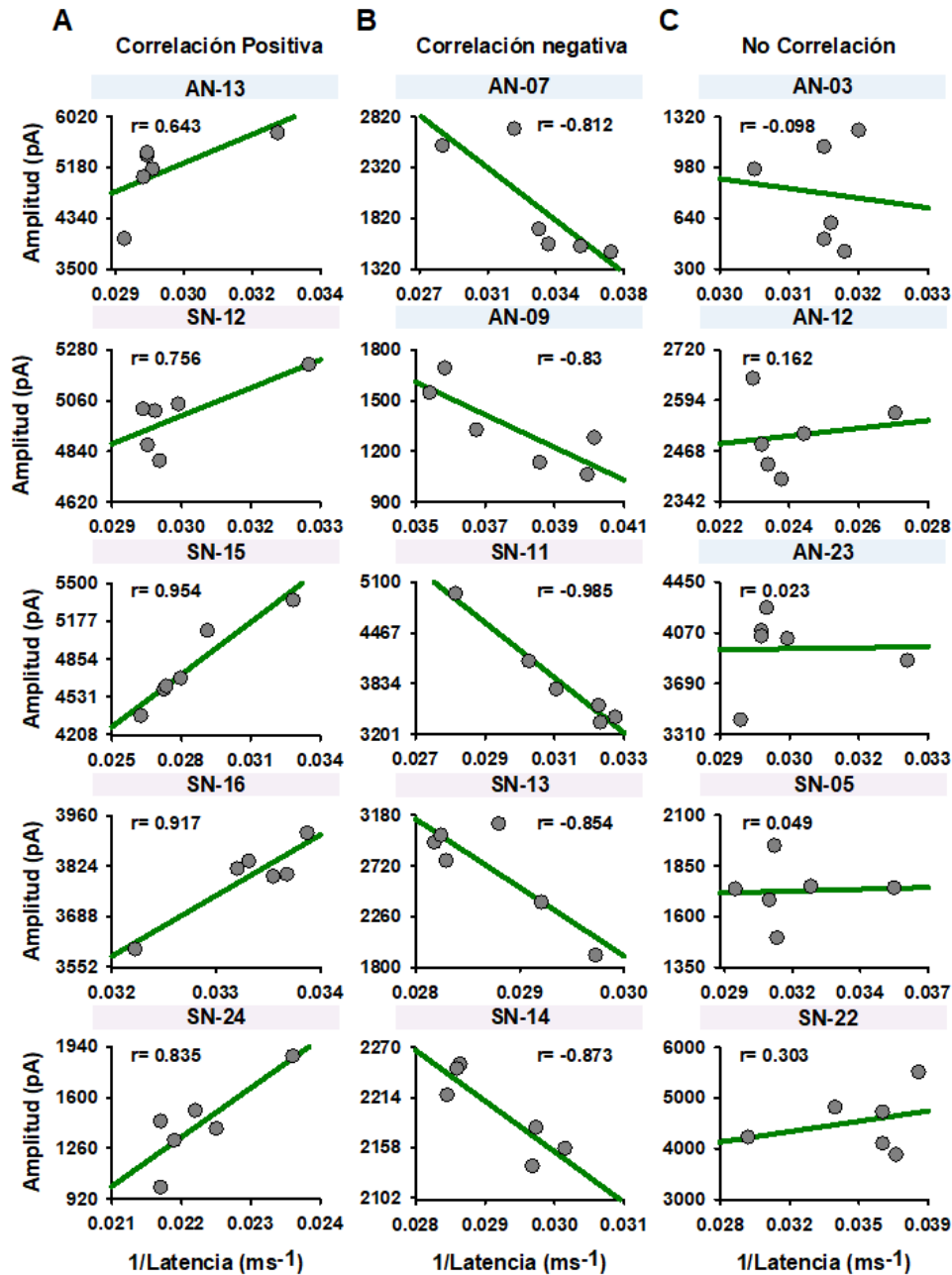
grupo, los valores máximos de estas funciones en forma de U invertidas ocurrieron en los mismos niveles de RNS eléctrico. En el segundo grupo (correlación negativa), la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> sensible a TTX y la inversa de su latencia siguieron perfiles diferentes de funciones U invertidas en relación con el nivel de RNS eléctrico (Figura 11B). En este grupo, los valores máximos de estas funciones de U invertidas ocurrieron en diferentes niveles de RNS eléctrico. En el tercer grupo (sin correlación), solo la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> mostró una clara función en forma de U invertida, pero la inversa de su latencia versus el RNS eléctrico no exhibieron un perfil que indicara que se estaba siguiendo una función en forma de U invertida (ver círculos rojos en la Figura 11C). En este grupo, los valores máximos de las funciones ocurrieron en diferentes niveles de RNS (ver círculos rojos en la Figura 11C). Para comprender con más detalle los cambios en amplitud y latencia, mostramos en la Figura 12 un zoom de los picos de corrientes de Na<sup>+</sup> para tres neuronas piramidales representativas (PN) de cada uno de tipos de correlación, registrados en las tres condiciones de RNS eléctrico, cero, óptimas y alta. Se muestra que el pico de la amplitud para la condición RNS eléctrico óptima (gráfica en rojo) es mayor que la amplitud máxima asociada con el RNS eléctrico cero (registro en verde) o la condición RNS eléctrico alta (registro en azul). La Figura 12A ilustra los registros de la corriente de Na<sup>+</sup> para el primer tipo de correlación (correlación positiva) y nos muestra, claramente, que tanto la amplitud como la inversa de su latencia son aumentadas para el nivel óptimo de RNS eléctrico (registro en rojo) y es por eso que están correlacionadas positivamente. En cambio para el grupo que presenta correlación negativa, Figura 12B, se observó que la latencia de los trazos rojos es menor que la latencia para la condición de control RNS eléctrico cero (registro en verde). Esto indica que hay un nivel óptimo de RNS eléctrico para el cual se reduce la latencia de la corriente de Na<sup>+</sup> (es decir, su inverso esta aumentado).

Por otro lado en la Figura 12C (sin correlación) se muestran que la latencia de los registros en rojo (respuesta óptima en amplitud) se encuentra en un valor intermedio entre la latencia para la condición de RNS eléctrico cero (registro en verde) y la latencia para la condición RNS eléctrico alto (registro en azul).

En las Figuras 13A, B y C mostramos los promedios globales de las amplitudes e inversas de sus latencias para las corrientes de Na<sup>+</sup>, que se obtuvieron de las neuronas piramidales auditivas y somatosensoriales para los tres grupos de correlación (correlación positiva, correlación negativa y sin correlación). Para todas las neuronas piramidales del primer y segundo grupo de correlación se observa que la amplitud pico de la corriente de Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia siguen una forma de U invertida en función del nivel de RNS eléctrico aplicado. Sin embargo, para el tercer grupo (sin correlación), solo la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> exhibe la forma de U invertida en función del nivel de RNS eléctrico aplicado.

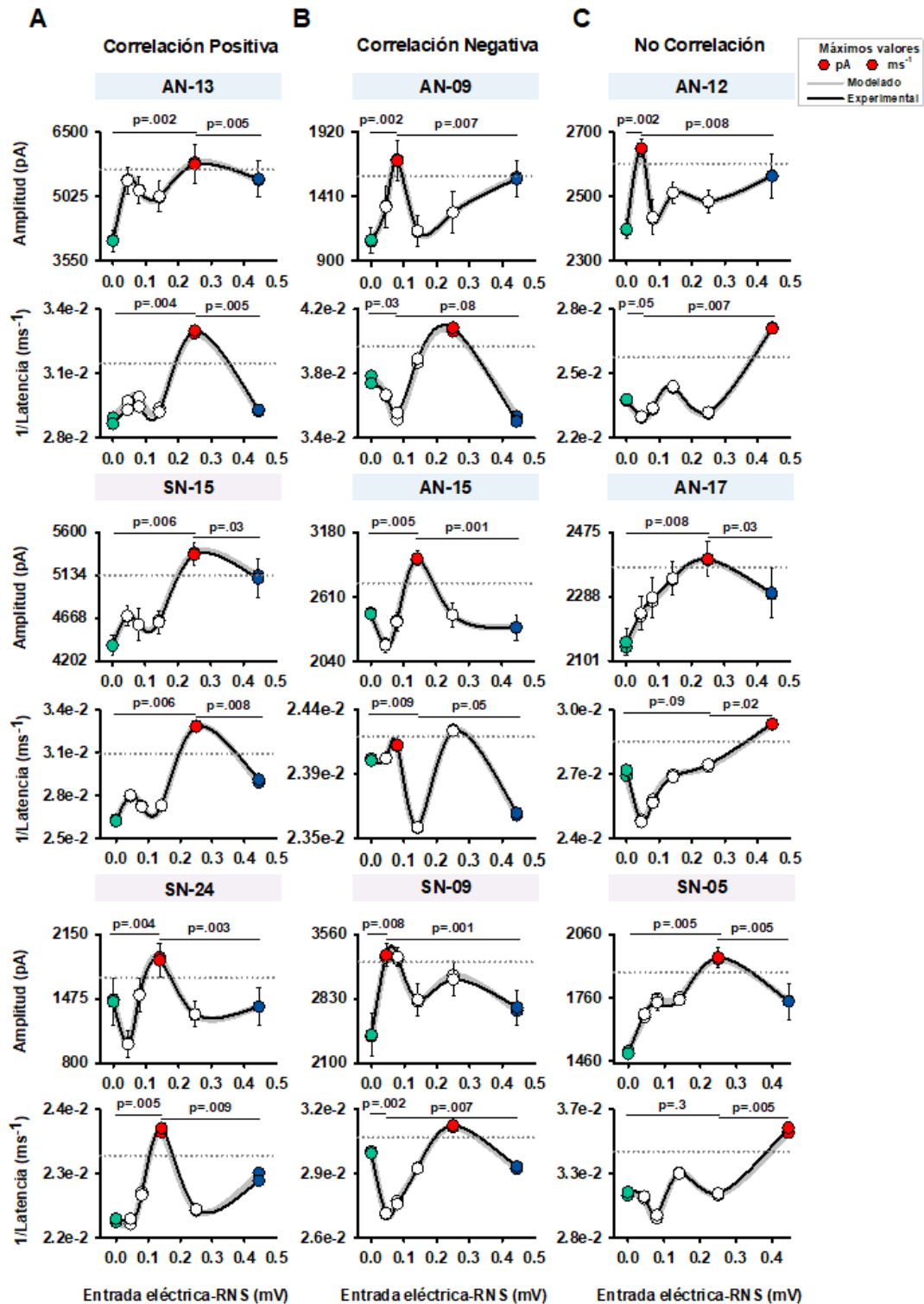
En contraste, en la Figura 13B (correlación negativa) y Figura 13C (sin correlación), los valores máximos para el pico de la amplitud y la inversa de su latencia se producen en diferentes niveles de RNS eléctrico (ver círculos rojos). Además, existen otras claras diferencias entre los tres grupos. Primero, el grupo con una correlación positiva (Figura 13 A) exhibe una forma de U invertida tanto para la amplitud como para la inversa de la latencia de la corriente de Na<sup>+</sup> frente al nivel de RNS eléctrico. En segundo lugar, el grupo con correlación negativa (Figura 13 B) exhibe diferentes formas en las funciones en forma de U invertida para tanto la amplitud como la inversa de la latencia versus el nivel de RNS eléctrico. En tercer lugar, el grupo sin correlación (Figura 13C) no exhibió una función similar a una U invertida en la inversa de su latencia versus el nivel de RNS eléctrico.

Mediante la prueba no paramétrica de rango con signo también se descubrieron diferencias significativas entre "RNS eléctrico cero" versus "RNS eléctrico óptimo" y "RNS eléctrico óptimo" versus "RNS eléctrico alto" para la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de todos los grupos, pero no para la inversa de latencia del tercer grupo. Los valores p están indicados en cada gráfico.



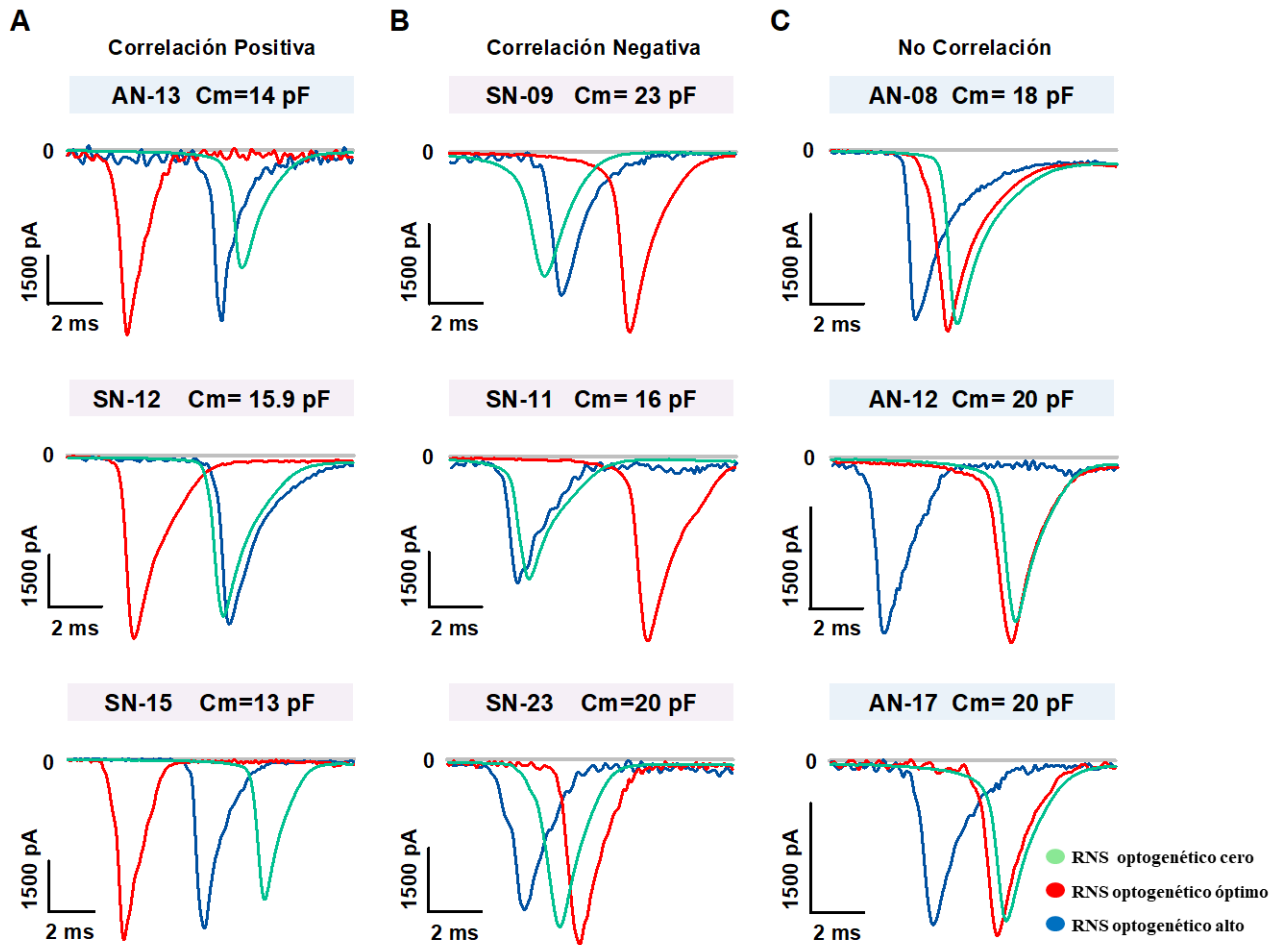
**Figura 10 |** Gráficos de la amplitud pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  versus el inverso de su latencia agrupados según un criterio de correlación. Se midieron la amplitud y latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$  como se indica en la Figura 16B para los seis niveles de RNS eléctrico. (A) Gráficos obtenidos de cinco neuronas piramidales que exhibieron una correlación positiva entre la amplitud pico de la corriente de  $\text{Na}^+$  versus su inversa de latencia. (B) Lo mismo que A, pero para otras cinco neuronas piramidales que presentan una correlación negativa. (C) Lo mismo que B pero para otras cinco neuronas piramidales

que no presentan correlación. Cada punto gris representa el promedio de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> para un nivel de RNS eléctrico aplicado. La línea verde se obtuvo con regresión lineal (Remedios y cols., 2019).

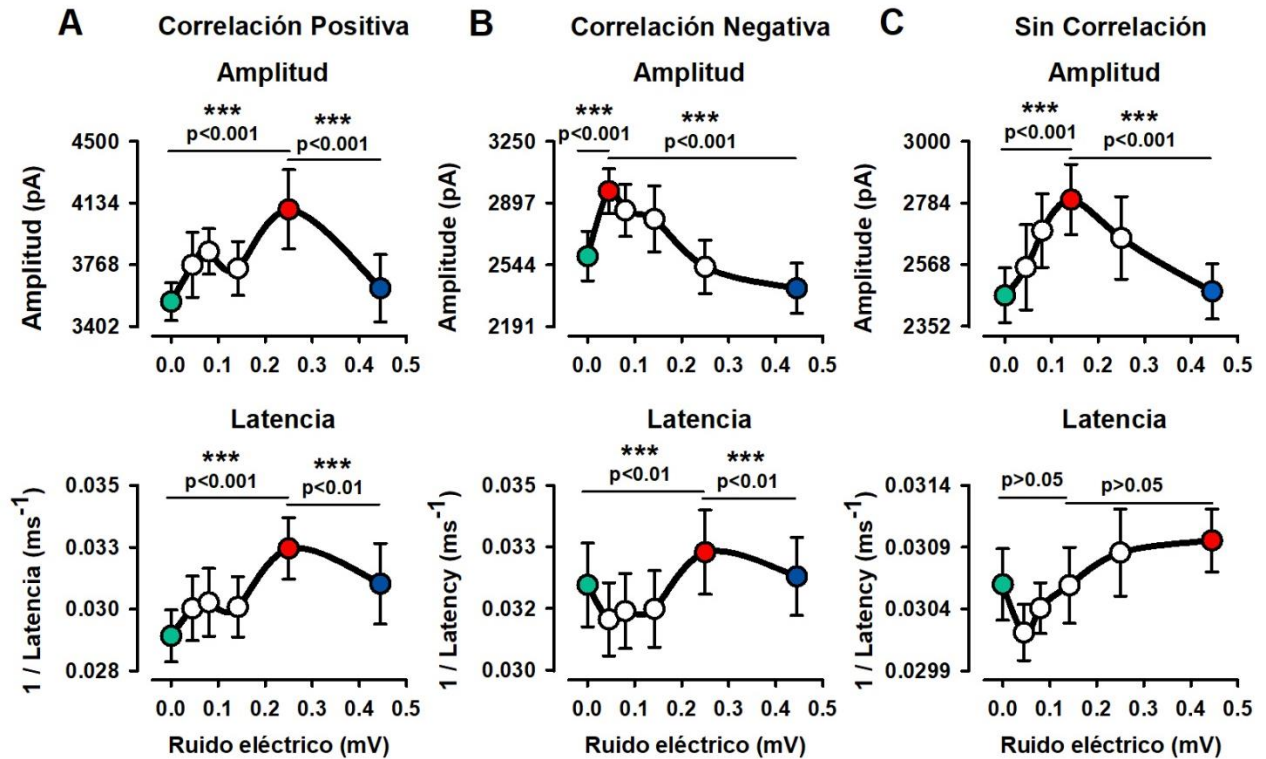


**Figura 11 | Gráficos de la amplitud pico de la corriente de Na<sup>+</sup>, para nueve células piramidales, y la inversa de su latencia en función del nivel de RNS eléctrico aplicado.**

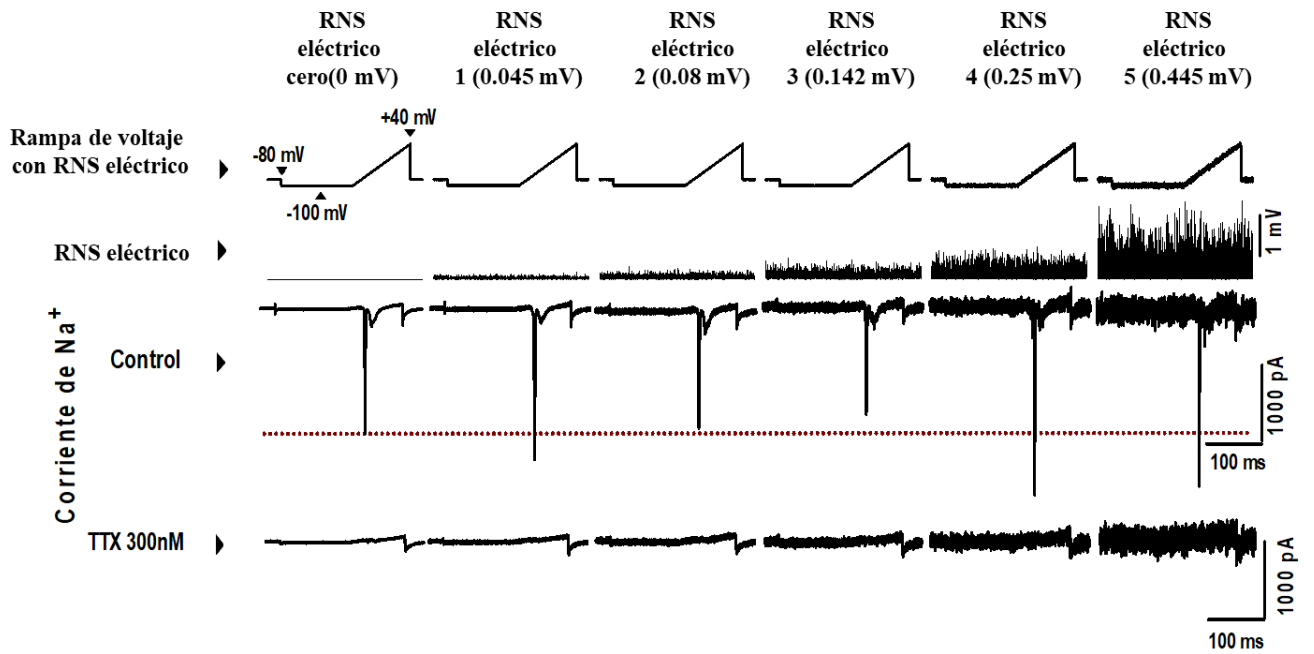
Las líneas grises se obtuvieron con el modelo matemático propuesto por remedios y cols., 2019. (A) Gráficos de tres células piramidales del grupo de correlación positiva. Para estas células, para un mismo nivel de RNS eléctrico se produjo un aumento máximo tanto en el pico de amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> y el inverso de su latencia (círculos rojos). (B) Gráficos de tres células piramidales del grupo de correlación negativa de otras tres células piramidales, el máximo aumento, tanto de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia fueron producidos por diferentes niveles de RNS eléctrico (los círculos en rojo tienen asociado diferente nivel de RNS eléctrico). (C) Gráficos de tres células piramidales del grupo de sin correlación, en el que aparte de que el aumento máximo en la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> y el inverso de su latencia fueron producidos por diferentes niveles de RNS eléctrico, también las gráficas de la inversa de su latencia no exhibieron la forma de U invertida. Las barras de error indican error estándar (SE).



**Figura. 12 | Registros superpuestos de corrientes de Na<sup>+</sup> para algunas células piramidales para tres niveles de ruido.** Cero (RNS eléctrico cero, verde), óptimo (RNS eléctrico óptimo, rojo) y alto (RNS eléctrico alto, azul). (A) Registros de corrientes de Na<sup>+</sup> de tres células piramidales en el primer grupo se denominó "Correlación positiva". (B) Lo mismo que A, pero para otras tres neuronas en el segundo grupo "Correlación Negativa." (C) Lo mismo que B pero para otras tres neuronas en el tercer grupo denominado "sin correlación".



**Figura 13 | Gran promedio de las amplitudes y latencias inversas de las neuronas piramidales agrupadas de acuerdo al análisis de la Figura 11. (A) Amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia en función del RNS eléctrico aplicado (Correlación positiva). (B y C) Lo mismo que A, pero para células piramidales de los grupos “Correlación negativa” y “Sin correlación” como se indica. Las barras de error indican la desviación estándar.**



**Figura 14. Efectos de la aplicación de 300 nM de TTX sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> registradas en nuestros experimentos.** Las dos filas superiores muestran las rampas de voltaje y la RNS eléctrico. Las filas inferiores muestran las respuestas de la neurona piramidal en la condición control y después de la aplicación de 300 nM de TTX en la solución.

		Propiedades eléctricas		Ecuación de regresión lineal $y=y_0+a*x$		Correlación de Pearson		
		Parámetros		Parámetros		Parámetros		
Neuronas		Cm (pF)	Ra (MΩ)	$y_0$ (pA*S)	a(pA*S)	z	r	Significancia
Correlación positiva	E.9 AN-11	12	12	-0.025	179.41	0.5374	0.491	0.161
	E.10 AN-13	14	18	-2.74	263.11	0.7633	0.643	0.035*
	E.10 AN-14	10	18	2.08	33.15	0.8404	0.686	0.046*
	E.10 SN-12	16	15.9	2.57	80.94	0.9868	0.756	0.04*
	E.11 SN-15	11	13	0.54	149.37	1.8745	0.954	0.002*
	E.11 SN-16	15	15	-1.64	163.41	1.5698	0.917	0.005*
	E.11 SN-17	9	22	-3.21	150.54	0.646	0.569	0.078
	E.12 SN-19	11	22	-2.42	190.47	0.6994	0.604	0.1
	E.12 SN-24	10	15	-6.05	329.68	1.2044	0.835	0.019*
	E.8 AN-07	-	20	6.75	-143.86	-1.132	-0.812	0.025*
E.9 AN-09	13	23	4.51	-83.88	-1.188	-0.83	0.021*	
E.9 AN-10	16	14	5.72	-92.09	-0.459	-0.43	0.197	
E.11 AN-15	13	14	14.07	-485.99	-0.905	-0.719	0.041*	
E.11 AN-18	16	24	11.5	-220.36	-0.984	-0.755	0.04*	
E.11 AN-19	15	17	9.29	-118.42	-0.637	-0.563	0.1	
E.11 AN-20	8	12	3.69	-90.14	-0.506	-0.467	0.175	
E.12 AN-24	10	19	5.54	-65.66	-0.989	-0.757	0.041*	
E.9 SN-09	14	23	7.11	-144.26	-0.787	-0.657	0.049*	
E.9 SN-10	12	10	11.15	-289.39	-0.480	-0.447	0.18	
E.9 SN-11	10	16	14.57	-344.09	-2.442	-0.985	0.0001*	
E.10 SN-13	11	14	20.49	-619.87	-1.270	-0.854	0.015*	
E.10 SN-14	7	30	3.82	-56.62	-1.345	-0.873	0.012*	
E.12 SN-21	9	11	5.53	-108.22	-0.523	-0.48	0.167	
E.12 SN-23	12	20	11.05	-213.33	-0.873	-0.703	0.04*	
E.4 AN-03	11	25	2.85	-64.87	-0.098	-0.098	0.426	
E.9 AN-08	16.9	18	2.44	16.48	0.2888	0.281	0.294	
E.10 AN-12	11	20	2.27	9.64	0.1634	0.162	0.38	
E.11 AN-16	19	26	5.74	-82.25	-0.243	-0.239	0.324	
E.11 AN-17	11	20	2.01	10.29	0.2007	0.198	0.353	
E.12 AN-22	8	15	1.06	19.46	0.2163	0.213	0.343	
E.12 AN-23	22	29	3.77	5.75	0.023	0.023	0.483	
E.5 SN-05	-	20	1.61	3.41	0.049	0.049	0.463	
E.12 SN-20	8	10	3.14	34.69	0.3826	0.365	0.238	
E.12 SN-22	11	18	2.57	55.75	0.3128	0.303	0.279	

**Tabla 1 |. Parámetros de las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales registradas y la regresión lineal para los datos experimentales.** La última columna muestra los valores p de significancia estadística de la correlación de Pearson.

---

---

## CAPÍTULO 3

# EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA RUIDOSA EN EL AUMENTO DE LA AMPLITUD DE LA CORRIENTE DE $\text{Na}^+$ DE CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATONES TRANSGÉNICOS

---

---

## INTRODUCCIÓN

Medina y col. (2012) demostraron por primera vez que la aplicación de ruido eléctrico en la corteza somatosensorial primaria mejora la percepción táctil artificial en los monos. Un estudio subsecuente en humanos mostró que la percepción sensorial también podría mejorarse a través de la resonancia estocástica cuando se aplica un nivel intermedio de ruido eléctrico de manera transcraneal (Moss y cols., 2004; Faisal y cols., 2008; McDonnell y Ward, 2011; McDonnell y cols., 2015) (Vander Groen y Wenderoth, 2016). Además, estudios previos en bicapas lipídicas artificiales, informaron que la aplicación de un nivel intermedio de ruido eléctrico aumenta la magnitud actual a lo largo de los canales de alameticina (Bezrukov y Vodyanoy, 1995, 1997). En el estudio descrito en el capítulo anterior, examinamos si la aplicación directa de ruido eléctrico en neuronas piramidales disociadas de la corteza somatosensorial también puede aumentar la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  provocada por protocolos de rampas de voltaje (Remedios y cols., 2019). Encontramos que la aplicación de un nivel intermedio de estimulación de ruido eléctrico

Browniano en neuronas piramidales disociadas puede producir un aumento en la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> y provocar un efecto modulador sobre su latencia.

Estos hallazgos motivaron a nuestro laboratorio a explorar si una intensidad optima de luz azul ruidosa también aumenta las corrientes de Na<sup>+</sup> en las neuronas piramidales de ratones transgénicos (Mabil y cols., 2020a).

---

---

---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

---

#### **Procedimientos generales**

Se realizaron experimentos en once ratones transgénicos (peso medio  $35.3 \pm 3g$ ,) y en dos ratones control (que pesaban 38 y 43 g). Los ratones transgénicos eran Thy1-ChR2-YFP, que expresan el canal iónico activado por luz Channelrhodopsin-2 (ChR2, obtenido de la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*), y fusionada con la Proteína amarilla fluorescente (ChR2-YFP) bajo el control promotor Thy1. Estos animales se obtuvieron del laboratorio de Jackson (JAX Estados Unidos) y se criaron en las instalaciones del CINVESTAV-IPN, México. Los animales tenían libre acceso a comida y agua y se mantuvieron en habitaciones con temperaturas controladas con exposición a la luz (luces encendidas a las 6

a.m. y luces apagadas a las 6 p.m.). Estos animales fueron donados por el Dr. Ranier Gutiérrez.

Todos los procedimientos experimentales se apegaron a los lineamientos del Comité Directivo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), de la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85-23, revisada en 1985) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Asimismo, todos los protocolos fueron aceptados por el comité de ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICUAL-Proyecto-00489).

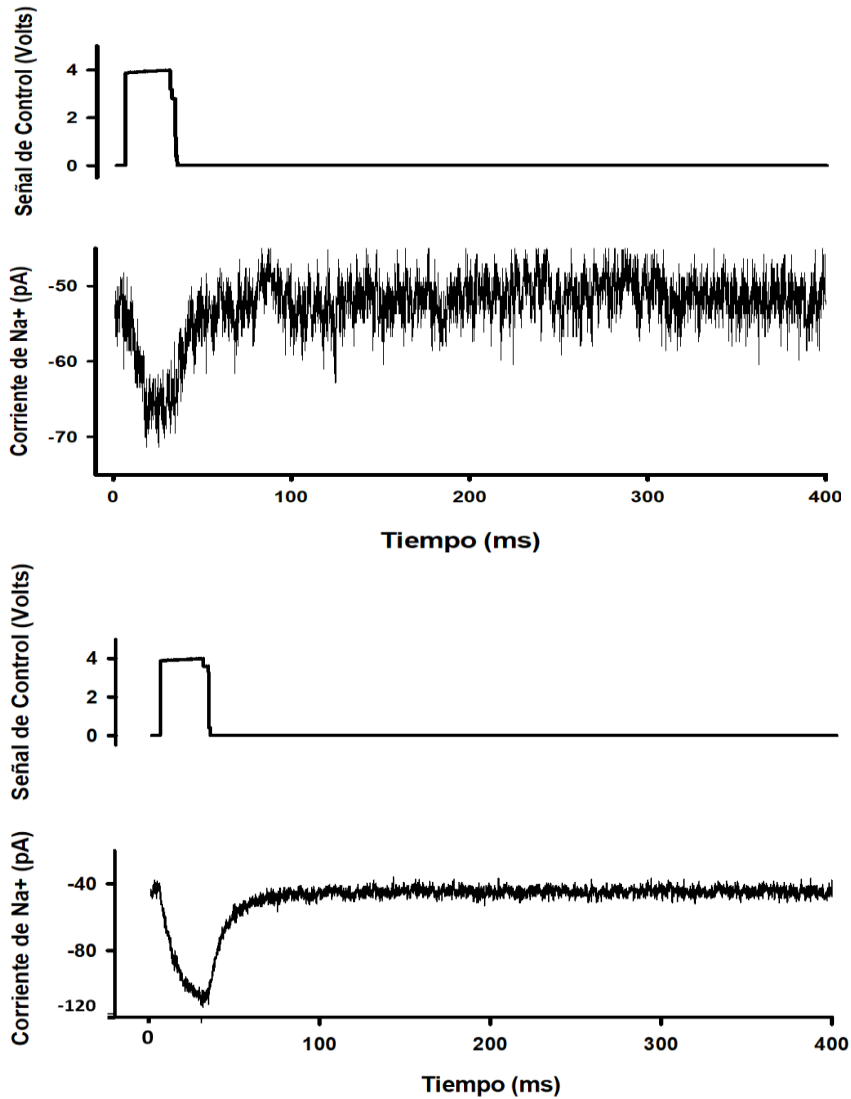
Registramos las corrientes de Na<sup>+</sup> en 25 neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de 11 ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP. Además, empleamos 2 ratones controles de la cepa C57 (Wildtype, WT, por sus siglas en inglés) ( $31 \pm 3$  gramos) con los cuales obtuvimos 10 neuronas piramidales de la corteza somatosensorial. Usamos halotano para anestesiarse a los ratones antes de su decapitación. Para aislar las neuronas seguimos los mismos procedimientos descritos en artículos anteriores. (Bargas y cols., 1994). Brevemente, el tejido cerebral se colocó en una solución fría de isetionato con bajo contenido de calcio.

Posteriormente, se obtuvieron cortes coronales de la corteza somatosensorial de 350  $\mu$ m de grosor. Después se colocaron los cortes en digestión enzimática por una hora. Después de la digestión enzimática, el tejido se lavó y se disoció mecánicamente con pipetas Pasteur. Usamos un microscopio invertido para identificar las células piramidales suspendidas en la solución. La Figura 16A ilustra una muestra de 15 células somatosensoriales piramidales. Las neuronas piramidales se registraron en modo de célula completa y fueron microestimuladas con seis grupos de 10 rampas de voltaje de 100 ms de duración, de  $-100$  a  $+40$  mV, con voltaje basal de  $-80$  mV y una duración de prepulso de 125 ms desde  $-80$  hasta  $-100$  mV. Al final de cada rampa, la membrana vuelve al voltaje basal Figura 27C.

Las neuronas piramidales, tanto del ratón transgénico como de los controles, fueron estimuladas durante el protocolo de rampa de 250 ms con RNS optogenética, que consistía de luz azul de 470 nm en el rango de potencia óptica de 0 a 0.67 mW utilizando una fibra óptica de 200 micrómetros colocados cerca de la célula.

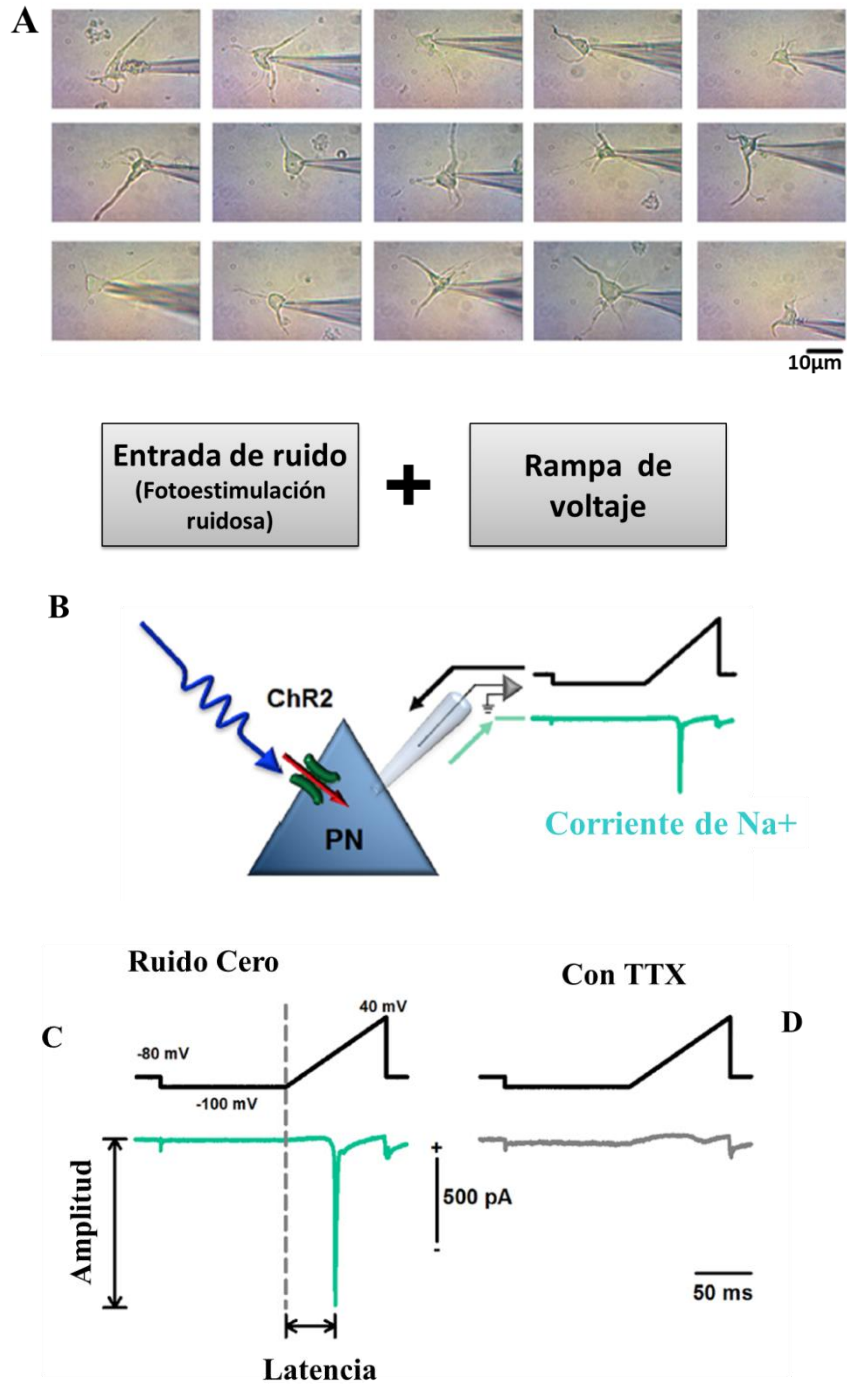
La fibra óptica tenía una apertura numérica de 0.39 (kit de inicio de Thorlabs) y se colocó con un micromanipulador en un ángulo de 45 grados. La disposición experimental se ilustra en la Figura 16B. La RNS optogenética exhibió un comportamiento similar a un destello con fluctuaciones en las intensidades de la luz. El espectro de potencia de la luz es browniana en el rango de frecuencia de 0 a 5.000 Hz (Huidobro y cols., 2017, 2018). Se midió la intensidad de la luz azul con un medidor de potencia óptica PM100D y con el sensor S150C de Thorlabs. Nuestro protocolo de estimulación consistió en una serie de seis rampas de voltaje para cada nivel de RNS optogenética (Figura 17A). Aplicamos ruido cero (RNS optogenética cero). También usamos otros cinco niveles diferentes de RNS optogenética (RNS optogenética 1, RNS optogenética 2, RNS optogenética 3, RNS optogenética 4, RNS optogenética 5).

Aplicamos un pulso de luz azul de 0.6mW, con duración de 40 ms, en dos neuronas de las 25 neuronas piramidales de nuestros ratones transgénicos para asegurarnos que las neuronas respondían a la luz azul (Figura 15).



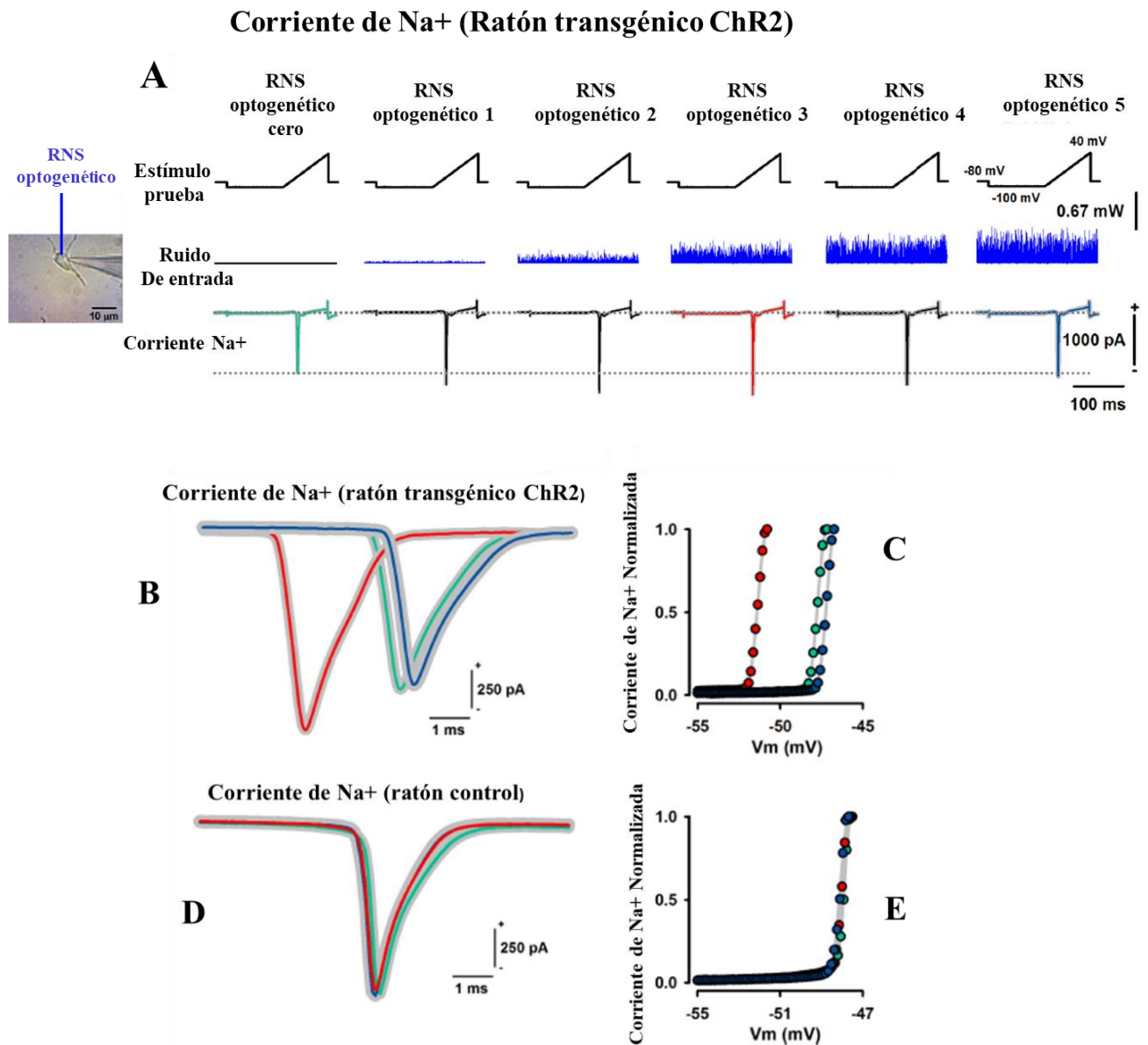
**Figura 15 |.** Respuesta de dos neuronas piramidales ante la iluminación de luz azul con forma de pulso cuadrado. Se ilustran los registros de corriente de dos neuronas de prueba a las que les aplicamos pulsos de luz de 40 ms para ver la fotocorriente de Na<sup>+</sup> que se generaba. La señal de control se refiere a la señal eléctrica de entrada que controla las variaciones de intensidad luminosa de nuestro dispositivo de fotoestimulación de Thorlabs. Las neuronas piramidales se disociaron de la corteza cerebral de un ratón transgénico Thy1-ChR2-YFP.

## Neuronas piramidales somatosensoriales



**Figura 16 |.** Esquema de la disposición experimental para la RNS optogenética y la microestimulación eléctrica con rampas de voltaje. (A) Imágenes de una muestra de 15 neuronas piramidales (PN) de la corteza somatosensorial registrada de cinco ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP. (B) La disposición experimental de RNS optogenética

aplicada (ruido de entrada, de 0 a 0.67 mW) durante la microestimulación eléctrica con rampas de voltaje (estimulación control). (C) Amplitud y latencia máxima de la corriente de Na<sup>+</sup>. (D) Registro que muestra cómo la aplicación de TTX inhibió la corriente de Na<sup>+</sup>. El uso de TTX se realizó al final de cada registro celular para verificar que la corriente de Na<sup>+</sup> era sensible a TTX.



**Figura 17 | Efectos posteriores de la RNS optogenética sobre la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidas por protocolos de rampas de voltaje en neuronas piramidales disociadas de la corteza somatosensorial de Thy1-ChR2-YFP y ratones**

**control.** (A) rampas de voltaje (estimulación de prueba) y las corrientes de  $\text{Na}^+$  producidas durante la aplicación de diferentes niveles de RNS optogenética (ruido de entrada) en la célula piramidal de un ratón Thy1-ChR2-YFP. Para este ejemplo, se tiene un aumento en la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  y el inverso de su latencia para una intensidad de RNS optogenética intermedia (que ocurre en RNS optogenética 3, en este caso). (B) Registros superpuestos de tres corrientes de  $\text{Na}^+$  para tres niveles de RNS optogenética, RNS optogenética cero (verde), RNS optogenética óptimo (rojo) y RNS optogenética alto (azul) para un ratón Thy1-ChR2-YFP ("ratón transgénico ChR2"). Se obtuvieron resultados similares para 25 neuronas piramidales de los 11 ratones transgénicos. (C) Las curvas de activación de voltaje para las corrientes de  $\text{Na}^+$  ilustradas en (B). Note el cambio en la curva asociada con la RNS optogenética óptimo (símbolos rojos). (D, E) Lo mismo que (B, C), pero para un ratón control. Se obtuvieron resultados similares en 10 neuronas piramidales de dos ratones control. En este caso la corriente de  $\text{Na}^+$  y sus curvas de activación de voltaje no se vieron afectadas por la RNS optogenética. Las líneas de color verde, rojo y azul representan el promedio de las corrientes de  $\text{Na}^+$  registradas. Mientras que el contorno gris, alrededor de estos promedios, representa la desviación estándar de las corrientes registradas en cada caso.

Además, para evitar la adaptación ante la RNS optogenética, se utilizaron intervalos de descanso de 3 segundos entre los cambios de niveles RNS optogenética. Los niveles de ruido fueron determinados por la salida del generador analógico WaveTek. En cambio, la elección de los niveles de RNS optogenética fue en orden aleatorio. Además, los valores de las amplitudes máximas de la corriente de  $\text{Na}^+$  ilustrado en la Figura 16 se unieron con líneas curvas suaves utilizando el software SigmaPlot, sin ninguna interpolación.

## **Análisis de Datos**

Calculamos la amplitud máxima y la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$  para todos los niveles de RNS optogenética. Debido a que los diferentes niveles de RNS optogenética produjeron cambios en la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$ , también usamos esta variable para analizar los efectos de la RNS optogenética en el registro de las células piramidales. Finalmente, medimos dicha latencia desde el comienzo de la rampa hasta el pico de la corriente de  $\text{Na}^+$

como se ilustra en la Figura 17A. Esta medida se utilizó para cuantificar el inverso de la latencia del pico de corriente de Na<sup>+</sup>.

## **Análisis estadístico**

Para probar cualquier diferencia estadística en la amplitud máxima de la corriente Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia, los comparamos en las siguientes condiciones: RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 1, RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 2, RNS optogenética frente a RNS optogenética 3, RNS optogenética cero frente a RNS optogenética 4, RNS optogenética cero frente a RNS optogenética 5. También comparamos RNS optogenética 1, RNS optogenética 3 o RNS optogenética 4 frente a RNS optogenética 5. Usamos la prueba no paramétrica de los rangos con signo por pares para examinar la significancia estadística. Comparamos las condiciones antes mencionadas de RNS optogenética, en todos los animales bajo la hipótesis nula de que las diferencias de las medias entre tales condiciones eran cero. Debido a las múltiples comparaciones, utilizamos un ajuste de Bonferroni corregido. Las barras de error indican la desviación estándar. Consideramos las comparaciones como significativas si  $p < 0.05$ . Los datos cada neurona se muestra en la tabla 2.

---

---

---

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

---

---

---

Aplicamos diferentes niveles de RNS optogenética a 25 células piramidales de la corteza somatosensorial de once ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP. Además, utilizamos diez células piramidales de dos ratones control, para aplicarles los mismos niveles de RNS optogenética que se hicieron con los transgénicos. Verificamos que todas las neuronas fueran piramidales, Figura 16A. Encontramos cambios estadísticamente significativos producidos por RNS optogenética en todos los ratones transgénicos ( $p < 0.05$ ) pero no en los ratones control. Al final de los experimentos, verificamos que las corrientes de  $\text{Na}^+$  registradas de cada neurona piramidal fueran inhibidas por la aplicación de TTX, como se ilustra en la Figura 16D.

La Figura 17A muestra los efectos de seis niveles de fotoestimulación ruidosa optogenética (RNS optogenética cero, RNS optogenética 1, RNS optogenética 2, RNS optogenética 3, RNS optogenética 4, RNS optogenética 5) sobre la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  producida por la microestimulación del protocolo de rampa de voltaje.

Cada nivel de RNS optogenética fue adicionado en una secuencia aleatoria, con el protocolo de rampa de voltaje que producía las corrientes de  $\text{Na}^+$ . Cabe aclarar que en la Figura 17A representamos la secuencia de niveles de RNS optogenética de menor a mayor con fines ilustrativos.

La aplicación de un nivel óptimo de RNS optogenética produjo una reducción en la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$  y una concomitante aumento en el pico de corriente de  $\text{Na}^+$  (Figura

17B). Considerando que, la sombra gris alrededor de estos trazos es el estándar desviación de las corrientes registradas en cada caso. La gráfica en verde representa el control, la gráfica en rojo representan la condición con ruido óptimo y la gráfica en azul representa la condición con ruido alto. Este resultado fue reproducible para todas las 25 neuronas somatosensoriales piramidales. Encontramos eso en todos los ratones transgénicos, la ganancia de la corriente de Na<sup>+</sup> con la RNS optogenética óptimo en comparación con el ruido cero fue de  $317 \pm 268$  pA por su amplitud máxima y  $2.54 \pm 1.9$  ms por su latencia.

Dichos cambios fueron estadísticamente significativos con una  $p < 0.001$  (Tabla 2). En la Figura 17C también se muestra que las curvas de activación de la corriente de Na<sup>+</sup> exhiben un cambio para intensidades intermedias de RNS optogenética. Este comportamiento también fue reproducible para todas las neuronas piramidales obtenidas en ratones transgénicos. Por el contrario, para los ratones controles, no observamos cambios significativos en la amplitud y latencia (Figura 17D) o en las curvas de activación de las corrientes de Na<sup>+</sup> (Figura 17E). Este comportamiento fue reproducible para las diez neuronas piramidales obtenidas de los ratones controles.

En la Figura 18 se muestra el efecto de la RNS optogenética en la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> y del inverso de su latencia de las 25 neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP.

La Figura 18A es el gran promedio de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup> en función de los diferentes niveles de RNS optogenética. En el cual se observa que las gráficas de la corriente de Na<sup>+</sup> siguen una forma de U invertida en función del nivel de RNS optogenética para las 25 neuronas piramidales. Y además se encontró una diferencia altamente significativa entre la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> en las condiciones de RNS optogenética cero (círculo verde), y RNS optogenética alto (círculo azul), con relación a la amplitud de la corriente Na<sup>+</sup> producida por una intensidad intermedia de RNS optogenética (círculo rojo).

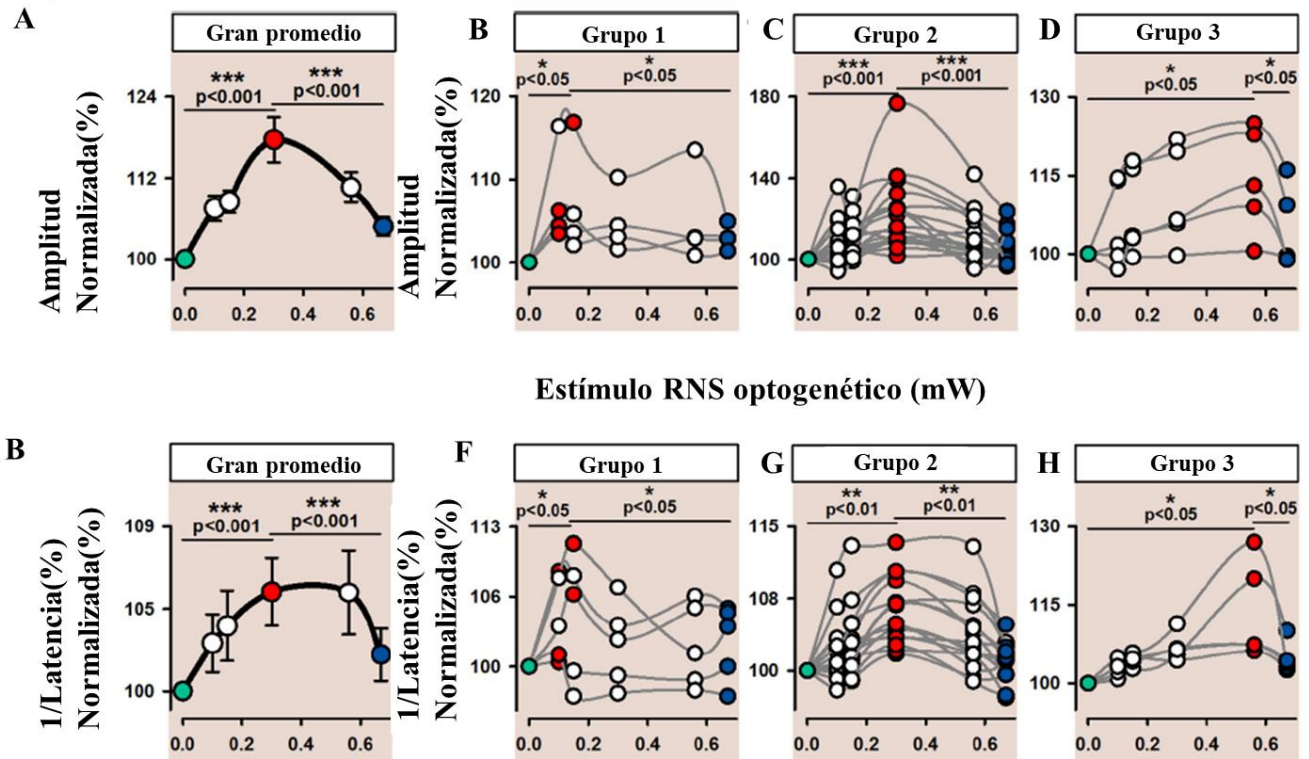
En general, encontramos que un nivel intermedio de RNS optogenética óptimo produjo un aumento estadísticamente significativo en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> en todos los ratones transgénicos ( $p < 0.001$ ). Y ya que como hubo diferentes intensidades

luminosas optimas en la que se presentó la amplificación de la corriente de Na<sup>+</sup>, agrupamos las respuestas de estas neuronas en función de la forma de U invertida que presentaron. Dándonos por lo tanto tres grupos de neuronas correlacionadas de diferente manera.

En la Figura 18B, mostramos un grupo de gráficos para neuronas piramidales que exhiben un perfil similar en el que la RNS optogenética óptimo fue de alrededor de 0.1 mW. En la Figura 18C, mostramos otro grupo de gráficos para neuronas piramidales que muestran el mismo patrón pero con un RNS optogenética óptimo de 0.3 mW. Mientras que en la Figura 18D, ilustramos un grupo de gráficos para neuronas piramidales que exhiben perfiles similares. En el que la RNS optogenética óptimo fue de alrededor de 0.58 mW. También examinamos si el inverso de la latencia de la corriente de Na<sup>+</sup> también exhibe un comportamiento similar a la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> cuando se aplican diferentes niveles de RNS optogenética.

La Figura 18E es el gran promedio de la inversa de la latencia de la corriente de Na<sup>+</sup> en función de los diferentes niveles de RNS optogenética. También encontramos que un nivel intermedio de RNS optogenética produce un aumento significativo en el inverso de la latencia de las corrientes de Na<sup>+</sup> en todos los ratones transgénicos ( $p < 0.001$ ). Agrupamos las neuronas dependiendo del nivel de RNS optogenética óptimo en el que respondieron más.

Las Figuras 18 (F-H) muestran los diferentes grupos obtenidos a partir de la selección de gráficos según cada perfil.



**Figura 18 | Efectos de RNS optogenética en la amplitud máxima y la inversa de la latencia de las corrientes de Na<sup>+</sup> provocadas por las rampas de voltaje en ratones Thy1-ChR2-YFP.** (A) El gran promedio de la amplitud normalizada de las corrientes de Na<sup>+</sup> en función del nivel de RNS optogenética para 25 neuronas de la corteza somatosensorial de once ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP. (B) Grupo 1, las neuronas piramidales exhiben un perfil similar en el que la RNS optogenética óptimo fue de alrededor de 0.1 mW. Las barras de error indican la desviación estándar (SD). (C) Grupo 2, las neuronas piramidales exhiben un perfil similar en el que la RNS optogenética óptimo fue de alrededor de 0.3 mW. (D) Grupo 3, las neuronas piramidales muestran un patrón similar en el que la RNS optogenética óptimo era de aproximadamente 0.58 mW. (E – H) Lo mismo que (A – D) pero para el inverso de la latencia de la corriente Na<sup>+</sup>. Todos estos gráficos ilustran que los niveles intermedios de RNS optogenética, en el rango de 0.1 a 0.67 mW, produjeron un aumento estadísticamente significativo en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia en todos los ratones transgénicos ( $p < 0.05$ ). Los

colores indican las tres condiciones: RNS optogenética cero (verde), RNS optogenética óptimo (rojo) y RNS optogenética alto (azul).

**Prueba de rango con signo (Amplitud normalizada)**

	RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 1						RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 2						RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 3					
	RNS optogenética cero	RNS optogenética 1	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 2	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 3	T	z	r	p
	Mdn	Mdn					Mdn	Mdn					Mdn	Mdn				
<b>Gran promedio</b>	100.00	105.85	30.00	-3.57	-0.71	0.0003	100.00	105.73	8.00	-4.16	-0.83	0.00003	100.00	110.65	1.00	-4.35	-0.87	0.00001
<b>Grupo 1</b>	100.00	105.34	0.00	-1.83	-0.61	0.034	100.00	104.71	0.00	-1.83	-0.61	0.034	100.00	103.78	0.00	-1.83	-0.61	0.034
<b>Grupo 2</b>	100.00	106.12	14.00	-2.79	-0.68	0.005	100.00	106.01	5.00	-3.23	-0.81	0.001	100.00	119.04	0.00	-3.52	-0.88	0.0004
<b>Grupo 3</b>	100.00	101.66	4.00	-0.94	-0.42	0.17	100.00	103.45	1.00	-1.75	-0.78	0.04	100.00	106.52	1.00	-1.75	-0.78	0.04

	RNS optogenética cero - vs. RNS optogenética 4						RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 5						RNS optogenética 1 vs. RNS optogenética 5, RNS optogenética 3 vs. RNS optogenética 5, or RNS optogenética 4 vs. RNS optogenética 5,					
	RNS optogenética cero	RNS optogenética 4	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 5	T	z	r	p	RNS 1, RNS optogenético 3, or RNS P4,	RNS optogenético 5	T	z	r	p
	Mdn	Mdn					Mdn	Mdn					Mdn	Mdn				
<b>Gran promedio</b>	100.00	106.73	13.00	-4.02	-0.8	0.0005	100.00	102.91	50.00	-3.03	-0.61	0.002	110.65	102.91	2.00	-4.32	0.86	0.00001
<b>Grupo 1</b>	100.00	102.95	0.00	-1.83	-0.61	0.034	100.00	102.90	0.00	-1.83	-0.61	0.034	105.34	102.90	0.00	-1.83	-0.61	0.034
<b>Grupo 2</b>	100.00	106.63	7.00	-3.52	-0.88	0.002	100.00	102.91	22.00	-2.38	-0.59	0.017	119.04	102.91	0.00	-3.52	-0.88	0.0004
<b>Grupo 3</b>	100.00	113.11	0.00	-2.00	-0.89	0.02	100.00	99.57	6.00	-0.4	-0.18	0.34	113.11	99.57	0.00	-2.02	-0.9	0.02

**Prueba de rango con signo (1/Latencia Normalizada)**

	RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 1						RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 2						RNS optogenético cero vs. RNS optogenética 3					
	RNS optogenética cero	RNS optogenética 1	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 2	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 3	T	z	r	p
	Mdn	Mdn					Mdn	Mdn					Mdn	Mdn				
<b>Gran promedio</b>	100.00	102.18	29.00	-3.59	-0.72	0.0003	100.00	102.97	23.00	-3.75	-0.75	0.0001	100.00	104.86	5.00	-4.23	-0.85	0.00002
<b>Grupo 1</b>	100.00	103.78	0.00	-2.02	-0.91	0.022	100.00	106.72	3.00	-2.21	-0.99	0.02	100.00	102.52	3.00	-1.21	-0.54	0.11
<b>Grupo 2</b>	100.00	100.85	23.00	-2.10	-0.68	0.01	100.00	101.75	9.00	-2.89	-0.75	0.002	100.00	104.86	0.00	-3.41	-0.88	0.0006
<b>Grupo 3</b>	100.00	103.14	0.00	-2.02	-0.91	0.022	100.00	104.64	0.00	-2.02	-0.91	0.022	100.00	106.39	0.00	-2.02	-0.91	0.022

	RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 4						RNS optogenética cero vs. RNS optogenética 5						RNS optogenética 2 vs. RNS optogenética 5, RNS optogenética 3 vs. RNS optogenética 5, or RNS optogenética 4 vs. RNS optogenética 5,					
	RNS optogenética cero	RNS optogenética 4	T	z	r	p	RNS optogenética cero	RNS optogenética 5	T	z	r	p	RNS optogenética 2, RNS optogenético 3, or RNS optogenética 4,	RNS optogenético 5	T	z	r	p
	Mdn	Mdn					Mdn	Mdn					Mdn	Mdn				
<b>Gran promedio</b>	100.00	104.44	19.00	-3.86	-0.77	0.0001	100.00	101.98	46.00	-2.97	-0.59	0.003	104.86	101.98	33.00	-3.48	0.7	0.0004
<b>Grupo 1</b>	100.00	101.24	4.00	-0.94	-0.42	0.17	100.00	103.73	1.00	-1.46	-0.65	0.07	106.72	103.73	1.00	-2.02	-0.91	0.04
<b>Grupo 2</b>	100.00	102.94	5.00	-3.12	-0.81	0.001	100.00	101.24	30.00	-1.71	-0.44	0.044	104.86	101.24	0.00	-3.41	-0.88	0.0006
<b>Grupo 3</b>	100.00	107.35	0.00	-2.02	-0.91	0.022	100.00	103.81	0.00	-2.02	-0.91	0.022	107.35	103.81	0.00	-2.02	-0.91	0.022

**Tabla 2 |. Análisis estadístico por comparación de los efectos de la RNS optogenética sobre la amplitud normalizada y el inverso de la latencia de las corrientes de Na+.**

---

---

## CAPÍTULO 4

# EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE RUIDO DE LARGA DURACIÓN EN LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES DE $Na^+$ DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE RATAS WISTAR

---

---

## INTRODUCCIÓN

En condiciones fisiológicas, los cambios equilibrados en la plasticidad sináptica pueden producir cambios en la excitabilidad neuronal de las neuronas piramidales. Sin embargo, durante los trastornos cerebrales, la alteración de dicho equilibrio podría producirse de forma anómala, aumentando o inhibiendo la excitabilidad neuronal (Beck y cols., 2008; Camp y cols., 2012; Beraneck y cols., 2012). Por lo tanto, el uso de métodos de estimulación cerebral puede ser de utilidad en la clínica para controlar la excitabilidad de los circuitos neuronales del cerebro.

Hay varias formas de medir los cambios en la excitabilidad cortical. Por ejemplo, la excitabilidad corticoespinal de los potenciales provocados motores. Con respecto a esta forma de medición, en 2008, el grupo de Walter Paulus aplicó pulsos de estimulación magnética transcraneal para provocar potenciales evocados motores registrados en el músculo interóseo dorsal. Descubrieron que 10 minutos de tRNS en la región de la corteza motora primaria aumentaban la excitabilidad corticoespinal, lo que se traducía en una amplificación de los potenciales provocados motores por la estimulación magnética transcraneal. En estudios posteriores, los efectos de la tRNS también se evaluaron en el contexto de su duración. Primero, se encontró que la aplicación de tRNS de corta duración

(4 minutos) induce la atenuación en la respuesta dependiente del nivel de oxigenación de la sangre (BOLD) en la corteza motora humana. Este resultado concuerda con un segundo estudio (Chaieb y cols., 2011) que utilizó estimulación magnética transcraneal para provocar potenciales provocados motores. En dicho estudio (Chaieb y cols., 2011) los autores compararon los efectos del tRNS de corta duración (4 minutos) y de larga duración (5 minutos y 6 minutos) en la amplitud de los potenciales provocados motores por la estimulación magnética transcraneal. Encontraron que la aplicación de tRNS de corta duración (Chaieb y cols., 2011) (4 minutos o menos) no inducía un cambio en la excitabilidad cortical, compatible con la observación de una respuesta BOLD atenuada en la corteza motora humana (Chaieb y cols., 2009). Sin embargo, un tRNS de 5 y 6 minutos produjo un aumento significativo de la excitabilidad cortical, aunque no tan alto como el aumento alcanzado por 10 minutos de tRNS (Terney y cols., 2008). Sobre la base de estas observaciones, el grupo de Paulus (Chaieb y cols., 2011) concluyó que los efectos secundarios plásticos del tRNS sobre la excitabilidad cortical requieren una estimulación mínima de 5 minutos. Aunque también se necesita una amplia gama de frecuencias en tRNS para aumentar la excitabilidad cortical (Moret y cols., 2019).

En un informe reciente (Abe y cols., 2019), se encontró que el rendimiento motor en humanos puede mejorar significativamente después de 10 minutos de tRNS en la región M1. Por tanto, las amplitudes de los potenciales provocados motores por pulsos de estimulación magnética transcraneal aumentan significativamente inmediatamente después de 10 minutos de intervención de tRNS. En comparación, el rendimiento motor mejora drásticamente 10 minutos después de la intervención de tRNS. Significa que el tRNS podría producir un impacto en las neuronas piramidales y en las acciones motoras, mejorando los estados cerebrales dependientes de la tarea para modular el comportamiento humano (Jooss y cols, 2019). El propósito de nuestro estudio es evaluar si la corriente de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales aisladas de los circuitos cerebrales, podrían exhibir un comportamiento similar al de los potenciales provocados motores después de la aplicación de un tRNS de corta o de larga duración, como se encontró para el cerebro humano. Si este fuera el caso, entonces podríamos sugerir que los efectos observados en el aumento de la excitabilidad corticoespinal debidos a un tRNS se deben principalmente a propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales, que involucran principalmente a los canales

ionotrópicos del ion de Na<sup>+</sup>. Esto está basado con la evidencia previa en humanos, que demuestra que los efectos secundarios del tRNS parecen no ser dependientes del receptor de NMDA, sino del canal de Na<sup>+</sup> (Chaieb y cols, 2015).

La aplicación de tRNS a redes corticales puede modular la percepción humana (Van der Groen y Wenderoth, 2016), pero también puede modular la excitabilidad corticoespinal cuando se administra de forma continua durante largos períodos de tiempo. En 2008, el grupo de Walter Paulus (Terney y cols., 2008) aplicó pulsos de estimulación magnética transcraneal (TMS) para provocar potenciales provocados motores registrados en el músculo interóseo dorsal. Descubrieron que con 10 minutos de tRNS en la región de la corteza motora primaria se aumenta la excitabilidad corticoespinal, amplificando los potenciales provocados motores de TMS. En estudios posteriores, los efectos secundarios del tRNS también se evaluaron en el contexto de su duración. Primero, se encontró que la aplicación de tRNS de corta duración (4 minutos) induce una atenuación en la respuesta dependiente del nivel de oxigenación sanguínea (BOLD) (Chaieb y cols., 2009). Este resultado fue consistente con un segundo estudio de Chaieb y cols., 2011 que utilizó TMS para provocar potenciales provocados motores. Estos autores compararon los efectos de 4 minutos o menos versus 5 o 6 minutos de tRNS en la amplitud de los potenciales provocados motores inducidos por TMS. Encontraron que el tRNS de 4 minutos o menos (Chaieb y cols., 2011) no inducía un cambio en la excitabilidad corticoespinal, compatible con la observación de una respuesta BOLD atenuada en la corteza motora humana (Chaieb y cols., 2009). Sin embargo, con 5 o 6 minutos de tRNS de mayor duración se produjo un aumento significativo en la excitabilidad corticoespinal, aunque no tan alto como el aumento alcanzado por 10 minutos de tRNS (Terney y cols., 2008). Con base en estas observaciones, el grupo de Paulus (Chaieb y cols., 2011) concluyó que las secuelas plásticas de tRNS sobre la excitabilidad corticoespinal requieren duraciones de estimulación mínimas de 5 minutos. Sin embargo, se necesita una amplia gama de frecuencias en tRNS para aumentar la excitabilidad corticoespinal (Moret y cols., 2019).

Recientemente (Abe y cols., 2019), encontraron que el rendimiento motor en humanos puede mejorarse significativamente después de 10 minutos de tRNS en la región M1. En comparación, en los mismos sujetos, los potenciales provocados motores inducidos por

TMS también aumentaron considerablemente con 10 minutos de tRNS. Este hallazgo sugiere que la tRNS podría producir un impacto tanto en las neuronas piramidales como en las acciones motoras, mejorando los estados cerebrales dependientes de la tarea para modular la conducta humana (Jooss y cols., 2019).

Aunque debemos tener cuidado al extrapolar los experimentos de tRNS que se han realizado en el cerebro humano *in vivo* en neuronas aisladas podemos examinar cuestiones similares en ambas situaciones. Ello que podría ser útil para avanzar en ambos campos de investigación. En esta dirección se ha avanzado utilizando preparaciones animales pero con otras formas de onda de estimulación eléctrica, diferente a el RNS eléctrico (Bindman y cols., 1964; Schoen y Fromherz, 2008; Alekseichuk y cols., 2019; Voroslakos y cols., 2018; Santin, 2019; Fentonani y Minussi, 2016). Por lo tanto, todavía se necesita mucho trabajo en este campo de investigación utilizando RNS eléctrico (Bezrukov y Vodyanov, 1995; Gluckman y cols., 1996; Medina y cols., 2012; Reed y Cohen Kadosh, 2018; Remedios y cols. ., 2019; Sánchez-León y cols., 2020).

El propósito de nuestro estudio es examinar si la corriente de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales aisladas podría exhibir efectos secundarios similares a los potenciales provocados motores inducidos por TMS después del tRNS (Chaieb y cols., 2011). Si este fuera el caso, podríamos arrojar luz sobre los mecanismos que podrían conducir a una disminución o aumento de la excitabilidad de las neuronas piramidales cuando un RNS eléctrico a de larga duración se aplica continuamente al cerebro. Por otro lado, estos datos podrían ser útiles para avanzar en ambos campos de investigación.

---

---

---

## CAPÍTULO 4

### MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

---

#### **Procedimientos generales**

Realizamos experimentos en cinco ratas Wistar (peso medio  $130 \pm 10$  g). Los animales fueron criados en la instalación animal “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Permitimos libre acceso a alimentos y agua para los animales, que se mantuvieron en habitaciones con exposición a la luz y temperatura controladas. Nuestro protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética local (CICUAL-Proyecto-00489) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Seguimos las pautas contenidas en la Guía (85-23, revisada en 1985) de los Institutos Nacionales de Salud para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio y la “Norma-Oficial-Mexicana-NOM-062-ZOO-1999”.

Realizamos los experimentos en 52 neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial de ratas Wistar. Usamos halotano para anestesiarse a las ratas antes de su decapitación. Para aislar las neuronas, seguimos los mismos procedimientos descritos en un informe anterior. Registramos las corrientes de  $\text{Na}^+$  de las neuronas piramidales mediante la aplicación de rampas de voltaje de -100 a +40 mV de 100 ms de duración, con un potencial de retención de -80 mV y una duración de prepulso de 125 ms de -80 a -100. mV. Primero, registramos la corriente de  $\text{Na}^+$  en condiciones de RNS eléctrico cero. En segundo lugar, aplicamos RNS eléctrico con corrientes de 22 a 143 pA a través de la misma micropipeta con la que registramos las corrientes de  $\text{Na}^+$ . La RNS eléctrica se administró de forma continua durante 2 o 5 minutos. El espectro de potencia del RNS eléctrico

aplicado fue Browniano en el rango de frecuencia de 0 a 5000 Hz. Las células piramidales que mantuvieron constante su resistencia de acceso durante todo el registro se incluyeron para el análisis.

Los experimentos se realizaron con la colaboración del Dr. Jorge Luis Flores Hernández y del Dr. Oswaldo Torres Ramírez del laboratorio de Neuromodulación.

## **Análisis de datos**

Obtuvimos las amplitudes promedio de las corrientes de Na<sup>+</sup> de 52 neuronas piramidales somatosensoriales, producidas por los protocolos de rampa de voltaje, en el que cada protocolo de rampa de voltaje consistió en aplicar diez señales eléctricas con forma de rampas de voltaje a la célula por medio de la micropipeta de registro y así obtener diez corrientes de Na<sup>+</sup>. Donde para medir la amplitud de cada corriente tomábamos el valor de la corriente a los -80mv hasta el valor del pico máximo (entre el intervalo de -100mV a +40mv). Además para medir la latencia de cada corriente, medimos el tiempo que pasaba entre el inicio de la rampa hasta el tiempo en que se producía el pico máximo.

Para cada protocolo de rampa de voltaje obtuvimos diez amplitudes de corriente y sus respectivas latencias. Junto con las cuales sacamos los promedios de las amplitudes y latencias de las corrientes de Na<sup>+</sup> como lo muestran las Figuras 23 y 25 donde cada círculo en color representa el promedio de un protocolo de rampa de voltaje.

## **Análisis estadístico**

Comparamos las diferencias estadísticas en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> en las siguientes condiciones: RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico (2 min) o RNS eléctrico cero vs. RNS eléctrico (5 min). Usamos las pruebas de rango con signo no paramétricas por pares para examinar la significancia estadística.

Las barras en todos los gráficos indican un error estándar. Realizamos comparaciones bajo la hipótesis nula de que las diferencias en las medias entre dichas condiciones eran cero. Debido a múltiples comparaciones, utilizamos un ajuste de Bonferroni corregido. Las diferencias se consideraron como significativas si  $p < 0.01$ . Cada valor en las gráficas y texto asociados con las corrientes de Na<sup>+</sup> corresponden a la media  $\pm$  error estándar.

---

---

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

---

---

---

Encontramos que con 2 y 5 minutos de RNS eléctrico se produjo una reducción en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> en las 52 neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de cinco ratas wistar ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, encontramos que la estimulación eléctrica ruidosa ocasionó que las corrientes de Na<sup>+</sup> exhibieran dos características de recuperación: 1) con recuperación lenta después de 2 minutos de RNS eléctrico, y 2) con una recuperación más rápida y facilitación después de 5 minutos de RNS eléctrico.

#### **Efecto de la RNS eléctrico con 2 minutos de estimulación**

35 neuronas piramidales se estimularon con 2 minutos de RNS eléctrico, en las cuales se produjo una reducción estadísticamente significativa en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ). La recuperación de las corrientes de Na<sup>+</sup> tuvo una constante de tiempo promedio de  $46.7 \pm 15.5$  s. La Figura 19A ilustra este tipo de respuesta para una neurona piramidal típica. La línea azul muestra una corriente control de Na<sup>+</sup> (es decir, RNS eléctrico cero). Las líneas rojas son los registros de las corrientes de Na<sup>+</sup> pero después de los 2 minutos de RNS eléctrico. El contorno gris alrededor de las líneas azules y rojas es la desviación estándar de las corrientes registradas en cada caso.

La Figura 20A muestra el gran promedio de las amplitudes normalizadas de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales versus el tiempo que duraron los protocolos experimentales. Los círculos azules representa un tiempo anterior a los 2 minutos de RNS eléctrico y los círculos rojos un tiempo posterior a dicho estímulo. Esta recuperación

después de los 2 minutos de RNS eléctrico se caracterizó por una reducción inicial estadísticamente significativa de la corriente de Na<sup>+</sup> del 100% al  $45.3 \pm 5.7\%$  (ver primer círculo rojo, media  $\pm$  EE,  $p < 0.001$ , N = 35 neuronas). Esta reducción fue seguida por una recuperación lenta con una constante de tiempo de  $46.7 \pm 15.5$  s (Figura 20A).

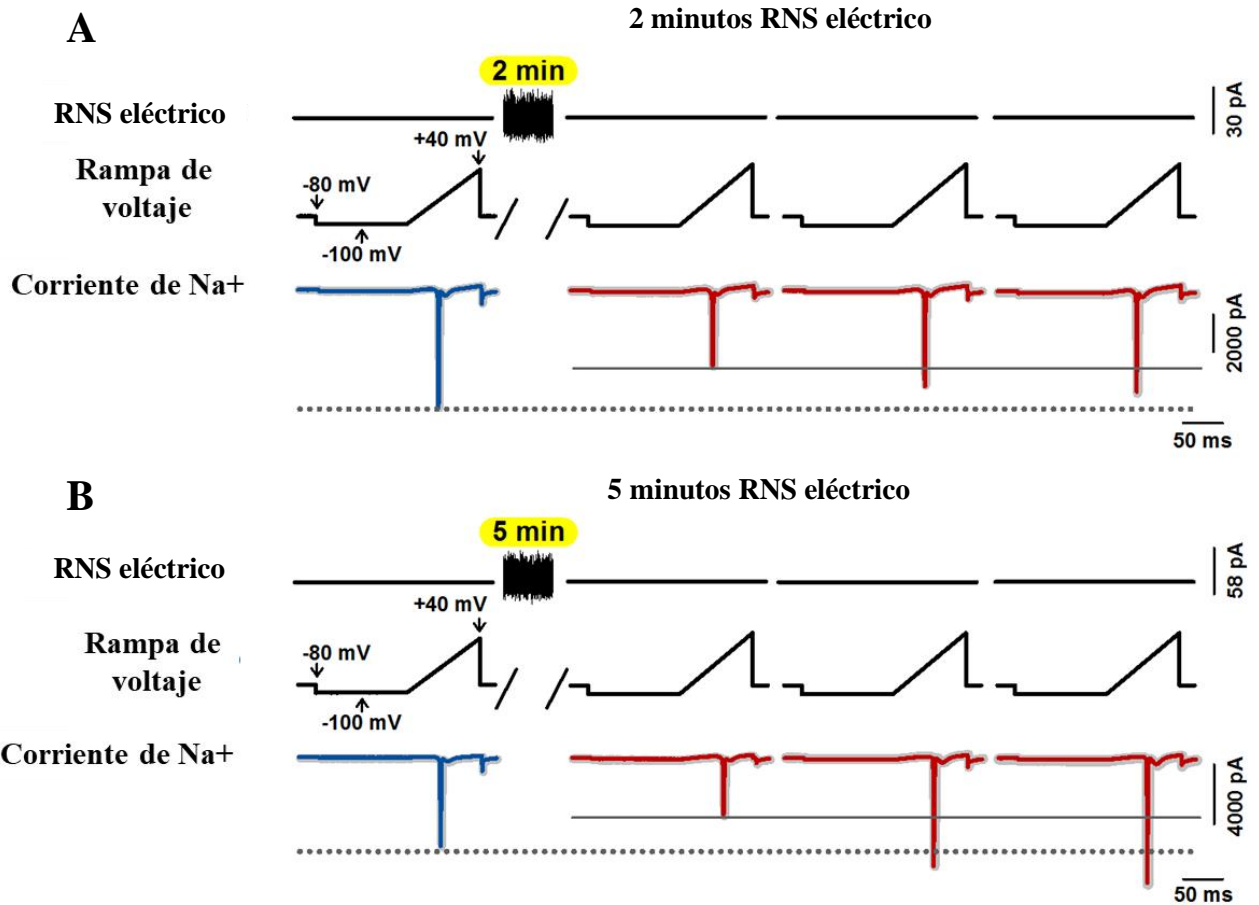
## **Efecto de la RNS eléctrico con 5 minutos de estimulación**

17 neuronas piramidales se estimularon con 5 minutos de RNS eléctrico, en las cuales se produjo una reducción estadísticamente significativa en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ), con una tendencia hacia la recuperación y facilitación tras los 5 minutos de RNS eléctrico. La Figura 19B ilustra este comportamiento típico de una neurona piramidal. La línea azul indica la corriente de Na<sup>+</sup> en condiciones de RNS eléctrico cero. Las líneas rojas son los registros de las corrientes de Na<sup>+</sup> pero después de los 5 minutos de RNS eléctrico. El contorno gris alrededor de las líneas azules y rojas es la desviación estándar de las corrientes registradas en cada caso.

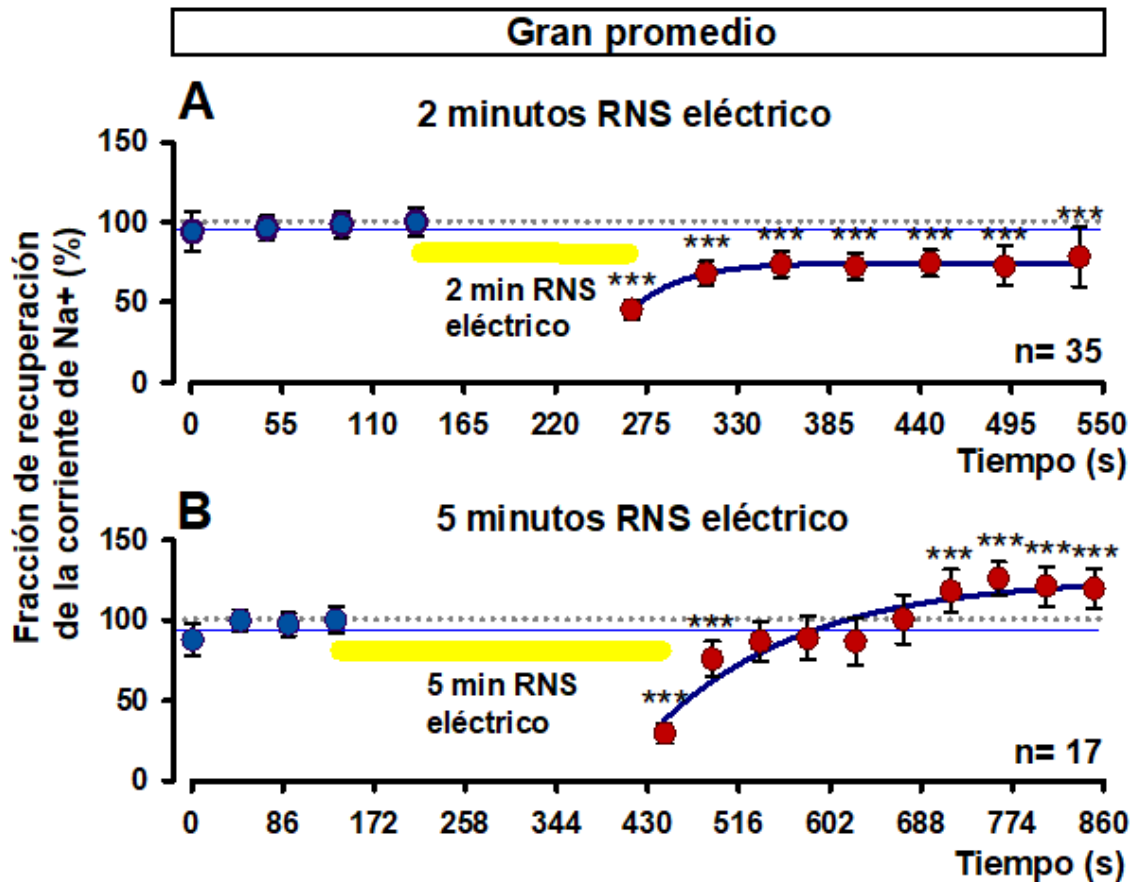
La Figura 20 muestra el gran promedio de las amplitudes normalizadas de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales versus el tiempo que duraron los protocolos experimentales. Donde para este tipo de neuronas piramidales tenemos que los círculos azules representa un tiempo anterior a los 5 minutos de RNS eléctrico y en círculos rojos un tiempo posterior a dicho estímulo. Después de los 5 minutos de RNS eléctrico se produjo una reducción inicial significativa ( $p < 0.001$ ) de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de 100% a  $29.4 \pm 6.3\%$  (ver primer círculo rojo, media  $\pm$  SE, N = 35), seguido de una rápida tendencia a la recuperación y posterior facilitación de  $118.2 \pm 7.5\%$  esto se dio a los 11.9 minutos con una constante de tiempo de  $32.4 \pm 8.7$  s.

## **Comparación entre los estímulos de 2 y 5 minutos de RNS eléctrico**

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre las constantes de tiempo de recuperación para los 2 y 5 minutos de RNS eléctrico. En la Figura 20A, podemos ver una inhibición significativa a los 536 segundos de duración de los experimentos en la cual la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Na}^+$  bajo del 100% al  $78 \pm 9.7\%$ ,  $p < 0.001$ , cuando se aplicaron los 2 minutos de RNS eléctrico. Por el contrario, encontramos una facilitación a los 716 segundos de duración de los experimentos en la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Na}^+$  de 100% a  $118.2 \pm 7.5\%$ ,  $p < 0.001$ , cuando se aplicaron los 5 minutos de RNS eléctrico. También encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la reducción máxima de la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  entre los 2 y 5 minutos de RNS eléctrico de  $45.3 \pm 5.7\%$  y  $29.4 \pm 6.3\%$ , respectivamente. Sin embargo, no encontramos ninguna correlación significativa entre los datos mostrados en la Tabla 3: capacitancia de membrana ( $C_m$ ), resistencia de acceso ( $R_a$ ), constante de tiempo de recuperación ( $\tau$ ) y estimulación de ruido aleatorio (RNS eléctrico).



**Figura 19 | Reducción de corrientes de Na<sup>+</sup> que exhiben una recuperación.** Registros típicos de la reducción de la corriente de Na<sup>+</sup> en dos neuronas piramidales, después de 2 y 5 minutos de RNS eléctrico de larga duración. (A) El primer tipo de efecto consistió en una disminución en la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> con recuperación lenta después de 2 minutos de RNS eléctrico. (B) El segundo tipo de efecto consistió en una mayor reducción de la corriente de Na<sup>+</sup> con recuperación y facilitación después de los 5 minutos de RNS eléctrico. Las líneas azules indican la corriente de Na<sup>+</sup> en condición de RNS eléctrico cero. Las líneas rojas muestran las corrientes de Na<sup>+</sup> pero a los 2 o 5 minutos después de la aplicación del RNS eléctrico. El contorno gris alrededor de las líneas azules y rojas indican las desviaciones estándar de las corrientes registradas en cada caso.



**Figura 20 | Reducción y recuperación de la amplitud máxima de las corrientes de Na+ versus la duración del registro de dichas corrientes.** (A) Gran promedio de las amplitudes máximas para 35 neuronas piramidales que exhiben una reducción en la amplitud máxima de las corrientes de Na+ con recuperación lenta. (b) Gran promedio de las corrientes de Na+ para 17 neuronas piramidales que muestran una disminución más sustancial en la amplitud máxima de las corrientes de Na+ con recuperación más rápida, seguida de una facilitación. Los tres asteriscos (\*\*\*) representan diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Los círculos azules son las amplitudes de las corrientes normalizadas de Na+ durante la etapa de RNS eléctrico cero. Los círculos rojos, son las amplitudes normalizadas de las corrientes de Na+ durante la etapa posterior a la aplicación del RNS eléctrico. La "fracción de recuperación (%)" indica el porcentaje de recuperación de las amplitudes máximas de las corrientes de Na+, posteriores a la estimulación con RNS eléctrico, con respecto al control.

Propiedades eléctricas						
Parámetros						
Neurona	Cm (pF)	Ra (MΩ)	RNS (pA)	τ (s)	Fracción de recuperación de la corriente de Na+ (%)	
	S1PN1	8.12	15	50	33.47	86.00
	S1PN2	8.12	18	45	73.52	72.0
	S1PN3	5.75	18.2	47	32.68	34.7
	S1PN4	4.9	24	30	44.35	7.9
	S1PN5	8.5	10	30	49.02	18.1
	S1PN6	11.7	15	38	66.46	5.0
	S2PN1	7.5	19	50	64.22	31.7
	S2PN3	13	14	30	37.67	45.1
	S2PN5	6.3	21.2	30	41.66	71.9
	S2PN6	13.95	27	78	38.2	49.8
	S2PN7	8.5	21.2	33	32.46	40.4
	S3PN3	9.1	10.5	85	48.15	18.1
	S3PN6	11.6	16.1	143	36.11	18.9
	S3PN7	6.38	13	30	23.47	20.8
	S3PN9	13.19	14	55	42.77	71.3
	S3PN11	8.9	17.2	35	66.67	48.7
<b>2 minutos de RNS eléctrico</b>	S3PN12	10.8	12.2	25	58.68	64.7
	S4PN2	12.2	14.4	24	34.73	47.7
	S4PN3	11.6	14.4	22	41.37	28.0
	S4PN5	13	11.86	26	48.18	78.3
	S4PN6	10	20	25	55.55	30.4
	S4PN7	7.84	24	27	53.09	24.7
	S4PN8	6.75	22	30	33.33	3.4
	S4PN9	9.56	10.5	30	97.38	63.1
	S4PN10	9.37	14.9	30	60.31	11.5
	S5PN2	15	20	29	32.62	73.3
	S5PN3	11.6	17.7	25	43.33	82.3
	S5PN4	9.17	19.6	48	35.69	66.1
	S5PN5	7.9	19.6	65	44.82	50.9
	S5PN6	6.71	18.16	117	32.46	55.3
	S5PN7	11	24.8	77	32.59	75.7
	S5PN10	9.56	24.8	27	41.33	15.8
	S5PN12	9	8.79	28	45.95	40.4
	S5PN13	9.63	12.5	35	39.64	48.1
	S5PN14	8.79	9	23	74.2	3.6
	S1PN1	7.46	12.92	30	38.65	8.4
	S1PN2	8.73	24.9	27	42.91	110.6
	S1PN3	7.52	20.4	35	39.94	19.1
	S1PN10	5.41	14.18	54	32.15	3.6
	S1PN11	5.28	14.18	35	27.96	31.9
	S1PN12	6.55	14.18	42	21.66	23.1
	S2PN2	11.4	17	66	22.17	7.2
	S2PN3	8.75	18	37	38.32	136.2
<b>5 minutos de RNS eléctrico</b>	S2PN4	9.49	16.73	30	23.11	120
	S2PN5	7.2	16.73	34	49.02	2.4
	S2PN6	6.95	22.84	24	37.71	42.1
	S3PN1	6.97	19.7	29	36.91	30.3
	S3PN2	6.18	22	32	32.31	118.5
	S3PN4	5.55	15.34	32	18.91	34.3
	S3PN6	8.79	18.36	31	36.82	123.1
	S3PN7	10.78	16.72	39	21.2	106.9
	S3PN8	8.5	22.49	23	32.46	2.0

**Tabla 3.  $C_m$  (capacitancia de membrana),  $R_a$  (resistencia de acceso), RNS eléctrico (estimulación de ruido aleatorio),  $\tau$  (constante de tiempo de recuperación), PN es para neuronas piramidales y S para un sujeto.** "La fracción de corriente de  $Na^+$  recuperada (%)" es el porcentaje con respecto a la máxima amplitud del pico de corriente de  $Na^+$  control que obtienen las corrientes de  $Na^+$  de recuperación al final de los protocolos experimentales. Por ejemplo, para la neurona S1PN1, las amplitudes de sus últimas corrientes de  $Na^+$  fueron un 86% de la corriente máxima para la condición control; es decir antes de la estimulación eléctrica ruidosa.

---

---

## CAPÍTULO 5

# **EFFECTO DE LA FOTOESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA RUIDOSA DE LARGA DURACIÓN EN EL AUMENTO DE LA AMPLITUD DE LA CORRIENTE DE $Na^+$ DE CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS WISTAR TRANSFECTADAS**

---

---

## **INTRODUCCION**

Como se describió previamente, la tRNS aumenta la excitabilidad cerebral humana, la cognición numérica y la percepción de la identificación facial (Terney y cols., 2008; Cappelletti y cols., 2013; Snowball y cols., 2013; Romanska y cols., 2015). Pero aún se desconoce el mecanismo por el cual el cerebro presenta estas respuestas conductuales debidas a las entradas sensoriales ruidosas externas.

Una de las estrategias que se siguen para entender estos mecanismos, es utilizar un modelo reduccionista que estudie individualmente las partes que conforman el SNC. Una de estas partes serían las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial. Es decir, en vez de estudiar toda la red neuronal que conforma el tejido nervioso donde se aplicó la tRNS, se deberán estudiar las neuronas individualmente mediante protocolos de estimulación análogos a las preparaciones in vivo. Como por ejemplo, si utilizamos neuronas con canales ChR2, cuyo potencial de membrana cambia cuando se le aplican pulsos de luz (Deisseroth, 2015). Será posible que la aplicación de luz ruidosa pueda producir cambios de manera aleatoria (estocástica) en el potencial de membrana de dichas neuronas? Y si esto es así, ¿de qué manera, este estímulo luminoso, impactará sobre sus corrientes iónicas a lo largo del tiempo?

---

---

---

## **CAPÍTULO 5**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---

---

#### **Procedimientos generales**

Realizamos experimentos en 10 neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de cuatro ratas wistar hembras ( $310 \pm 10$  gramos) proporcionadas por el Dr. Pavel Rueda Orozco, del Instituto de neurobiología (UNAM), Campus Querétaro, quien transfectó a los animales en su laboratorio. La transfección se realizó con el promotor CAMK-II, para que las neuronas expresaran la proteína canalrodopsina-2. Ello permitió que las neuronas exhibieran una permeabilidad al ion  $\text{Na}^+$  cuando un estímulo luminoso de luz azul de 420 nm incidiera sobre ellas. Registramos las corrientes de  $\text{Na}^+$  producidas por la aplicación de un protocolo de rampa de voltaje y también durante la adición de RNS optogenética.

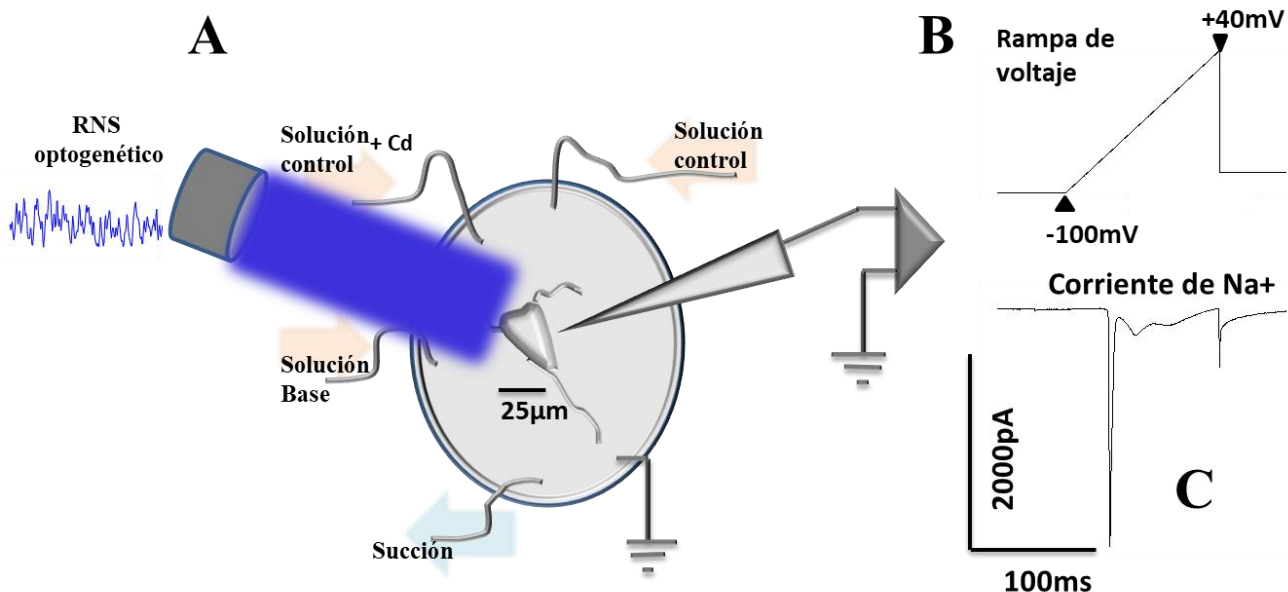
Los animales se mantuvieron en cuartos con luz y temperatura controlada (luz encendida a las 6 a.m. y luz apagada a las 6 p.m.) y con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales se apegaron a los lineamientos del Comité Directivo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), de la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85- 23, revisada en 1985) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Asimismo, todos los protocolos fueron aceptados por el comité de ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICUAL-Proyecto-4032).

Una vez que se ha establecido el sello entre la micropipeta y la membrana de la neurona piramidal, aplicamos una rampa control para observar las corrientes de Na<sup>+</sup> y calcio. Posteriormente, suministramos la solución control adicionada con cadmio para bloquear las corrientes de calcio dependientes de voltaje. Al cerciorarnos de registrar la corriente de Na<sup>+</sup>, aplicamos el protocolo de estimulación completo, el cual consistió en diez rampas continuas. Consideramos a este protocolo como nuestro control experimental.

Después de los dos minutos de RNS optogenética, se realizaron cinco protocolos de estimulación con rampa de voltaje espaciados temporalmente por 30 segundos. Las características de la rampa de voltaje se observan en la Figura 21B.

### **Fotoestimulación ruidosa optogenética**

La zona central de la caja de Petri donde se obtuvieron las neuronas piramidales, se iluminó con luz azul ruidosa de 470 nm (RNS optogenética), la cual, se aplicó con una fibra óptica de 200  $\mu\text{m}$ , con una apertura numérica de 0.39 del sistema ThorLabs. Las variaciones de la intensidad de la luz azul se controlaron a través de un generador de ruido WaveTek 132. Por otra parte, usamos un medidor de potencia óptica PM100D con salida analógica y sensor tipo S150C de ThorLabs para caracterizar el espectro de potencia de la RNS optogenética aplicada a la corteza cerebral. El espectro de potencia de la RNS optogenética fue similar al espectro de potencia del ruido Browniano en el rango de 0 a 5000 Hz. Empleamos este tipo de RNS optogenética en 0.5 mW de potencia óptica.



**Figura 21 |. Representación de la metodología experimental.** En A se muestra la representación de la ubicación central de la neurona piramidal en una caja Petri. Por medio de dos capilares suministramos el cambio de la solución control y la solución de control más cadmio. Al encontrar una neurona con las características previamente mencionadas realizamos el sello de la neurona. Posteriormente, suministramos por el capilar derecho una solución control con el fin de ver las corrientes que pasan por la membrana neuronal. A continuación, hacemos un cambio de la solución control por el capilar izquierdo con la solución que contenga cadmio. El propósito de realizar el cambio de solución con cadmio es bloquear los canales de calcio y poder observar la corriente de Na<sup>+</sup>. Una vez que se han obtenido las corrientes de Na<sup>+</sup> control, se procedió a estimularla con RNS optogenética, la zona central de la caja de Petri a una distancia de 5 cm durante 2 minutos. Durante este tiempo se hicieron dos protocolos experimentales de obtención de corrientes de Na<sup>+</sup>, donde se obtienen 10 barridos por cada protocolo experimental.

Al mismo tiempo, suministramos la solución fisiológica que contiene los iones necesarios para que las neuronas se mantengan estables. La porción inferior izquierda de la Figura 21A indica la succión, la cual es la encargada de controlar el nivel de solución que contiene la caja Petri. Esto nos ayudó a renovar la solución fisiológica hacia las neuronas piramidales aisladas. La porción inferior derecha de la Figura 21A muestra la referencia de nuestro sistema de registro.

La Figura 21B representa los datos que se registran en el equipo de cómputo, el cual consiste en la amplificación y la digitalización de la señal de la corriente que atraviesa la membrana. La Figura 21C representa una corriente de Na<sup>+</sup> representativa que se registró de una neurona piramidal. La Figura 21B representa la rampa de estimulación que se aplicó para obtener la corriente que se observa en la Figura 21C. Ambas imágenes se encuentran alineadas para observar el efecto de la rampa de estimulación sobre la corriente de Na<sup>+</sup> de la neurona piramidal.

### **Análisis de datos**

Obtuvimos las amplitudes promedio de las corrientes de Na<sup>+</sup> de 10 neuronas piramidales somatosensoriales, producidas por los protocolos de rampa de voltaje. Cada protocolo de rampa de voltaje consistió en aplicar diez señales eléctricas con forma de rampas de voltaje a la célula por medio de la micropipeta de registro y así obtener diez corrientes de Na<sup>+</sup>. Para medir la amplitud de cada corriente se tomó el valor de la corriente a los -80mv hasta el valor del pico máximo (entre el intervalo de -100mV a +40mv). Además para medir la latencia de cada corriente, medimos el tiempo que pasaba entre el inicio de la rampa hasta el tiempo en que se producía el pico máximo.

Para cada protocolo de rampa de voltaje obtuvimos diez amplitudes de corriente y sus respectivas latencias. Junto con las cuales calculamos los promedios de las amplitudes y latencias de las corrientes de Na<sup>+</sup> como lo muestran las Figuras 31 y 32, donde cada círculo en color representa el promedio de un protocolo de rampa de voltaje.

## **Análisis estadístico**

Comparamos las diferencias estadísticas en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> en las siguientes condiciones: RNS optogenética cero vs. RNS optogenética (2 min). Usamos las pruebas de rango con signo no paramétricas por pares para examinar la significancia estadística.

Las barras en todos los gráficos indican el error estándar. Realizamos el análisis bajo la hipótesis nula de que las diferencias en las medias entre dichas condiciones eran cero. Las diferencias se consideraron como significativas si  $p < 0.05$ . Cada valor en las gráficas y texto asociados con las corrientes de Na<sup>+</sup> corresponden a la media  $\pm$  error estándar (se).

---

---

---

# **CAPÍTULO 5**

## **RESULTADOS**

---

---

---

Realizamos experimentos en cuatro ratas wistar transfectadas. Encontramos que un nivel de intensidad de RNS optogenética sobre neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial primaria genera un aumento en la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> posterior a dicha estimulación.

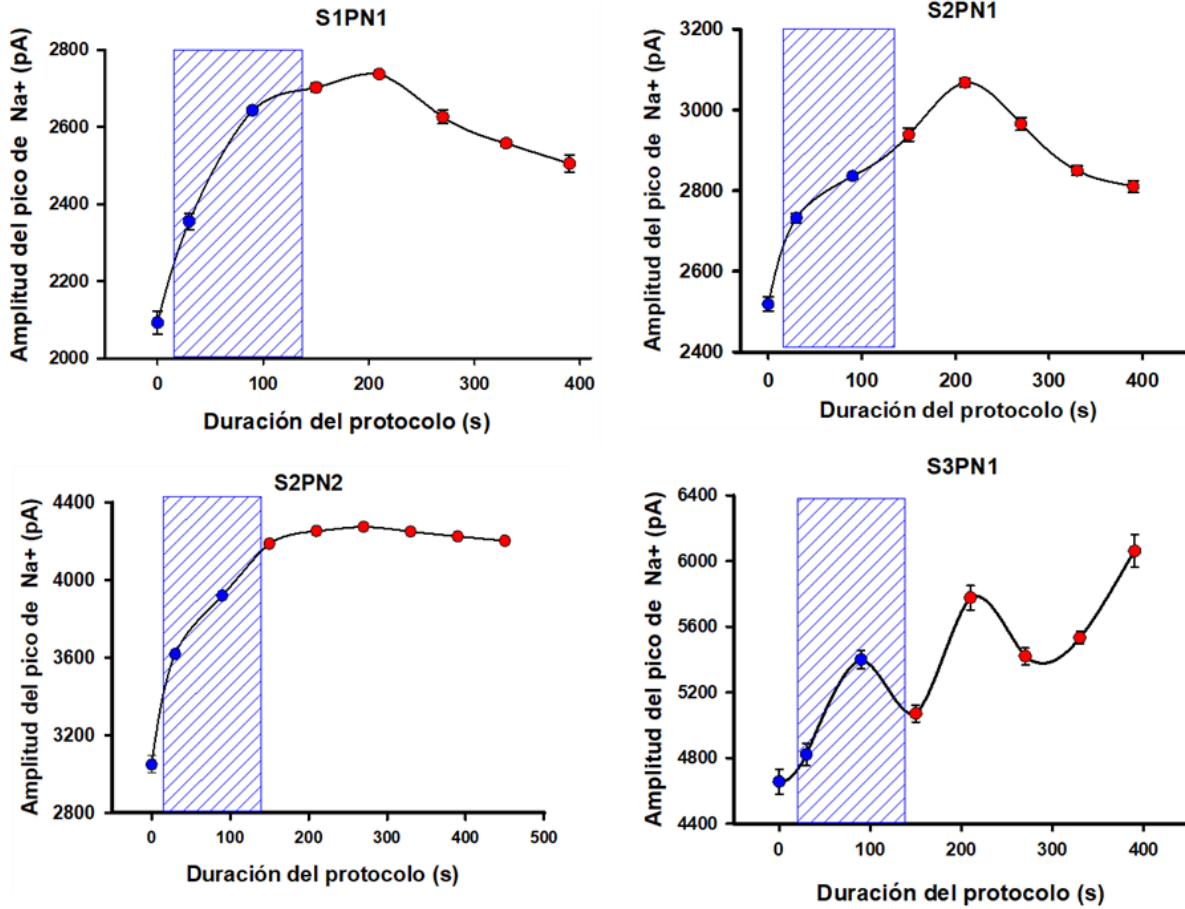
La letra S indica cada sujeto y la letra W (rata wistar), seguido de un número para indicar de cuál sujeto se trata. Después indicamos el tipo de neurona que se está usando con las letras PN (piramidal neurons, por sus siglas en inglés). Para este caso utilizaremos solo neuronas piramidales. Así, por ejemplo para indicar que estamos hablando de la segunda neurona piramidal que obtuvimos del primer sujeto de experimentación, usamos: S1PN2.

También obtuvimos las resistencias de acceso ( $R_a$ ) y capacitancia de membrana de cada célula ( $C_m$ ) ver tabla 4.

Para cada célula piramidal hicimos una gráfica que nos muestra el comportamiento del promedio de la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  en cada protocolo de rampa de voltaje a lo largo del tiempo (~400 s de duración) Figuras 22 y 23.

En la Figura 24 se muestra el promedio sin normalizar de los promedios de las corrientes de  $\text{Na}^+$ . En la Figura 25, se muestra el promedio normalizado de las corrientes de  $\text{Na}^+$  de las diez neuronas.

Observamos que el efecto secundario primario después de aplicar la RNS optogenética por dos minutos fue un aumento estadísticamente significativo de la corriente de  $\text{Na}^+$  ( $p < 0.006$ ).



**Figura 22 | Efecto de la aplicación de RNS optogenética de larga duración (rectángulo en azul) sobre los promedios de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidos por ocho protocolos de rampa de voltaje de las neuronas piramidales de los sujetos 1, 2 y 3. El rectángulo vertical indica el periodo de tiempo en el que se realizó la RNS optogenética.**

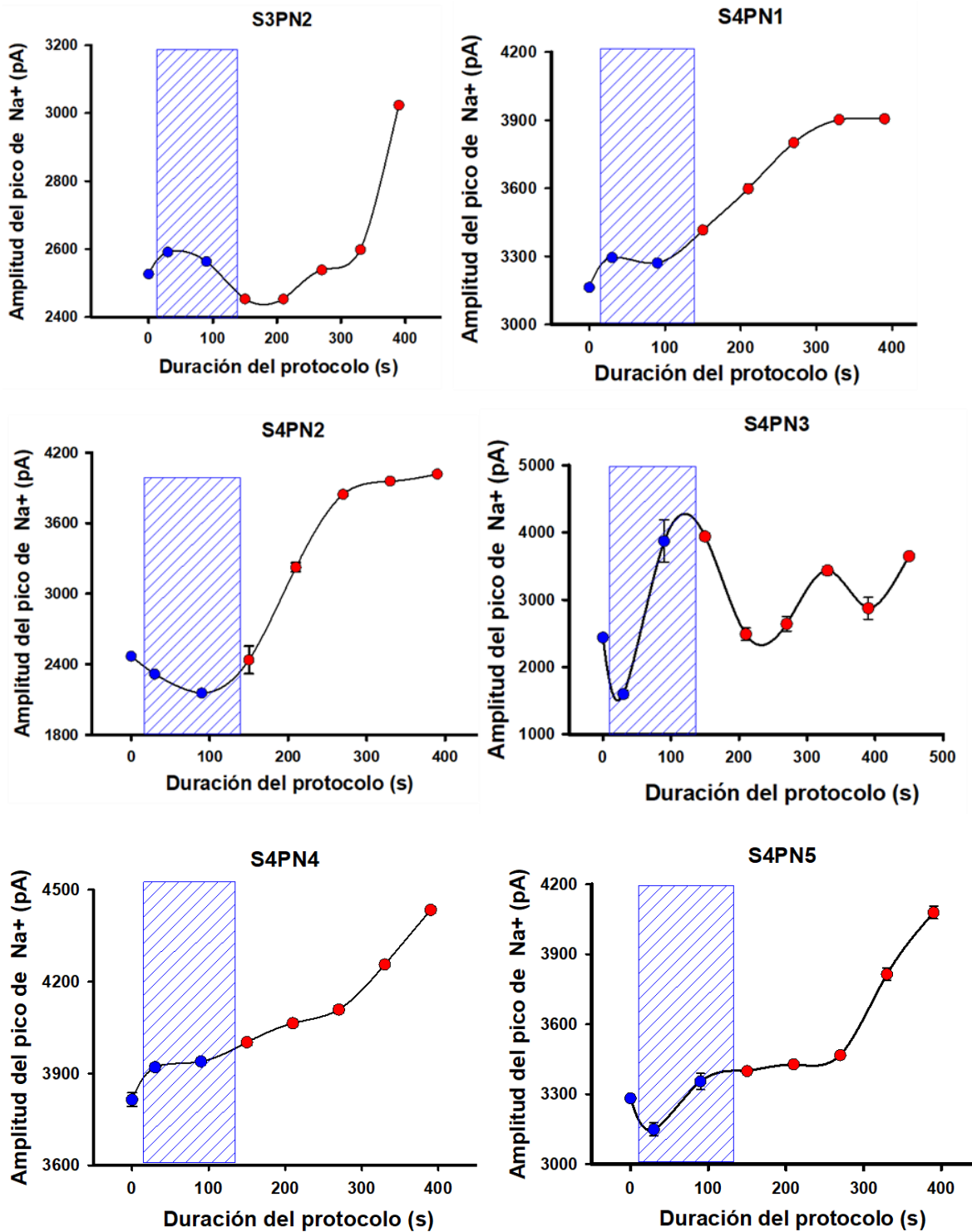
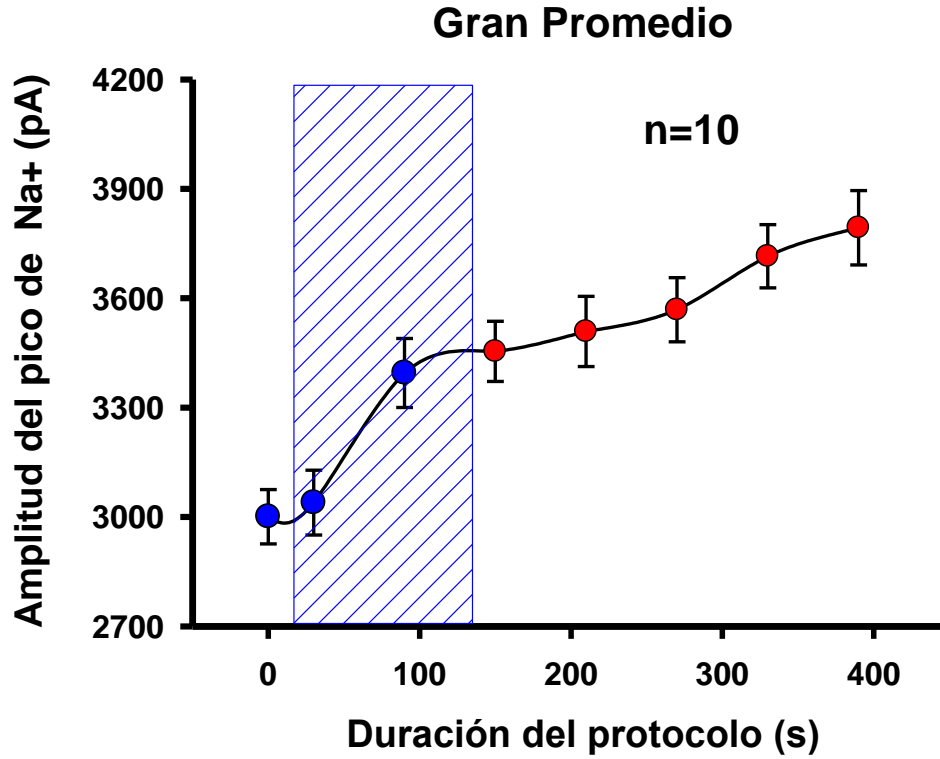
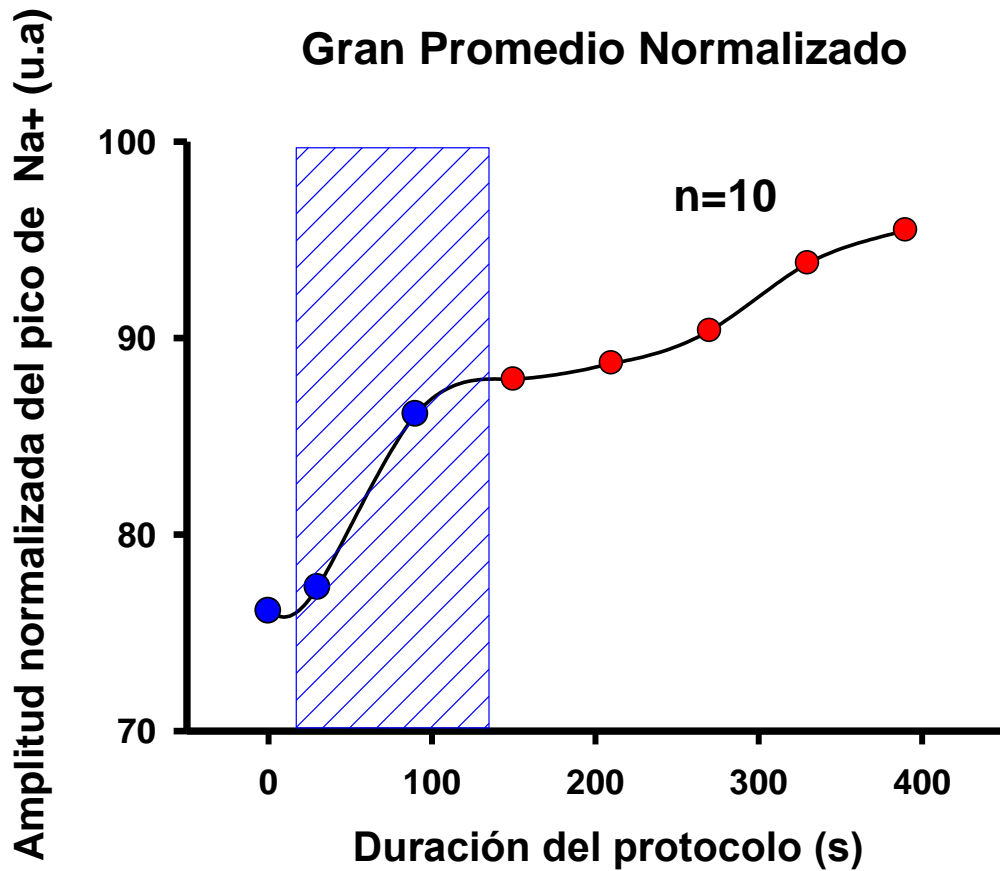


Figura 23 Efecto de la aplicación de RNS optogénica de larga duración (rectángulo en azul) sobre los promedios de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidos por ocho protocolos de rampa de voltaje de las neuronas piramidales de los sujetos 3 y 4. El rectángulo vertical indica el periodo de tiempo en el que se realizó la RNS optogénica).



**Figura 24 |.** Gran promedio de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales vs el tiempo del protocolo experimental. El rectángulo en azul indica el período de tiempo en que se aplicó la RNS optogenética. La letra n indica el número de neuronas usadas en los experimentos.



**Figura 25 | Gran promedio normalizado de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales vs el tiempo del protocolo experimental.** El rectángulo en azul indica el período de tiempo en que se iluminaron las células. Aquí n representa el número de neuronas usadas en los experimentos.

<b>Neurona</b>	<b>Ra(M<math>\Omega</math>)</b>	<b>Cm(pF)</b>
<b>S1PN1</b>	20	8.19
<b>S2PN1</b>	19	14
<b>S2PN2</b>	13.7	11.4
<b>S3PN1</b>	9.3	10.11
<b>S3PN2</b>	9.1	10.67
<b>S4PN1</b>	18.8	9.05
<b>S4PN2</b>	20.5	12.14
<b>S4PN3</b>	11	5.47
<b>S4PN4</b>	28.2	11.05
<b>S4PN5</b>	11.4	5

**Tabla 4 |. Parámetros eléctricos de las neuronas piramidales de las ratas wistar transfectadas en el protocolo experimental de largo alcance. Ra=resistencia de entrada y Cm=capacitancia de membrana.**

---

---

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

---

Ya que el SNC es en esencia un sistema no lineal, es de esperarse que su respuesta sea aleatoria; es decir, que no se puede tener una predicción exacta de los elementos que la componen. Sin embargo, esta aleatoriedad no limita al SNC para cumplir con sus funciones de procesamiento y transmisión de la información sensorial y multisensorial. Si no por el contrario, lo ayuda a cumplir con dichas funciones.

Esta propiedad de aleatoriedad, en la cual no podemos hacer una predicción exacta de los estados futuros de una variable que intervienen en un fenómeno complejo, lo denominamos como “ruido”. Pero es gracias a este ruido de fondo eléctrico del SNC, que los organismos vivos puedan producir respuestas ante estímulos de su medio externo y poder con ello tomar decisiones para su supervivencia.

Ya en 1964 Bindman y cols., propusieron que la variabilidad de las respuestas corticales producidas por estímulos periódicos ocurre por la presencia de la alta actividad poblacional espontánea de fondo; es decir, por una alta cantidad de ruido de fondo, que es producida en mayor proporción en las sinapsis o conexiones entre neuronas (Blessloff., 1995; Brunel y cols., 2001).

Por lo anterior, se propuso que la actividad de fondo de grupos de neuronas del SNC representa el estado basal del sistema y tiene un papel funcional importante en el procesamiento y control de múltiples señales sensoriales (Manjarrez y cols., 2000; Faisal y cols., 2008).

## **Efecto del ruido eléctrico sobre la corriente de Na<sup>+</sup> en neuronas piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratas wistar**

Encontramos que la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de todas las neuronas piramidales sensibles a TTX siguió una forma de U invertida en función del nivel de RNS eléctrico u optogenético aplicado de corta duración. Además, observamos que el RNS eléctrico produjo una modulación en la inversa de la latencia de las corrientes de Na<sup>+</sup> del siguiente modo: 1) siguiendo un forma de U invertida en función de la RNS eléctrico para neuronas del grupo 1 y 2. 2) siguieron un perfil arbitrario como una función del RNS eléctrico para las neuronas del grupo 3. Significa que el RNS eléctrico ejerce una modulación sobre la activación o inactivación de los canales de Na<sup>+</sup>. Esto refuerza la hipótesis de que la RNS eléctrica podría inducir la facilitación de las corrientes de Na<sup>+</sup> sensibles a TTX a través de un aumento de excitabilidad con un nivel intermedio de ruido. Los estudios de Bezrukov y Vodyanoy (1995, 1997) sugirieron la existencia de resonancia estocástica en un nivel subcelular en bicapas lipídicas artificiales y abren la pregunta de si este fenómeno podría ocurrir en células nerviosas de la corteza cerebral.

Nuestros resultados son consistentes con los estudios en humanos realizados por Chaieb y cols. (2015). Estos autores mostraron que la plasticidad inducida por estimulación transcraneal eléctrica ruidosa es independiente del receptor NMDA, pero es sensible a las benzodiazepinas. Nuestros hallazgos también son consistentes con estudios previos hechos con tRNS eléctrica que aumentan la excitabilidad del sistema nervioso, mejorando la percepción y el aprendizaje en humanos (Terney y cols., 2008; Laczo y cols., 2014; Van Doren y col., 2014; Romanska y cols., 2015; Pasqualotto, 2016; Popescu y cols., 2016; Van der Groen y Wenderoth, 2016; Koningsbruggen y cols., 2016; Antal y cols., 2017; Looi y col., 2017; Mammarella y cols., 2017; Penton y col., 2017; Rufener y col., 2017; Yang y Banissy, 2017). Aplicamos RNS eléctrico en lugar de otros patrones de estimulación, primero, porque queríamos explicar los resultados obtenidos por Terney y cols. (2008), y segundo, porque hay evidencia convincente de que la estimulación tRNS excede las influencias beneficiosas de la estimulación transcraneal en corriente continua (Fertonani y Miniussi, 2011; Jausovec y Pahor, 2017).

En otras palabras, hay un nivel intermedio de RNS eléctrico que mejora la activación o inactivación de los procesos que ocurren en los canales de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales. Nuestros hallazgos arrojan luz sobre el posible proceso fisiológico relacionado con la amplificación de las corrientes de Na<sup>+</sup> durante la aplicación de RNS eléctrico de corta duración. Estos hallazgos podrían ser útiles para el diseño de nuevos protocolos de estimulación con tRNS de corta duración (en el orden de 250 ms) en humanos.

## **Efecto de la estimulación optogenética ruidosa en el aumento de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de células piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratones transgénicos**

Descubrimos que aplicando una serie de niveles de RNS optogenética a las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP, ocasiona que la respuesta que sigue la amplitud de la corriente Na<sup>+</sup> y la inversa de su latencia sea una gráfica con forma de U invertida. Esto significa que un nivel intermedio de RNS optogenética puede maximizar la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup>. La RNS optogenética aplicado en este experimento se basó en dos estudios previos de nuestro laboratorio (Huidobro y cols., 2017; Huidobro y cols., 2018).

Con este hallazgo responderemos a tres preguntas fundamentales: (1) ¿cómo la RNS optogenética aumenta la excitabilidad de los canales de Na<sup>+</sup>? (2) ¿por qué es que existe un nivel intermedio óptimo de RNS optogenética? (3) ¿cómo el alto nivel de RNS optogenética disminuye la excitabilidad de los canales de Na<sup>+</sup>?

Una posible respuesta a la pregunta 1 es que la RNS optogenética aumenta indirectamente la excitabilidad de los canales Na<sup>+</sup> a través de su acción en los canales ChR2, posiblemente a través de su impacto en la cinética de activación e inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> (Remedios y cols., 2019).

Finalmente, una respuesta sugerida para las preguntas 2 y 3 es que hay un nivel intermedio de RNS optogenética con un perfil en forma de U invertida que está asociado con el fenómeno de resonancia estocástica (Moss y cols., 2004). Dicha resonancia posiblemente influye sobre los canales de ChR2, como se sugirió anteriormente en preparaciones *in vivo* (Huidobro y cols., 2017, 2018).

Para el caso del cambio en el tiempo de activación de las corrientes de Na<sup>+</sup> en ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP, solo podemos especular que la señal producida por un nivel intermedio de RNS optogenética podría sumarse a la rampa de voltaje. Ello ocasionaría que se alcance antes de tiempo el potencial de membrana suficiente para activar los canales de Na<sup>+</sup> y producir un incremento de la corriente. Sin embargo esta hipótesis no explica el hecho de que para la máxima intensidad de RNS optogenética, no se obtenga el mínimo tiempo de latencia en las corrientes de Na<sup>+</sup>. Muy por el contrario, aplicando el máximo nivel de RNS optogenética se obtienen las mayores latencias (Figura 28B).

Desde una perspectiva integradora, nuestros resultados son consistente con estudios previos que muestran que un ruido eléctrico aplicado a la corteza somatosensorial podría emplearse para mejorar la percepción táctil (Medina y cols., 2012) y el aumento de la función cerebral a través de interfaces cerebro-máquina (Lebedev y cols., 2018). Mientras que a nivel celular nuestros resultados también son consistentes con otros estudios que utilizan canales iónicos de alameticina estimulados con ruido eléctrico. (Bezrukov y Vodyanoy, 1995, 1997a). En la presente investigación, empleamos luz en lugar de electricidad o estímulos magnéticos, porque la luz proporciona un control preciso de actividad neuronal cuando se aplica en ratones transgénicos que expresa ChR2 (Arenkiel y cols., 2007).

Recientemente, se demostró que la luz por sí sola es capaz de modular los canales iónicos en ratones controles, transitoriamente, cambiando la temperatura del tejido de 0.1 a 0.4 C, y su efecto es diferente de un tipo de célula a otra en el cerebro (Ait Ouares y cols., 2018). La discrepancia entre las observaciones por Ait Ouares y cols. (2018), y nuestros resultados podrían deberse a las diferentes intensidades de luz empleadas. En nuestros experimentos, Mabil y cols., (2020) la luz ruidosa aumenta las corrientes de Na<sup>+</sup> en ratones transgénicos pero no en ratones controles, aplicamos luz con un rango de potencia de 0 a 0.67 mW,

mientras que Ait Ouares y cols. (2019) aplicaron luz a intensidades más altas de 1.5 y 13 mW.

Ait Ouares y cols. (2019) demostró que la temperatura del tejido aumenta linealmente con la potencia luminosa alcanzando un valor medio de 0.03 C a 1 mW y 0.4 C a 13 mW. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 29 (ver eje horizontal), encontramos que los niveles óptimos de RNS optogenética (círculos rojos) para todas nuestras células piramidales fueron menores de 0.6 mW. Es decir, alrededor de 0.1, 0.3 y 0.58 mW, como se ilustra en los gráficos agrupados. Por lo tanto, según estas comparaciones, podríamos sugerir que nuestros resultados en ratones transgénicos se deben al efecto de RNS optogenética en los canales de Na<sup>+</sup> pero no a la temperatura.

### **Efectos posteriores a la estimulación eléctrica de ruido aleatorio de corta y larga duración en la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial de ratas wistar**

Encontramos que tanto 2 como 5 minutos de RNS eléctrico produjeron una reducción significativa de los efectos secundarios en la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> seguida de una recuperación lenta y rápida con facilitación, respectivamente. Nuestros resultados son consistentes con los datos obtenidos de experimentos en el cerebro humano realizados por Terney y cols., 2008; Chaieb y col., 2009; Chaieb y cols., 2011. Demostraron que el tRNS de menos de 4 minutos no produce cambios de excitabilidad corticoespinal. Por el contrario, la tRNS de larga duración, igual o superior a 5 minutos, facilita la excitabilidad corticoespinal. En este contexto, nuestros resultados destacan la posible contribución de los canales de Na<sup>+</sup> en tales efectos diferenciales. Esto está en concordancia con la evidencia previa en humanos, que muestra que los efectos de la tRNS de larga duración no son dependientes del receptor NMDA sino del canal de Na<sup>+</sup> (Chaieb y cols., 2015).

Nuestros hallazgos relacionados con una recuperación rápida con facilitación de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> por 5 minutos de RNS eléctrico están en concordancia con la evidencia de que el tRNS de larga duración puede mejorar la cognición y el

comportamiento humano (Snowball y cols., 2013), así como el rendimiento motor en pacientes con accidente cerebrovascular (Arnao y cols., 2019). No obstante, otras propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales, como las propiedades pasivas y el árbol dendrítico, también podrían contribuir con el efecto del tRNS observadas en el cerebro humano (Mainen y Sejnowski, 1996).

Además, las características de los canales iónicos en el soma y los árboles dendríticos de las células piramidales no son estáticas, sino que pueden modificarse por la actividad neuronal (Remy y cols., 2010). Por lo tanto, es posible que el RNS eléctrico de larga duración de 5 minutos pueda cambiar la actividad neuronal y las propiedades de los canales de Na<sup>+</sup>, aumentando así la excitabilidad de las neuronas piramidales. Esta posibilidad es consistente con reportes que muestran que diferentes patrones fisiológicos de estimulación eléctrica también pueden inducir la expresión de genes neuronales (Brosenitsch y Katz, 2001) y alteraciones del árbol dendrítico (Remy y cols., 2010). En particular, Brosenitsch y Katz (2001) encontraron que la estimulación eléctrica de neuronas sensoriales primarias disociadas a 5 Hz, o el tratamiento con K<sup>+</sup> elevado, producían un aumento sustancial en el porcentaje de neuronas que expresan ARNm y proteína de tirosina hidroxilasa (TH). Consistentemente, Santin y Schulz (2019) encontraron que el voltaje de la membrana neuronal influye directamente en la expresión del canal iónico correlacionado. Por lo tanto, es tentador especular que el tRNS de larga duración de 5 minutos podría inducir a la expresión de más canales iónicos y un posible aumento en la excitabilidad neuronal.

Otra posible explicación para entender el mecanismo fisiológico que subyace a este peculiar efecto del ruido eléctrico es la siguiente. Podría deberse al hecho de que los canales de Na<sup>+</sup> actúen como pequeños elementos eslabonados que sincronicen su actividad para aumentar la magnitud de la corriente de Na<sup>+</sup> en función del tiempo que es estimulada la membrana celular. Es decir, si la célula no pasa suficiente tiempo siendo estimulada no se le dará el tiempo suficiente para que los canales se eslabonen mutuamente y puedan producir una respuesta sincronizada con un estímulo de rampa de voltaje. Lo cual demuestra que dos minutos de estimulación eléctrica no es tiempo suficiente para ocasionar una respuesta facilitadora sobre los canales de Na<sup>+</sup>.

Un ejemplo de este tipo de carácter colectivo de elementos individuales de un sistema no lineal se puede encontrar en la famosa reacción Belousov-Zhabotinsky, la cual involucra la coordinación de millones de moléculas individuales (Pomeau y cols, 1981). Como resultado de pasar de un estado de cinética química estable a uno turbulento (ruido), producido por termoconvección de la solución donde se realiza la reacción.

Nuestros hallazgos relacionados con la reducción de la excitabilidad neuronal sin facilitación de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> después de 2 minutos de RNS eléctrico, como se ilustra en las Figuras 19A y 20A, podrían ayudar a mejorar algunas estrategias para tratar el daño cerebral a través de una reducción de las corrientes de Na<sup>+</sup>. Sugerimos que el uso combinado de fármacos neuroprotectores que reducen las corrientes de Na<sup>+</sup> (Lakics y cols., 1995; Molnar y Erdö, 1995; Kopanitsa y cols., 2000) con la administración de tRNS de 2 minutos también podría ayudar a desarrollar una prometedora estrategia en el tratamiento de trastornos cerebro-vasculares relacionados con la isquemia y trauma cerebral (Urenjak y Obrenovitch, 1996; Taylor y Meldrum, 1995). En la misma línea, nuestro estudio también podría ser útil para aclarar una hipótesis clínica, afirmando que un aumento en la excitabilidad de las neuronas piramidales se asocia con un comportamiento depresivo en ratones (Sun y cols., 2011). Por lo tanto, podríamos especular que el tRNS de 2 minutos podría disminuir la depresión en estos ratones.

Nuestros resultados sugieren que el tRNS de 2 minutos podría ser suficiente para reducir la excitabilidad de las neuronas piramidales mediante una reducción prolongada en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup>. Tal resultado podría usarse para implementar estrategias para suprimir la actividad epileptiforme (Bilson y cols., 2001). Finalmente, podríamos sugerir que la reducción prolongada de la corriente de Na<sup>+</sup> sin facilitación después del RNS eléctrico podría ser útil para caracterizar las neuronas piramidales. Tal afirmación está respaldada por estudios de inhibición dependiente del uso de las corrientes de Na<sup>+</sup> por homólogos de benzocaína (Quan y cols., 1996).

Una limitación de nuestro estudio es que no examinamos los mecanismos de reducción y recuperación de la corriente de Na<sup>+</sup> después de la estimulación del RNS eléctrico de larga duración. Solo podemos especular al respecto. Es posible que tanto el RNS eléctrico de 2 como de 5 minutos produzcan un impacto transitorio sobre el péptido inactivante

relacionado con el modelo de "bola y cadena" (Amstrong y Bezanilla, 1977; Amstrong, 1981; Kuo y Liao, 2000). En tal caso, la estimulación por ruido de 5 minutos sería más eficiente para producir una mayor inactivación del canal de  $\text{Na}^+$  con una recuperación y facilitación más rápidas que la RNS eléctrico de 2 minutos. Para examinar esta posibilidad, serán necesarios experimentos futuros con fármacos que impacten en el péptido inactivante del motivo de bola y cadena y nuevos modelos matemáticos utilizando resonancia estocástica (Nobukawa y Nishimura, 2016) o caótica (Nobukawa y Shibata, 2019).

Otra explicación de nuestros hallazgos, coinciden con la descripción dada por Moliadze y cols. (2012) con respecto al descubrimiento de que las intensidades bajas de tRNS producen una inhibición, pero las intensidades altas de tRNS provocan excitación. Estos autores sugirieron que el tRNS de menor intensidad podía facilitar selectivamente las redes inhibitoras intracorticales o inhibir las redes facilitadoras intracorticales en las neuronas piramidales. Un mecanismo similar podría ocurrir en la estimulación del RNS eléctrico de 2 minutos versus 5 minutos si las neuronas piramidales que examinamos pudieran registrarse en el cerebro intacto.

Otra limitación de nuestro estudio es la dificultad de obtener registros en la misma neurona piramidal para examinar las secuelas del RNS eléctrico para 2 y 5 minutos en sus amplitudes de las corrientes de  $\text{Na}^+$ . Este tipo de experimento, aunque desafiante (por la integridad estructural de la neurona que se ve comprometida por el pinzamiento de la micropipeta en la membrana de la neurona), podría ser necesario para investigar si la misma neurona piramidal puede exhibir ambos comportamientos con una recuperación lenta y rápida en respuesta a 2 y 5 minutos de RNS eléctrico.

Otra limitación de nuestro estudio es que analizamos los efectos del RNS eléctrico en neuronas piramidales disociadas sin árbol dendrítico, que se eliminó debido al proceso de disociación en la solución enzimática con las pipetas Pasteur. Se podrían realizar experimentos futuros de patch-clamp en cortes coronales que contengan células piramidales intactas para examinar si el RNS eléctrico de larga duración produce cambios en el árbol dendrítico asociados con el aumento de la excitabilidad. En la misma línea de investigación, sería interesante analizar los efectos del RNS eléctrico sobre las interneuronas inhibitoras que median la retroalimentación con las neuronas piramidales. Es

posible que, en el caso de RNS eléctrico de 5 minutos, la reducción de la corriente de Na<sup>+</sup> con una recuperación más rápida pueda inducir una respuesta posterior a la facilitación más robusta si las células piramidales se encuentran en un cerebro intacto.

Concluimos que las neuronas piramidales aisladas de la corteza somatosensorial de rata wistar exhiben una recuperación diferencial de la corriente de Na<sup>+</sup> inhibida después de RNS eléctrico de larga duración, con un efecto inhibitorio después de 2 minutos y un efecto de facilitación después de 5 minutos de RNS eléctrico.

### **Efecto de la fotoestimulación optogenética ruidosa de larga duración en el aumento de la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> de células piramidales de la corteza somatosensorial primaria de ratas wistar transfectadas**

Usando 10 neuronas que expresan los canales ChR2, se observó un aumento significativo en la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> a lo largo de un tiempo posterior a una fotoestimulación ruidosa optogenética. Debido muy probablemente al cambio aleatorio en el potencial de membrana que experimentó la célula al ser expuesta durante 2 minutos a una fotoestimulación ruidosa optogenética. Resulta interesante observar que la aplicación durante 2 minutos de dicha estimulación produjo un efecto amplificador de las intensidades de las corrientes de Na<sup>+</sup>. Ello es contrario a los experimentos que se realizaron en esta misma tesis (capítulo 4) con dos grupos de neuronas piramidales aisladas, de ratas wistar no transfectadas, aplicándoles estimulación eléctrica ruidosa durante 2 y 5 minutos, respectivamente. En tal caso se obtuvo un efecto facilitador con la estimulación de 5 minutos. Esta aparente contradicción probablemente se deba al hecho de que las neuronas de ratones transgénicos expresen en mayor medida los canales ChR2 haciéndolas altamente sensibles a la estimulación óptica ruidosa. Entonces, tendríamos que realizar nuevos experimentos en los que disminuyamos el tiempo de exposición y la intensidad del estímulo luminoso (mW), para observar si el cambio en estos parámetros genera una inhibición de las amplitudes de las corrientes de Na<sup>+</sup>. De esta manera podríamos contrastar, de un modo

más completo, los resultados con estimulación eléctrica *in vitro* e *in vivo* Moliadze y cols., (2012) con la estimulación optogenética.

## **Efecto de la estimulación eléctrica y optogenética ruidosa sobre la actividad eléctrica cortical de ratas wistar (estudio *in vivo*)**

También en este proyecto de doctorado se realizaron algunos experimentos preliminares *in vivo* que replicaron los hallazgos de la tesis de maestría de la estudiante Lizárraga (2020) para la caracterización del efecto de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria sobre la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales de la corteza de los barriles de ratas wistar (Tesis de Maestría de Lizárraga). En donde para generar dichos potenciales provocados, se realizó la prostración de las vibrisas de ratas wistar anestesiadas. Los resultados finales de la tesis de Lizárraga indicaron que este tipo de estimulación produce un incremento en la excitabilidad de dicho sistema.

Sin embargo, para conocer si esta excitabilidad también se daba en otras zonas sensibles a la estimulación mecánica, se hizo el registro de la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales (PPS) producidos por una estimulación mecánica, antes y después de 10 minutos de estimulación eléctrica ruidosa aplicada en la corteza somatosensorial primaria. Se aplicaron indentaciones en la piel de la extremidad anterior de 4 ratas wistar anestesiadas con tres intensidades de estimulación mecánica, 2.3 mN, 3.4 mN y 4 mN (Figura 31, ver sección de anexos). Con esto, encontramos que las gráficas de las amplitudes de los PPS versus el tiempo transcurrido, exhibió una línea ascendente, indicando un incremento de los PPS a lo largo del tiempo (Figura 32, ver sección de anexos). Estos hallazgos son similares a los encontrados por Lizárraga para las vibrisas.

Después de una inspección de las gráficas de la (Figura 33, ver sección de anexos), observamos que el pico máximo en el aumento de los PPS se obtiene aproximadamente a los 45 minutos y después empieza a decaer. Esto concuerda con los trabajos de Terney y cols., 2008, en los que también existe un periodo de tiempo en que la actividad eléctrica

tiene un pico y posteriormente empieza a decaer. Posiblemente este método podría emplearse para producir una mejora en la percepción sensorial, tareas motoras y procesos cognitivos. Estas hipótesis están respaldadas por las técnicas de estimulación ruidosa en el contexto de la teoría de resonancia estocástica (Samoudi y cols., 2012; Lee y cols., 2015; Kim y cols., 2013).

Aplicamos ruido Browniano de alta potencia en el rango de 0 a 1000 Hz porque en estudios previos (Fertonani y cols., 2011) demostraron que la estimulación ruidosa aleatoria transcraneal de alta frecuencia (100 - 640 Hz) en la corteza visual mejoró la función conductual en una tarea visual. Sería muy interesante explorar los efectos del NRS optogenético usando otros ruidos coloreados versus ruido Browniano (Nozaki y cols., 1999).

## CONCLUSIONES

En el contexto de la estimulación de corta duración (250 ms), la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa de intensidad intermedia sobre las neuronas piramidales de las cortezas somatosensorial y auditiva, incrementó la amplitud de dichas corrientes. Dicho efecto facilitador de la corriente y su latencia, tuvo características diferenciales en la cinética de los canales de Na<sup>+</sup> cuando se empleó la estimulación eléctrica. Sin embargo, cuando se empleó la estimulación optogenética, no se encontró dicho efecto diferencial. Sugerimos que esta discrepancia podría asociarse a que la estimulación luminosa y eléctrica ruidosa actúan de manera diferente sobre las compuertas de activación e inactivación de los canales de Na<sup>+</sup>. En este contexto, nuestros hallazgos generan una nueva línea de investigación para examinar esta posibilidad.

Respecto a la estimulación de larga duración (2 y 5 minutos), concluimos que la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa de intensidad intermedia sobre las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial, incrementó significativamente la amplitud de dichas corrientes después de aplicar la estimulación. Dicho efecto se mantuvo al menos por 7 minutos después de haber estimulado.

Dado que nuestros experimentos se hicieron en células aisladas, esto implica que las propiedades intrínsecas son un elemento relevante en el fenómeno de facilitación que produce la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa sobre la cinética de las corrientes de Na<sup>+</sup>. En este contexto, nuestros resultados representan un primer paso relevante para comprender en un futuro la neurofisiología de la estimulación eléctrica ruidosa transcraneal.

## **Conclusión general**

Dado que nuestros experimentos se hicieron en células aisladas, esto implica que las propiedades intrínsecas, asociadas a la cinética de las corrientes de  $\text{Na}^+$ , son un elemento relevante en el fenómeno de facilitación que produce la estimulación eléctrica u optogenética ruidosa. En este contexto, nuestros resultados que caracterizan a dicha facilitación, representan un primer paso relevante para comprender en un futuro la neurofisiología de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa.

---

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

---

Abe T, Miyaguchi S, Otsuru N, Onishi H (2019) The effect of transcranial random noise stimulation on corticospinal excitability and motor performance. *Neuroscience letters*, 705: 138–142.

Ait Ouares K, Beurrier C, Canepari M, Laverne G, Kuczewski N (2019) Opto nongenetics inhibition of neuronal firing. *The European journal of neuroscience*, 49: 6–26.

Antal A, Alekseichuk I, Bikson M, Brockmüller J, Brunoni AR, Chen R, Cohen LG, Douthwaite G (2017) Low intensity transcranial electric stimulation: safety, ethical, legal regulatory and application guidelines. *Clin Neurophysiol* 128:1774-1809.

Antal A, Herrmann CS (2016). Transcranial Alternating Current and Random Noise Stimulation: Possible Mechanisms. *Neural plasticity*, 2016: 3616807.

Antal M (1984) Termination areas of corticobulbar and corticospinal fibres in the rat. *Journal für Hirnforschung* 25:647–659.

Armenta Salas M, Bashford L, Kellis S, Jafari M, Jo H, Kramer D, Shanfield K, Pejsa K, Lee B, Liu CY, Andersen RA (2018) Proprioceptive and cutaneous sensations in humans elicited by intracortical-microstimulation. *Elife* 7: e32904.

Armstrong CM (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* 61: 644–683.

Armstrong CM, Bezanilla F (1977) Reduction of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70: 567–590.

Arnao V, Riolo M, Carduccio F, Tuttolomondo A, D'Amelio M, Brighina F, Gangitano M, Salemi G, Ragonese P, Aridon P. (2019). Effects of transcranial random noise stimulation combined with Graded Repetitive Arm Supplementary Program (GRASP) on motor rehabilitation of the upper limb in sub-acute ischemic stroke patients: a randomized pilot study. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 126: 1701–1706.

Azin M, Guggenmos DJ, Barbay S, Nudo RJ, Mohseni P (2011) A miniaturized system for spike-triggered intracortical-microstimulation in an ambulatory rat. *IEEE Trans Biomed Eng* 58: 2589-2597.

Bajic D, Proudfit HK (1999) Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *The Journal of comparative neurology* 405:359–379.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 14: 6667–6686.

Beck H, Yaari Y (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), 357–369.

Benjamin R, Arenkiel, Peca J, Davison JG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007). In Vivo Light-Induced Activation of Neural Circuitry in Transgenic Mice Expressing Channelrhodopsin-2. , 54: 0–218.

Bensmaia SJ, Miller LE (2014) Restoring sensorimotor function through intracortical interfaces: progress and looming challenges. *Nat Rev Neurosci* 15: 313-325.

Benzi R, Sutera A, Vulpiani A (1981) The mechanism of stochastic resonance. *J. Phys. A: Math. Gen.* 14: L453-L457.

Beraneck M, Idoux E (2012). Reconsidering the role of neuronal intrinsic properties and neuromodulation in vestibular homeostasis. *Frontiers in neurology*, 3: 25.

Berg JA, Dammann III JF, Tenore FV, Tabot GA, Boback JL, Manfredi LR, Peterson ML, Katyal KD, Johannes MS, Makhlin A, Wilcox R, Franklin RK, Vogelstein RJ, Hatsopoulos NG, Bensmaia SJ (2013) Behavioral demonstration of a somatosensory neuroprosthesis. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 21:500-507.

Berg RW, Kleinfeld D (2003) Vibrissa movement elicited by rhythmic electrical microstimulation to motor cortex in the aroused rat mimics exploratory whisking. *J Neurophysiol* 90: 50-63.

Bernard JF, Peschanski M, Besson JM (1989) A possible spino (trigemino)- ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neuroscience letters* 100: 83–88.

Bezrukov SM, Vodyanoy I (1995) Noise-induced enhancement of signal transduction across voltage-dependent ion channels. *Nature* 378: 362-364.

Bezrukov SM, Vodyanoy I (1997) Signal transduction across alamethicin ion channels in the presence of noise. *Biophys J* 73: 2456-2464.

Bindman LJ, Lippold OCJ, Redfearn JWT (1964). The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *The Journal of Physiology*, 172: 369–382.

Blair EA, Erlanger JA (1933). Comparison of the characteristics of axons through their individual electric responses. *Am. J. Physiol.* 106: 524-564.

Bowling NC, Banissy MJ (2017) Modulating vicarious tactile perception with transcranial electrical current stimulation. *Eur J Neurosci* 46: 2355-2364.

Briggs J, David P (1994) *Espejo y reflejo, Del caos al orden, Guía ilustrada de la teoría del caos y la ciencia de la totalidad*, Barcelona, Gedisa, 1994. 2ª ed.. pp. 83-112.

Brosenitsch TA, Katz DM (2001). Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21: 2571–2579.

Bueno-Lopez JL, Reblet C, Lopez-Medina A, Gómez-Urquijo SM, Grandes P, Gondra J, Hennequet L (1991) Targets and laminar distribution of projection neurons with inverted morphology in rabbit cortex. *Eur J Neurosci* 3: 415–430.

Butovas S, Schwarz C (2007) Detection psychophysics of intracortical-microstimulation in rat primary somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 25: 2161-2169.

Cajal Ramon Santiago. 1959. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. vol. 2, New York, NY: Hafner.

Callier T, Brantly NW, Caravelli A, Bensmaia SJ (2020). The frequency of cortical microstimulation shapes artificial touch. *Proc Natl Acad Sci USA* 117: 1191-1200.

Callier T, Schluter EW, Tabot GA, Miller LE, Tenore FV, Bensmaia SJ (2015). Long-term stability of sensitivity to intracortical-microstimulation of somatosensory cortex. *J Neural Eng* 12: 056010.

Camp AJ (2012). Intrinsic neuronal excitability: a role in homeostasis and disease. *Frontiers in neurology*, 3: 50.

Cappelletti M, Gessaroli E, Hithersay R, Mitolo M, Didino D, Kanai R, Cohen Kadosh R, Walsh V (2013). Transfer of Cognitive Training across Magnitude Dimensions Achieved with Concurrent Brain Stimulation of the Parietal Lobe. *Journal of Neuroscience*, 33: 14899–14907.

Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M (1990) Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience* 35: 609–626.

Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB (1985) Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 240: 153–160.

Chaieb L, Antal A, Paulus W (2015) Transcranial random noise stimulation induced plasticity is NMDA-receptor independent but sodium-channel blocker and benzodiazepines sensitive. *Neurosci* 9: 125.

Chaouch A, Menetrey D, Binder D, Besson JM (1983) Neurons at the origin of the medial component of the bulbopontine spinoreticular tract in the rat: an anatomical study using

horseradish peroxidase retrograde transport. *The Journal of comparative neurology* 214: 309–320.

Chen KH, Dammann JF, Boback JL, Tenore FV, Otto KJ, Gaunt RA, Bensmaia SJ (2014) The effect of chronic intracortical-microstimulation on the electrode-tissue interface. *J Neural Eng* 11: 026004.

Chimelli L, Bello AR, Scaravilli F (1994) Development of cortical fibres into the gracile nucleus of the rat: an ultrastructural study. *Developmental neuroscience* 16: 260–266.

Schultheis C, Liewald JF, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A (2011) Optogenetic Long-Term Manipulation of Behavior and Animal Development. *PLoS ONE*, e18766.

Cliffer KD, Burstein R, Giesler GJ (1991) Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 11: 852–868.

Collins JJ, Imhoff TT, Grigg P (1996) Noise-Enhanced information transmission in rat SA1 cutaneous mechanoreceptor via aperiodic stochastic resonance. *Journal of Neurophysiology*. 76: 642-645.

Craig AD, Burton H (1981) Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. *Journal of neurophysiology* 45: 443–466.

De Lima AN, Voigt T, Morrison JH (1990) Morphology of the cells within the inferior temporal gyrus that project to the prefrontal cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 296: 159–172.

DeCosta-Fortune TM, Ramshur JT, Li CX, de Jongh Curry A, Pellicer-Morata V, Wang L, Waters RS (2020) Repetitive microstimulation in rat primary somatosensory cortex (SI) strengthens the connection between homotopic sites in the opposite SI and leads to expression of previously ineffective input from the ipsilateral forelimb. *Brain Res* 1732: 146694.

Deisseroth K (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neuroscience*, 18: 1213–1225.

Delattre V, Keller D, Perich M, Markram H, Muller EB. Network-timing-dependent plasticity. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:220. Published 2015 Jun 9. doi:10.3389/fncel.2015.00220

Delgado JM, Ferrus A, Mora F, Rubia FJ (1998) Manual de neurociencia (Síntesis, ed) 1st ed.

Delhaye BP, Saal HP, Bensmaia S (2016) Key considerations in designing a somatosensory neuroprosthesis. *J Physiol Paris* 110: 402-408.

Desbois C, Le Bars D, Villanueva L (1999) Organization of cortical projections to the medullary subnucleus reticularis dorsalis: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 410: 178–196.

Devecioğlu İ, Güçlü B (2017) Psychophysical correspondence between vibrotactile intensity and intracortical-microstimulation for tactile neuroprostheses in rats. *J Neural Eng* 14: 016010.

Diba K, Lester HA, Koch C (2004) Intrinsic noise in cultured hippocampal neurons: experiment and modeling. *J. Neurosci.* 24: 9723–9733.

Einstein G (1996). Reciprocal projections of cat extrastriate cortex: I. Distribution and morphology of neurons projecting from posterior medial lateral suprasylvian sulcus to area 17. *The Journal of comparative neurology*, 376: 518–529.

Einstein G, Fitzpatrick D (1991) Distribution and morphology of area 17 neurons that project to the cat's extrastriate cortex. *J Comp Neurol* 303: 132–149.

Emmers R (1988) Somesthetic System of the Rat. Raven Press, ed.

Faisal AA, Selen LPJ, Wolpert D (2008) Noise in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 9: 292-303.

Fauve S, Heslot F (1983) Stochastic resonance in a bistable system. *Phys. Lett. A*97: 5-7.

Ferrucci R, Mameli F, Guidi I, Mrakic-Sposta S, Vergari M, Marceglia S, Priori A (2008) Transcranial direct current stimulation improves recognition memory in Alzheimer disease. *Neurology*, 71: 493–498.

Fertonani A, Miniussi C (2011) Random noise stimulation improves neuroplasticity in perceptual learning. *J Neurosci* 31: 15416-15423.

Fertonani A, Miniussi C (2016) Transcranial electrical stimulation: what we know and do not know about mechanisms. *Neuroscientist* 23:109-123.

Feurra M, Bianco G, Santarnecchi E, Del Testa M, Rossi A, Rossi S (2011). Frequency-Dependent Tuning of the Human Motor System Induced by Transcranial Oscillatory Potentials. *Journal of Neuroscience*, 31: 12165–12170.

Flesher SN, Collinger JL, Foldes ST, Weiss JM, Downey JE, Tyler-Kabara EC, Bensmaia SJ, Schwartz AB, Boninger ML, Gaunt RA (2016) Intracortical-microstimulation of human somatosensory cortex. *Sci Transl Med* 8:361ra141-361ra141.

Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernández-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88: 3010-3020.

Gammaitoni L, Häggi P, Jung P, Marchesoni F (1998) Stochastic resonance. *Rev. of Mod. Phys.* 70: 223-287.

Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS*, pp: 13940-13945.

Gluckman BJ, Netoff TI, Neel EJ, Ditto WL, Spano ML, Schiff SJ (1996) Stochastic resonance in a neuronal network from mammalian brain. *Phys Rev Lett* 77: 4098-4101.

Guilbaud G, Oliveras JL, Giesler G, Besson JM (1977) Effects induced by stimulation of the centralis inferior nucleus of the raphe on dorsal horn interneurons in cat's spinal cord. *Brain research* 126: 355–360.

Gutierrez-Ibarluzea I, Acera-Osa A, Mendizábal-Zubiaga JL, Arana-Arri E, Bueno-López JL, Reblet, C. (1999) Morphology and laminar distribution of cortico-claustral neurons in different areas of the rabbit cerebral cortex. *Eur J Anat* 3, 101–109.

Gutierrez-Ibarluzea I, Acera-Osa A, Mendizábal-Zubiaga JL, Arana-Arri E, Bueno-López JL, Reblet, C. (1999) Morphology and laminar distribution of corticoclaustal neurons in different areas of the rabbit cerebral cortex. *Eur J Anat* 3, 101–109.

Hänggi P (2002) Stochastic resonance in biology. How noise can enhance detection of weak signals and help improve biological information processing. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 3: 285–290.

Harmann PA, Carlton SM, Willis WD (1988) Collaterals of spinothalamic tract cells to the periaqueductal gray: a fluorescent double-labeling study in the rat. *Brain research* 441: 87–97.

Huidobro N, De la Torre-Valdovinos B, Mendez A, Treviño M, Arias-Carrion O, Chavez F, Gutierrez R, Manjarrez E (2018) Optogenetic noise-photostimulation on the brain increases somatosensory spike firing responses. *Neurosci Lett* 664: 51-57.

Huidobro N, Mendez-Fernandez A, Mendez-Balbuena I, Gutierrez R, Kristeva R, Manjarrez E (2017) Brownian optogenetic-noise-photostimulation on the brain amplifies somatosensory-evoked field potentials. *Front Neuroci* 11: 464.

Hummel F (2005) Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain*, 128(3), 490–499.

Iyer M B, Mattu U, Grafman J, Lomarev M, Sato S, Wassermann E M. (2005) Safety and cognitive effect of frontal DC brain polarization in healthy individuals. *Neurology*, 64(: 872–875.

Izraeli R, Porter LL (1995) Vibrissal motor cortex in the rat: connections with the barrel field. *Exp Brain Res* 104: 41-54.

Jausovec N, Pahor A (2017) Changing brain activity, increasing intelligence: transcranial electrical and magnetic stimulation. *Increasing intelligence*. Chapter 4. Academic Press, Elsevier. p. 175-236.

Jooss A, Haberbosch L, Köhn A, Rönnefarth M, Bathe-Peters R, Kozarzewski L, Fleischmann R, Scholz M, Schmidt S, Brandt SA (2019) Motor Task-Dependent Dissociated Effects of Transcranial Random Noise Stimulation in a Finger-Tapping Task

Versus a Go/No-Go Task on Corticospinal Excitability and Task Performance. *Frontiers in neuroscience*, 13: 161.

Katz B, Miledi R (1970) Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature*. 226: 962–963.

Kerr JB (2010) *Functional Histology*, Mosby, 2<sup>a</sup> ed., Chatswood.

Kevetter GA, Willis WD (1982) Spinothalamic cells in the rat lumbar cord with collaterals to the medullary reticular formation. *Brain research* 238: 181–185.

Kim S, Callier T, Tabot GA, Gaunt RA, Tenore FV, Bensmaia SJ (2015a) Behavioral assessment of sensitivity to intracortical-microstimulation of primate somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 15202-15207.

Kim S, Callier T, Tabot GA, Tenore FV, Bensmaia SJ (2015b) Sensitivity to microstimulation of somatosensory cortex distributed over multiple electrodes. *Front Syst Neurosci* 9: 47.

Kim BR, Chun MH, Kim DY, Lee SJ (2013) Effect of High and Low Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Visuospatial Neglect in Patients With Acute Stroke: A Double Blind, Sham-Controlled Trial. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 94(5), 803–807.

Klaes C, Shi Y, Kellis S, Minxha J, Revechkis B, Andersen RA (2014) A cognitive neuroprosthetic that uses cortical stimulation for somatosensory feedback. *J Neural Eng* 11: 056024.

Kopanitsa MV, Krishtal OA, Komissarov IV (2000) Inhibitory action of ambocarb on voltage operated sodium channels in rat isolated hippocampal pyramidal neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 46-54.

Kuo CC, Liao SY (2000) Facilitation of recovery from reduction by external Na<sup>+</sup> and location of the activation gate in neuronal Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 20: 5639-5646.

Laczo B, Antal A, Rothkegel H, Paulus W (2014) Increasing human leg motor cortex excitability by transcranial high frequency random noise stimulation. *Restor Neurol Neurosci* 32: 403-410.

- Lakics V, Molnar P, Erdö SL (1995) Protection against veratridine toxicity in rat cortical cultures: Relationship to sodium channel blockade. *Neuroreport* 7: 89–92.
- Landrieu P, Goffinet A (1981) Inverted pyramidal neurons and their axons in the neocortex of the reeler mutant mice. *Cell Tissue Res* 218: 293-301.
- Larkman A, Mason A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J Neurosci* 10: 1407–1414.
- Lebedev MA, Nicolelis MA (2006) Brain-machine interfaces: past, present and future. *Trends Neurosci* 29:536-546.
- Lebedev MA, Nicolelis MA (2017) Brain-machine interfaces: from basic science to neuroprostheses and neurorehabilitation. *Physiol Rev* 97: 767-837.
- Lebedev MA, Opris I, Casanova MF (2018) Editorial: augmentation of brain function: facts, fiction and controversy. *Front Syst Neurosci* 12: 45.
- Lebedev MA, Tate AJ, Hanson TL, Li Z, O'Doherty JE, Winans JA, Ifft PJ, Zhuang KZ, Fitzsimmons NA, Schwarz DA, Fuller AM, An JH, Nicolelis MA (2011) Future developments in brain-machine interface research. *Clinics* 66 Suppl 1: 25-32.
- Ledergerber D, Larkum ME (2010) Properties of Layer 6 Pyramidal Neuron Apical Dendrites. *J Neurosci* 30: 13031–13044.
- Lee B, Kramer D, Armenta Salas M, Kellis S, Brown D, Dobrev T, Klaes C, Heck C, Liu C, Andersen RA (2018) Engineering artificial somatosensation through cortical stimulation in humans. *Front Syst Neurosci* 12: 24.
- Lee JH, Beitz AJ (1993) The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain* 52: 11–28.
- Liebetanz, D. (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain*, 125: 2238-2247.
- Lima D, Coimbra A (1989) Morphological types of spinomesencephalic neurons in the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord, as shown after retrograde labelling with cholera toxin subunit B. *The Journal of comparative neurology* 279: 327–339.

Lizarraga LV (2020) Efectos de la estimulación “tetánica” de la corteza de los barriles con ruido eléctrico aleatorio sobre la amplitud de potenciales provocados somatosensoriales. Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología BUAP, 29 Junio 2020.

Looi CY, Lim J, Sella F, Lolliot S, Duta M, Avramenko AA, Kadosh RC (2017) Transcranial random noise stimulation and cognitive training to improve learning and cognition of the atypically developing brain: a pilot study. *Sci Rep* 7: 4633.

Lugo E, Doti R, Faubert J (2008) Ubiquitous crossmodal stochastic resonance in humans: auditory noise facilitates tactile, visual and proprioceptive sensations. *PLoS ONE* 3(8): e2860.

Lund RD, Webster KE (1967) Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 130: 313–328.

Mabil P, Huidobro N, Torres Ramirez O, Flores-Hernandez J, Flores A, Gutierrez R, Manjarrez E (2020) Noisy light augments the Na<sup>+</sup> current in somatosensory pyramidal neurons of optogenetic transgenic mice. *Front Neurosci* 14: 490.

Mabil P, Huidobro N, Flores A, Manjarrez E (2020) Potential role of noise to improve intracortical-microstimulation in tactile neuroprostheses. *Neural Regen Res* 16: 1533-1534.

Mainen ZF, Sejnowski TJ (1996). Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*, 382: 363–366.

Mammarella N, Di Domenico A, Palumbo R, Fairfield B (2017) Self-generation and positivity effects following transcranial random noise stimulation in medial prefrontal cortex: a reality monitoring task in older adults. *Cortex* 91: 186-196.

Manjarrez E, Rojas-Piloni G, Pérez H, Méndez I, Hernández-Paxtian Z, Flores A (2002b) Stochastic resonance in the spinal cord and somatosensory cortex of the cat. *Proceedings of the SPIE*. 5110: 102-113.

Manjarrez E, Rojas Piloni JG, Méndez I, Martínez L, Vélez D, Flores A (2002a) Internal stochastic resonance in the coherence between spinal and cortical neuronal ensembles in the cat. *Neuroscience Letters*. 326: 93–96.

Martínez L, Pérez T, Mirasso CR, Manjarrez E (2007) Stochastic resonanc in the motor system: Effects of noise on the monosynaptic reflex pathway of the cat spinal cord. *J Neurophysiol* 97: 4007– 4016.

Maslany S, Crockett DP, Egger MD (1991) Somatotopic organization of the dorsal column nuclei in the rat: transganglionic labelling with B-HRP and WGA-HRP. *Brain research* 564: 56–65.

McDonnell M. D, Abbott D (2009) What Is Stochastic Resonance? Definitions, Misconceptions, Debates, and Its Relevance to Biology. *PLoS Computational Biology*, 5(5), e1000348.

Medina LE, Lebedev MA, O'Doherty JE, Nicolelis MA (2012) Stochastic facilitation of artificial tactile sensation in primates. *J Neurosci* 32: 14271-14275.

Méndez-Balbuena I, Huidobro N, Silva M, Flores A, Trenado C, Quintanar L, Arias-Carrión O, Kristeva R, Manjarrez E (2015) Effect of mechanical tactile noise on amplitudeof visual evoked potentials: multisensory stochastic resonance. *J Neurophysiol*, 114: 2132-2143.

Méndez-Balbuena I, Manjarrez E, Schulte-Monting J, Huethe F, Tapia JA, Hepp-ReymondMC, Kristeva R (2012) Improved sensorimotor performance via stochastic resonance.*Journal of Neuroscience*. 32: 12612-12618.

Mendizábal-Zubiaga JL, Reblet C, Bueno-Lopez JL (2007) The underside of the cerebral cortex: layer V/VI spiny inverted neurons. *J Anat*. 211: 223–236.

Menétréy D, Chaouch A, Binder D, Besson JM (1982) The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology* 206: 193–207.

Moliadze V, Atalay D, Antal A, Paulus W (2012) Close to threshold transcranial electrical stimulation preferentially activates inhibitory networks before switching to excitation with higher intensities. *Brain Stimulation* 5: 505–511.

Molnar P, Erdö SL (1995) Vinpocetine is as potent as phenytoin to block voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 273: 303–306.

Moret B, Donato R, Nucci M, Cona G, Campana G (2019) Transcranial random noise stimulation (tRNS): a wide range of frequencies is needed for increasing cortical excitability. *Scientific reports* 9: 15150.

Moss F, Ward L, Sannita W (2004) Stochastic resonance and sensory information processing: a tutorial and review of application. *Clinical Neuro- physiology* 115: 267–281.

Mulkey, Rosel M., Herron, Caroline E., Malenka, Robert C. 1993. “An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression.” *Science* 261: 1051-5.

Nahin RL, Madsen AM, Giesler GJ (1986) Funicular location of the ascending axons of neurons adjacent to the spinal cord central canal in the rat. *Brain research* 384: 367–372.

Nahin RL, Micevych PE (1986) A long ascending pathway of enkephalinlike immunoreactive spinoreticular neurons in the rat. *Neuroscience letters* 65: 271–276.

Nicolelis MA (2003) Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 4: 417-422.

Nitsche M. A, Schauenburg A, Lang N, Liebetanz D, Exner C, Paulus W, Tergau F (2003). Facilitation of Implicit Motor Learning by Weak Transcranial Direct Current Stimulation of the Primary Motor Cortex in the Human. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 15: 619–626.

Nitsche MA, Kuo MF, Karrasch R, Wächter B, Liebetanz D, Paulus W (2009) Serotonin affects transcranial direct currentinduced neuroplasticity in humans. *Biol Psychiatry* 66: 503-8.

Nobukawa S, Nishimura H (2016) Enhancement of Spike-Timing-Dependent Plasticity in Spiking Neural Systems with Noise. *Int J Neural Sys* 26: 1550040.

Nobukawa S, Shibata N (2019) Controlling Chaotic Resonance using External Feedback Signals in Neural Systems. *Sci Rep* 9: 4990.

Nonaka M (2009) A Janus-like role of CREB protein: enhancement of synaptic property in mature neurons and suppression of synaptogenesis and reduced network synchrony in early development. *J Neurosci* 29: 6389-91.

Nord SG (1967) Somatotopic organization in the spinal trigeminal nucleus, the dorsal column nuclei and related structures in the rat. *The Journal of comparative neurology* 130: 343–356.

Nozaki D, Douglas M, Peter G, Collins J (1999) Effects of Colored Noise on Stochastic Resonance in Sensory Neurons. 82: 2402–2405.

O'Doherty JE, Lebedev MA, Hanson TL, Fitzsimmons NA, Nicolelis MA (2009) A brain-machine interface instructed by direct intracortical-microstimulation. *Front Integr Neurosci* 3: 20.

O'Doherty JE, Lebedev MA, Ifft PJ, Zhuang KZ, Shokur S, Bleuler H, Nicolelis MA (2011) Active tactile exploration using a brain-machine-brain interface. *Nature* 479: 228-231.

O'Doherty JE, Shokur S, Medina LE, Lebedev MA, Nicolelis MA (2019) Creating a neuroprosthesis for active tactile exploration of textures. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 21821-21827.

Onorato I, D'Alessandro G, Di Castro MA, Renzi M, Dobrowolny G, Musarò A, Salvetti M, Limatola C (2016) Noise enhances action potential generation in mouse sensory neurons via stochastic resonance. *PLoS One* 11e0160950.

Opris I, Lebedev MA, Pulgar VM, Vidu R, Enachescu M, Casanova MF (2020) Editorial: nanotechnologies in neuroscience and neuroengineering. *Front Neurosci* 14: 33.

Overstreet CK, Hellman RB, Ponce Wong RD, Santos VJ, Helms Tillery SI (2016) Discriminability of single and multichannel intracortical-microstimulation within somatosensory cortex. *Front Bioeng Biotechnol* 4: 91.

Öztürk S, Devecioğlu I, Beygi M, Atasoy A, Mutlu Ş, Özkan M, Güçlü B (2019) Real-time performance of a tactile neuroprosthesis on awake behaving rats. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 27: 1053-1062.

Pais-Vieira M, Chiuffa G, Lebedev M, Yadav A, Nicoletis MA (2015) Building an organic computing device with multiple interconnected brains. *Sci Rep* 5: 11869.

Pais-Vieira M, Lebedev M, Kunicki C, Wang J, Nicoletis MA (2013) A brain-to-brain interface for real-time sharing of sensorimotor information. *Sci Rep* 3: 1319.

Palecek J, Paleckova V, Willis WD (2002) The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats. *Pain* 96: 297–307.

Pang, Zhiping P, Cao, Peng, Xu, Wei, Sudhof, Thomas C (2010) Calmodulin controls synaptic strength via presynaptic activation of calmodulin kinase II. *J Neurosci* 30: 4132–42.

Parnavelas JG, Lieberman AR, Webster KE (1977) Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the rat. *J Anat* 124: 305–322.

Pasqualotto A (2016) Transcranial random noise stimulation benefits arithmetic skills. *Neurobiol Learn Mem* 133: 7–12.

Boggio P. S, Ferrucci R, Rigonatti S P, Covre P, Nitsche M, Pascual-Leone A, Fregni F (2006) Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 249: 31–38.

Paulus W. (2014) Transcranial brain stimulation: potential and limitations. *e-Neuroforum*, 5: 29–36.

Paxino G (2004) *The rat nervous system* (Elsevier,ed) 3th ed.

Paxino G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Elsevier, ed)., 6th ed.

Pechura CM, Liu RP (1986) Spinal neurons which project to the Pechura CM, Liu RP (1986) Spinal neurons which project to the periaqueductal gray and the medullary reticular formation via axon collaterals: a double-label fluorescence study in the rat. *Brain research* 374: 357–361.

Penton T, Dixon L, Evans LJ, Banissy MJ (2017) Emotion perception improvement following high frequency transcranial random noise stimulation of the inferior frontal cortex. *Sci Rep* 711278.

Peschanski M, Besson JM (1984a) Coerulear projections to the lateral diencephalon in the rat. An anatomical study using wheat-germ agglutinin conjugated to HRP. *Neuroscience letters* 46: 329–334.

Peschanski M, Besson JM (1984b) Diencephalic connections of the raphé nuclei of the rat brainstem: an anatomical study with reference to the somatosensory system. *The Journal of comparative neurology* 224: 509–534.

Peschanski M, Besson JM (1984c) A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. *Neuroscience* 12: 165–178.

Pinault D, Deschênes M (1998a) Anatomical evidence for a mechanism of lateral inhibition in the rat thalamus. *The European journal of neuroscience* 10: 3462–3469.

Pinault D, Deschênes M (1998b) Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a threedimensional, graphic, and morphometric analysis. *The Journal of comparative neurology* 391: 180–203.

Pisanello F, Sileo L, De Vittorio M (2016) Micro- and nanotechnologies for optical neural interfaces. *Front Neurosci* 10: 70.

Pomeau Y, Roux J C, Rossi A, Bachelart S, Vidal C (1981) Intermittent behaviour in the Belousov-Zhabotinsky reaction. *Journal de Physique Lettres*, 42: 271–273.

Popescu T, Krause B, Terhune DB, Twose O, Page T, Humphreys G, Kadosh RC (2016) Transcranial random noise stimulation mitigates increased difficulty in an arithmetic learning task. *Neuropsychologia* 81: 255-264.

Qi HX, Jain N, Preuss TM, Kass JH (1999) Inverted pyramidal neurons in chimpanzee sensorimotor cortex are revealed by immunostaining with monoclonal antibody SMI-32. *Somatosens Mot Res* 16: 49–56.

Quan C, Mok WM, Wang GK (1996) Use-dependent inhibition of Na<sup>+</sup> currents by benzocaine homologs. *Biophys J* 70: 194-201.

Reblet C, Blanco Santiago I, Mendizábal Zubiaga JL, Gutierrez Ibarluzea I, Bueno-Lopez JL (1996) Development of inverted cells in infragranular layers of the rabbit visual cortex. *Int J Dev Biol* 1 (Suppl), 145–146.

Reblet C, Lopez-Medina A, Gomez-Urquijo SM, Bueno-Lopez JL (1992) Widespread horizontal connections arising from layer 5/6 border inverted cells in rabbit visual cortex. *Eur J Neurosci* 4: 221–234.

Reblet C, Perez-Samartin A, Caballero A, Marín I, Bueno-Lopez JL (1993) Identified inverted cells in the cortico-cortical projections from extrastriate to striate visual cortex of cats. *Eur J Neurosci* 6 (Suppl), 13.

Reed T, Cohen Kadosh R (2018) Transcranial electrical stimulation (tES) mechanisms and its effects on cortical excitability and connectivity. *Journal of Inherited Metabolic Disease*.

Reis J, Schambra H M, Cohen L G, Buch E R, Fritsch B, Zarah E, Celnik P A, Krakauer JW (2009) Noninvasive cortical stimulation enhances motor skill acquisition over multiple days through an effect on consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 1590–1595.

Remedios L, Mabil P, Flores Hernández J, Torres Ramírez O, Huidobro N, Castro G, Cervantes L, Tapia JA, De la Torre Valdovinos B, Manjarrez E (2019) Effects of short-term random noise electrical stimulation on dissociated pyramidal neurons from the cerebral cortex. *Neuroscience* 404: 371-386.

Remy S, Beck H, Yaari Y (2010) Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites. *Current opinion in neurobiology*, 20: 503–509.

Richer F, Martinez M, Robert M, Bouvier G, Saint Hilaire JM (1993) Stimulation of human somatosensory cortex: tactile and body displacement perceptions in medial regions. *Exp Brain Res* 93: 173-176.

Romanska A, Rezlescu C, Susilo T, Duchaine B, Banissy MJ (2015) High frequency transcranial random noise stimulation enhances perception of facial identity. *Cereb Cortex* 25: 4334-4340.

Romo R, Hernández A, Zainos A, Brody CD, Lemus L (2000) Sensing without touching: psychophysical performance based on cortical microstimulation. *Neuron* 26: 273-278.

Romo R, Hernández A, Zainos A, Salinas E (1998) Somatosensory discrimination based on cortical microstimulation. *Nature* 392: 387-390.

Ross MH, Pawlina W (2013) *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, Ed. Panamericana, 6ª ed., Madrid

Rufener KS, Ruhnau P, Heinze HJ, Zaehle T (2017) Transcranial random noise stimulation (tRNS) shapes the processing of rapidly changing auditory information. *Front Cell Neurosci* 11: 162.

Salzman CD, Britten KH, Newsome WT (1990) Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. *Nature* 346: 174-177.

Samoudi G, Jivegård M, Mulavara AP, Bergquist F (2015) Effects of Stochastic Vestibular Galvanic Stimulation and LDOPA on Balance and Motor Symptoms in Patients With Parkinson's Disease. *Brain Stimulation*, 8: 474-480.

Santin J M, Schulz D J (2019) Membrane Voltage Is a Direct Feedback Signal That Influences Correlated Ion Channel Expression in Neurons. *Current biology : CB*, 29: 1683–1688.e2.

Schoen I, Fromherz P (2008) Extracellular Stimulation of Mammalian Neurons Through Repetitive Activation of Na<sup>+</sup> Channels by Weak Capacitive Currents on a Silicon Chip. *Journal of Neurophysiology*, 100: 346–357.

Schultheis C, Liewald J F, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A (2011) Optogenetic Long-Term Manipulation of Behavior and Animal Development. *PLoS ONE*, 6: e18766.

Segundo JP, Vibert JF, Pakdaman K, Stiber M, Diez Martinez O (1994) Noise and the neurosciences: a long history, a recent revival and some theory. In: Pribram KH, editor. *Origins: brain and selforganization*. Hillsdale, NJ: Elbaum. p. 299-333.

Sievert CF, Neafsey EJ (1986) A chronic unit study of the sensory properties of neurons in the forelimb areas of rat sensorimotor cortex. *Brain Res* 381: 15-23.

Simonotto E, Riani M, Seife C, Roberts M, Twitty J, Moss F (1997) Visual perception of the stochastic resonance. *Physical Review Letters*. 78: 1186-9.

Snowball A, Tachtsidis I, Popescu T, Thompson J, Delazer M, Zamarian L, Zhu T, Cohen Kadosh R (2013) Long-Term Enhancement of Brain Function and Cognition Using Cognitive Training and Brain Stimulation. *Current Biology*, 23: 987–992.

Stacey WC, Durand DM (2000) Stochastic resonance improves signal detection in hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* 83: 1394-1402.

Stagg C J, Best J G, Stephenson M C, O'Shea J, Wylezinska M, Kincses Z T, Morris PG, Matthews PM, Johansen Berg H (2009) Polarity-Sensitive Modulation of Cortical Neurotransmitters by Transcranial Stimulation. *Journal of Neuroscience*, 29: 5202–5206.

Stagg CJ, Bachtiar V, O'Shea J, Allman C, Bosnell RA, Kischka U, Matthews PM, Johansen-Berg H (2012) Cortical activation changes underlying stimulation-induced behavioural gains in chronic stroke. *Brain* 135: 276-84.

Steger R, Ramos LR, Cao R, Yang Q, Chen Ch-Ch, Dominici J, Brumberg JC (2013) Physiology and morphology of inverted pyramidal neurons in the rodent neocortex. *Neuroscience* 248: 165-179.

Steinberg, Holger (2013) A Pioneer Work on Electric Brain Stimulation in Psychotic Patients. Rudolph Gottfried Arndt and his 1870s Studies. *Brain Stimulation*, 6: 477–481.

Sun P, Wang F, Wang L, Zhang Y, Yamamoto R, Sugai T, Zhang Q, Wang Z, Kato N (2011) Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. *J Neurosci* 31: 16464-16472.

Sun P, Wang F, Wang L, Zhang Y, Yamamoto R, Sugai T, Zhang Q, Wang Z, Kato N (2011) Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31: 16464–16472.

Swett JE, McMahon SB, Wall PD (1985) Long ascending projections to the midbrain from cells of lamina I and nucleus of the dorsolateral funiculus of the rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology* 238: 401–416.

Tabot GA, Dammann JF, Berg JA, Tenore FV, Boback JL, Vogelstein RJ, Bensmaia SJ (2013) Restoring the sense of touch with a prosthetic hand through a brain interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 18279-18284.

Tabot GA, Kim SS, Winberry JE, Bensmaia SJ (2015) Restoring tactile and proprioceptive sensation through a brain interface. *Neurobiol Dis* 83: 191-198.

Taylor CP, Meldrum BS (1995) Na<sup>+</sup> channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci* 16: 309-316.

Taylor C P, Meldrum B S (1995) Na<sup>+</sup> channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends in pharmacological sciences*, 16: 309–316.

Terney D, Chaieb L, Moliadze V, Antal A, Paulus W (2008) Increasing human brain excitability by transcranial high-frequency random noise stimulation. *J Neurosci* 28: 14147-14155.

Thomson EE, Carra R, Nicoletti MA (2013) Perceiving invisible light through a somatosensory cortical prosthesis. *Nat Commun* 4:1-7.

Traynelis S F, Wollmuth L P, McBain C J, Menniti F S, Vance K M, Ogden K K, Hansen K B, Yuan H, Myers S J, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62: 405–496.

Urenjak J, Obrenovitch TP (1996) Pharmacological modulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: A rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol Rev* 48: 21–67.

Van der Groen O, Wenderoth N (2016) Transcranial random noise stimulation of visual cortex: stochastic resonance enhances central mechanisms of perception. *J Neurosci* 36: 5289-5298.

Van Doren J, Langguth B, Schecklmann M. (2014) Electroencephalographic effects of transcranial random noise stimulation in the auditory cortex. *Brain Stimul* 7:807-812.

Van Koningsbruggen MG, Ficarella SC, Battelli L, Hickey C (2016) Transcranial random-noise stimulation of visual cortex potentiates value-driven attentional capture. *Soc Cogn Affect Neurosci* 11: 1481-1488.

Veinante P, Lavallée P, Deschênes M (2000) Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *The Journal of comparative neurology* 424: 197–204.

Venkatraman S, Elkabany K, Long JD, Yao Y, Carmena JM (2008) A system for neural recording and closed-loop intracortical-microstimulation in awake rodents. *IEEE Trans Biomed Eng* 56: 15-22.

Verveen AA, Derksen HE, Schick KL (1967) Voltage fluctuations of neural membrane. *Nature* 216: 588–589.

Volkov EI, Ullner E, Kurths J (2005) Stochastic multiresonance in the coupled relaxation oscillator. *Chaos*.15: 023105.

Vöröslakos Mihály, Takeuchi Yuichi, Brinyiczki Kitti, Zombori Tamás, Oliva Azahara, Fernández Ruiz Antonio, Kozák Gábor, Kincses, Zsigmond Tamás, Iványi Béla, Buzsáki György, Berényi Antal (2018) Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nature Communications*, 9: 483.

Waite PM (1973) Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus. *The Journal of physiology* 228: 527– 540.

Wang J, Thow XY, Wang H, Lee S, Voges K, Thakor NV, Yen SC, Lee C (2018) A highly selective 3d spiked ultraflexible neural (SUN) interface for decoding peripheral nerve sensory information. *Adv Healthc Mater* 7:1700987.

Weinberg RJ, Rustioni A (1989) Brainstem projections to the rat cuneate nucleus. *The Journal of comparative neurology* 282: 142–156.

White E, Hersch S (1982) A quantitative study of thalamocortical and other synapses involving the apical dendrites of corticothalamic projection cells in mouse SmI cortex. *J Neurocyto* 11: 137–157.

Yang T, Banissy MJ (2017) Enhancing anger perception in older adults by stimulating inferior frontal cortex with high frequency transcranial random noise stimulation. *Neuropsychologia* 102: 163-169.

Yeziarski RP, Mendez CM (1991) Spinal distribution and colateral projections of rat spinomesencephalic tract cells. *Neuroscience* 44: 113–130.

---

---

---

# ANEXOS

---

---

---

## Organización de la corteza cerebral

La corteza cerebral humana tiene un espesor que varía de 2-5 mm y el número de neuronas que posee oscila entre 12.000 y 15.000 millones. A esto se añade una cantidad 10 veces mayor de células de la neuroglia que en su mayoría son astrocitos.

Hay dos tipos de corteza cerebral, la allocorteza y la isocorteza. Mientras que la allocorteza es de estructura diversa y se encuentra en las regiones corticales filogenéticamente antiguas, la isocorteza corresponde a regiones corticales filogenéticamente más nuevas. En los seres humanos la isocorteza constituye alrededor del 95% de la corteza cerebral (Ross y Pawlina, 2013). Cuando se estudia la citoarquitectura de la corteza cerebral con la tinción de Nissl o de H & E, se pueden distinguir varias capas de la isocorteza (Figura 26). En concreto, la isocorteza tiene seis capas horizontales y una estructura relativamente uniforme. En ellas encontramos células de la neuroglia, fibras nerviosas y neuronas gabaérgicas y glutamaérgicas:

**Capa I o molecular o plexiforme:** las pocas neuronas que encontramos son Golgi y horizontales de Cajal, pero abundan las fibras nerviosas.

**Capa II o granular externa:** encontramos neuronas piramidales pequeñas y neuronas granulares o estrelladas. También llegan aferencias.

**Capa III o piramidal externa:** es rica en neuronas piramidales medianas e interneuronas. También hay neuronas en candelabro (gabaérgicas). Llegan aferencias y salen eferencias.

**Capa IV o granular interna:** es rica en neuronas no piramidales. Es la capa receptora fundamental con células en cesto (gabaérgicas), granulares o estrelladas (glutamaérgicas). La mayor parte pequeñas aunque también hay algunas grandes.

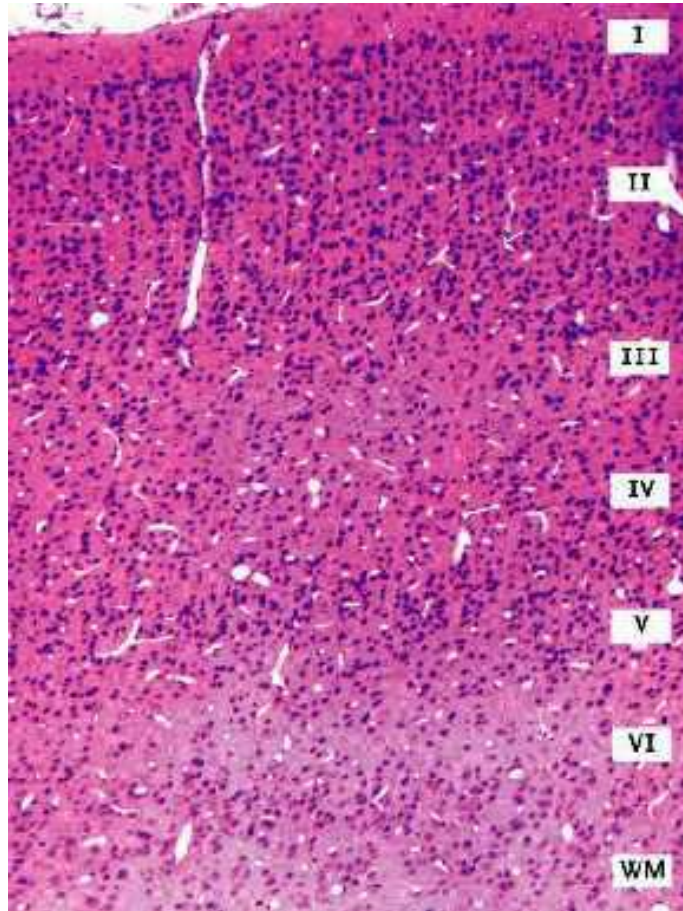
**Capa V o piramidal interna:** es rica en células piramidales (son las únicas neuronas efectoras de la corteza). Es la capa efectora fundamental. Se encuentra la estría de Baillarger interna en la zona más interna.

**Capa VI o polimorfa:** en esta capa hay neuronas piramidales modificadas cuyas dendritas solo llegan a la capa IV. En esta capa también hay neuronas de Martinotti.

En cuanto a las fibras nerviosas, se dividen en aferentes y eferentes:

Las fibras aferentes a la corteza cerebral son de 3 tipos: cortico-corticales (desde otras zonas de la corteza a todas las capas), tálamo-corticales (desde el tálamo sobre todo a la capa IV y algo a III y VI) y difusas que son inespecíficas: colinérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas a todas las capas.

Hay varios tipos de fibras eferentes: axones de neuronas piramidales: P (de proyección a todo tipo de zonas subcorticales desde la capa V), A (de asociación a otras zonas de la corteza desde las capas II, III y VI) y C (callosas o comisurales a la corteza del otro hemisferio desde las capas II y III). Además las neuronas piramidales de la capa VI proyectan a otras zonas de la corteza y el tálamo (Ross y Pawlina, 2013).



**Figura. 26| Capas de la corteza cerebral teñida con H & E (Kerr, 2010).**

## **Neuronas de la isocorteza**

Cuando se estudia la corteza cerebral con la tinción de Golgi se distinguen diferencias morfológicas en las neuronas de las láminas corticales. Las neuronas de la isocorteza son en el 85% neuronas piramidales (y neuronas piramidales modificadas) y en el 15% las llamadas neuronas no piramidales (interneuronas).

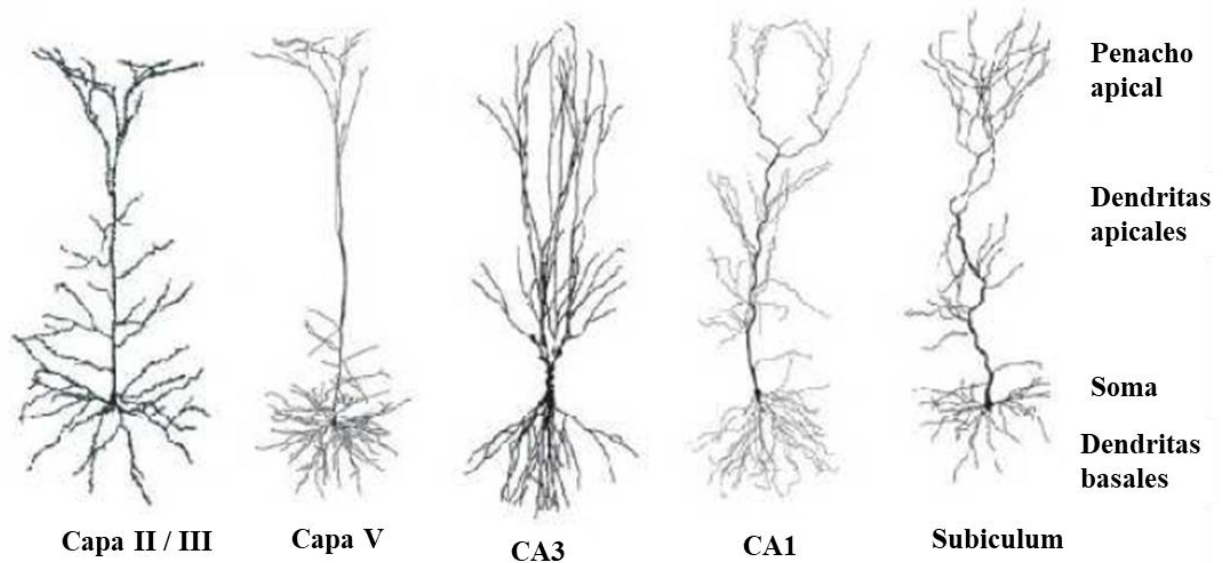
## **Neuronas no piramidales**

Entre las neuronas no piramidales (desde un punto de vista morfológico, células granulosas o estrelladas) pueden distinguirse varios tipos muy diferentes como células en cesta, células en candelabro, células de penacho doble o células bipolares. Todas estas neuronas poseen

un axón corto y la mayoría carece de espinas en las dendritas. Su axón no abandona la corteza y funcionan como interneuronas (neuronas intercalares), que tienen una acción inhibitoria (GABA) o excitadora (diversos péptidos como la colecistocinina y el péptico intestinal vasoactivo) y vinculan neuronas dentro de la corteza.

## Neuronas piramidales

Como su nombre indica, el soma de las neuronas piramidales tiene una forma semejante a la de una pirámide (Figura 27). De su vértice surge la llamada dendrita apical, gruesa, que está orientada hacia la superficie del cerebro que llega a la capa I excepto en las modificadas de la capa VI que no sobrepasan la capa IV. De la base parten las dendritas basales de trayecto más horizontal.



**Figura. 27| Neuronas piramidales de diversas localizaciones de la corteza cerebral** (Tomado de Spruston 2008).

Las dendritas se ramifican en grado diverso y todas tienen espinas. Estas espinas son pequeñas extensiones de las dendritas y corresponden a estructuras postsinápticas, con las

cuales establecen múltiples vinculaciones con varias terminaciones presinápticas de axones de otra neuronas.

La configuración de las neuronas piramidales puede variar de manera considerable, desde formas diminutas hasta formas gigantes. Un ejemplo de neuronas piramidales muy grandes corresponde a las neuronas gigantopiramidales de Betz en la corteza motora primaria por delante del surco central.

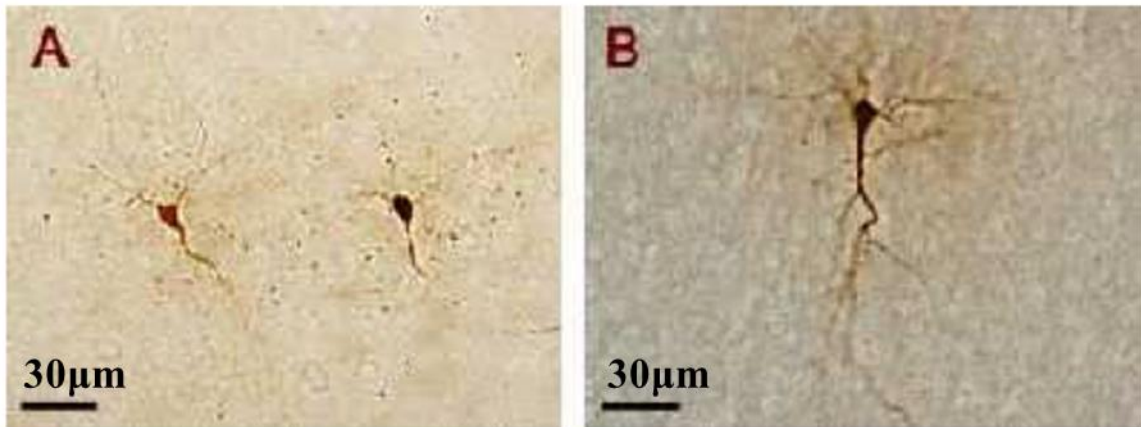
Los axones largos de las neuronas piramidales discurren en sentido vertical hacia la sustancia blanca subcortical. Allí suelen emitir muchas colaterales, algunas de expansión muy amplia. Los axones se dirigen hacia otras regiones corticales (como al hemisferio contralateral, neuronas comisurales y de asociación) o hacia núcleos subcorticales (neuronas de proyección). El neurotransmisor de las neuronas piramidales es el glutamato. Son las únicas neuronas efectoras de la corteza cerebral (Ross y Pawlina, 2013).

## **Neuronas piramidales invertidas**

Las neuronas piramidales invertidas representan un pequeño porcentaje del total de células que se encuentran en la corteza cerebral variando entre el 1 y el 8.5% según la especie y la localización (Parnavelas y cols. 1977, Bueno-López y cols. 1991) sobre todo es conocida por formar proyecciones callosas e intracorticales. Y se cree que puede participar en funciones locales e interhemisfericas (Figura 28). (Steger y cols. 2013).

## **Morfología**

Las neuronas piramidales típicas tienen un soma con forma de pirámide y de su vértice surge la dendrita apical que apunta a la superficie de la corteza cerebral. Sin embargo, en las neuronas piramidales invertidas la dendrita apical apunta a la sustancia blanca.



**Figura. 28|** Neuronas piramidales invertidas de ratón (A) y rata (B) llenas de biocitina. (Tomado de Steger y cols., 2013).

## Dendrita apical

La dendrita apical emerge desde la cara del soma más cercana a la sustancia blanca. Entonces la dendrita apical puede seguir la dirección del eje radial cortical o desviarse oblicuamente de él. Esto último, a veces, sucede porque el soma celular está orientado oblicuamente y la dendrita apical tiene que desviarse en un principio para poder seguir el eje radial cortical. El curso que sigue serpenteando la dendrita apical de la neurona piramidal invertida por el eje radial cortical es muy diferente al de la dendrita apical de la neurona piramidal típica. Ya que ésta última es mucho más directa. Además, la dendrita apical de la neurona piramidal invertida se puede bifurcar en dos árboles dendríticos más delgados. Durante el camino hacia la sustancia blanca, la dendrita apical o sus bifurcaciones van a dar lugar posteriormente a muchas ramas dendríticas. Siguen descendiendo en dirección oblicua. Y pueden ser terminales o ramificarse hasta cuatro veces más sucesivamente. A su vez, la dendrita apical puede terminar brotando en una dendrita penacho (Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).

## Dendritas basales

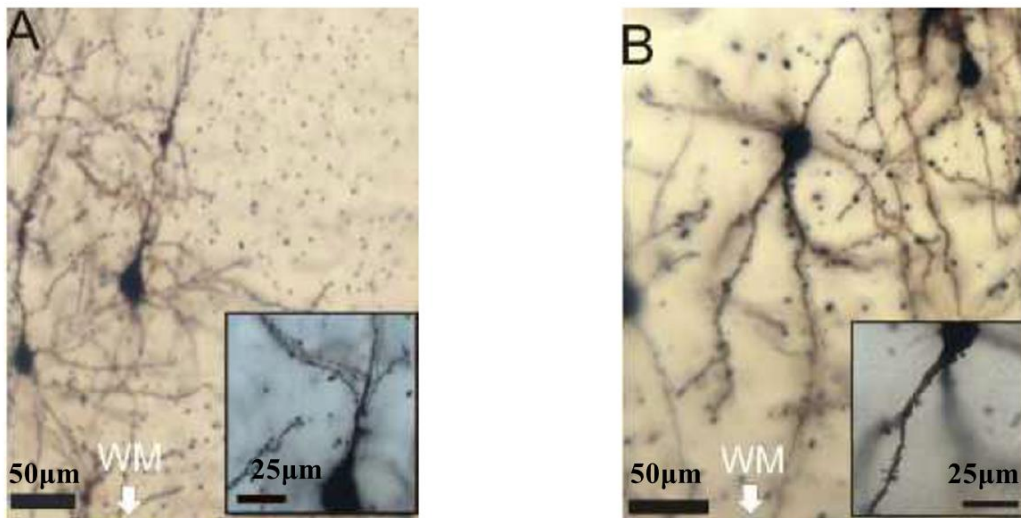
Desde la cara superior del soma, en dirección a la corteza suprayacente, emergen ocho dendritas basales. Una de estas dendritas puede continuar directamente hacia la corteza cerebral más superficial.

Las primeras porciones de las dendritas apicales y basales no tienen espinas. En la dendrita apical puede continuar después de la primera ramificación dendrítica. La superficie restante de las dendritas está ricamente cubierto de espinas (Mendizábal- Zubiaga y cols. 2007).

Las dendritas apicales son más gruesas que las dendritas basales y su espesor puede variar de un diámetro de 1  $\mu\text{m}$  (Larkman y Mason 1990; Lederberger y Larkum 2010) hasta más de 10  $\mu\text{m}$  (White y Hersch 1982).

## Espinas dendríticas

La superficie de las dendritas de las neuronas piramidales invertidas está cubierta de pequeñas prolongaciones que reciben el nombre de espinas dendríticas (Figura 29) (Parnavelas y cols. 1977; Qi y cols. 1999; Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).



**Figura. 29| Neuronas piramidales típicas (A) e invertidas (B) teñidas con Golgi y mostrando dendritas con sus espinas. (Tomado de Steger y cols. 2013).**

Comparando la densidad de espinas en las CPI y las CP del ratón teñidas con el método de Golgi (Steger y cols. 2013) se constata que no hay una diferencia significativa en la densidad de espinas de la dendrita apical y las dendritas basales de las CPI y las CP.

## **Axón**

El axón de las neuronas piramidales invertidas no emerge siempre del mismo lugar. Estos lugares pueden ser (Landrieu y Goffinet 1981; Bueno-López y cols. 1991):

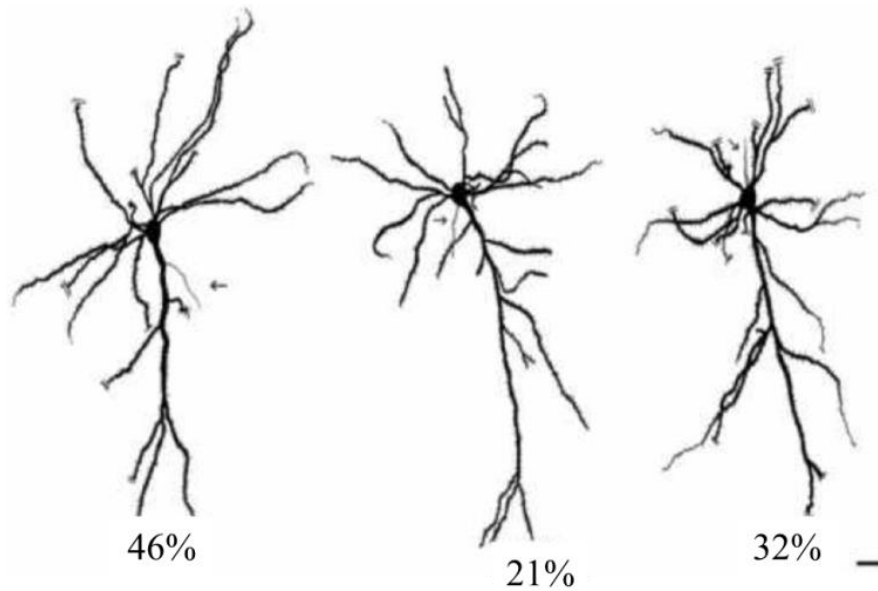
- 1- La superficie basal del soma, o incluso la porción basal de una dendrita junto al soma.
- 2- En una cara lateral del soma celular.
- 3- La dendrita apical, a veces de la parte más alejada del soma.

En los estudios que se han llevado a cabo para estudiar el lugar del que emerge el axón se han seleccionado neuronas piramidales invertidas de la corteza occipital y temporal de conejos (n=127). Y se ha observado que entorno al 60% de los axones emergen de la dendrita apical, un 30% de la superficie basal del soma y un 10% de la cara lateral del soma (Bueno-López y cols. 1991). Por lo tanto, el sitio más frecuente de aparición del axón de la neurona piramidal invertida es la dendrita apical.

También se ha llevado a cabo este mismo estudio en ratas. En la Figura 30 se informa de una distribución diferente, aunque en este estudio la muestra era menor (n=28). Se han estudiado las neuronas de la corteza visual y la sensitivo-motora. En este caso el 46% salían de la dendrita apical, el 32% de la superficie basal del soma y el 21% restante del flanco lateral del soma. En ratas se observó que la aparición del soma en la dendrita apical o el soma era parecida (Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).

Pese a la diferencia de lugares de aparición del axón, normalmente suele ir a la sustancia blanca. Por lo que los axones que salen de la dendrita apical tienen que inclinarse para seguir la dirección hacia la sustancia blanca. En el caso de que salga desde la parte basal del soma, el camino es más complicado porque el axón entra en la capa de la corteza superior para hacer un giro de 180° e ir en dirección descendente. En contraste, otros axones de las

neuronas piramidales invertidas tienen abundantes colaterales. Estas pueden proceder no sólo de la porción descendente, sino también de la porción ascendente del axón.



**Figura.30| Dibujos de los distintos subtipos de neuronas piramidales invertidas dependiendo del lugar de nacimiento del axón (de izquierda a derecha): dendrita apical, parte lateral del soma y parte basal del soma. Los porcentajes indican la proporción de los subtipos (Tomado de Mendizábal- Zubiaga y cols. 2007).**

Ambos tipos de colaterales van horizontales y oblicuas dentro de la corteza durante cientos de micrómetros. Las colaterales oblicuas pueden ser ascendentes o descendentes. Las ascendentes pueden llegar hasta la capa II y III. En la corteza visual del gato, la orientación de las dendritas apicales de una neurona piramidal invertida depende de la posición de la célula madre dentro de las circunvoluciones. La incidencia de las neuronas piramidales invertidas disminuye desde la parte superior de las circunvoluciones a la parte inferior de los surcos. Mientras que las neuronas piramidales orientadas horizontalmente aumentó. La mayoría de los axones surgen de la dendrita apical (Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).

## **Proyecciones axonales**

Las zonas a las que proyectan los axones de las neuronas piramidales invertidas pueden situarse en diversas localizaciones: en la corteza cerebral ipsilateral, en la corteza contralateral, en el claustró, en el striatum y en otros centros no telencefálicos.

## **Proyecciones córtico-corticales ipsilaterales**

Las neuronas piramidales invertidas suponen alrededor del 25% de las neuronas que tienen proyecciones ipsilaterales a otras áreas de la corteza. Sin embargo, hay diferencias entre la corteza visual y la auditiva. En la corteza visual primaria las proyecciones de las neuronas piramidales invertidas representan el 26% del total, y en la corteza visual secundaria la cifra desciende hasta 7.5%. En la corteza auditiva primaria la proporción es mayor ya que llega hasta el 42% respecto del total de proyecciones ipsilaterales. En cuanto a la proporción de neuronas piramidales invertidas en las proyecciones entre áreas secundarias, es bastante alta y se sitúa en el 31% (Bueno-López y cols. 1991; Reblet y cols. 1992).

Las neuronas piramidales invertidas constituyen el 82% de las neuronas que forman una banda horizontal entre la frontera de las capas V y VI de la corteza visual y las proyecciones ipsilaterales de la corteza visual primaria en conejos. La banda de neuronas se extiende a través de la corteza visual primaria hasta la corteza visual secundaria (Reblet y cols. 1992). Estos hallazgos han demostrado que hay una proyección convergente desde las neuronas de las capas V y VI de la corteza visual a puntos específicos de la corteza visual primaria. Las neuronas piramidales invertidas son las principales neuronas de este tipo de proyección. Esta proyección es distinta de la proyección cortico-cortical desde la corteza visual primaria a la secundaria. No se ha encontrado ninguna otra proyección similar a ésta última.

En los gatos y en los monos macacos, las neuronas piramidales invertidas son células de proyección cortico-cortical callosas e ipsilaterales (De Lima y cols. 1990; Einstein y Fitzpatrick 1991; Reblet y cols. 1993; Einstein, 1996).

Estos resultados indican que las neuronas piramidales invertidas tienen un papel aún desconocido distinto entre las áreas visuales secundarias y el área visual primaria, tanto en gatos y en conejos. Y también son importantes en las conexiones laterales cortico-corticales.

## **Proyecciones córtico-corticales contralaterales**

Las neuronas piramidales invertidas que dan estas proyecciones se encuentran en la corteza visual primaria, visual secundaria y en la corteza auditiva secundaria de los conejos.

Estas proyecciones salen desde las capas II-V en la corteza visual primaria y secundaria de los conejos. Las neuronas piramidales invertidas están dispuestas en columnas radiales. En concreto, una de cada tres neuronas son piramidales invertidas. La corteza visual primaria, que es en donde se encuentran preferentemente, se asocia con la visión monocular periférica (Bueno-López y cols.1991).

Además, en la capa V se extiende una banda horizontal a través de la corteza visual primaria y secundaria. Aunque parece tener especial relación con la parte lateral de la corteza visual primaria, que se asocia con la visión binocular. En esta banda, dos de cada tres neuronas son piramidales invertidas.

En la corteza del lóbulo temporal de los conejos se ha encontrado una gran proporción de neuronas piramidales invertidas que proyectan fibras al lóbulo contralateral. En torno al 20% de las proyecciones estudiadas en la corteza auditiva secundaria eran de neuronas piramidales invertidas (Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).

## **Proyecciones córtico-claustrales**

Las proyecciones cortico-claustrales se encuentran por toda la corteza cerebral del conejo. En la corteza visual, en la auditiva, en la motora-sensorial y en la cingulada retrosplenial. Las neuronas de las que salen estas proyecciones se encuentran en las capas V-VI de la

corteza (Bueno-López y cols. 1991; Gutiérrez-Ibarluzea y cols.,1999). Las neuronas piramidales invertidas con este tipo de proyecciones se encuentran sobre todo en la capa más profunda, en la capa VI. Aunque también emiten proyecciones las de la capa V (Mendizábal-Zubiaga y cols. 2007).

En la corteza visual primaria constituyen más del 80% de las neuronas con proyección axonal al claustró. En cambio, en las cortezas visuales y auditivas secundarias, las neuronas piramidales invertidas tan solo constituyen el 23%(corteza visual secundaria) y 24% (corteza auditiva secundaria) de las neuronas córtico-claustrales. En la corteza cingulada retrosplenial, las neuronas espinosas invertidas constituyen sólo el 10% de las células cortico-claustrales infragranulares.

## **Proyecciones córtico-estriatales**

Estas proyecciones salen de la corteza occipital y temporal y las neuronas piramidales invertidas apenas llegan al 20% de las neuronas que forman estas proyecciones (Bueno-López y cols. 1991).

# **EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA RUIDOSA SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CORTICAL DE RATAS WISTAR**

## **Procedimientos generales**

Con la finalidad de replicar los mismos experimentos de Lizárraga (2020), pero utilizando la estimulación táctil de una extremidad en lugar de la estimulación de las vibrisas, realizamos experimentos en 4 ratas wistar adultas sin distinción de sexo (250g –300g. de peso). Los animales fueron provistos por el bioterio Claude Bernard de nuestra casa de estudios. Los animales se mantuvieron en cuartos con luz y temperatura controlada (luz encendida a las 6 a.m. y luz apagada a las 6 p.m.) y con libre acceso a comida y agua.

Todos los procedimientos experimentales se apegaron a los lineamientos del Comité Directivo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), de la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85-23, revisada en 1985) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Asimismo, todos los protocolos fueron aceptados por el comité de ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICUAL-Proyecto-004032).

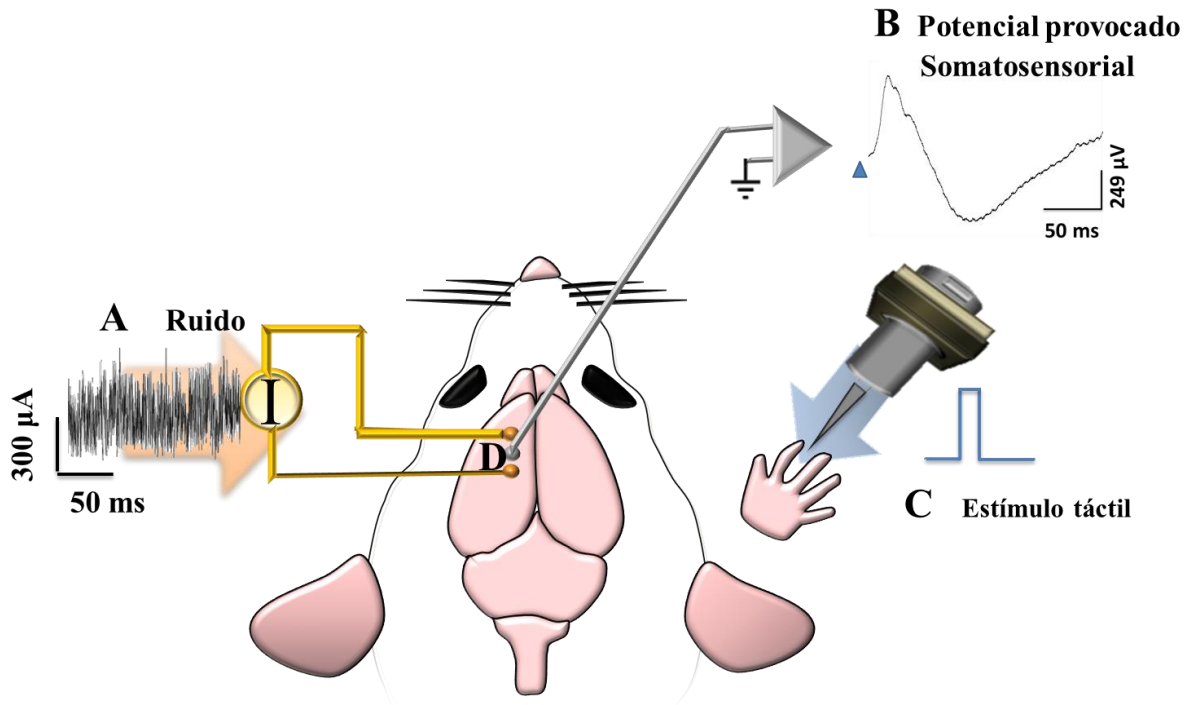
Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con una mezcla de ketamina (70mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y acepromacina (1.5 mg/kg). Para mantener un adecuado nivel de anestesia, administramos dosis de la mezcla ketamina/xilacina/acepromacina cada 60-90min. Una vez anestesiadas, las ratas se colocaron en un aparato esterotáxico. En seguida, expusimos la superficie del cráneo del lado izquierdo y derecho para posteriormente realizar un trepano de 7 mm de diámetro para descubrir la corteza somatosensorial (contralateral al sitio de la estimulación de la extremidad). Posteriormente, retiramos la duramadre (~5-7 mm<sup>2</sup>). Además, empleamos una lámpara de luz roja para mantener la temperatura de los animales alrededor de 37°C. Al término del experimento, se realizó la eutanasia de las ratas con sobredosis de pentobarbital sódico.

## **Estimulación mecánica**

*Para el registro de los potenciales provocados somatosensoriales*

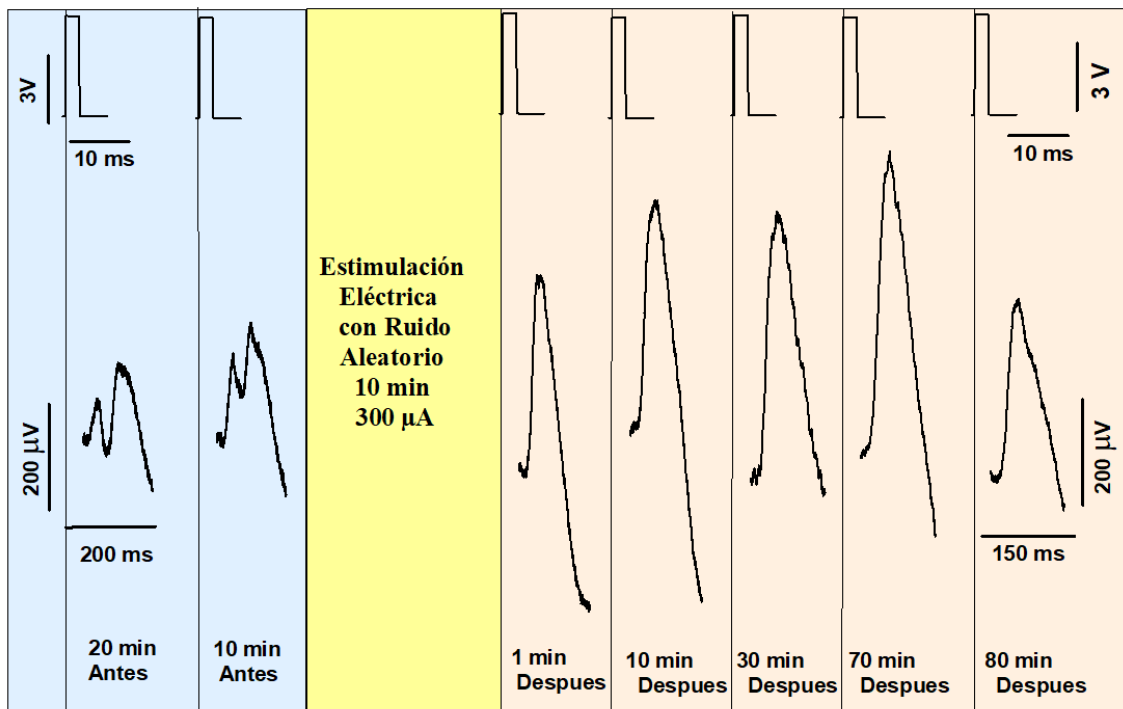
La estimulación mecánica de la extremidad izquierda anterior de cada animal permitió el registro de los potenciales provocados somatosensoriales en la corteza somatosensorial primaria contralateral. Debido a que la longitud de la punta con el que contaba el sistema de estimulación táctil de nuestro laboratorio, el sistema Chubuck, no era lo suficientemente largo para entrar en contacto con la extremidad anterior del sujeto de experimentación, se optó por el diseño y construcción de un nuevo estimulador táctil que pudiera resolver este problema. Este sistema de estimulación táctil posteriormente se sometió a consideración de patente, para aplicarlo en otros proyectos de nuestro laboratorio. Dicho sistema lleva por nombre: Estimulador Táctil transductor con sistema de efecto hall. Este nuevo sistema, aparte de poder ejecutar las tareas del anterior sistema, permite una mejor manipulación, por su tamaño reducido y facilidad de operación.

La estimulación con el nuevo sistema consistió en poner en contacto un eje de madera en medio de los nudillos de los dedos índice y medial con un pulso de duración de 5 ms a 1 Hz de frecuencia, de 2.35, 3.4 y 4 mN. La Figura 5 ilustra el arreglo experimental y cómo el conjunto de la extremidad se estimuló en masa para producir una gran actividad eléctrica (por ejemplo, PPSs). Obtuvimos registros de los PPSs con electrodos de plata clorurada de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Registramos los PPSs en la región de la corteza somatosensorial donde el promedio de los PPSs exhibió su máxima amplitud. Dichos PPSs se obtuvieron con amplificadores Astromed- Grass p511 con un filtro pasabandas de 0.05-30kHz. Posteriormente, se digitalizaron con el sistema Digidata 1440A (Molecular Devices, Axon Instruments) con una frecuencia de muestreo de 50 kHz.



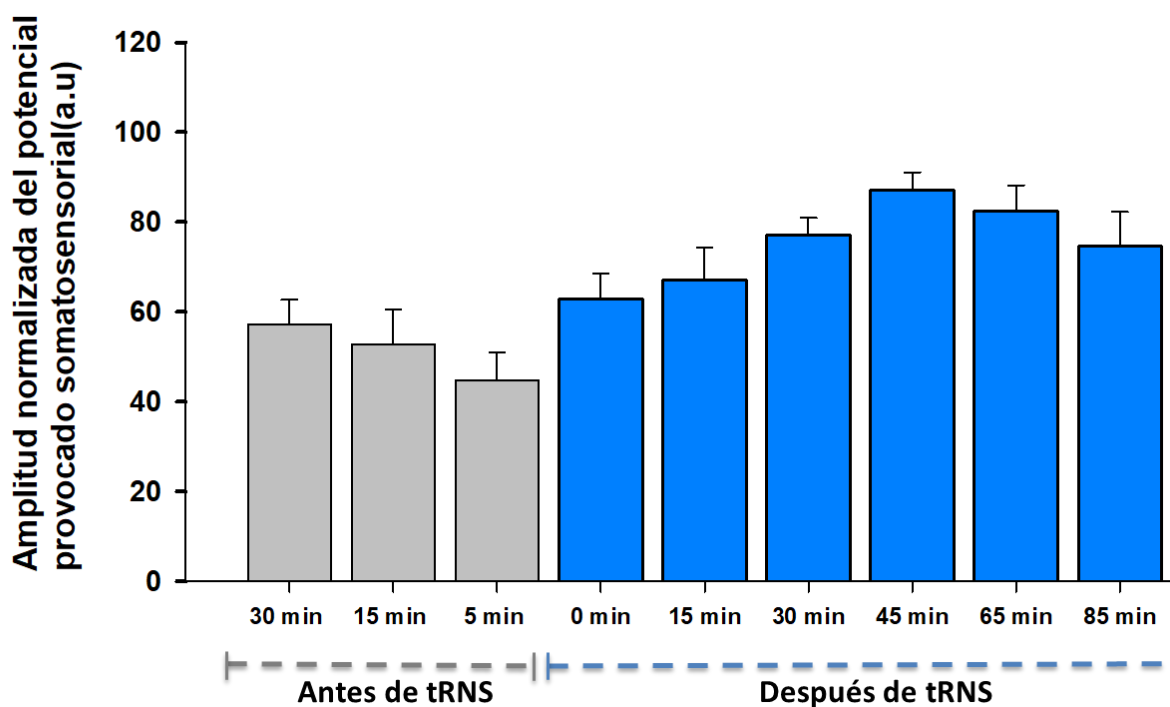
**Figura 31]. Representación esquemática de la estimulación eléctrica somatosensorial.**

A) Representación de la estimulación ruidosa con corriente eléctrica. B) Ilustración de un Potencial Provocado Somatosensorial (PPS). C) Representación de la estimulación mecánica (1 Hz-5ms). D) Corteza somatosensorial primaria.



**Figura 32 |.** Efecto de la estimulación eléctrica con ruido aleatorio sobre los potenciales provocados somatosensoriales. En la parte superior se muestran las señales eléctricas de entrada (pulso cuadrado) que se usaron para generar los estímulos mecánicos y en la parte inferior los potenciales provocados somatosensoriales promedios correspondientes a los estímulos mecánicos y el tiempo que duro el protocolo experimental.

## Resultados



**Figura 33 | Gran promedio normalizado de los tres niveles de estimulación mecánica de los PPS de los cuatro sujetos, para diferentes periodos de tiempo.** Para cada periodo de tiempo se calculó el promedio normalizado de las diferentes magnitudes de estimulación mecánica.

---

---

## ARTÍCULOS DERIVADOS DEL TRABAJO DE TESIS

---

---

- I. Remedios L, Mabil P, Flores-Hernández J, Torres-Ramírez O, Huidobro N, Castro G, Cervantes L, Tapia J A, De la Torre Valdovinos B, Manjarrez E (2019) Effects of Short-Term Random Noise Electrical Stimulation on Dissociated Pyramidal Neurons from the Cerebral Cortex. *Neuroscience* 404: 371–386.
- II. Mabil P, Huidobro N, Torres-Ramirez O, Flores-Hernandez J, Flores A, Gutierrez R, Manjarrez E (2020) Noisy Light Augments the Na<sup>+</sup> Current in Somatosensory Pyramidal Neurons of Optogenetic Transgenic Mice. *Frontiers in neuroscience* 14: 490.
- III. Mabil P, Huidobro N, Flores A, Manjarrez E (2020) Potential role of noise to improve intracortical-microstimulation in tactile neuroprostheses. *Neural Regen Res* 16: 1533-1534.
- IV. Mabil P, Torres-Ramirez O, Huidobro N, Flores-Hernandez J, Flores A, Manjarrez E (2020) The impact of long-term random noise stimulation on isolated pyramidal cells (en revisión).