



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurofisiología Integrativa

Tesis:

Análisis temporal y covarianza cruzada entre descargas unitarias de neuronas ON-OFF y OFF-ON de la región del óbex durante el rascado ficticio en gato descerebrado

Tesis presentada como requisito para obtener el título de Maestría en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

L. Fis. Lorena López Beltrán

Asesor de Tesis:

Dr. Elías Manjarrez López

Enero 2016



Instituto de Fisiología
BUAP

Agradecimientos

A todas las personas que confían en la ciencia.

Dedicatoria

A mi familia y compañeros que siempre me han apoyado.

Resumen

Mediante el análisis de Covarianza Cruzada entre registros simultáneos de la actividad extracelular unitaria de neuronas ON-OFF y OFF-ON de la vecindad del óbex en la preparación de gato descerebrado demostramos que no hay evidencia con la cual se pueda concluir algún tipo de conectividad entre estos tipos de neuronas a pesar de cambiar su actividad con el inicio del Potencial Lento del Óbex y del rascado ficticio. Sin embargo, proponemos una nueva hipótesis de sincronización mediante un grupo neuronal superior e interneuronas excitadoras e inhibitoras.

Contenido

1. Introducción	7
1.1 Tallo cerebral y la referencia anatómica: Óbex	7
1.2 Núcleos y tractos del tallo cerebral	9
1.3 Tipos de neuronas del tallo cerebral	13
1.4 Reflejo de rascado y rascado ficticio.....	15
1.5 Generador Central de Patrones	17
1.6 Potencial Lento del Óbex	22
1.7 Neuronas ON-OFF y OFF-ON de la región del Óbex	25
2. Planteamiento del problema	28
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos particulares	30
5. Metodología	31
5.1 Preparación del modelo y montaje experimental	31
5.2 Obtención de datos.....	32
5.3 Análisis de datos	33
5.3.1 Spike sorting usando Wave Clus	33
5.3.2 Histogramas de coincidencia y Correlación Cruzada	35
5.3.3 Covarianza Cruzada	37
5.3.4 Frecuencia instantánea	38
5.3.5 Prueba estadística de Rayleigh y Gráficas Polares.....	39
5.3.6 Ecuaciones Morris-Lecar y método de Runge Kutta de cuarto orden.....	40
6. Resultados	41
7. Conclusiones.....	54
8. Discusión	55
Apéndice I. Wave Clus.....	57
Apéndice II. Programa del Dr. André F. Kohn	60

Apéndice III. Estadística de Rayleigh y gráficas polares	62
Apéndice IV. Ecuaciones tipo Morris Lecar y método Runge Kutta de cuarto orden ..	64
Bibliografía	67

1. Introducción

Desde que Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX demostró que las células que conforman el cerebro no forman un *sinsitio* sino una red de elementos individuales el estudio de las conexiones entre las neuronas tuvo un gran auge. Científicos como Sherrington y Graham Brown propusieron modelos de circuitos neuronales con los cuales pretendieron explicar el origen de movimientos como la locomoción y el rascado. Sin embargo, aún no se ha logrado tener un circuito completo que explique en su totalidad el movimiento. Por ello estudiar la actividad de las neuronas que podrían ser parte de estos circuitos y modelar su participación en la generación del movimiento sigue siendo importante en la actualidad.

1.1 Tallo cerebral y la referencia anatómica: Óbex

El tallo cerebral es la estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) que contiene al cerebro medio, el puente de Varolio y el bulbo raquídeo [11] (Figura 1.1.1). Comunica a la médula espinal con el resto de las estructuras superiores del SNC (vías ascendentes y descendentes) y es importante para muchas funciones integrativas.

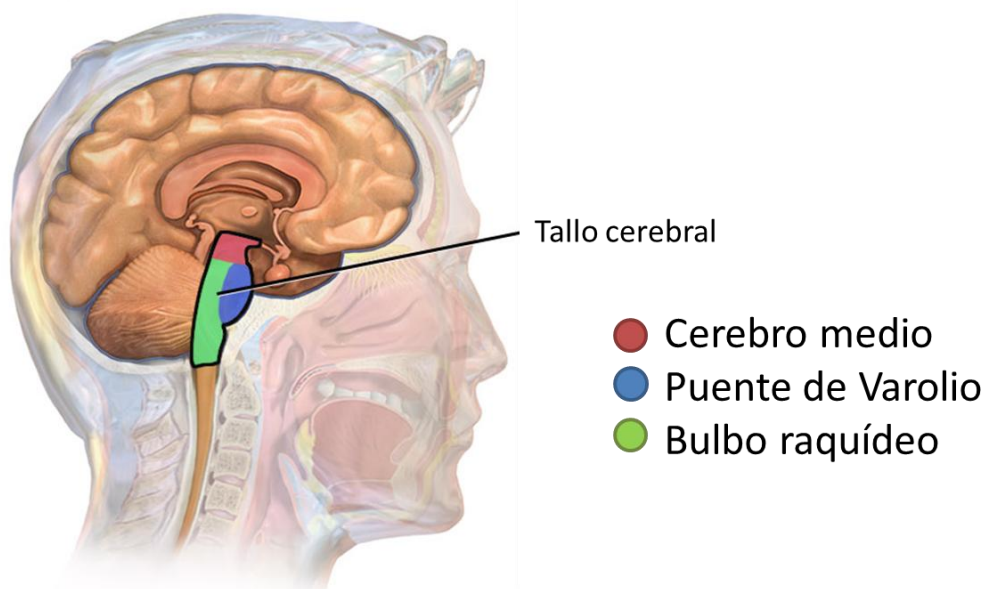


Figura 1.1.1 División general del tallo cerebral. En rojo el cerebro medio, en azul el puente de Varolio y en verde el bulbo raquídeo. (Corte sagital).

El bulbo raquídeo o médula oblonga está ubicado de manera superior o rostral a la médula espinal e incluye centros de funciones autonómicas vitales como la digestión, la respiración y el control de la frecuencia cardíaca.

Superior o rostral al bulbo raquídeo se encuentra el puente de Varolio que transmite información acerca del movimiento desde los hemisferios cerebrales hasta el cerebelo.

Finalmente el cerebro medio es la parte más superior o rostral del tallo cerebral, controla algunas funciones sensoriales y motoras como el movimiento ocular y la coordinación de los reflejos visuales y auditivos.

En una vista dorsal del tallo cerebral (Figura 1.1.2) se puede observar que en el bulbo raquídeo se encuentra la pared ventral del cuarto ventrículo o la llamada fosa romboidea cuyo extremo inferior (caudal) forma el punto anatómico llamado óbex.

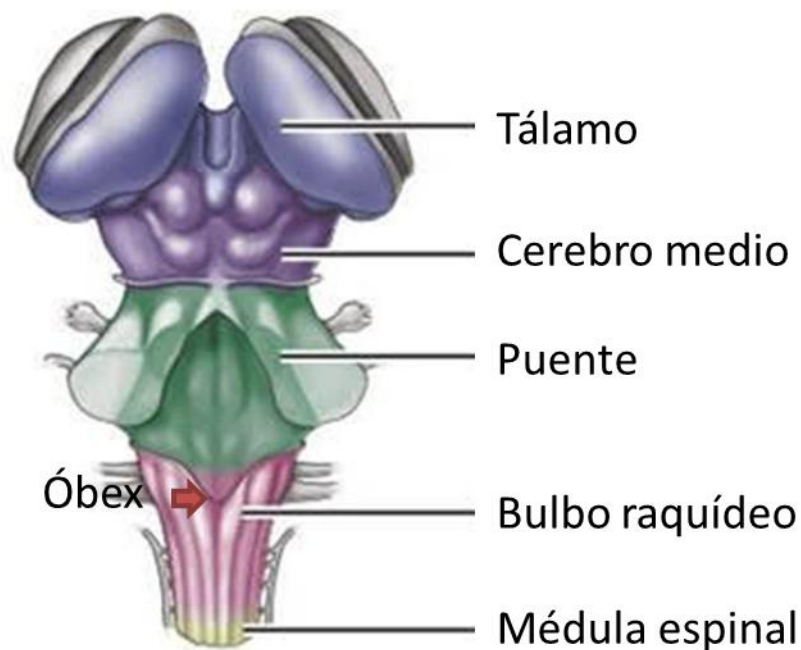


Figura 1.1.2 Referencia anatómica óbex. En azul los tálamos, en morado el cerebro medio, en verde el puente, en rosa el bulbo raquídeo y en amarillo la médula espinal. La flecha roja indica la referencia anatómica óbex. (Vista dorsal).

El óbex es un punto anatómico fácilmente identificable cuando se ha removido el cerebelo. A partir de ésta referencia anatómica pueden darse coordenadas y

profundidades para referir un punto específico del bulbo raquídeo como los núcleos que se describen a continuación.

1.2 Núcleos y tractos del tallo cerebral

El tallo cerebral contiene núcleos motores y sensoriales (Figuras 1.2.1 y 1.2.2) [10]. Sus funciones generales se describen en la Tabla 1.2.1.

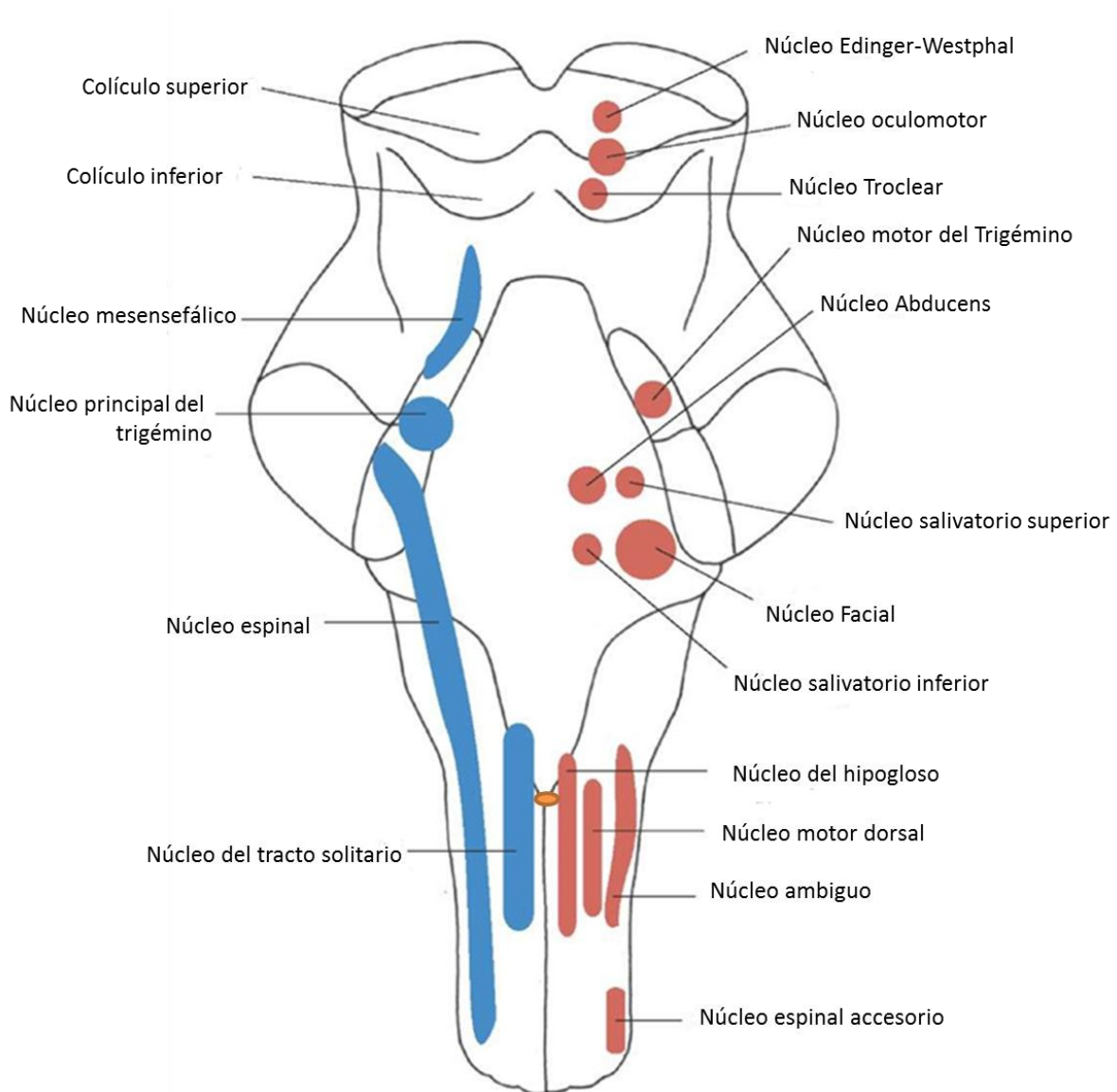


Figura 1.2.1 *Núcleos motores y sensoriales del tallo cerebral.* Esquema de la vista dorsal del tallo cerebral. En rojo los núcleos motores y en azul los núcleos sensoriales. El óvulo naranja indica la posición del óvulo. Todos los núcleos indicados se encuentran de manera bilateral.

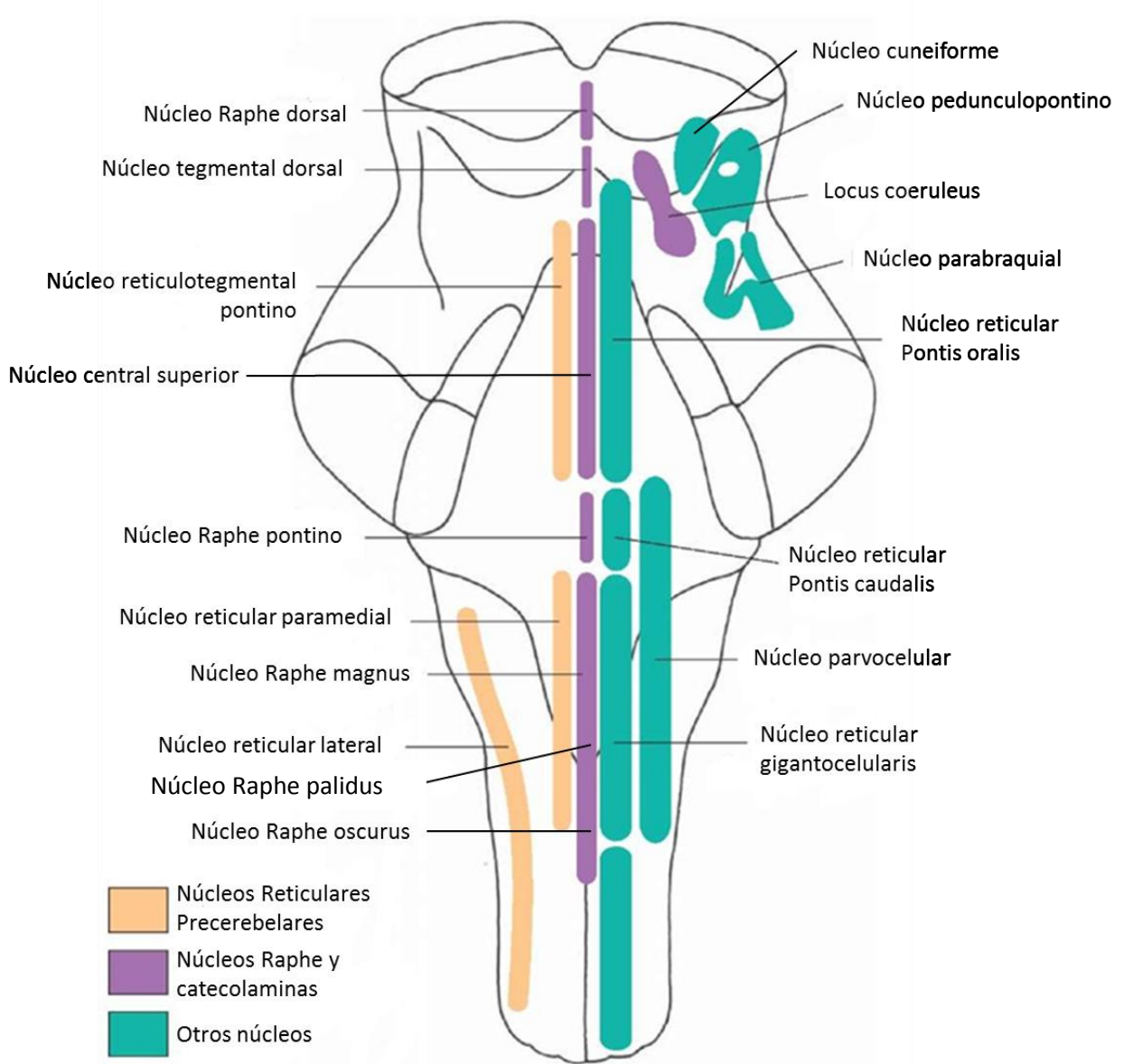


Figura 1.2.2 *Otros núcleos del tallo cerebral.* Esquema de la vista dorsal del tallo cerebral. En amarillo los núcleos reticulares precerebelares. En morado núcleos Raphe y de catecolaminas. En turquesa otros núcleos. Todos los núcleos se encuentran de manera bilateral.

Las vías del tallo cerebral relacionadas con locomoción (Figura 1.2.3) son los tractos vestibulo espinal, tectoespinal, retículo espinal y rubroespinal.

El tracto vestibulo espinal se origina en el núcleo vestibular. La estimulación de dicho núcleo produce la excitación de motoneuronas extensoras que descargan en fase [17].

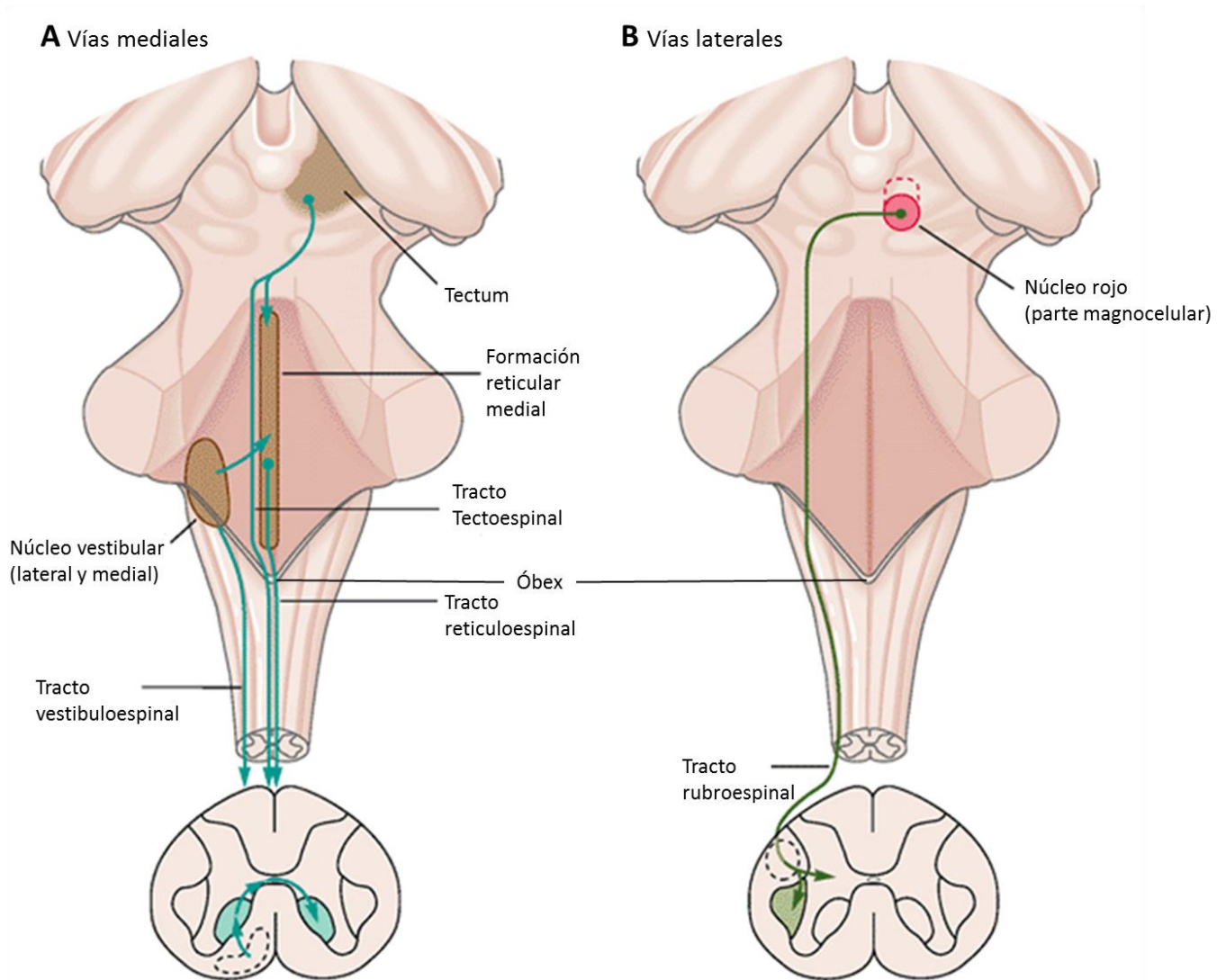


Figura 1.2.3 Vías del tallo cerebral relacionadas con locomoción. Esquema de la vista dorsal del tallo cerebral y corte transversal de la médula espinal (arriba: dorsal, abajo: ventral). A: (Vías mediales) Tracto tectoespinal, tracto reticuloespinal y tracto vestibulo espinal. B: (Vías laterales) Tracto rubroespinal.

El tracto tectoespinal se origina en el tectum (Figura 1.2.3 A) y desciende de manera contralateral. Tiene acción inhibitoria en motoneuronas de músculos extensores y, excitadora en motoneuronas de músculos flexores [10, 21].

El tracto reticuloespinal se origina en núcleos reticulares (Pontis oralis y caudalis), desciende por el fonículo ventral y termina en las astas ventrales de la médula espinal. Excita a motoneuronas extensoras [10].

El tracto rubroespinal (Figura 1.2.4 B) Se origina en el núcleo rojo e inmediatamente desciende de manera contralateral hasta las astas dorsales de la médula espinal y activa motoneuronas principalmente flexoras [21].

Nombre del Núcleo	Función general
Núcleo Edinger-Westphal	Parasimpática preganglionar ocular
Núcleo oculomotor	Movimientos voluntarios del ojo
Núcleo Troclear	Inerva al músculo oblicuo superior del ojo
Núcleo motor del trigémino	Inerva músculos masticadores, tensor del tímpano y porción del digástrico
Núcleo Abducens	Movimiento del músculo rectolateral del ojo
Núcleo salivatorio superior	Inerva las glándulas submaxilar y sublingual
Núcleo salivatorio inferior	Inerva glándula parótida
Núcleo facial	Movimiento (somático) de cara y cuello
Núcleo del hipogloso	Inerva músculos de la lengua e hioideos
Núcleo ambiguo	Parte del plexo nervioso faríngeo
Núcleo espinal accesorio	Inerva al esternocleidomastoideo
Núcleo del tracto solitario	Papilas gustativas de los 2/3 anteriores de la lengua
Núcleo espinal	Parte de la sensibilidad esteroceptiva
Núcleo principal del trigémino	Sensibilidad táctil de la porción anterior de la cabeza
Núcleo mesencefálico	Información propioceptiva de los músculos de la masticación
Núcleo cuneiforme	Sensibilidad propioceptiva inconsciente y esteroceptiva de la mitad superior del cuerpo
Núcleo pedunculopontino	Relevo de información de ganglios basales
Locus coeruleus	Participa en el ciclo sueño-vigilia, en la atención y la memoria
Núcleo parabraquial	Señales gustativas y viscerales
Núcleo reticular pontis oralis	Participa en el ciclo sueño-vigilia
Núcleo reticular pontis caudalis	Movimiento de cabeza ante estímulo auditivo
Núcleo parvocelular	Participa en la integración audio-visual
Núcleo reticular gigantocelularis	Recibe aferencias de la corteza cerebral
Núcleo Raphe magnus	Centro serotoninérgico B3
Núcleo Raphe pálido	Centro serotoninérgico B1
Núcleo Raphe obscuro	Centro serotoninérgico B2
Núcleo reticular lateral	Participa en la frecuencia respiratoria y la presión arterial
Núcleo reticular paramedial	Mantenimiento del tono muscular
Núcleo Raphe pontino	Centro serotoninérgico B5
Núcleo central superior	Relacionado con reflejos auditivos

Nombre del Núcleo	Función general
Núcleo reticulotegmental pontino	Participa en el ciclo sueño-vigilia, en la atención y la memoria
Núcleo tegmental dorsal	Envía fibras a los núcleos de la formación reticular
Núcleo Raphe Dorsal	Centro serotoninérgico B7

Tabla 1.2.1 Funciones generales de los núcleos del tallo cerebral.

Distintos tipos de neuronas forman los tractos y núcleos mencionados en ésta sección. Algunas de ellas se describen a continuación.

1.3 Tipos de neuronas del tallo cerebral

Estructuras como el bulbo raquídeo, el puente de Varolio y el mesencéfalo se han conservado filogenéticamente en vertebrados [13] de manera que estudios realizados en especies inferiores pueden ser extendidos a especies superiores con ciertas precauciones.

En 1993 Lee y colaboradores [13] realizaron experimentos de marcaje retrógrado con peroxidasa de rábano (HRP) en la región retículo espinal (RS) de pez dorado y describieron el arreglo neuronal del tallo cerebral (Figura 1.3.1). Dada la distribución que obtuvieron decidieron dividir la región en 7 segmentos (RS1-RS7) rostrocaudales. Notaron que los cuerpos celulares se mantienen mediales mientras que las arborizaciones dendríticas se extienden ventral y lateralmente y los axones descienden de manera ipsilateral o contralateral dependiendo del segmento en el que se encuentren.

También encontraron un tipo de células llamadas neuronas de Mauthner (M) (Figura 1.3.2) que se caracterizan por su gran tamaño y además son cercanas a la vecindad del óbex.

Neki y colaboradores en 2014 [20] investigaron la conectividad electrofisiológica entre las neuronas M, un par de neuronas gigantes en el segmento 4 (relacionadas con la activación del escape rápido) y neuronas de los segmentos 4 al 6 (Figura 1.3.3). Ellos hallaron la evidencia de conexiones unidireccionales entre las neuronas M y neuronas retículo espinales (MRE) y sugirieron una organización jerárquica en la red del control motor rostrocaudal. Posiblemente el registro de la actividad neuronal en la vecindad del óbex corresponda a neuronas como las descritas en ésta sección.

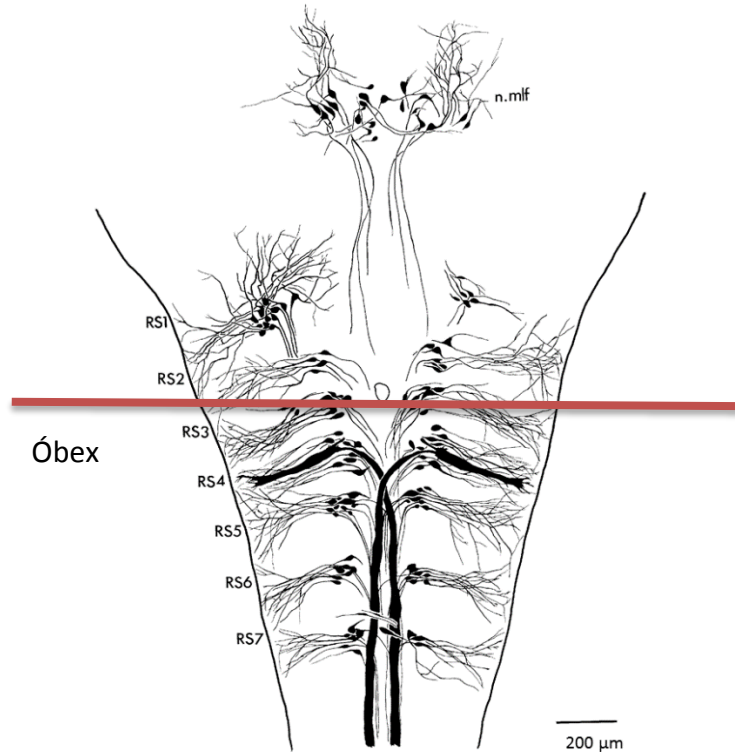


Figura 1.3.1 Distribución neuronal en el tallo cerebral de pez dorado. La abreviación n.mlf significa neurona de la formación medial lateral y RS: Retículo espinal. La línea roja representa el corte (coronal en el caso del pez) que intersectaría al óbex. Modificado de [13].

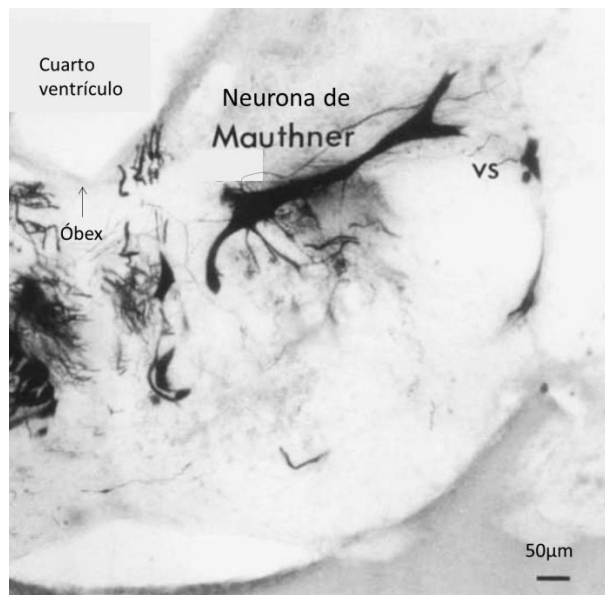


Figura 1.3.2 Neurona de Mauthner. Sección transversal de RS4. Las dendritas de la neurona de Mauthner se extienden de manera distal cercanas a las neuronas de la región vestibulo espinal (vs). En la parte superior izquierda se encuentra el piso del cuarto ventrículo y la referencia anatómica óbex. Modificado de [13]

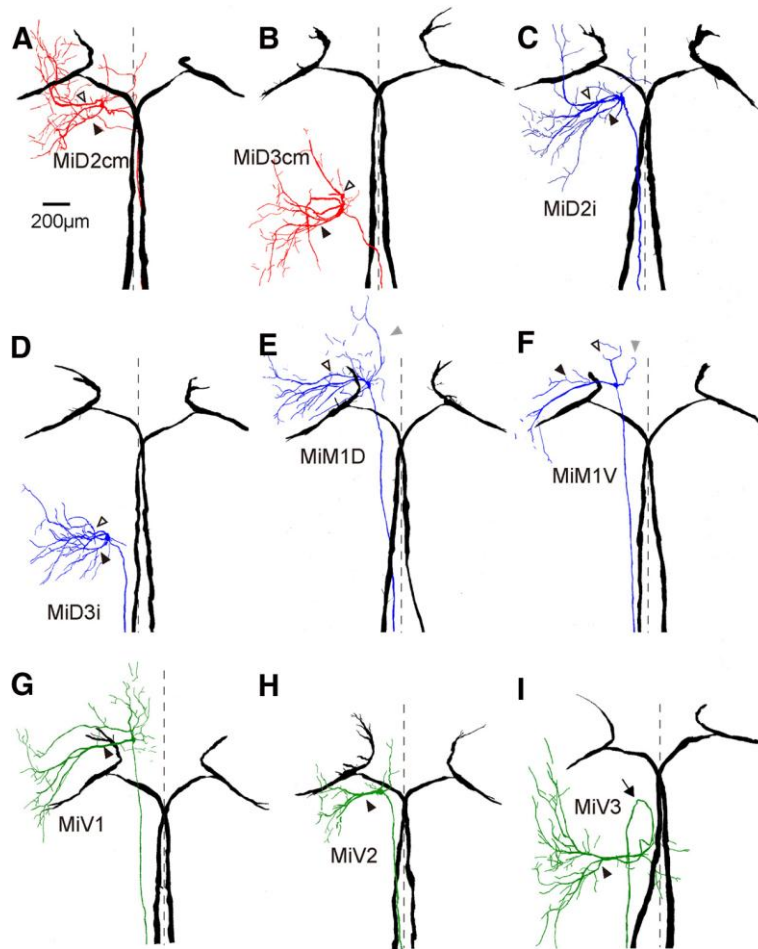


Figura 1.3.3 *Neuronas de Mauthner y retículo espinales de las regiones 4 y 6.* De manera punteado se indica la línea media. Las puntas de flecha rellenas indican las dendritas laterales y las abiertas indican las dendritas ventrales. A: MiD2cm de r5 con M bilateral. B: MiD3cm con M bilateral. C: MiD2i con axón que se proyecta ipsilateral hacia la médula espinal. D: MiD3i en r6 con axón que proyecta ipsilateralmente hacia la médula espinal. E y F: MiM1 dorsal y ventral respectivamente. G: MiV1 en r4. H: MiV2 en r5. I: MiV3 en r6. Modificado de [20]

Hasta ahora hemos abordado la estructura interna y externa del tallo cerebral haciendo hincapié en los objetos motores. La actividad motora de interés en esta tesis es el rascado así que en la siguiente sección profundizamos en los detalles de dicha tarea.

1.4 Reflejo de rascado y rascado ficticio

Las tareas reflejas rítmicas, como la locomoción, el nado y rascado reflejo, fueron inicialmente consideradas como un conjunto de reflejos espinales monosinápticos repetitivos.

Sin embargo, en los estudios realizados por Sherrington [27] y Graham Brown [3] se concluyó que se trataba de una actividad mucho más compleja que involucra la flexión y extensión de diversos grupos musculares en perfecta coordinación, de modo que no podía tratarse de un reflejo monosináptico [25] lo que motivó el estudio de los posibles circuitos involucrados en la generación de dichas tareas.

Kuhta y Smith en 1910 [12] definieron el rascado como una respuesta refleja motora en la que una extremidad se aproxima a un campo receptivo y realiza movimientos rítmicos para remover un estímulo irritante en la zona.

Un gato intacto presenta el reflejo de rascado al estimular campos receptivos como la pinna [27].

El reflejo de rascado presenta dos etapas. La primera etapa es el acercamiento de la extremidad hacia la cabeza, llamada fase tónica. La segunda etapa es la actividad rítmica y alternante entre flexión y extensión con una frecuencia característica de 3 a 4 Hz [6].

Sherrington [27] describió que el reflejo de rascado puede ser evocado en una preparación descerebrada y desaferentada. Cuando el reflejo de rascado es evocado en una preparación además inmovilizada entonces a dicha actividad alternante se le conoce como rascado ficticio.

Al aplicar tópicamente curare (D-tubocurarina) en los segmentos cervicales C1 y C2 de la médula espinal (retirando la dura madre) puede facilitarse el reflejo de rascado [8] aunque el mecanismo por el cual se produce este efecto no se ha determinado completamente. Domer y Feldberg [7] asumieron que podría actuar en las sinapsis del par craneal V en los segmentos C1 y C2.

El rascado ficticio en gato conserva la actividad alternante característica del rascado, pero la duración de las fases flexora y extensora se modifica durando 200ms y 50ms respectivamente [6].

Para estudiar la actividad flexora y extensora de los músculos en una preparación inmovilizada pueden registrarse los nervios que corresponden a músculos antagonistas que participen en la tarea rítmica.

En un registro como el descrito correspondiente a rascado ficticio en gato (Figura 1.4.1) puede observarse la actividad alternante flexora y extensora así como la fase tónica o de acercamiento.

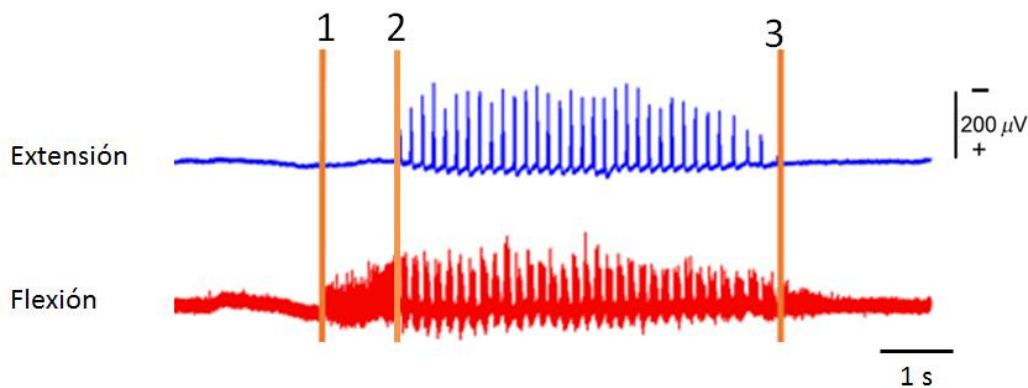


Figura 1.4.1 *Actividad alternante flexora y extensora durante el rascado ficticio.* En azul el registro electroencefaloeléctrico de la actividad de extensión en rojo la actividad de flexión. Las líneas naranjas indican 1: inicio de la fase tónica, 2: fin de la fase tónica e inicio de la fase cíclica (rítmica) y 3: fin del episodio de rascado ficticio.

El estudio de las tareas rítmicas estereotipadas ha llevado al desarrollo de modelos de circuitos neuronales como los que se describen en la siguiente sección.

1.5 Generador Central de Patrones

Thomas Graham Brown [4] dirigió una serie de experimentos sobre el control neural de la locomoción usando las preparaciones de gato descerebrado o espinalizado, introducidas por Sherrington [25, 26] quien creía que los ritmos locomotores eran creados por entradas cíclicas de propioceptores de los músculos flexores de la cadera y otros reflejos. Con sus resultados experimentales Brown concluyó que la locomoción era producida y controlada por una red neuronal contenida en la médula espinal que ha sido llamada Generador Central de Patrones (GCP), [9]. El cual es referido como una red neuronal que es capaz de generar y organizar patrones de ritmo para la actividad motora, independientemente de las entradas sensoriales [14].

A partir de la contribución de Brown se han realizado estudios que han jugado un rol primordial en el entendimiento de las bases celulares y de las redes generadoras del ritmo motor y los patrones locomotores en especies vertebradas e invertebradas.

Brown utilizó el concepto de Sherrington de “Hemicentros” para explicar la inhibición recíproca en su modelo de control locomotor espinal [9]. Basado en sus experimentos mostró que el patrón básico de marcha es generado enteramente en la médula espinal en ausencia de entradas aferentes periféricas.

El modelo que Brown [3] propuso está formado por dos grupos de neuronas espinales organizadas recíprocamente y mutuamente inhibidas unas a otras, que eran capaces de reproducir el patrón y el ritmo básico para la marcha (Figura 1.5.1).

Modelo de Hemicentros

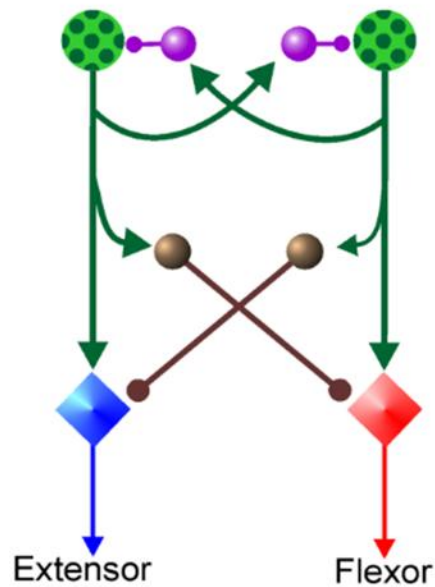


Figura 1.5.1. *Modelo de Hemicentros de Brown.* El modelo de hemicentro de Brown consiste en dos grupos neuronales que se inhiben de manera recíproca de modo que la activación de uno implica la inactivación del otro, de esta manera podía explicarse que la actividad del nervio flexor y extensor sea alternante. En el esquema los círculos verdes punteados son grupos de neuronas de la médula espinal. Las flechas verdes representan conexiones excitadoras, en café interneuronas de la médula espinal, las líneas de color café terminadas en círculos indican conexiones inhibitorias. Los rombos azul y rojo representan motoneuronas de extensoras y flexoras respectivamente. Modificado de [14].

En 1977 Miller y Scott [16] sugirieron la hipótesis de que las células Renshaw eran las responsables de la alternancia entre la flexión y la extensión. En cuestión de arquitectura, su modelo tomó en cuenta conexiones neuronales conocidas (cadenas de neuronas) en las que incluyeron células de Renshaw e interneuronas inhibitorias la responsables de la activación recíproca entre motoneuronas flexoras y extensoras.

En general existen muchos modelos que han fallado en explicar enteramente los principales patrones que pueden ocurrir en la generación de actividad alternante flexora y extensora durante la locomoción. En particular, los cambios impredecibles llamados “supresiones” los cuales refieren periodos de actividad silente en algunas poblaciones de motoneuronas acompañadas de actividad rítmica o sostenida en motoneuronas antagonistas mientras el ritmo “post-supresión” es generalmente mantenido, por esta razón se han usados GCP de dos niveles.

En 1980, Perret y Cabelguen [23] propusieron un GCP de dos niveles (Figura 1.5.2) que explica la compleja actividad bifásica en las neuronas denominadas bifuncionales. Ellos propusieron que los hemicentros flexores y extensores pueden enviar comandos motores a motoneuronas bifuncionales. También sugirieron que el generador de ritmo debería estar funcionalmente separado del generador de patrones ya que el ritmo y la amplitud de los potenciales eléctricos asociados a la locomoción aparentan ser dos características distintas que pueden cambiar espontánea e independientemente. Éste tipo de modelo se ha sugerido para explicar cómo la estimulación sensorial puede alterar el ciclo del periodo locomotor sin alterar el nivel de la actividad motoneuronal.

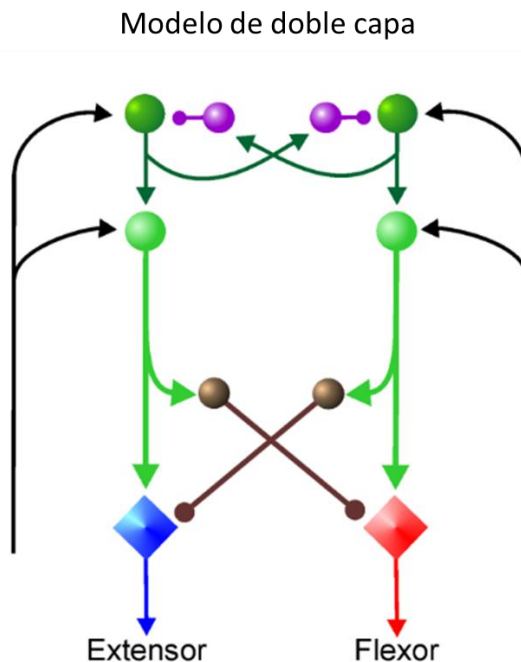


Figura1.5.2 Modelo de GCP de Perret y Cabelguen. En verde oscuro la primera capa del GCP que corresponde a la capa generadora de ritmo. En verde claro la segunda capa del GCP correspondiente a la capa formadora de patrones. En morado y en café interneuronas inhibidoras. Los rombos azul y rojo corresponden a motoneuronas excitadoras e inhibidoras respectivamente. Las líneas que terminan en punta de flecha indican conexiones excitadoras y las que terminan en círculos indican conexiones inhibitorias. Las líneas negras corresponden a entradas aferentes. Modificado de [14].

Un avance que reafirmó el modelo de GCP de dos capas fueron los datos experimentales de McCrea y Rybak [14] obtenidos durante la locomoción y el rascado ficticio en gatos descerebrados así como la introducción de modelos matemáticos (simulación computacional) con lo cual se han podido explicar las “supresiones” y otros patrones más complejos durante la actividad motora (Figura 1.5.3).

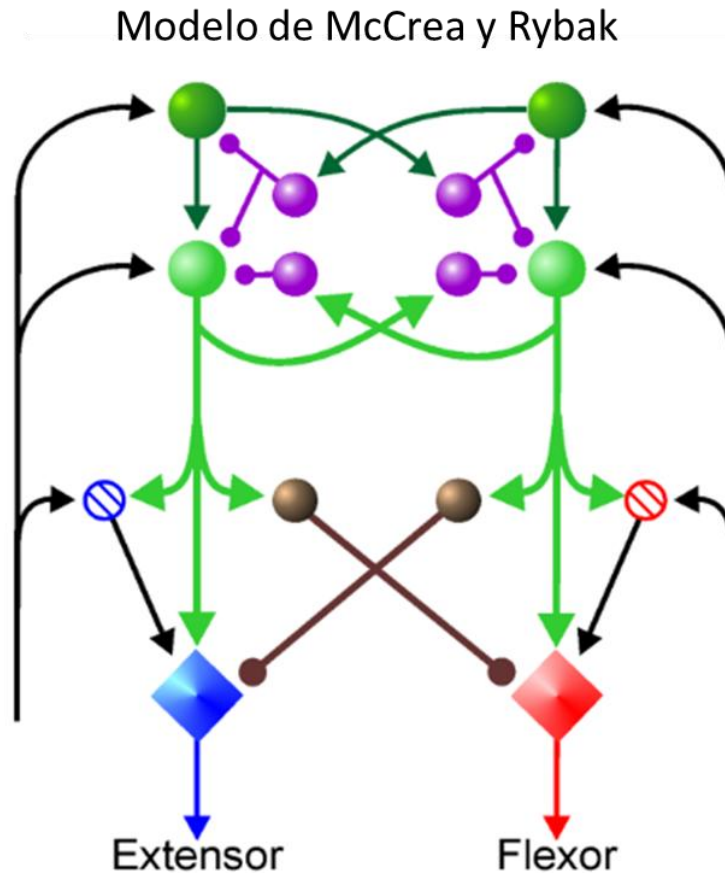


Figura 1.5.3. Modelo de GFP de McCrea y Rybak. En verde oscuro la primera capa del GFP que corresponde a la capa generadora de ritmo. En verde claro la segunda capa del GFP correspondiente a la capa formadora de patrones. En morado y en café interneuronas inhibidoras. Los círculos azul y rojo corresponden a interneuronas excitadoras de Renshaw. Los rombos azul y rojo corresponden a motoneuronas excitadoras e inhibitoras respectivamente. Las líneas que terminan en punta de flecha indican conexiones excitadoras y las que terminan en círculos indican conexiones inhibitoras. Las líneas negras corresponden a entradas aferentes. Modificado de [14].

Actualmente, la última versión de GFP es la propuesta por Pérez y colaboradores (2009) [22] en la que además de implementar dos capas para su modelo, también se considera una conexión asimétrica entre la capa generadora de ritmo y la capa de formación de patrones (Figura 1.5.4). Éste modelo ha sido implementado en simulaciones

computacionales con lo que se ha explicado mejor el funcionamiento de las redes neuronales que controlan la locomoción.

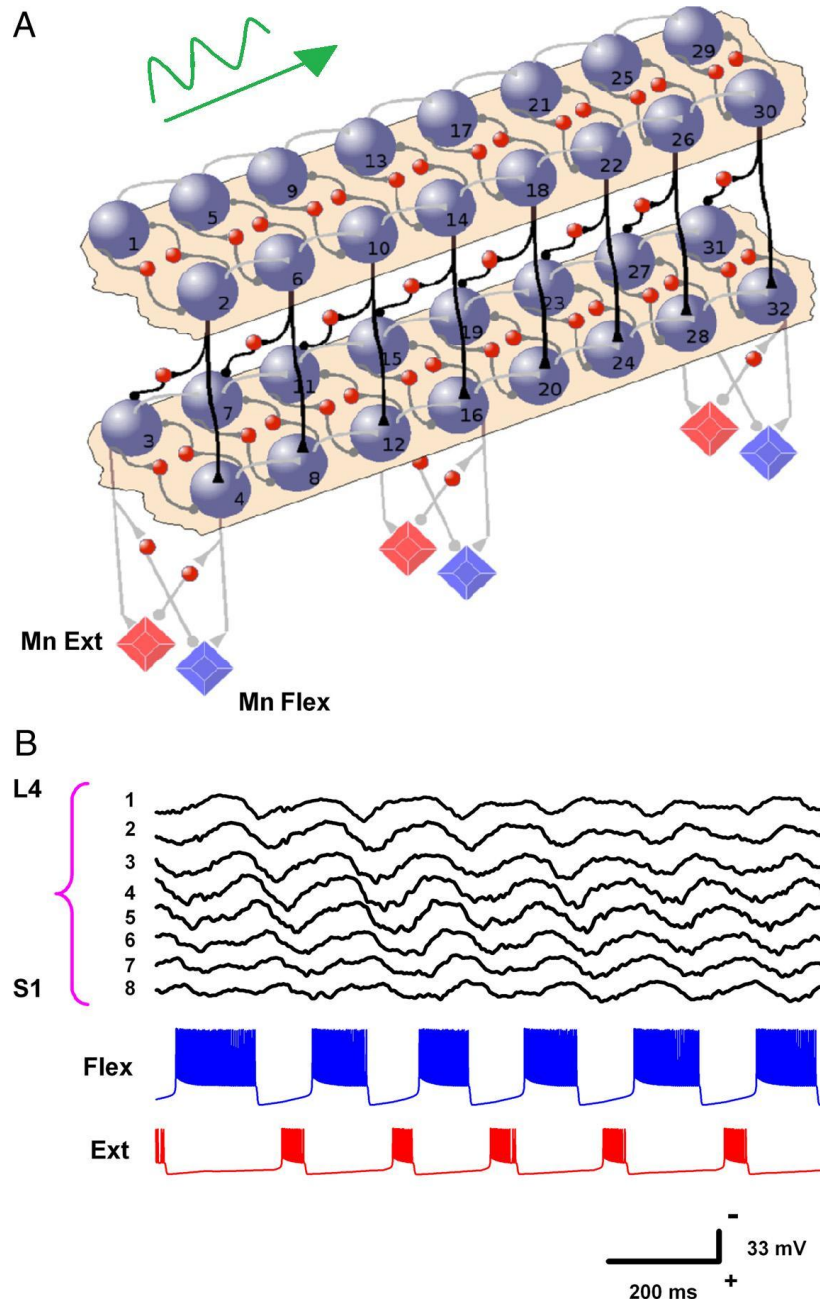


Figura 1.5.4 Modelo de GCP de Pérez y colaboradores. A. Representación esquemática del GCP propuesto por Pérez y colaboradores (2009). Se asumen ocho nodos del GCP distribuidos a lo largo de la médula espinal en una organización de dos capas asimétricas. Cada nodo contiene poblaciones de neuronas excitadoras (esferas grises) y poblaciones de neuronas inhibitorias (esferas rojas pequeñas) sinápticamente conectadas (líneas negras y grises). Las flechas gris claro dentro de las capas generador de ritmo y formadora de patrones denotan las conexiones sinápticas entre los nodos (las motoneuronas de los nodos 2, 3, 5, 6 y 7 fueron omitidas para una mejor visualización). B. Propagación de la actividad eléctrica a lo largo de la médula espinal bajo operación normal (omitiendo supresiones). Modificada de [22].

A pesar de contar con modelos de GCP que explican cada vez mejor los circuitos neuronales que generan locomoción, rascado o tareas rítmicas en general ninguno considera por completo todos los grupos neuronales que pueden llegar a estar involucrados, un motivo de ello es el reciente descubrimiento de distintos elementos que podrían formar parte de estos complejos sistemas, muestra de ello son los elementos descritos en las dos secciones siguientes.

1.6 Potencial Lento del Óbex

En 2013 Tapia y colaboradores [28] registraron el potencial de superficie en el tallo cerebral con un arreglo de 32 electrodos. De manera simultánea registraron la actividad electroneurográfica de los nervios gastrocnemios (medial y lateral) y tibial anterior en la preparación de gato descerebrado además de la actividad de neuronas de la Formación Reticular (FR).

Al evocar rascado ficticio encontraron que el potencial de superficie en la región del óbex cambiaba lentamente antes de ser registrada la actividad tónica del nervio flexor que corresponde al inicio del rascado y se mantenía durante éste. A dicho potencial le llamaron Potencial Lento del Óbex (PLO). En la Figura 1.7.1 puede observarse que del arreglo de 32 electrodos la mayor amplitud del PLO fue registrada por los electrodos 11 y 19 que corresponden a la región cercana al óbex.

De tener una amplitud de $0\mu\text{V}$ el PLO alcanzó máximos de $(-248\pm 110)\mu\text{V}$ asociado al rascado ficticio izquierdo y $(-239\pm 102)\mu\text{V}$ asociado al rascado ficticio derecho sin tener diferencias significativas en la distribución del PLO entre ambos casos (Figura 1.7.2). Los registros de mayor amplitud ocurrieron en una región 1mm rostral al óbex y 1mm lateral a éste (Figura 1.7.2 A)

El PLO también fue correlacionado por Tapia y colaboradores con el potencial del dorso de la médula espinal (PDM) a nivel Lumbar 6 (L6) (Figura 1.7.3) y descubrieron que el inicio del PLO ocurre antes que el inicio del PDM. Dado que el PLO inicia (0.8 ± 0.4) s antes del episodio de rascado ficticio y antes del PDM lo consideraron un potencial pre-movimiento.

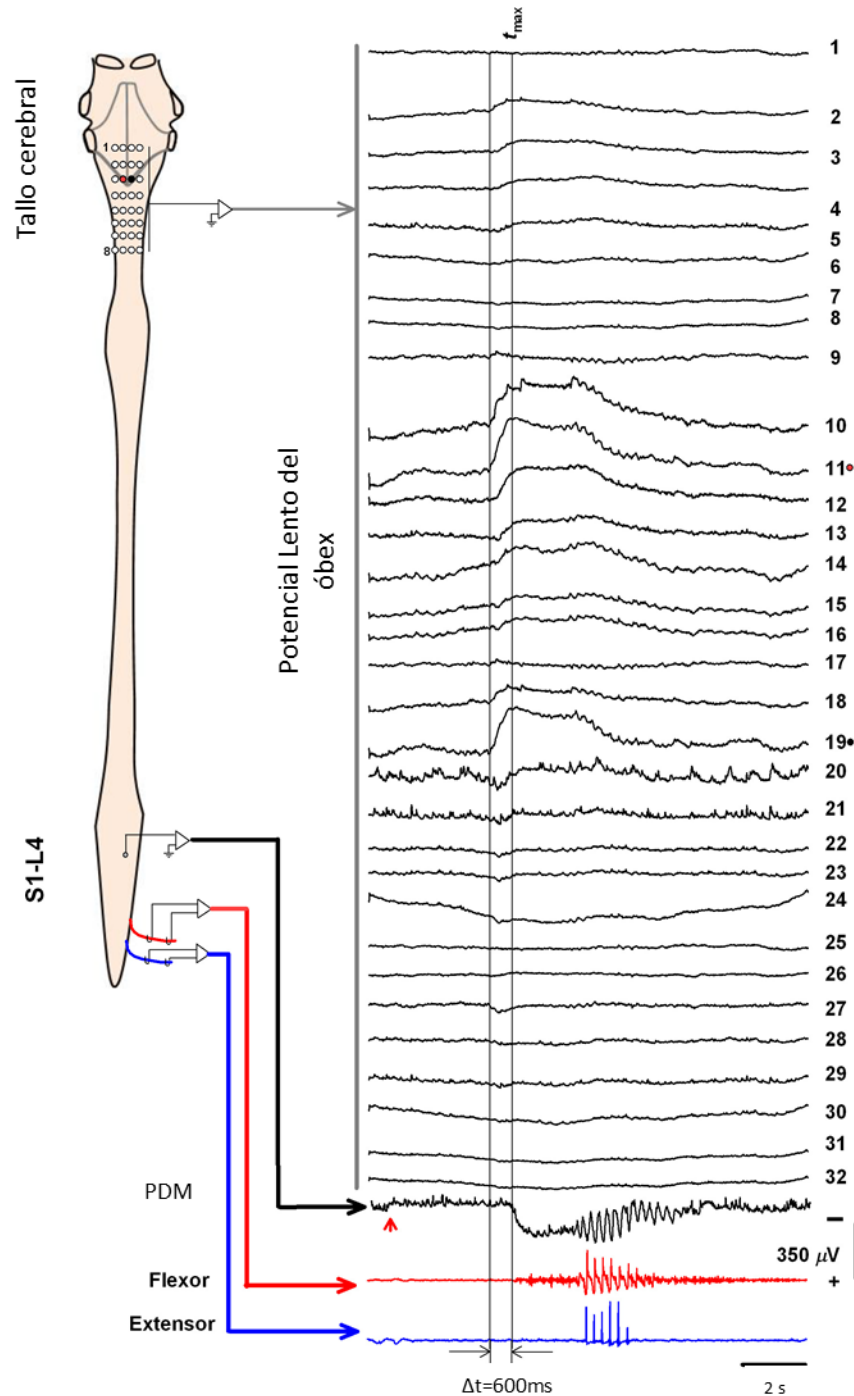


Figura 1.7.1 *Potencial Lento del Óbex (PLO)*. Del lado izquierdo un esquema del tallo cerebral y la médula espinal donde se marca la región de registro tanto en el tallo cerebral como en la médula espinal. Del lado derecho se encuentra el registro de los 32 electrodos colocados en el tallo cerebral mostrando con un punto rojo y uno negro la actividad de los electrodos 11 y 19. Por debajo de los 32 registros se encuentra el registro del PDM. Finalmente en rojo y azul el registro electroneurográfico de los nervios flexor y extensor respectivamente. Modificado de [28].

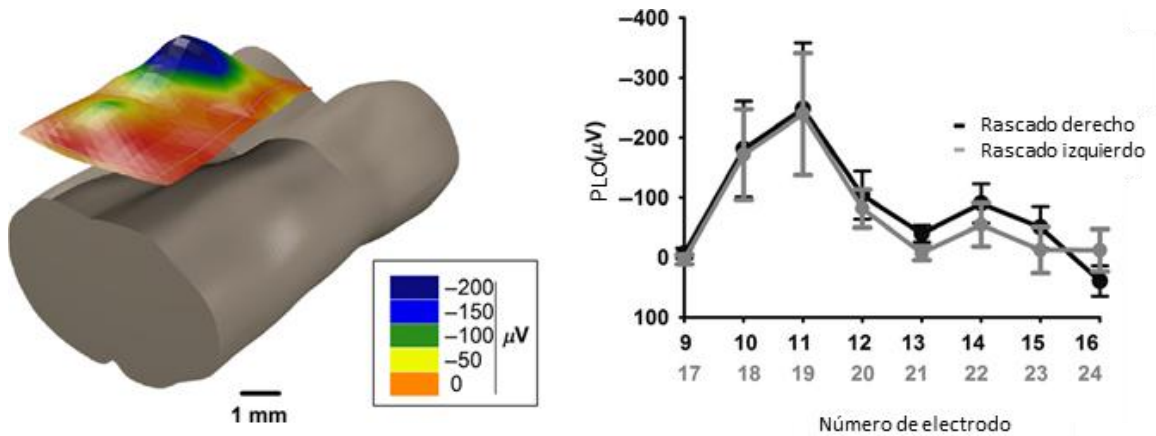


Figura 1.7.2 Distribución del PLO. Del lado izquierdo una reconstrucción 3D de un segmento del tallo cerebral en gris, sobre éste una representación 3D del voltaje registrado por cada electrodo en el tiempo t_{max} . Del lado derecho la distribución longitudinal de la amplitud promedio de los registros del PLO donde la línea negra corresponde al rascado derecho y la línea gris al rascado de lado izquierdo. Modificado de [28].

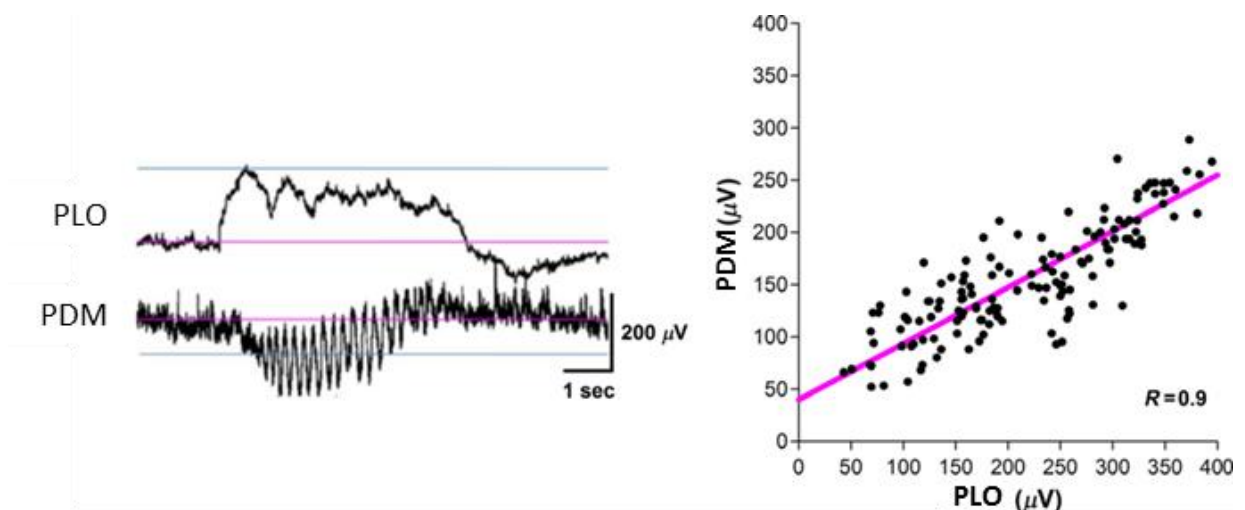


Figura 1.7.3 Relación del PLO con el PDM. Del lado izquierdo se muestra el registro simultáneo del PLO y PDM en el cual se puede observar que el PLO inicia antes que el PDM. La línea azul superior indica la máxima amplitud del PLO y la línea azul inferior el promedio de la actividad del PDM. Del lado derecho se muestra una gráfica PLO versus PDM donde cada punto representa los valores que se indicaron anteriormente para 156 episodios de rascado ficticio. La línea magenta representa el rango del coeficiente de correlación de Spearman. Modificado de [28].

Éste hecho los llevó a considerar que posiblemente la actividad de algunos grupos neuronales de la FR participa en la activación del Generador Central de Patrones del rascado pues la actividad de las neuronas que registraron también corresponde con el PLO y el rascado ficticio.

La actividad neuronal que fue hallada con registros del tipo extracelular unitario y que fue relacionada con el PLO y el rascado ficticio se describe en la siguiente sección.

1.7 Neuronas ON-OFF y OFF-ON de la región del Óbex

Otro de los hallazgos obtenidos por Tapia y colaboradores [28] fue el registro extracelular unitario de neuronas que clasificaron de acuerdo a su actividad, asociada al inicio del PLO y al rascado ficticio, en tres grupos: neuronas ON-OFF, neuronas OFF-ON y neuronas tónicas.

Las neuronas tipo ON-OFF (Figura 1.5.1) exhiben un patrón de disparo con frecuencia de 27 ± 14 Hz se inactivan con el inicio del episodio de rascado ficticio y vuelven a su actividad al terminar el episodio. A diferencia de las neuronas tipo OFF-ON (Figura 1.5.2) que se mantienen silentes hasta activarse junto con el inicio del PLO. Las neuronas tipo OFF-ON exhiben actividad con una frecuencia de 80 ± 56 Hz.

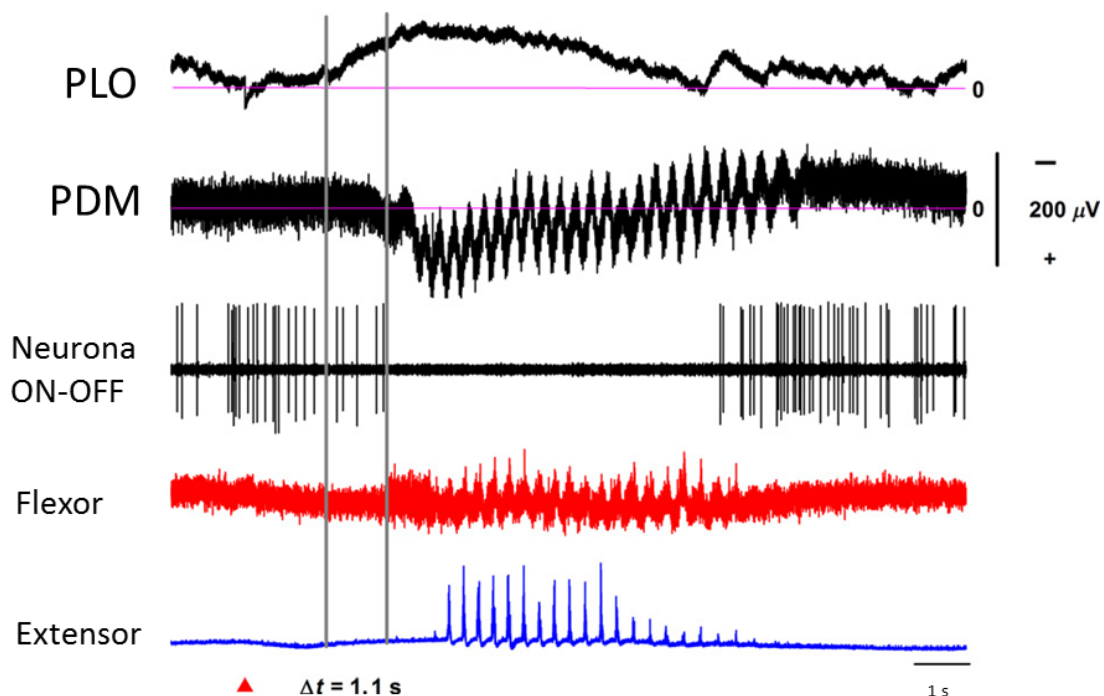


Figura 1.5.1 Registro de una neurona ON-OFF en la vecindad del Óbex. PLO: Registro del Potencial Lento del Óbex. PDM: Registro del Potencial del Dorso de la Médula espinal en el nivel L6. Registro de una neurona ON-OFF. En rojo y azul el registro electroneurográfico de los nervios que inervan al músculo flexor gastrocnemios (lateral o medial) y el extensor tibial anterior. Modificado de [28].

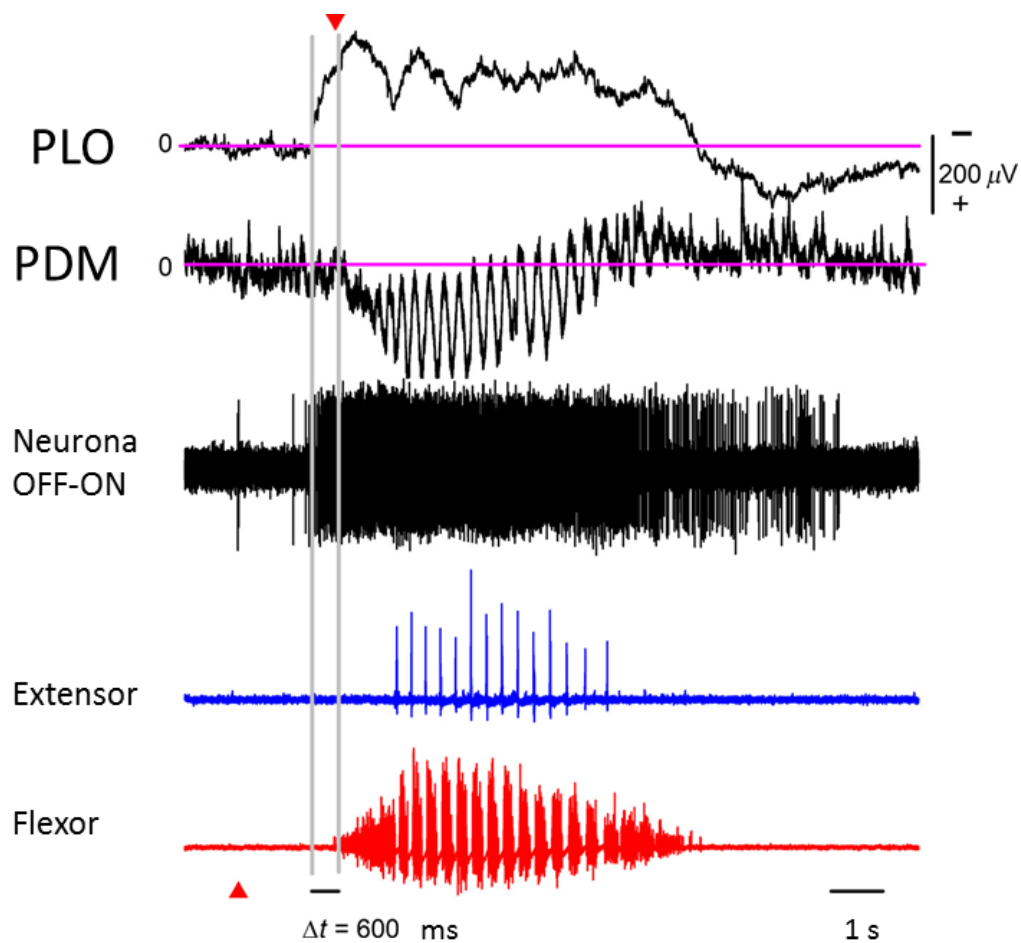


Figura 1.5.2 Registro de una neurona OFF-ON en la vecindad del Óbex. PLO: Registro del Potencial Lento del Óbex. PDM: Registro del Potencial del Dorso de la Médula espinal a nivel L6. Registro de una neurona OFF-ON. En rojo y azul el registro electroneurográfico de los nervios que inervan al músculo flexor gastrocnemios (lateral o medial) y el extensor tibial anterior. Modificado de [28].

Las neuronas tónicas no presentan algún comportamiento asociado al rascado ficticio o al PLO pues mantienen actividad similar antes, durante y después del rascado.

La distribución de las neuronas ON-OFF y OFF-ON registradas por Tapia y colaboradores [28] (Figura 1.5.3) indica que ambos tipos de neuronas se encuentran al nivel del óbex a una profundidad de 2222-4118 μm sin obviar una distribución en núcleos específicos.

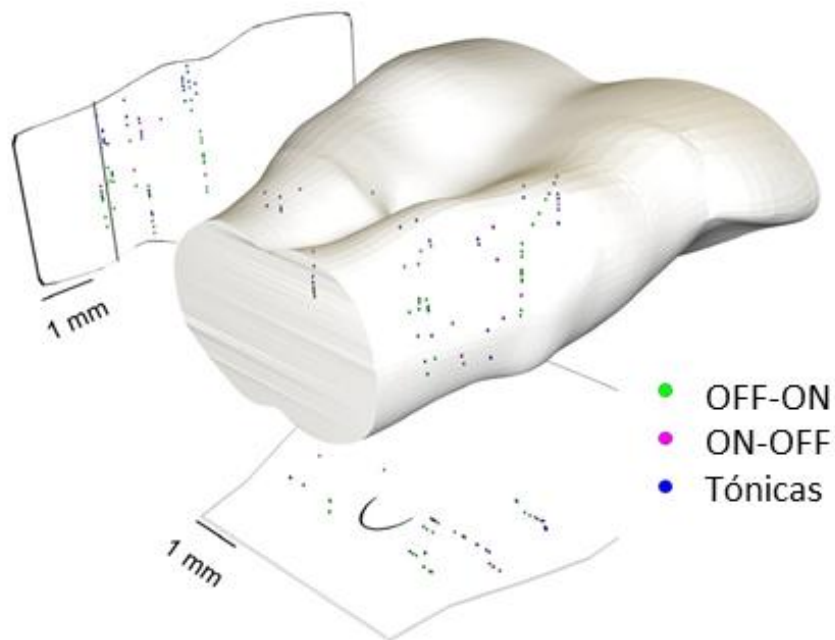


Figura 1.5.3 *Distribución de las neuronas ON-OFF, OFF-ON y Tónicas.* Reconstrucción histológica de la distribución de las neuronas registradas [28]. La línea vertical en la proyección izquierda indica la ubicación del Óbex. Modificado de [28].

A pesar de no estar distribuidas en núcleos específicos, las neuronas ON-OFF y OFF-ON muestran comportamientos que podrían estar relacionados de algún modo. Sin embargo, en el trabajo de Tapia y colaboradores [28] las neuronas fueron registradas de manera individual.

2. Planteamiento del problema

En estudios realizados en el Laboratorio de Neurofisiología Integrativa se encontraron neuronas tipo ON-OFF y OFF-ON que con el inicio del Potencial Lento del Óbex se inactivan o activan, respectivamente. Estos grupos neuronales tienen frecuencias distintas cuando están activas. Las ON-OFF tienen frecuencia de 24Hz (banda beta) y las OFF-ON de 60Hz (banda gamma). Estos hallazgos sugieren que las neuronas ON-OFF y OFF-ON tienen propiedades intrínsecas distintas siendo probablemente dos grupos neuronales diferentes. Sin embargo, estos grupos neuronales no se registraron simultáneamente y aún no se conoce si tienen alguna conectividad entre sí. Es por ello que en la presente tesis obtendremos registros simultáneos de pares de neuronas ON-OFF y OFF-ON para determinar si están o no interconectados de manera sináptica.

3. Hipótesis

Las neuronas ON-OFF con ON-OFF, OFF-ON con OFF-ON y ON-OFF con OFF-ON se interconectan sinápticamente (tienen covarianza cruzada significativa).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar la covarianza cruzada y la frecuencia instantánea de la descarga eléctrica unitaria de neuronas ON-OFF y OFF-ON asociadas a un episodio de rascado ficticio en gato.

4.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la covarianza cruzada antes, durante y después de un episodio de rascado ficticio entre las descargas eléctricas unitarias de neuronas ON-OFF con ON-OFF, OFF-ON con OFF-ON y ON-OFF con OFF-ON.
2. Caracterizar los cambios en frecuencia instantánea de neuronas ON-OFF y OFF-ON antes durante y después de un episodio de rascado ficticio. Con la finalidad de conocer de manera cualitativa si dichas neuronas presentan actividad rítmica en alguno de estos momentos.
3. Demostrar de manera cuantitativa si las neuronas OFF-ON presentan actividad rítmica asociada a la actividad electroneurográfica de nervios flexores y extensores durante un episodio de rascado ficticio.
4. Realizar un modelo matemático y simulación de la actividad eléctrica unitaria de neuronas ON-OFF y OFF-ON basado en los resultados experimentales.

5. Metodología

5.1 Preparación del modelo y montaje experimental

Para el protocolo experimental, el cual se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Integrativa, se usaron gatos de (2.5-4.0) Kg sin distinción de sexo proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La obtención de los sujetos experimentales así como todos los procedimientos que se describen a continuación cumplen con los lineamientos de la NOM 062-ZOO-1999.

A cada sujeto se le indujo anestesia por medio de una mezcla gaseosa de oxígeno e isoflurano (2%) dentro de una caja de inducción durante 15 a 20 minutos, después se les colocó una mascarilla por la cual se siguió administrando la anestesia durante el proceso quirúrgico que se describe a continuación.

El primer procedimiento es una traqueotomía seguida de la colocación de una cánula T para mantener la inducción de la anestesia y retirar la mascarilla.

Posteriormente se disecciona la arteria carótida y se introduce un catéter el cual tiene dos extensiones: una que se conecta a un transductor de presión y otra que se conecta a una bomba de perfusión (Mini-PUMP 7892 K05, Thomas Scientific) mediante la cual se administra una solución amortiguadora de pH (glucosa 5% y NaCOH_3 0.84%) a 5ml/hr.

Después se disecciona la vena radial de alguna extremidad anterior para tener una vía de administración de fármacos y fluidos. En éste momento se administra Atropina (0.5ml a 10mg/ml), Dexametasona (1ml a 4mg/ml) y Bromuro de pancuronio (2ml a 0.4mg/ml cada hora).

Seguidamente se disecan los nervios que inervan a los músculos gastrocnemios medial, gastrocnemios lateral y tibial anterior de una extremidad posterior para el registro de la actividad flexora y extensora respectivamente.

Se continúa con una laminectomía en el segmento espinal cervical 1 (C1) y se coloca al sujeto en un aparato esterreotáxico (Narishige SN-2N) sobre el que se realiza la craneotomía e inmediatamente se realiza la descerebración precolicularpostmamar (Figura 5.1) El espacio que se desocupa tras la descerebración se llena con una solución Agar-Agar en solución salina a 37°C al momento de la aplicación.

Finalmente se realiza la cerebelotomía para exponer la fosa romboidea y localizar el Óbex que se usa como referencia anatómica.

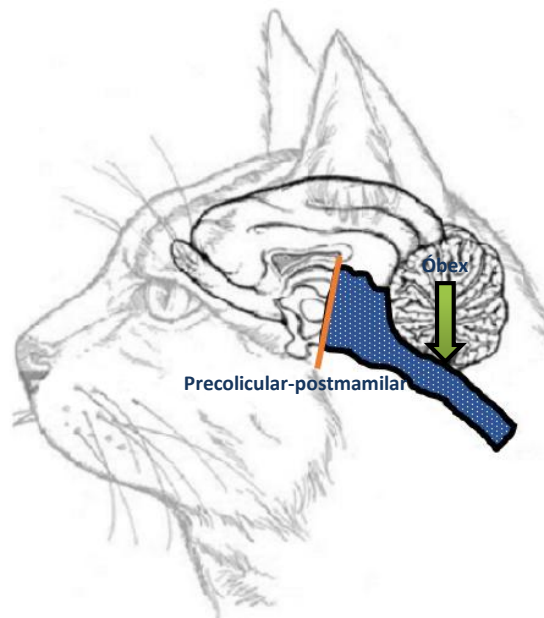


Figura 5.1.1 Descerebración y cerebelotomía. La línea naranja indica el corte de la descerebración precolicular-postmamar. Después de la cerebelotomía sólo se mantiene la región azul donde está ubicado el Óbex (flecha verde) y la zona de registro.

Una vez terminada esta secuencia se suspende la anestesia gaseosa y se conecta al sujeto a un respirador artificial (Ugo Basile). Se espera un tiempo aproximado de media hora para que la presión y temperatura se estabilicen antes de iniciar con los registros.

Cuando el sujeto se ha estabilizado se coloca una torunda de algodón impregnada con una solución de D-Tubocurarina al 0.1% en el segmento espinal C1, con la intención de facilitar la inducción de rascado ficticio cuando se estimule de manera táctil el campo receptivo (cara interna de la pinna del gato) ipsilateral a la extremidad anterior de la cual se han diseccionado los nervios mencionados anteriormente.

En ese momento se procede a obtener los datos del experimento.

5.2 Obtención de datos

Para llevar a cabo el registro extracelular unitario se coloca un equipo de 5 electrodos de cuarzo-platino-tungsteno (Thomas Recording Minimatrix microelectrodes manipulation system, TRec[®]) de manera longitudinal respecto al Óbex e ipsilateral a la extremidad de la

cual se registrarán los nervios. Éste sistema permite la manipulación de los electrodos de manera individual lo cual permite que cada uno pueda tener distinta profundidad en la zona de registro. La profundidad de registro estuvo en el rango de (2000-4000) μm . Los registros se obtuvieron de forma aleatoria.

El registro de la actividad eléctrica de superficie (Potencial lento del Óbex, PLO) se obtiene colocando un electrodo de superficie justo en el Óbex. Finalmente, para obtener el registro electroneurográfico de los nervios se utiliza un par de electrodos bipolares de Ag-Cl (Figura 5.2).

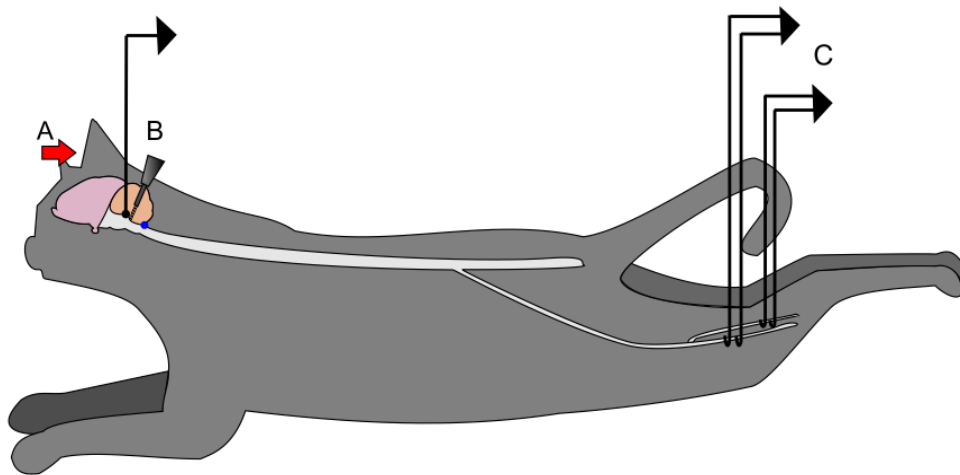


Figura 5.2.1 Montaje experimental. El esquema representa los elementos fundamentales del montaje experimental. A) Se indica la zona de estimulación táctil. En B se observa la colocación de los electrodos (Minimatrix TRec) y del electrodo de superficie. En C la ubicación de los electrodos bipolares. La zona rosa y la naranja corresponden a la descerebración y cerebelotomía realizados previamente al registro. El punto azul corresponde a la zona de aplicación de la D-Tubocurarina.

La toma de datos se obtuvo con una frecuencia de 50KHz, 100KHz y 250KHz. La impedancia de los electrodos fue de 5 a 7 M Ω . Se usó un filtro *pasabajas* (0.5 a 20 KHz).

5.3 Análisis de datos

Obtenidos los registros se realizaron los tipos de análisis descritos a continuación, los análisis por pares se realizaron para todas las combinaciones sin repetición posibles en cada episodio de rascado ficticio.

5.3.1 Spike sorting usando Wave Clus

Mediante el uso del programa Wave Clus se obtuvieron los rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal. Esta herramienta permitió que la

actividad de cada neurona pudiera ser considerada por separado en cada uno de los análisis posteriores.

En general, Wave Clus examina cada espiga que cumpla con parámetros establecidos previamente (umbral y amplitud máxima) mediante el uso de *wavelets* y después los clasifica en *clusters* que almacenan el momento en que ocurrió cada espiga (Figura 5.3.1.1).

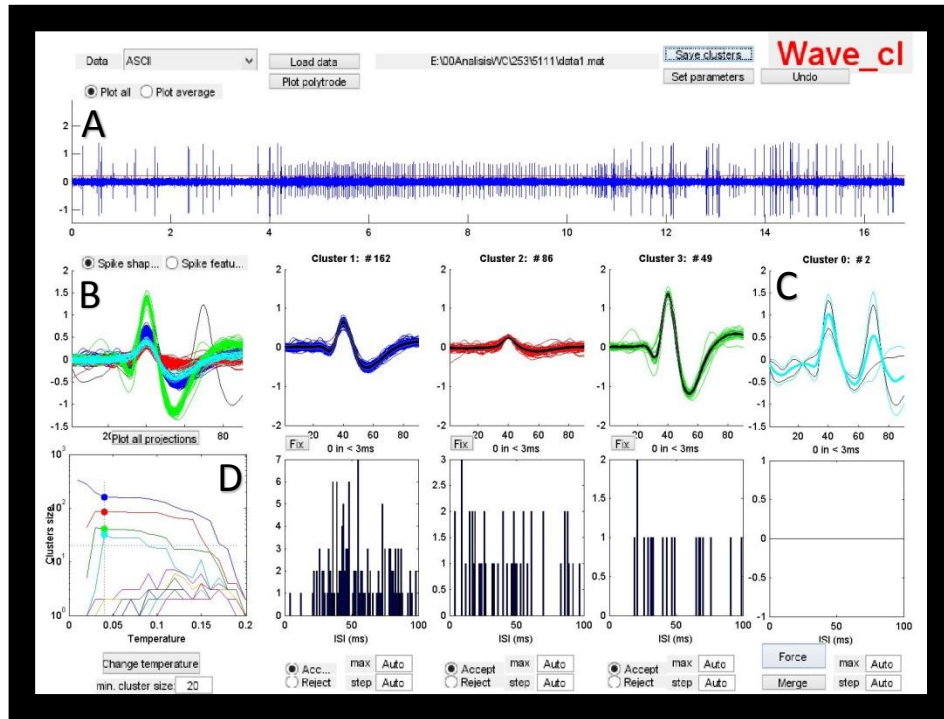


Figura 5.3.1.1 Interfaz de Wave Clus. En A se observa el registro original, la línea roja es el umbral elegido. En B se muestran todas las espigas encontradas y de acuerdo con el color que tienen es el *cluster* al que pertenecen. En C se encuentran las espigas que no fueron incluidas en ningún *cluster*. En D se grafica el parámetro 'temperatura' y puede ser modificado directamente desde esa ventana.

Antes de guardar la información obtenida en el programa se puede modificar un tercer parámetro con el cual es posible incluir o separar espigas que han sido ubicadas en diferentes *clusters* y son de la misma neurona o que están en el mismo *cluster* y son de dos neuronas distintas, a éste parámetro los autores le llaman 'temperatura' (Para más información ver Apéndice I).

Al tener separados los rastros de actividad de cada neurona fueron graficados junto con la actividad electroencefalográfica de los nervios flexor y extensor para determinar si

presentaban un comportamiento tipo ON-OFF u OFF-ON, las de actividad tónica fueron descartadas.

El criterio para decidir si podían ser consideradas ON-OFF fue el siguiente: Se realizó un conteo de las espigas presentes antes y después del rascado tomando el promedio como el 100% de disparos de interés, luego se contaron las espigas que ocurrieron durante el rascado y si la cantidad de estas era menor o igual al 2% del promedio anterior entonces se podían considerar ON-OFF.

Para determinar si una neurona se podía considerar OFF-ON se tomó el conteo de espigas durante el rascado y se consideró como el 100% de las espigas de interés, después se contaron las espigas presentes antes y después del rascado y si cada cantidad era menor o igual al 2% de las espigas de interés esa neurona podía ser considerada OFF-ON.

5.3.2 Histogramas de coincidencia y Correlación Cruzada

Al tener la actividad de cada neurona por separado se realizaron histogramas de coincidencia. Estos consisten en tomar los rastros de actividad de cada par de neuronas y restarlos entre sí, es decir, si los rastros de actividad de la primera neurona son r_i y los de la segunda neurona son r_j entonces se realizan todas las restas $r_i - r_j$. El conjunto de restas obtenidas se grafica en un histograma cuyo ancho de barra (tamaño del *bin*) es de 1ms (Figura 5.3.2.1) finalmente se busca la barra con mayor conteo y el valor del *bincenter* correspondiente.

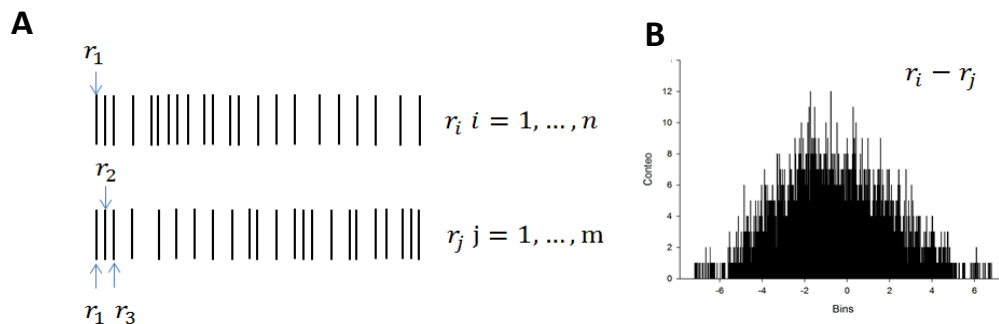


Figura 5.3.2.1 *Histograma de Coincidencia.* A: Representa los rastros de actividad de un par de neuronas; r_i representa los rastros de actividad de la primera neurona y r_j los de la segunda neurona. Donde n y m son el número total de rastros de actividad correspondiente a cada neurona. Para obtener el histograma de coincidencia se resta cada elemento de r_i con cada elemento de r_j . B: Ejemplo de histograma de coincidencia, el ancho de cada barra (*bin*) corresponde a 1ms.

Con éste proceso se obtuvo una visión general de la distribución de las diferencias disparo a disparo entre cada par de neuronas.

Un proceso alternativo a éste fue el cálculo de la Correlación Cruzada entre cada par de neuronas. Para calcular la Correlación Cruzada se implementó la función *xcorr* de Matlab y se normalizó con el comando *coeff* y el algoritmo correspondiente es el descrito en la siguiente ecuación:

$$\hat{R}_{xy}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-m-1} x_{n+m}y_n^* & m \geq 0 \\ \hat{R}_{yx}^*(-m) & m < 0 \end{cases}$$

Donde $\hat{R}_{xy}(m)$ es el valor de la Correlación Cruzada entre x_n y y_n . N es el tamaño de las series y el símbolo * denota complejo conjugado. El índice m toma valores de -1 a $2N - 1$.

Para la normalización por medio de *coeff* se toma la autocorrelación igual a 1 en el *lag* cero.

De cada Correlación Cruzada (Figura 5.3.2.2) obtuvimos el valor de máxima correlación y el lag correspondiente.

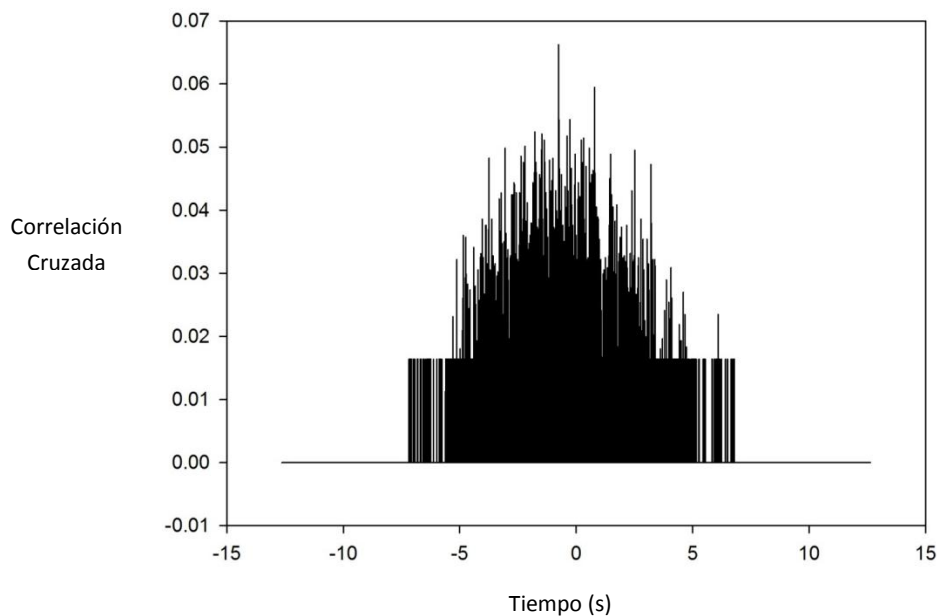


Figura 5.3.2.2 Correlación Cruzada. Se muestra la correlación Cruzada de un par de neuronas OFF-ON durante el rascado.

Éste análisis con histogramas de coincidencia y Correlación Cruzada se realizó para obtener una visión general de la posible conectividad entre las neuronas, por lo cual sobre estos análisis no se realizó ninguna prueba estadística.

5.3.3 Covarianza Cruzada

La Covarianza Cruzada se calculó por medio de la implementación del programa para Matlab desarrollado por el Dr. André F. Kohn. Este programa requiere de las dos señales a las cuales les aplica la función *detrend* de Matlab y un modelo Auto-Regresivo de orden p (AR (p)) devolviendo la Covarianza Cruzada de las señales ya *blanqueadas* (ver Apéndice II) y los valores inferior y superior del intervalo de confianza (95%) además del valor máximo (o mínimo de ser el caso) de la Covarianza Cruzada y el *lag* correspondiente (Figura 5.3.3.1).

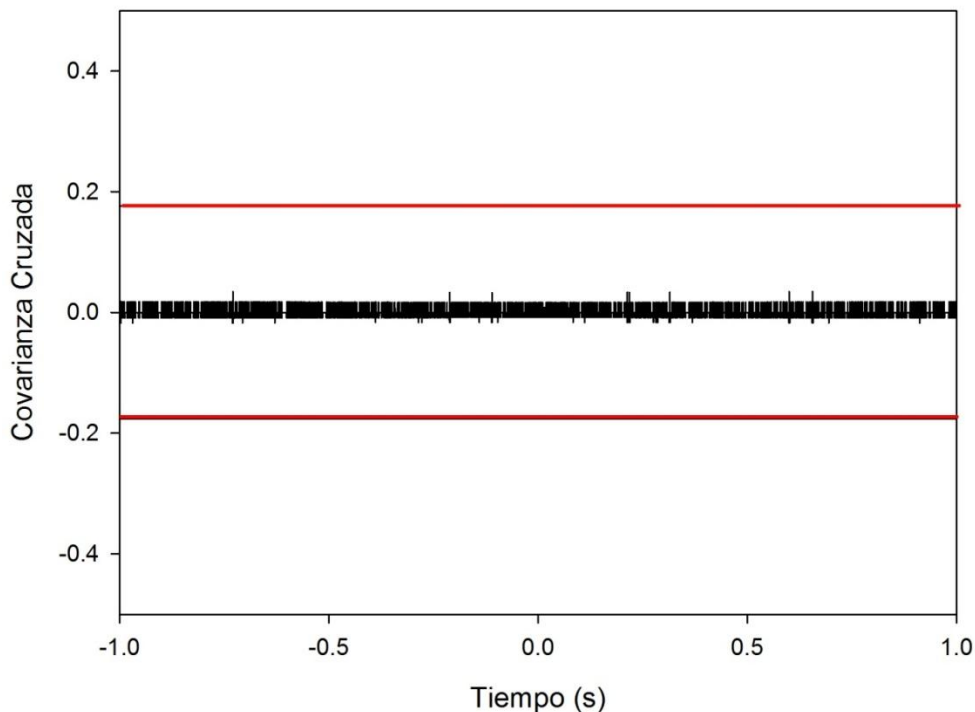


Figura 5.3.3.1 *Covarianza Cruzada*. En negro se muestra la Covarianza Cruzada de un par de neuronas OFF-ON durante el rascado. Las líneas rojas representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza. Note que se ha graficado de -1 a 1 segundos pues no se espera un *lag* mayor o menor.

La Covarianza Cruzada es calculada por la función $xcov$ que sigue el algoritmo descrito por:

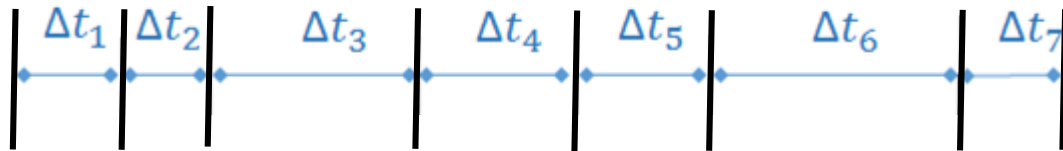
$$c_{xy}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-m-1} \left(x_{n+m} - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} x_i \right) \left(y_n^* - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} y_i^* \right) & m \geq 0, \\ c_{yx}^*(-m) & m < 0 \end{cases}$$

Donde $c_{xy}(m)$ es el valor de la Covarianza Cruzada entre x_n y y_n . N es el tamaño de las series y el símbolo * denota complejo conjugado. El índice m toma valores de 1 a $2N - 1$.

Con éste análisis pudimos determinar si cada Covarianza Cruzada era o no significativa, de modo que los datos obtenidos con éste método son los reportados en los resultados.

5.3.4 Frecuencia instantánea

Para el estudio de la frecuencia instantánea se tomaron los rastros de actividad de neuronas ON-OFF y OFF-ON calculamos el inverso de cada diferencia de tiempo entre cada par de rastros de actividad neurona por neurona (ver Figura 5.3.4.1), es decir, calculamos $\Delta t_i = r_{n+1} - r_n$ donde r_n son los rastros de actividad de cada neurona y $n = N - 1$, siendo N el número de rastros de actividad de cada neurona.



$$f_i = \frac{1}{\Delta t_i}$$

Figura 5.3.4.1 Frecuencia instantánea. Teniendo los rastros de actividad de cada neurona se calcularon todas las frecuencias instantáneas, restando el valor del rastro de actividad $\Delta t_i = r_{n+1} - r_n$ con $n = N - 1$.

Dado que este análisis fue cualitativo se realizó la estadística de Rayleigh para poder concluir cuantitativamente si la actividad de cada neurona correspondía a alguna fase del rascado o no. Dicho proceso se describe a continuación.

5.3.5 Prueba estadística de Rayleigh y Gráficas Polares

Para estudiar si la actividad de las neuronas corresponde a alguna fase del rascado se realizó una distribución de la actividad en una gráfica polar. La circunferencia, dependiendo del promedio de cada fase durante todo el episodio de rascado con el que está involucrado cada neurona, se divide en tres partes: Fase flexora, fase extensora y fase intermedia. La actividad de la neurona se distribuye en un histograma centrado en la circunferencia y cuyos anchos de barra sumados corresponden a los 360° de la circunferencia (ver Apéndice III) de manera que la actividad de las neuronas quedará distribuida en los 360° de la circunferencia (ver Figura 5.3.5.1) después con la información del histograma se obtiene un vector promedio cuyo ángulo indicará la fase a la cual se asocia la actividad de la neurona en caso de que sea significativo.

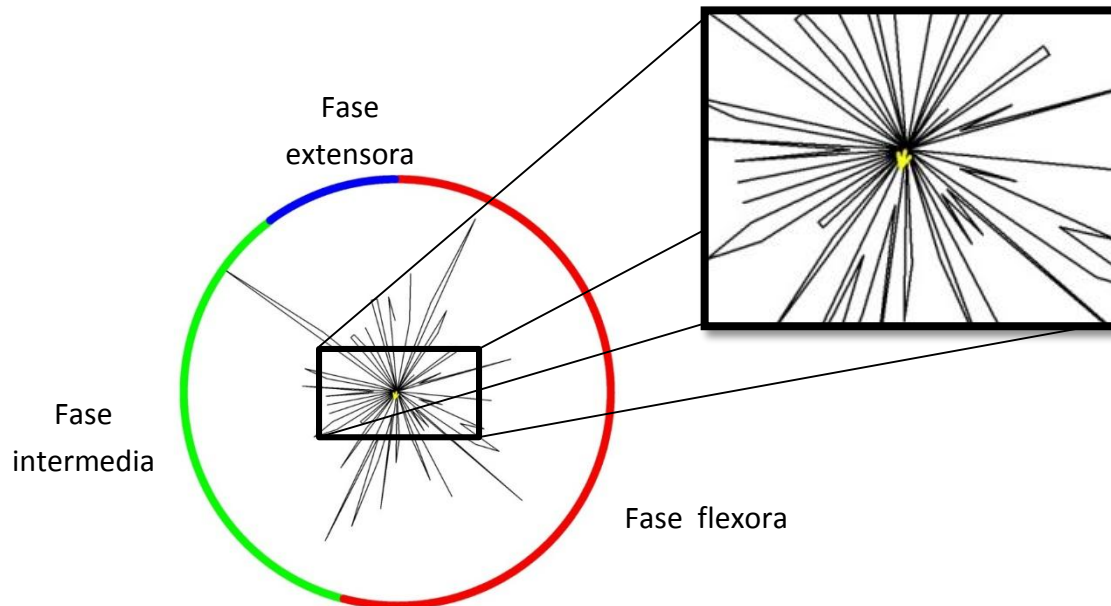


Figura 5.3.5.1 Gráfica Polar de un evento de rascado y la actividad de una neurona OFF-ON. En azul la fase extensora, en rojo la fase flexora, y en verde la fase intermedia. La flecha amarilla es el vector resultante. En éste caso la prueba estadística de Rayleigh no es significativa como puede verse en el acercamiento la magnitud del vector no es suficiente para ser significativa.

La prueba estadística de Rayleigh se realiza sobre el vector resultante mencionado anteriormente.

5.3.6 Ecuaciones Morris-Lecar y método de Runge Kutta de cuarto orden

Para realizar el modelo computacional del circuito de neuronas implementaremos ecuaciones diferenciales tipo Morris-Lecar. Como método de solución usaremos Runge-Kutta de cuarto orden implementado en Matlab (Ver Apéndice IV).

Con la implementación de los métodos descritos anteriormente se obtuvieron los siguientes resultados.

6. Resultados

De acuerdo con nuestro objetivo general y nuestros objetivos particulares obtuvimos los siguientes resultados.¹

En un total de 9 experimentos obtuvimos 146 neuronas ON-OFF (Figura 6.1) y 170 neuronas OFF-ON (Figura 6.2) con las cuales formamos 239 pares ON-OFF, 295 pares OFF-ON y 264 pares mixtos. Se calculó la Covarianza Cruzada antes, durante y después del episodio de rascado para los pares tipo ON-OFF y OFF-ON. Para los pares mixtos se consideraron dos momentos de análisis distintos: durante la fase tónica y durante todo el tiempo (antes, durante y después del rascado en el mismo análisis).

Cada vez que se calculó Covarianza Cruzada entre pares de neuronas también se calculó un intervalo de confianza de 95% de confiabilidad y se obtuvo el punto de máxima CVC y el *lag* correspondiente.

En el caso de los 239 pares de neuronas ON-OFF no obtuvimos valores significativos en ninguno de los tres momentos analizados. No todos los pares tuvieron valores de máxima CVC debido a que en esos casos una o ambas neuronas no presentaban actividad en ese momento de análisis.

De manera gráfica y sólo con fines ilustrativos presentamos la CVC de 5 pares ON-OFF en los tres momentos de análisis (Figura 6.3) junto con los correspondientes intervalos de confianza.

Para el caso de los 295 pares de neuronas OFF-ON tampoco obtuvimos valores máximos de CVC que superaran los límites del intervalo de confianza. Algunos pares no tuvieron valores de CVC antes y después del rascado. Esto se debe a que en esos momentos de análisis una o ambas neuronas no presentaban actividad.

De manera gráfica y sólo con fines ilustrativos presentamos la CVC de 5 pares OFF-ON en los tres momentos de análisis (Figura 6.4) junto con los correspondientes intervalos de confianza.

En el caso de los 264 pares mixtos, analizamos la actividad durante la fase tónica y en todo el tiempo de registro, es decir, antes durante y después del rascado. Esto por el hecho de

¹ En ésta sección las Figuras y Tablas serán presentadas al final para la fluidez de la lectura y accesibilidad al contenido.

que mientras una de las neuronas está activa la otra está inactiva, pero en algunos casos ambas están activas durante la fase tónica. El análisis de tiempo completo se realizó esperando encontrar alguna relación aunque no estuviera asociada a un momento específico del rascado. Aun así no todos los pares tuvieron valores en el análisis durante la fase tónica. Esto es porque una o ambas neuronas no presentaban actividad en ese momento.

De manera gráfica y sólo con fines ilustrativos presentamos la CVC de un par mixto en los dos momentos de análisis (Figura 6.5) junto con los correspondientes intervalos de confianza.

El caso de los 264 pares mixtos no fue la excepción pues tampoco se obtuvo una Covarianza Cruzada significativa en ninguno de los momentos analizados (durante la fase tónica y durante todo el registro).

De modo que en ningún caso el *lag* correspondiente al valor máximo de la Covarianza Cruzada pudo ser relacionado con algún tiempo de desfase entre la actividad de una de las neuronas con la otra de cada par.

Con respecto al objetivo particular 2 obtuvimos la frecuencia instantánea de cada neurona y se graficó en histogramas de coincidencia separando los tres momentos de análisis. Para las neuronas tipo ON-OFF se muestra la actividad representativa de 10 pares (Figura 6.6).

Podemos observar que la frecuencia es mayor antes y después del rascado (histograma en la Figura 6.6), pero no podemos indicar algún patrón rítmico que corresponda a alguna fase del rascado.

Para las neuronas tipo OFF-ON se muestra la actividad representativa de 10 pares (Figura 6.7)

Podemos observar que la frecuencia es durante el rascado (histograma en la Figura 6.7), pero no podemos indicar algún patrón rítmico que corresponda a alguna fase del rascado

De manera cualitativa se puede observar que las neuronas no exhiben patrones rítmicos correspondientes a alguna fase del rascado.

Por lo que en el objetivo 3 nos planteamos la demostración cuantitativa de éste hecho por medio de la estadística de Rayleigh, además de la representación en gráficas polares (Figura 6.8) de la actividad de las neuronas OFF-ON puesto que las neuronas tipo ON-OFF presentan actividad escasa o nula durante el rascado.

Como resultado no obtuvimos alguna neurona que tuviera actividad correspondiente a alguna fase específica del rascado (en todos los casos $p > 0.5$), cabe mencionar que éste análisis se realizó en 170 neuronas OFF-ON puesto que son las que tienen actividad durante el episodio de rascado.

En cuanto al modelo matemático se propuso un circuito de conectividad en el que se considera la actividad de un elemento común que activa a distintos grupos de interneuronas que se encargan de inhibir a las neuronas ON-OFF y excitar a las neuronas OFF-ON durante el rascado (Figura 6.9).

Para simular cada neurona del circuito se utilizó un modelo tipo Morris-Lecar cuyas ecuaciones diferenciales se resolvieron mediante el método de Runge Kutta de cuarto orden implementado en Matlab con el cual se realizaron 20 simulaciones.

En la Figura 9.10 se muestra una de las simulaciones realizadas.

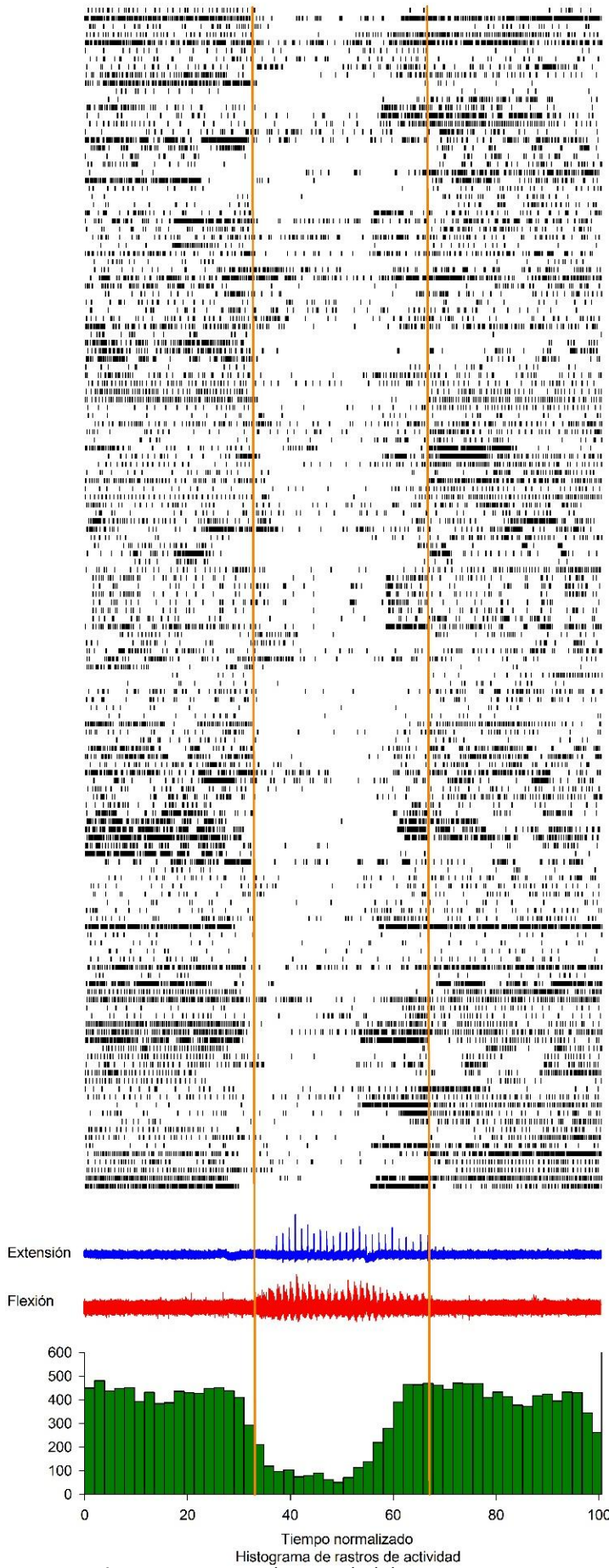
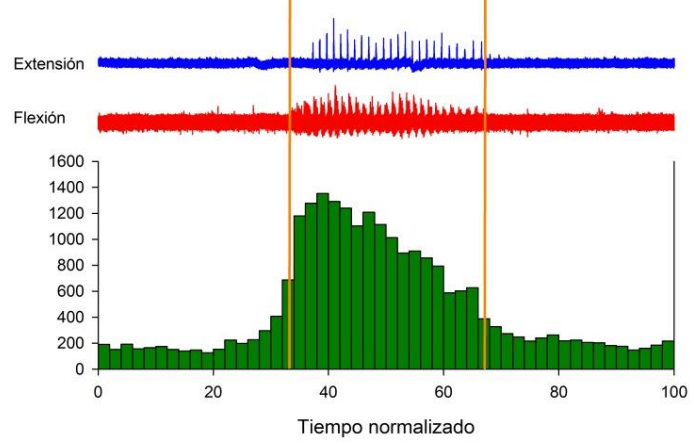
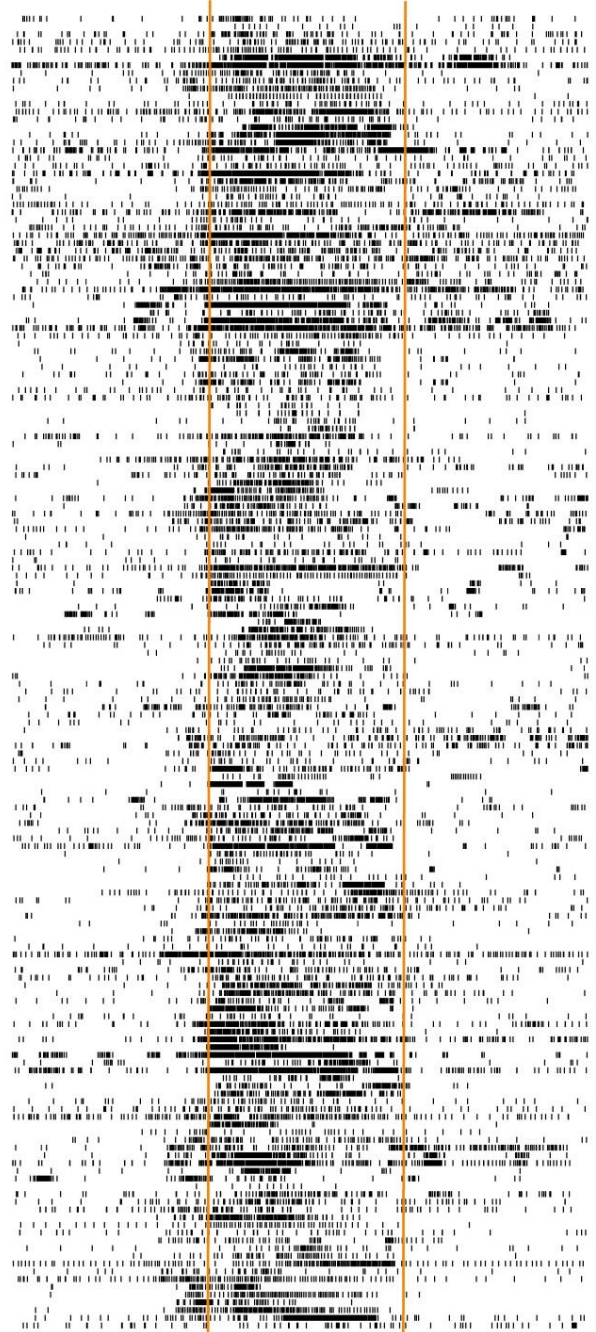


Figura 6.1 Rastros de actividad de neuronas ON-OFF.



Histograma de rastros de actividad
Figura 6.2 Rastros de actividad de neuronas OFF-ON.

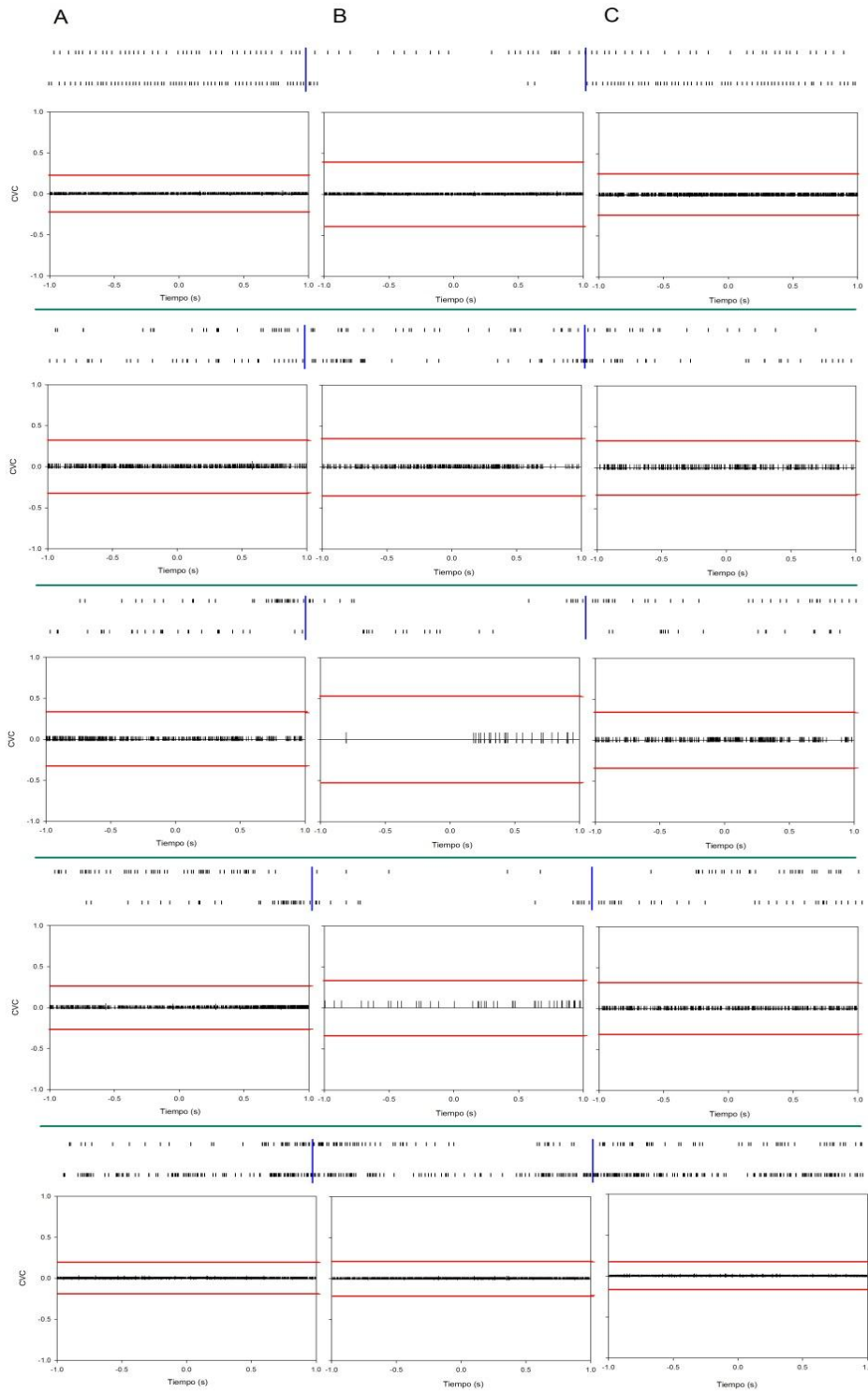


Figura 6.3 Gráficas de CVC para pares de neuronas ON-OFF. El panel A corresponde al momento de análisis de antes del rascado, el panel B la CVC durante el rascado y el panel C después del rascado. Las líneas rojas corresponden al intervalo de confianza y las azules al inicio y fin del rascado.

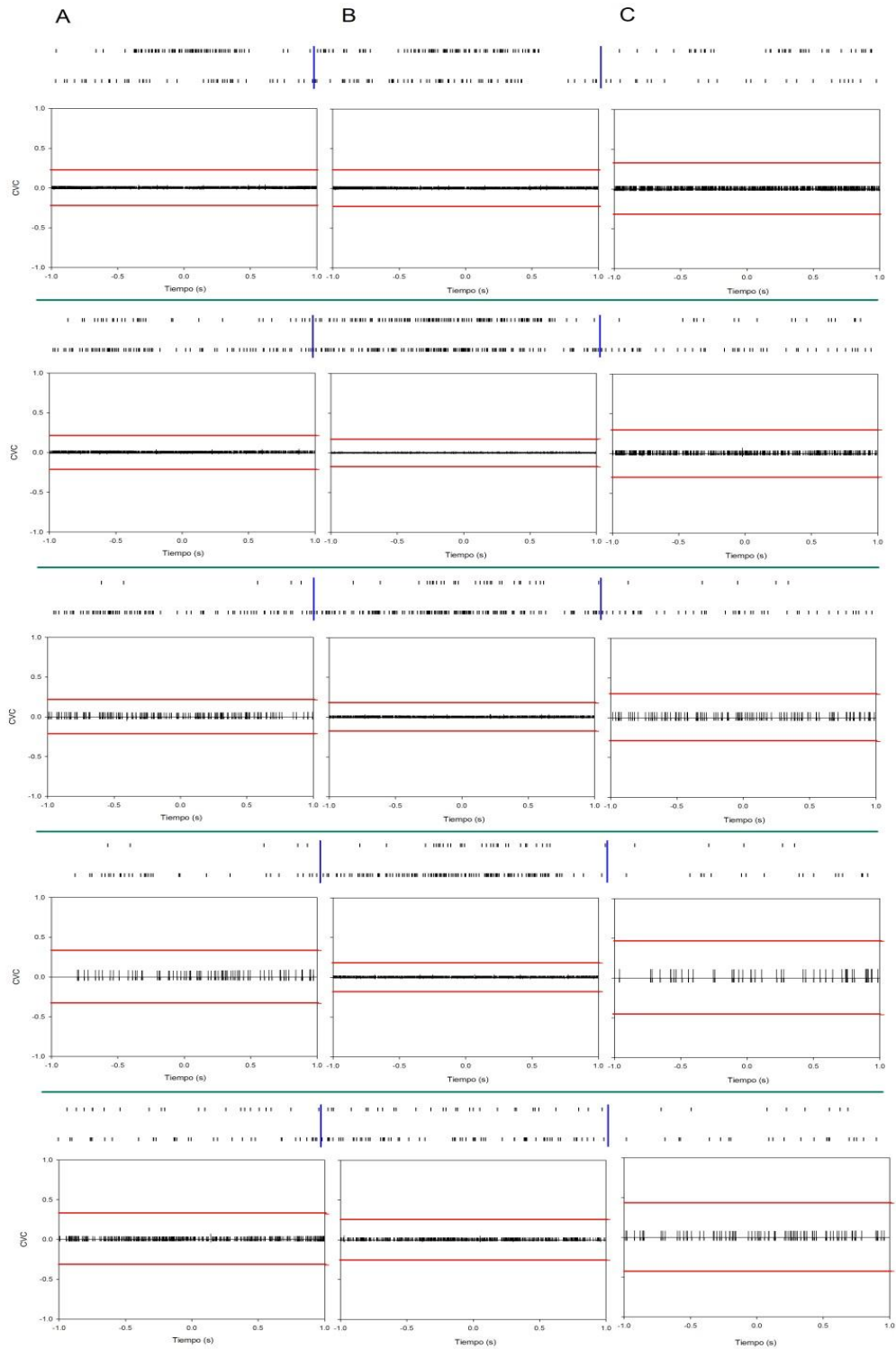


Figura 6.4 Gráficas de CVC para pares de neuronas OFF-ON. El panel A corresponde al momento de análisis de antes del rascado, el panel B la CVC durante el rascado y el panel C después del rascado. Las líneas rojas corresponden al intervalo de confianza y las azules al inicio y fin del rascado.

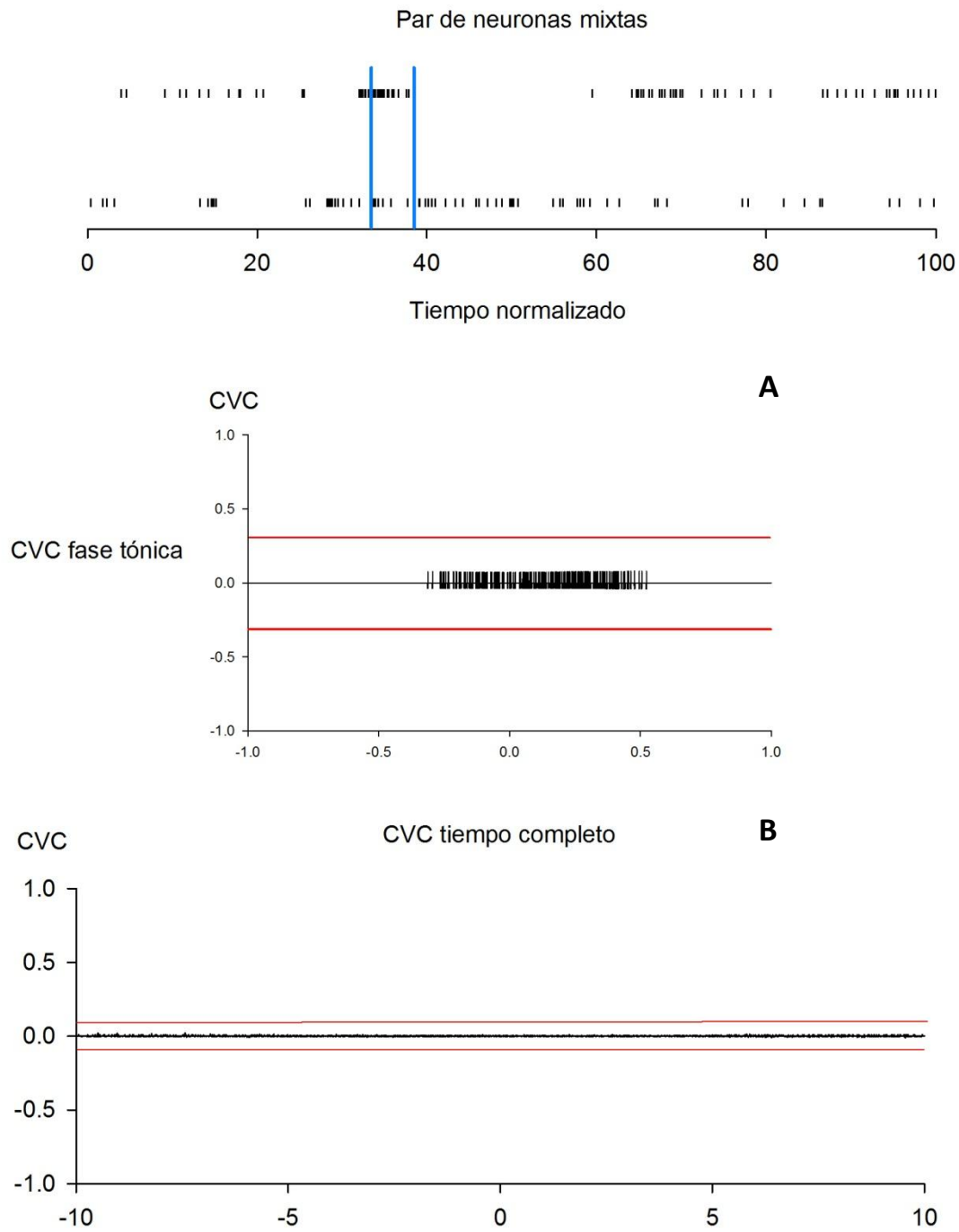


Figura 6.5 Gráficas de CVC para pares mixtos. El panel A corresponde al momento de análisis de la fase tónica, B la CVC durante todo el registro. Las líneas rojas corresponden al intervalo de confianza y las azules al inicio y fin de la fase tónica.

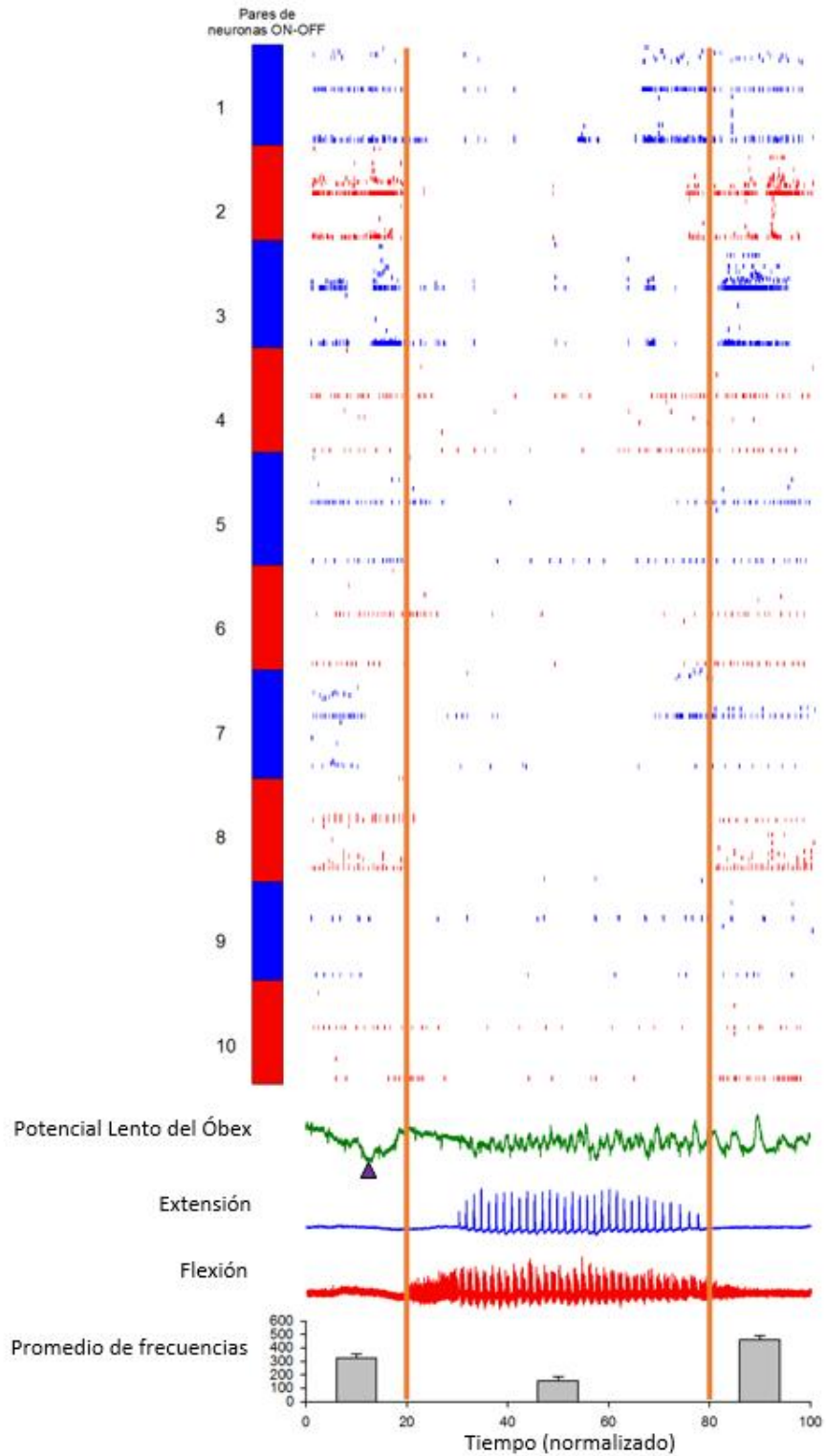


Figura 6.6 *Frecuencia instantánea de neuronas ON-OFF.* Se presenta la frecuencia instantánea de 10 pares ON-OFF, en verde el PLO donde la punta de flecha indica su inicio, en azul y rojo el registro electroencefaloeléctrico de extensión y flexión respectivamente, finalmente un histograma de los momentos antes durante y después del rascado. Las líneas naranjas indican el inicio y el final del rascado.

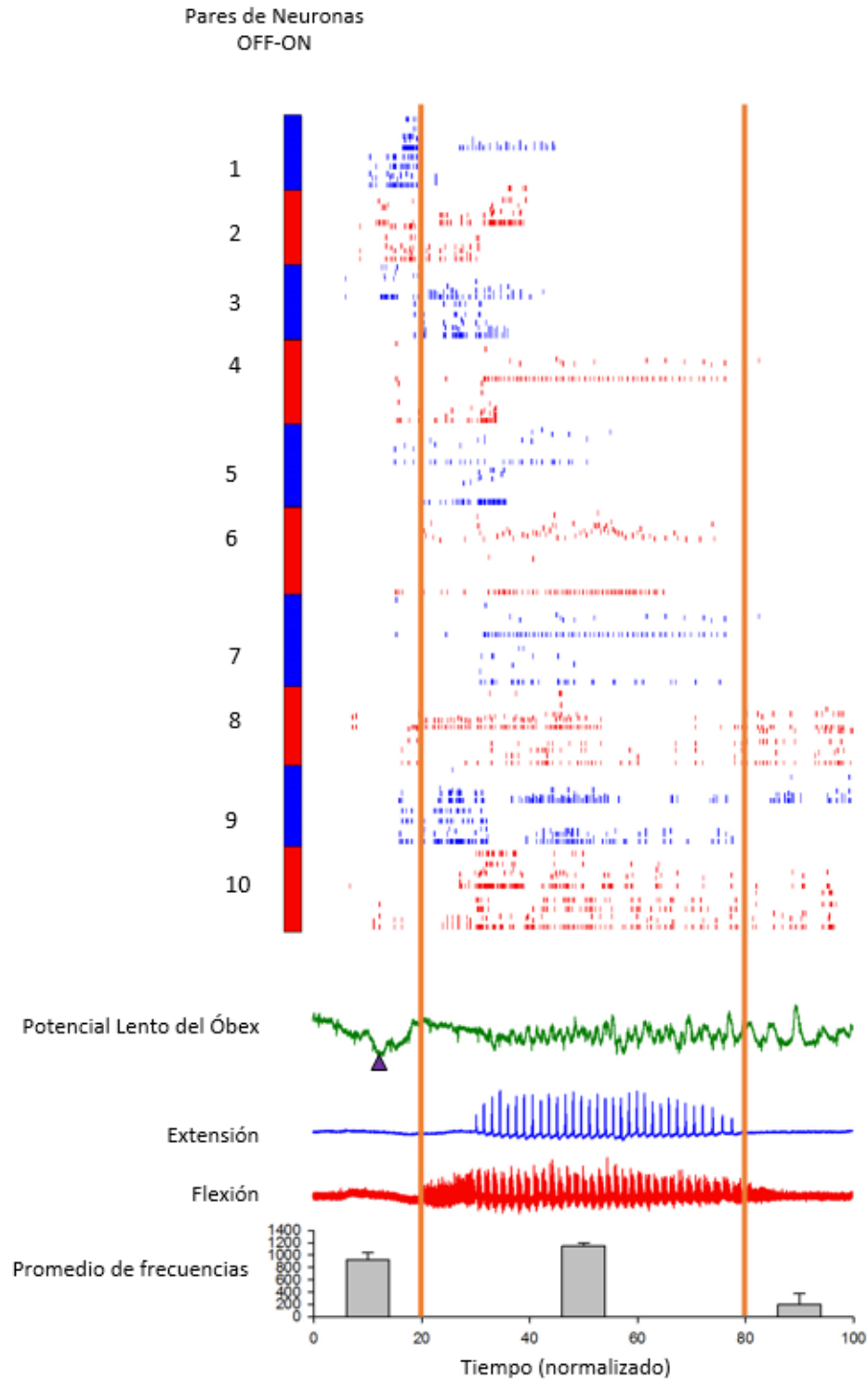


Figura 6.7 Frecuencia instantánea de neuronas OFF-ON. Se presenta la frecuencia instantánea de 10 pares OFF-ON, en verde el PLO donde la punta de flecha indica su inicio, en azul y rojo el registro electroencefaloeléctrico de extensión y flexión respectivamente, finalmente un histograma de los momentos antes durante y después del rascado. Las líneas naranjas indican el inicio y el final del rascado.

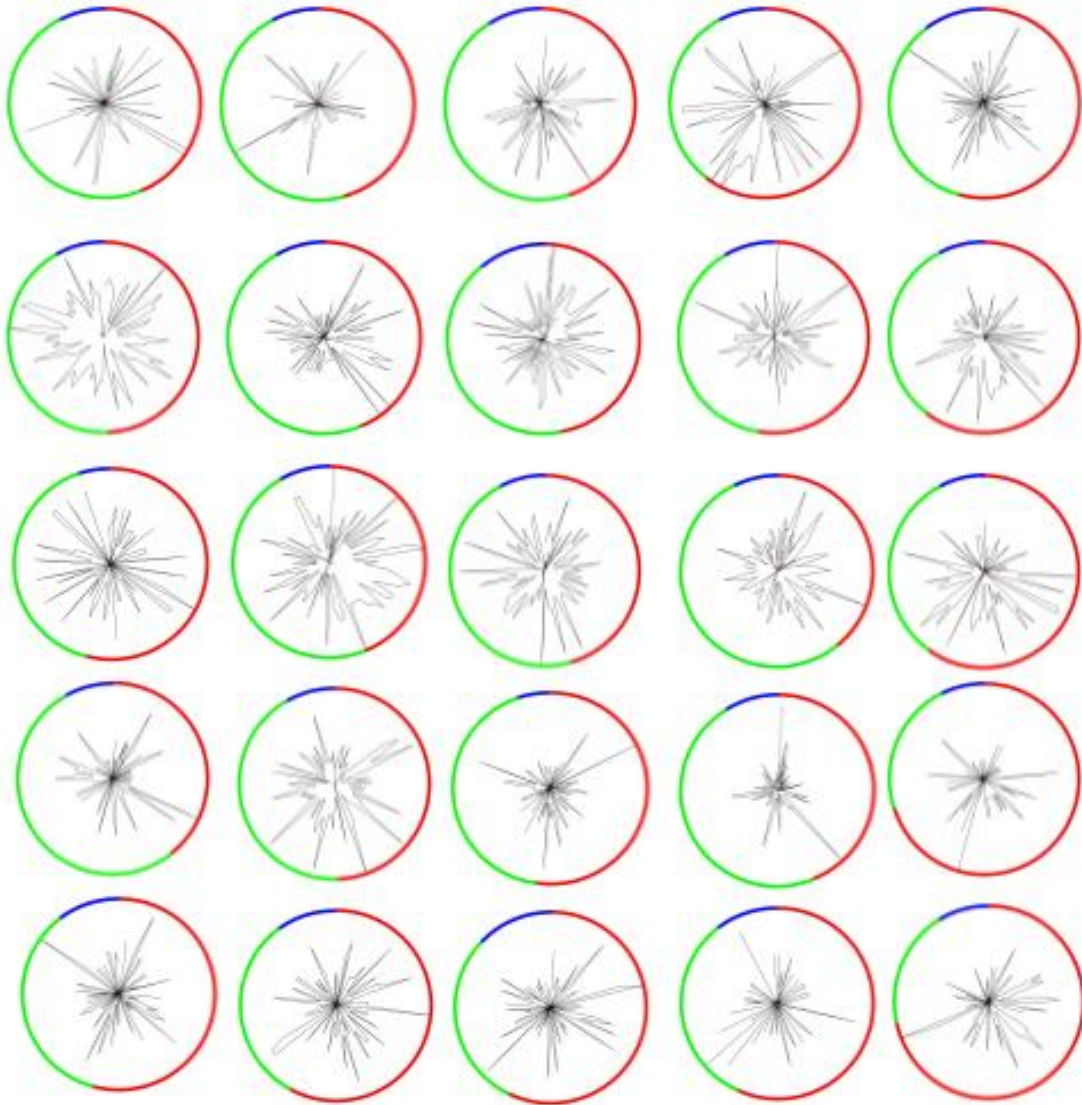


Figura 6.8 *Gráficas polares de neuronas OFF-ON.* Se presentan 25 gráficas polares representativas, donde puede observarse la dispersión de la actividad de las neuronas en todo el episodio de rascado. En azul la fase extensora, en rojo la flexora y en verde la fase intermedia. La flecha rosa corresponde al vector resultante.

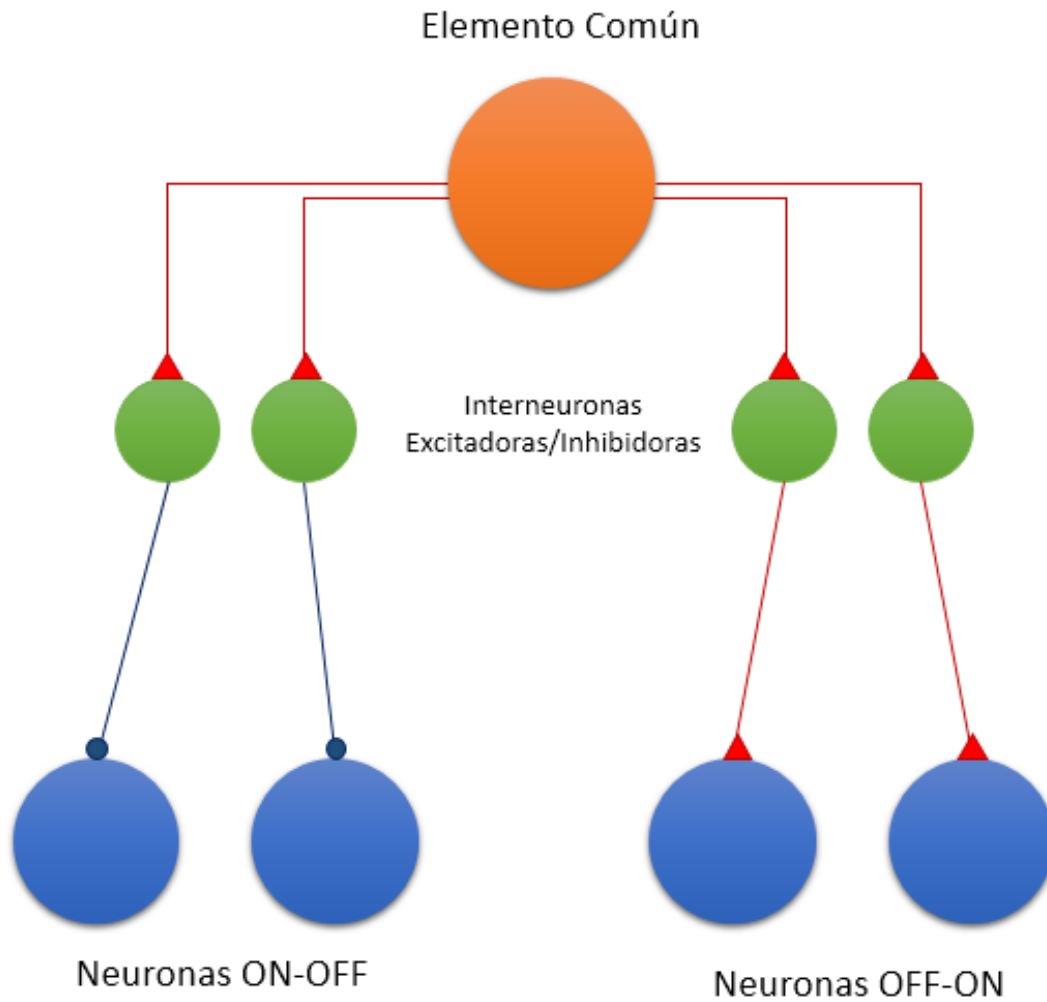


Figura 6.9 *Circuito propuesto.* El círculo naranja indica el grupo neuronal que consideramos como un elemento común. Los círculos verdes corresponden a Interneuronas excitadoras e inhibidoras. Los círculos azules corresponden a las neuronas ON-OFF (izquierda) y a las OFF-ON (derecha). Las líneas rojas con final en triángulo indican conexiones excitadoras y las líneas azules con final en círculo indican conexiones inhibitoras.

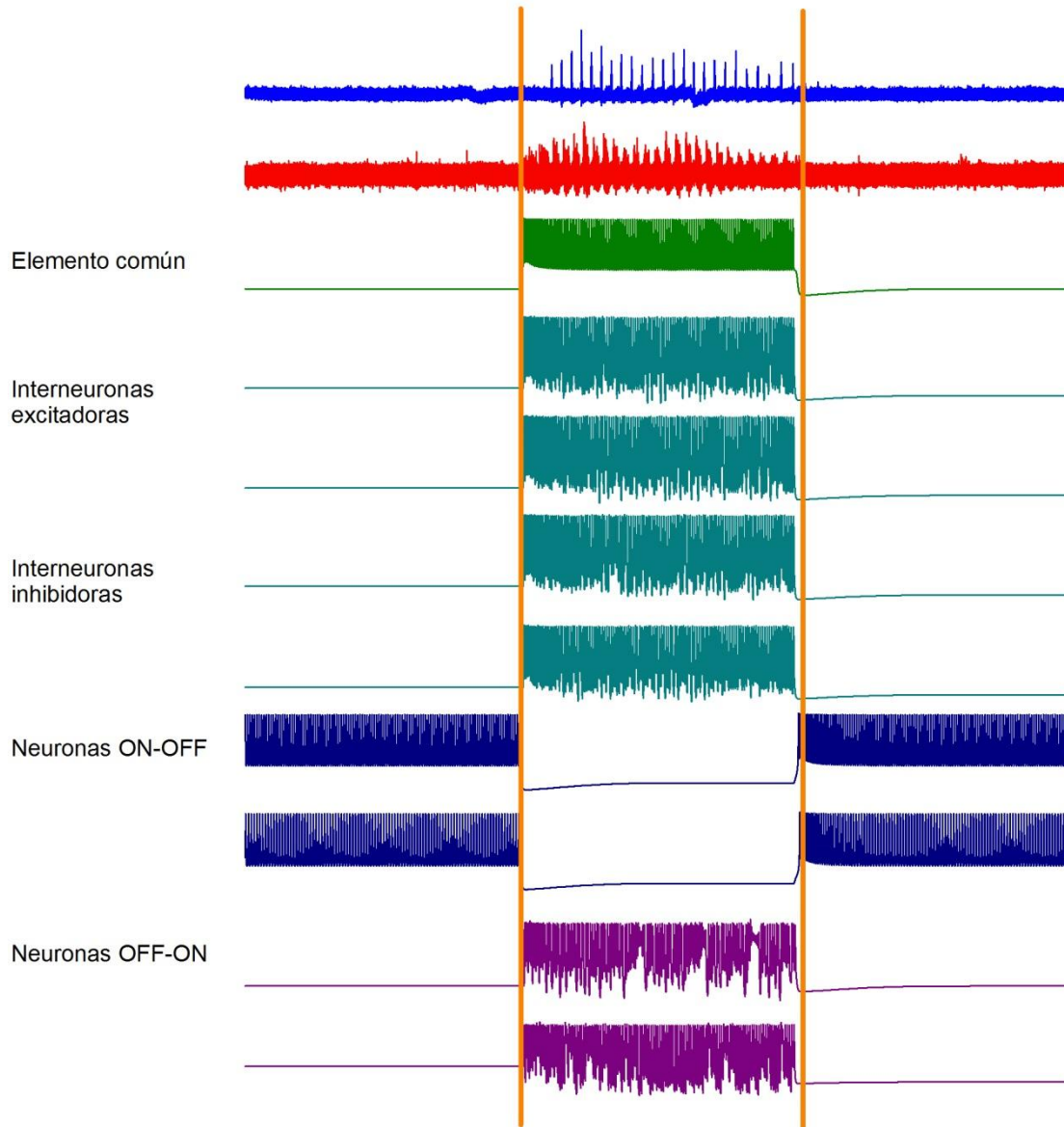


Figura 6.10 Simulación computacional del modelo propuesto. En azul y rojo un ejemplo de actividad alternante del rascado ficticio. En verde la actividad simulada del elemento común. En turquesa la actividad simulada de interneuronas excitadoras e inhibitoras. En azul oscuro la actividad simulada de neuronas ON-OFF. En morado la actividad simulada de neuronas OFF-ON. Las líneas naranjas indican el inicio y fin del rascado ficticio.

7. Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en ésta tesis podemos concluir que el método de Covarianza Cruzada utilizado no muestra la existencia de algún tipo de conexión entre pares de neuronas ON-OFF, OFF-ON o mixtos.

Además de que no podemos considerar a alguna de las neuronas analizadas como rítmicas o asociadas a algún momento del rascado en particular.

8. Discusión

En el trabajo de Tapia y colaboradores (2013) [28] se presentaron dos grupos neuronales con actividad opuesta pero sincronizada de alguna manera con el inicio del PLO y el rascado ficticio en gato. Sin embargo, en dicho trabajo no se registró la actividad de dichas neuronas simultáneamente.

Este hecho nos abría la cuestión de si sería posible que las neuronas ON-OFF y OFF-ON estuvieran conectadas entre ellas de manera sináptica. Así que propusimos la hipótesis de conectividad entre estas neuronas. Sin embargo, tras una serie de experimentos y análisis llegamos a la conclusión de que no existe dicha conectividad.

A pesar de que nuestra hipótesis inicial no pudo ser aceptada dados nuestros resultados, no consideramos haber tenido resultados negativos puesto que el hecho de no hallar conectividad directa entre los disparos de pares de neuronas abre distintas posibilidades.

Una de ellas es la propuesta que realizamos sobre la posible existencia de un grupo neuronal ubicado rostralmente al tallo cerebral. Este supuesto elemento común tendría la función de excitar distintas interneuronas tanto inhibitoras como excitadoras las cuales de manera independiente excitaran a las neuronas OFF-ON e inhibieran a las neuronas ON-OFF durante el episodio de rascado. Esta propuesta fue modelada mediante ecuaciones tipo Morris-Lecar y simulada computacionalmente mediante un programa implementado en Matlab y reproduce de manera favorable los resultados experimentales. Sin embargo, al modelar las neuronas ON-OFF fue necesario implementar una corriente inducida puesto que no fue posible modelar la actividad basal de dichas neuronas.

Si el elemento común descrito anteriormente existe entonces se abre una nueva pregunta: ¿Dónde está ubicado?

Respecto a esta cuestión sugerimos que la respuesta sea posiblemente en la Región Locomotora Mesencefálica, la cual está involucrada en la activación de la locomoción [5] de modo que podría ser posible que también lo esté en el rascado.

Una segunda posibilidad podría ser que las neuronas registradas estén asociadas a vías que se dirigen hacia el cerebelo o desde él, de acuerdo a lo estudiado en 2000 por Mori y colaboradores [18]. Pero ya que el cerebelo es retirado en nuestra preparación esta vía no estaría completa y la actividad de las neuronas ON-OFF y OFF-ON podría no ser cercana a la real.

Otra posibilidad podría ser que el tipo de análisis realizado sobre la actividad registrada no evidencie otro tipo de conectividad, es decir, podrían existir potenciales sinápticos que sincronizaran la actividad de las neuronas ON-OFF y OFF-ON sin que estas tuviesen que estar conectadas una a una como lo propuesto por Berg y colaboradores en 2007 [1]. De manera que un disparo de una neurona no corresponde a ninguno de los disparos de la otra neurona de cada par analizado que es justo el resultado que hemos obtenido en esta tesis. Pero un conjunto de ellos podría estar asociado a otro debido a los potenciales sinápticos.

Además de que los registros realizados siempre se hicieron de manera ipsilateral podría existir algún tipo de actividad de lado contralateral que nos diera indicios de conectividad con el lado ipsilateral.

Finalmente podría existir la posibilidad de que las neuronas ON-OFF y OFF-ON sean neuronas motoras que controlan el movimiento del cuello o la cabeza hacia la extremidad que presenta el rascado, pero precisamente al ser rascado ficticio no podemos observar dicho movimiento. Para probar esta posibilidad podríamos registrar la actividad muscular del cuello en un gato intacto al rascarse y analizar si esta coincide con la actividad de las neuronas ON-OFF y OFF-ON.

Después de exponer estas posibilidades aún está abierta la pregunta: ¿Qué elemento comanda la actividad de las neuronas ON-OFF y OFF-ON de la región del óbex? Y ¿Cuál es su papel funcional?

Apéndice I. Wave Clus

El programa *Wave Clus* desarrollado por R. Quian Quiroga (2004) [24] sirve para clasificar neuronas de acuerdo a su perfil de disparo mediante el uso de *wavelets* y el llamado *Superparamagnetic Clustering* [2]. El programa requiere de las señales originales, es decir, de la amplitud original del registro además de la fijación de los parámetros siguientes: frecuencia de muestreo, el umbral que deben superar las espigas para ser consideradas y la amplitud máxima que pueden tener.

Un *wavelet* es un perfil de onda característica. El análisis de señales mediante *wavelets* es realizado mediante la convolución de la señal y el *wavelet* elegido (llamado *wavelet madre*) mediante las siguientes ecuaciones:

$$W_{\psi}X(a, b) = \int x(t) \psi_{a,b}(t) dt \quad (I.1)$$

$$\psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (I.2)$$

Donde $\psi_{a,b}(t)$ son versiones modificadas del *wavelet madre* $\psi(t)$ puesto que a y b son parámetros que desplazan el *wavelet madre* (horizontal y verticalmente) y $x(t)$ es la señal que se va a analizar. La ecuación I.1 es la convolución entre la señal y el *wavelet madre*.

El *Superparamagnetic Clustering* realiza la clasificación de las espigas usando los parámetros que se obtuvieron mediante el análisis por *wavelet* (a y b), realizando grupos con los rastros de actividad correspondientes a cada neurona distinta por medio de baja varianza o distribuciones gaussianas

Al implementar el programa se siguen los siguientes pasos: primero, con los parámetros umbral y amplitud se encuentran todas las espigas que tenga la señal; después se analizan mediante *wavelets* definiendo los parámetros (a y b) para cada espiga encontrada y finalmente se clasifican en grupos o *clusters*.

Los parámetros de umbral y amplitud máxima se establecen en la sección *Set Parameters* de la ventana del programa (Figura I.1) o directamente en el código de la función del mismo nombre.

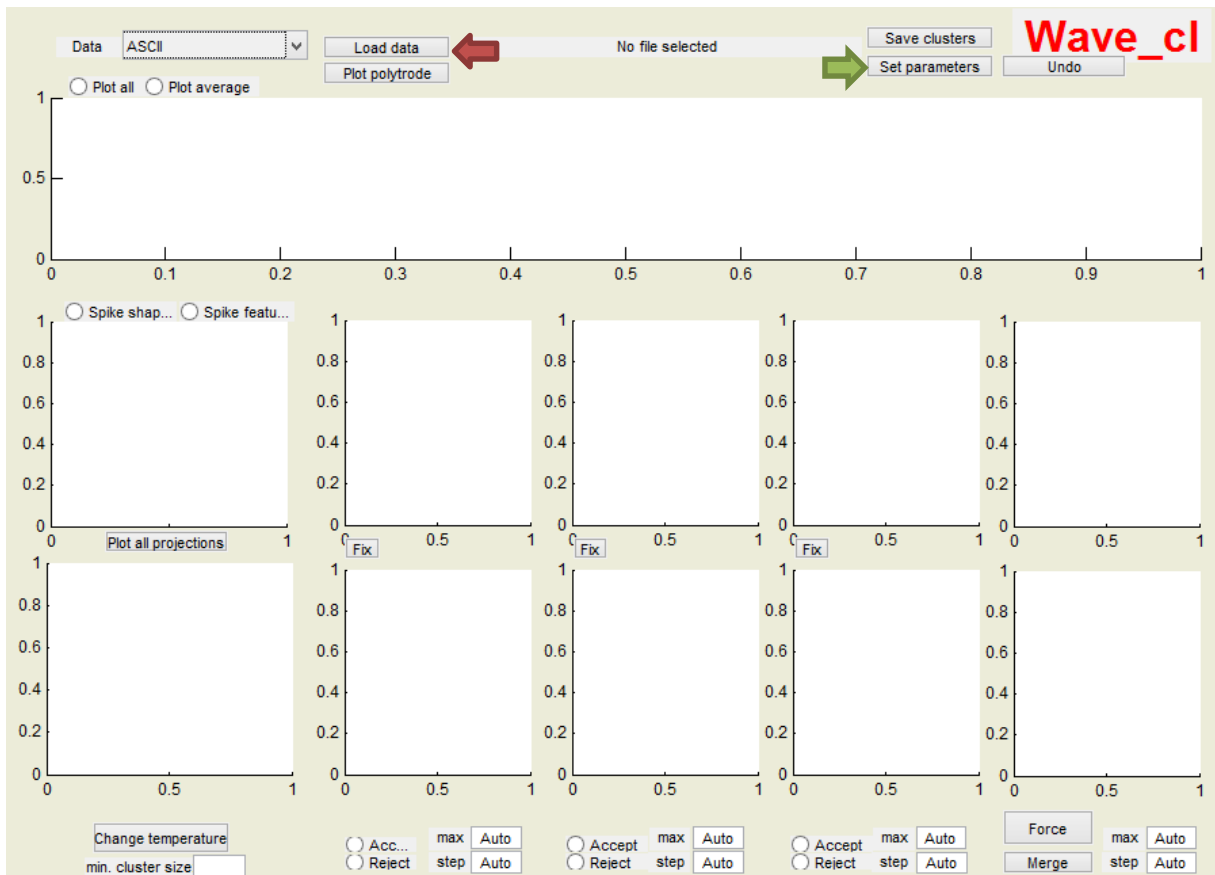


Figura I.1 Interfaz de Wave Clus. La flecha verde indica el botón donde se fijan los parámetros. La flecha roja indica el botón donde se carga la señal.

Después el análisis se realiza inmediatamente al cargar la señal deseada usando el botón *Load data* (Figura I.1) dando como resultado el gráfico de la señal original junto con el umbral, el gráfico de todas las espigas encontradas en distinto color según el *cluster* al que han sido asignadas, el gráfico de cada *cluster*, el gráfico de las espigas que no fueron asignadas a ningún *cluster* (*Cluster 0*), el gráfico de un parámetro adicional llamado *temperatura* que puede ser modificado por el usuario desde esa ventana y los histogramas de ISI de cada *cluster* (Figura I.2)

El parámetro *temperatura* permite rechazar *clusters* que no sean de interés o aceptar *clusters* que no han sido considerados en la primera respuesta.

Una función adicional del programa es el botón *Force* (Figura I.1) el cual hace que las espigas que se encuentran en el *Cluster 0* sean incluidas en alguno de los *clusters* existentes con el perfil más adecuado o puede ser considerado como un *cluster* independiente.

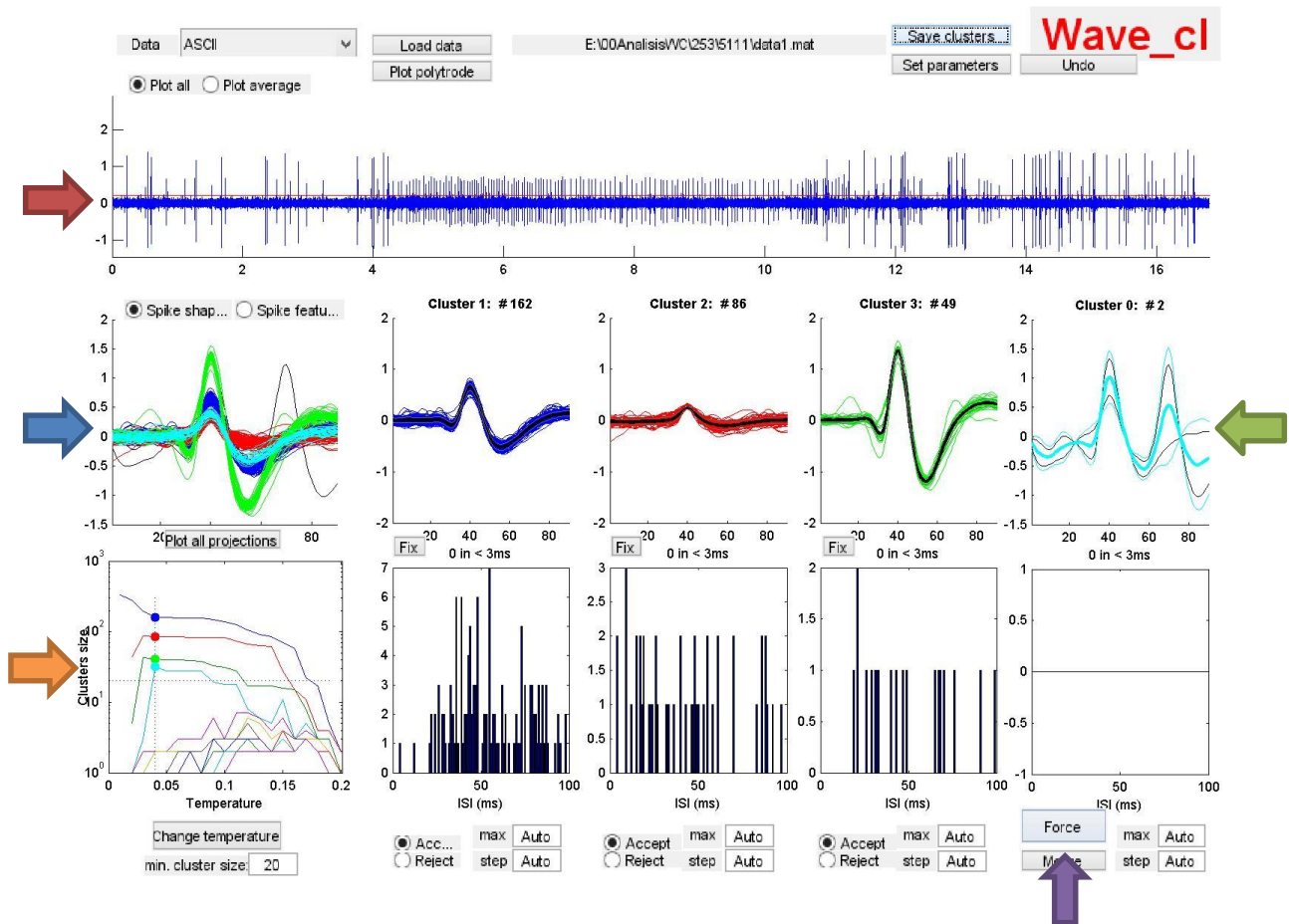


Figura 1.2 Resultados de Wave Clus. La flecha roja indica el panel en el que se muestra la señal original con el umbral. La flecha azul indica el panel en el que se grafican todas las espigas (del color del *cluster* asignado). La flecha verde indica el panel en el que se grafican las espigas que no fueron asignadas a ningún *cluster* (*cluster 0*). La flecha naranja indica el panel donde se grafica el parámetro *temperatura*. La flecha morada indica el botón *Force*.

En conjunto la forma de presentar los datos y la libertad de fijar parámetros hace que *Wave Clus* sea un programa versátil y adecuado a nuestros intereses.

Apéndice II. Programa del Dr. André F. Kohn

El programa del Dr. André F. Kohn escrito en Matlab fue inicialmente creado para el análisis de Reflejos H en humano [15]. Sin embargo, lo hemos adaptado para el análisis de la actividad de pares de neuronas.

El programa requiere de la frecuencia de muestreo y dos vectores que contengan la amplitud de las señales. El vector de tiempo no es necesario puesto que el programa lo genera cuando lo requiere.

En general el programa elimina la tendencia en las señales e implementa un modelo Auto Regresivo de orden p (AR (p)) a cada una, a estos procesos se les llama *blanqueo*. Después, calcula la Covarianza Cruzada (CVC) entre las señales blanqueadas y los límites del intervalo de confianza (95%). (Figura II.1)

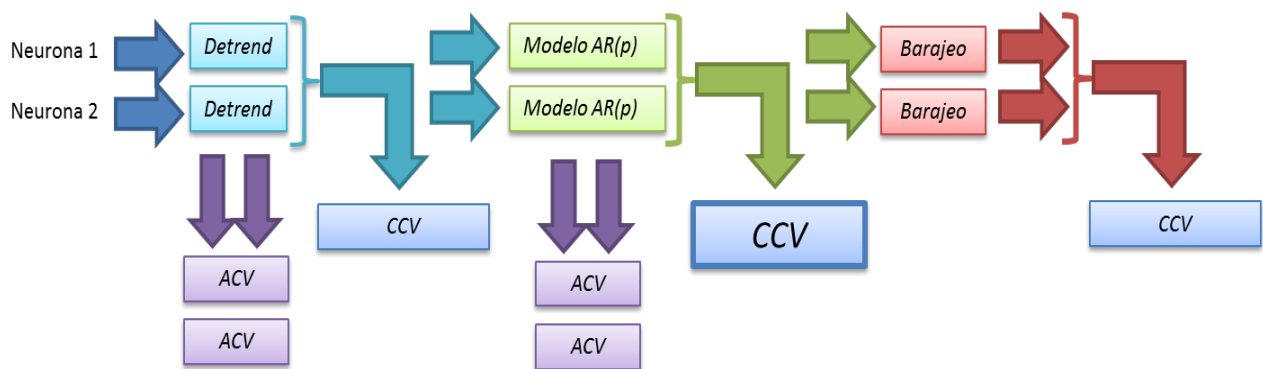


Figura II.1 Esquema general de funciones del programa. De izquierda a derecha: elimina la tendencia, calcula la Auto-Covarianza (ACV), calcula la Covarianza Cruzada (CCV) de las señales sin tendencia, realiza un modelo AR (p) a cada señal, vuelve a calcular la CCV (ahora de las señales blanqueadas), hace el barajeo de las señales blanqueadas y vuelve a calcular CCV con el fin de mostrar que no hay CCV debida a elementos aleatorios.

Los pasos particulares que realiza el programa son:

1. Elimina la tendencia a cada señal con la función *detrend* de Matlab la cual calcula los mínimos cuadrados para el ajuste lineal a los datos y resta la función resultante a los datos.
2. Calcula la Auto-Covarianza a cada señal usando la función *xcov* de Matlab. Esta función calcula la media de la señal y la resta de los datos, mediante el algoritmo siguiente:

$$c_{xy}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-m-1} \left(x_{n+m} - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} x_i \right) \left(y_n^* - \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} y_i^* \right) & m \geq 0, \\ c_{yx}^*(-m) & m < 0 \end{cases} \quad (II.1)$$

3. Calcula los límites del intervalo de confianza de 95% con $\mp 1.96/\sqrt{N}$ donde N es el menor número de espigas entre las dos señales. Lo que da como resultado el mayor valor de los límites del intervalo.
4. Determina el orden el modelo AR (p) usando las funciones *pburg*, *arburg* y *pAIC*.
 - *pburg*: Calcula la densidad espectral de potencia usando el método de Burg y el orden de un modelo AR para estimar la densidad de potencia espectral.
 - *arburg*: Ésta función utiliza el método de Burg que estima los coeficientes de reflexión para estimar los parámetros de AR de forma recursiva. Utiliza el algoritmo Levinson-Durbin, un algoritmo para calcular en forma recursiva la solución de una ecuación, con un costo (computacional) de $n \log \rho$ (en nuestro caso usamos una $n=256$)
 - *pAIC*: AIC significa Criterio de Información de Akaike es una medida de la calidad relativa de un modelo estadístico, proporciona un medio para la selección del modelo usando. En general $AIC = 2k - n * \ln(L)$ donde k es el número de parámetros del modelo y L el máximo valor de la función de verosimilitud para el modelo estimado. En nuestro caso k va de 1 a 20, $n=256$ y L es el valor de ρ obtenido de la función *pburg*.
5. Calcula la Covarianza Cruzada entre las señales con la función *xcov*.
6. Desordena (baraja) las señales de forma aleatoria con la función *shuffle* y vuelve a calcular la Covarianza Cruzada con el fin de mostrar que la CVC calculada en el punto 5 no es debida a algún elemento aleatorio.

Apéndice III. Estadística de Rayleigh y gráficas polares

La estadística de Rayleigh aplicada a distribuciones circulares suele ser útil para eventos cíclicos comparados con alguna variable a la cual se pretende estudiar algún tipo de periodicidad

Para realizar un estudio de una distribución circular (Figura III.1) primero debe tenerse una escala circular. Dicha escala, en nuestro caso, corresponde a un ciclo de actividad flexora y extensora de la fase rítmica del rascado. Para obtener qué valor de la circunferencia tendrá cada parte de la actividad se realiza un promedio de todos los ciclos de un evento de rascado (10 como mínimo). Con ese promedio se tiene qué parte de un ciclo es cada tipo de actividad y se puede realizar la siguiente transformación:

$$a = \frac{(360^\circ)X}{k} \quad (III. 1)$$

Donde X es el valor del porcentaje del ciclo que corresponde a la actividad flexora, extensora o intermedia, k es el ciclo completo (100%) y a es igual a el número de grados de la circunferencia que le corresponden a esa actividad.

De manera que si la flexión corresponde al 20% del ciclo entonces:

$$a_{flex} = \frac{(360^\circ)20\%}{100\%} = 72^\circ$$

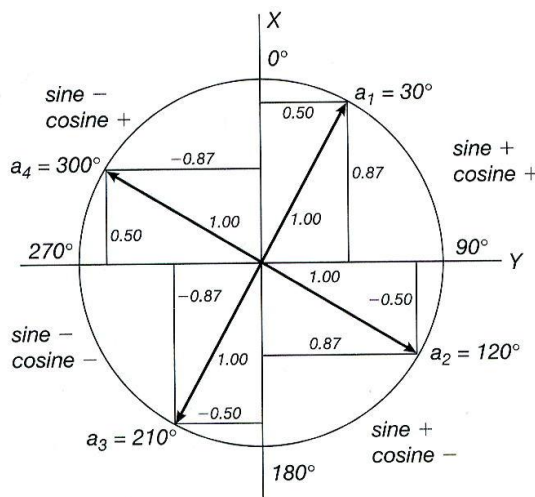


Figura III.1 Distribución circular. Cada valor de un plano puede representarse en coordenadas polares (α, r) . Cuando $r = 1$ las coordenadas cartesianas de los valores de la circunferencia son iguales al seno y coseno de α .

Una vez que tenemos la distribución del ciclo en la circunferencia tenemos que distribuir la actividad de la neurona en la misma. Para ello usamos coordenadas polares

$$\cos \alpha = \frac{X}{r} \quad (III. 2)$$

$$\sin \alpha = \frac{Y}{r} \quad (III. 3)$$

Donde α es el ángulo medido a partir del eje X hacia la derecha y r es el radio de la circunferencia.

Al hacer esto para los rastros de actividad de una neurona tendremos su distribución circular. Sin embargo, para obtener a qué fase del ciclo correspondería dicha actividad se tiene que evaluar un vector resultante cuya magnitud y ángulo se obtienen con las siguientes ecuaciones:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n \cos a_i}{n}, \quad \bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n \sin a_i}{n} \quad (III. 4)$$

$$\bar{r} = \sqrt{\bar{X}^2 + \bar{Y}^2} \quad (III. 5)$$

$$\cos \bar{a} = \frac{\bar{X}}{\bar{r}}, \quad \sin \bar{a} = \frac{\bar{Y}}{\bar{r}} \quad (III. 6)$$

En la ecuación III.5 \bar{r} es la magnitud del vector promedio y \bar{a} es el valor del ángulo promedio que puede obtenerse calculando el seno o el coseno de las ecuaciones III.6.

Una vez obtenido el vector promedio, el cual es una medida de la dispersión angular de los rastros de actividad de la neurona en cuestión pues su magnitud tiene una relación inversa a la dispersión de los dato (entre menor sea mayor será la dispersión), debemos proceder con la estadística para probar la significancia del ángulo promedio (éste indicaría la fase del ciclo donde hay una mayor concentración de los datos) y para ello usamos la prueba de Rayleigh.

La hipótesis nula es H_0 : Los datos están uniformemente distribuidos en la circunferencia (en el ciclo) y la hipótesis alternativa es H_A : Los datos no están uniformemente distribuidos en la circunferencia (en el ciclo).

La prueba de Rayleigh indica qué tan grande debe ser la muestra para indicar con un nivel de confianza dado si la distribución es o no uniforme. Para ello se calcula la R de Rayleigh (Ecuación III.7)

$$R = n\bar{r} \quad (III. 7)$$

$$z = \frac{R^2}{n} \quad \text{ó} \quad z = n\bar{r}^2 \quad (III. 8)$$

Y se utiliza la z de Rayleigh (Ecuación III.8) para probar la hipótesis nula que de no rechazarse indica que los datos están distribuidos de manera uniforme en el ciclo por lo cual no corresponden a una parte específica de este.

Como parte de nuestro análisis esta prueba estadística fue de gran utilidad.

Apéndice IV. Ecuaciones tipo Morris Lecar y método Runge Kutta de cuarto orden

En 1981 Morris y Lecar [19] publicaron un sistema de ecuaciones diferenciales para modelar el comportamiento oscilatorio de la actividad de las fibras musculares de molusco. Las ecuaciones son:

$$I = C \frac{dV}{dt} + g_L(V_L) + g_{Ca}M(V - V_{Ca}) + g_KN(V - V_K)$$
$$\frac{dM}{dt} = \lambda_M(V)[M_\infty(V) - M] \quad (IV.1)$$
$$\frac{dN}{dt} = \lambda_N(V)[N_\infty(V) - N]$$

Donde los parámetros M y N son la fracción de canales abiertos en cualquier momento dado y cuyos valores se calculan con:

$$M_\infty(V) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{V - V_1}{V_2} \right) \right)$$
$$\lambda_M(V) = \bar{\lambda}_M \cosh \left(\frac{V - V_1}{2V_2} \right) \quad (IV.2)$$
$$N_\infty(V) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{V - V_3}{V_4} \right) \right)$$
$$\lambda_N(V) = \bar{\lambda}_N \cosh \left(\frac{V - V_3}{2V_4} \right)$$

Las ecuaciones IV.1 y IV.2 corresponden al circuito equivalente de la Figura IV.1.

Para nuestro modelo utilizamos una modificación de las ecuaciones IV.1 y IV.2 presentadas por Pérez y colaboradores (2009) [22] en las que toma en cuenta una corriente de calcio dependiente de potasio y una corriente sináptica (ecuaciones IV.3). Los parámetros de las ecuaciones y sus valores están en la Tabla IV.2.

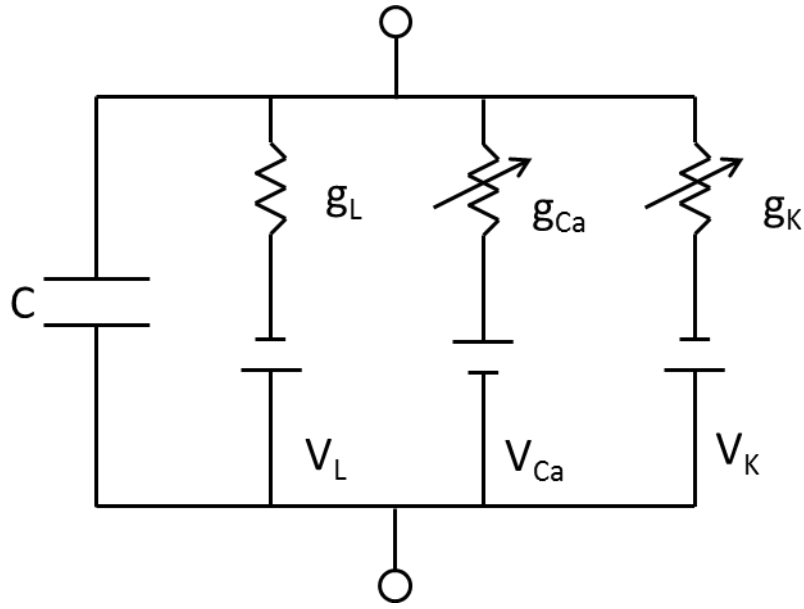


Figura IV.1 *Circuito equivalente.* Modelo de sarcolema de molusco. Las g representan las conductancias para cada ion y las V los potenciales de reposo. C es la capacitancia. Las flechas indican que esas capacitancias son variables.

Ecuaciones IV.3:

$$C \frac{dv}{dt} = I - g_{Ca} m_{\infty}(v)(v - V_{Ca}) - g_K w(v - V_K) - g_{KCa} z(Ca)(v - V_K) - g_L(v - V_L) - I_{sináptica}$$

$$\frac{dw}{dt} = \varphi \tau(v)(w_{\infty}(v) - w)$$

$$\frac{dy}{dt} = \varepsilon(-\mu g_{Ca} m_{\infty}(v)(v - V_{Ca}) - y)$$

$$m_{\infty}(v) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{v + V_1}{V_2} \right) \right)$$

$$w_{\infty}(v) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{v + W_1}{W_2} \right) \right)$$

$$\tau(v) = \cosh \left(\frac{v - W_1}{2W_2} \right)$$

$$z(y) = \frac{y}{1 - y}$$

$$I_i^{sináptica} = \sum_{j \in \text{cerca}(i)} g_{ij}^{sin} r_j (v_i - E_s)$$

$$r_j = (1 - e^{-\alpha t}) \text{ para } t \leq t_{on}$$

$$r_j = (1 - e^{-\alpha t_{on}}) e^{-\beta(t-t_{on})} \text{ para } t > t_{on}$$

Las variables y los valores de los parámetros de las ecuaciones IV.3 están en la Tabla IV.1

Parámetros	Valores
g_K	$8 \mu\text{S}/\text{cm}^2$
g_{Ca}	$4 \mu\text{S}/\text{cm}^2$
g_L	$2 \mu\text{S}/\text{cm}^2$
g_{KCa}	$0.25 \mu\text{S}/\text{cm}^2$
V_K	-84 mV
V_{Ca}	120 mV
V_L	-60 mV
V_1	-1.2 mV
V_2	18 mV
W_1	12 mV
W_2	17.4 mV
ϕ	$0.1-0.24 \text{ s}^{-1}$
μ	$0.1-0.26$
ε	0.00175 s^{-1}
α	0.1 m s^{-1}
β	0.2 m s^{-1}
I	$40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$
g_s	$0.3 \mu\text{S}/\text{cm}^2, 0 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ (exitatorio, inhibitorio)
E_s	$0 \text{ mV}, -80\text{mV}$ (inhibitorio, exitatorio)

Tabla IV.1 Parámetros de las ecuaciones IV.3.

Bibliografía

- [1]. Berg R.W., Alaburda A. y Hounsgaard J. (2007). Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal Half-Centers. *Science*, 315: 390-393.
- [2]. Blatt M., Wiseman S. y Domany, E. (1996). Super-paramagnetic clustering of data. *Physiology Rev. Letters*, 76: 3251–3254.
- [3]. Brown G. (1911). The intrinsic factors in the act progression in the mammal. *Proceedings Royal Society London Biological Science*, 84: 308-319.
- [4]. Brown G. (1914). On the nature of fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of the rhythmic activity in progression and a theory of the evolution of function in the nervous system. *Journal of Physiology*, 48: 18-41.
- [5]. Degtyarenko A.M., Simon E.S. y Burke R. E. (1998). Locomotor Modulation of Disynaptic EPSPs from the mesencephalic locomotor region in cat motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 80: 3284-3296.
- [6]. Deliagnina T.G., Feldman A.G., Gelfand I.M. y Orlovsky G.N. (1975). On the role of central program and afferent inflow in the control of scratching movements in the cat. *Brain Research*, 100: 297-313.
- [7]. Domer F.R. y Feldberg W. (1960). Scratching movements and facilitation of the scratch reflex produced by tubocurarine in cats. *Journal of Physiology*, 153: 35-51.
- [8]. Feldberg W. y Fleischhauer K. (1960). Scratching movements evoked by drugs applied to the upper cervical cord. *Journal of Physiology*, 151: 502-517.
- [9]. Guertin P. (2009). The mammalian central pattern generator for locomotion. *Brain Research Reviews*.
- [10]. Grillner S., Georgopoulos A.P. y Jordan L.M. (1997). Selection and innitiation of motor behavior. In *Neurons, Networks, and Motor Behavior*. P. S. G. Stein, S. Grillner, A. I.Selverston & D. G. Stuart, Eds. *MIT Press. Cambridge, MA*.
- [11]. Hurley R.A., Hayman L.A., M.D. y Taber K.H. (2010). The Brainstem: Anatomy, Assessment, and Clinical Syndromes. *Journal of Neuropsychiatry* 22:1

- [12]. Kutha P.C. y Smith J.L. (1990). Scratch responses in normal cats: hindlimb kinematics and muscle synergies. *Journal of Neurophysiology* 64: 1653-1667.
- [13]. Lee R., Eaton R. y Zottoli J. (1993). Segmental Arrangement of Reticulospinal Neurons in the Goldfish Hindbrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 329: 539-556.
- [14]. McCrea D.A. y Rybak I.A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Research Reviews*, 57(1): 134-146.
- [15]. Mezzarane R.A. y Kohn A.F. (2002). Bilateral soleus H-Reflexes in humans elicited by simultaneous trains of stimuli: Symmetry, variability and covariance. *Journal of Neurophysiology*, 87: 2074-2083.
- [16]. Miller S. y Scott P.D. (1977). The spinal locomotor generator. Experimental. *Brain Research*, 30: 387-403.
- [17]. Mori S, Matsui T, Kuse B, Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K (1999). Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. *Journal of Neurophysiology*, 82:290-300.
- [18]. Mori S., Matsui T., Mori F., Nakajima K. y Matsuyama K. (2000). Instigation and control of treadmill locomotion in high decerebrate cats by stimulation of the bundle of Russell in the cerebellum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 78: 945-957.
- [19]. Morris C. y Lecar H. (1981). Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber. *Journal of Biophysics*, 35: 193-213.
- [20]. Neki D., Nakayama H., Fujii T., Matsui-Fususho H. y Oda Y. (2014). Functional motifs Composed of Morphologically Homologous Neurons Repeated in the Hindbrain Segments. *Journal of Neuroscience*, 34 (9): 3291-3302.
- [21]. Orlovsky GN, Deliagina TG, Grillner S (1999). Neuronal control of locomotion from mollusk to man. *Oxford University Press*.
- [22]. Perez T., Tapia J., Mirasso C.R., García-Ojalvo J., Quebedo J., Cuellar C.A. y Manjarrez E. (2009). An intersegmental neuronal architecture for spinal wave propagation under deletions. *The Journal of Neuroscience*, 29(33): 10254-10263.
- [23]. Perret C. y Cabelguen J.M. (1980). Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. *Brain Research*, 187(2): 333-352.

- [24]. Quian Quiroga R., Nadasdy Z. y Ben Shaul Y. (2004). Unsupervised spike detection and sorting whit wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Computation*, 16: 1661-1687.
- [25]. Sherrington C.S. (1906). Integrative actions of the nervous system. *Journal of Physiology*.
- [26]. Sherrington C.S. (1910a). Flexion-reflex of the limb, cross extension-reflex, and reflex stepping and standing. *Journal of Physiology*, 40: 28-121.
- [27]. Sherrington C.S. (1910b). Notes on the scratch-reflex of the cat. *Journal of Physiology*, 3 (2): 213,220.
- [28]. Tapia J., Trejo A., Linares P., Alva J.M., Kristeva R. y Manjarrez E. (2003). Reticular activating system of a central pattern generator: premovement electrical potentials. *Physiological Reports*, 1 (5): 1-11.