



**Post-efectos de la estimulación eléctrica ruidosa en la corteza somatosensorial de la rata y de ratones transgénicos Thyl-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP**

Tesis para obtener el grado de

**Doctorado en Ciencias Fisiológicas**

Presenta

M en C. Jorge Gutiérrez Ojeda

Instituto de Fisiología

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Director de Tesis**

Dr. Elias Manjarrez López

**Revisores internos:**

Dra. Amira del Rayo Flores Urbina, Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

**Revisores externos:**

Dr. Joél Lomelí González, Dr. Saúl Manuel Domínguez-Nicolás

**Mayo 2025**

*Le soleil, la lune et les étoiles seront éternels,  
mais la vie s'évapore rapidement.  
Pendant un siècle, voire un millénaire,  
il y aura des pandémies et des guerres.  
Aucune personne que vous connaissez maintenant n'existera.  
Votre existence, qui contribue  
à l'humanité, à votre cercle social...*

*Agradezco profundamente al Dr. Elías Manjarrez por haber guiado mi formación como investigador a lo largo de la licenciatura, la maestría y el doctorado. Su acompañamiento constante y su ejemplo han sido fundamentales en este camino.*

*A la Dra. Amira del Rayo Flores Urbina, gracias por abrirme por primera vez las puertas de un laboratorio de investigación y por acompañar con generosidad cada etapa de mi desarrollo académico.*

*A mi familia, por estar presentes en los momentos más difíciles y agotadores de este proceso, brindándome siempre su amor y apoyo incondicional.*

*Y a mi compañera de vida, Lizeth Jocelin Serna Villalobos, gracias por caminar a mi lado en cada momento, especialmente en los más complejos. Tu presencia ha sido mi mayor fortaleza.*

*Agradezco también al CONACYT por el apoyo brindado a través de la beca de doctorado, que hizo posible la realización de este trabajo.*

# TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	11
2.	ANTECEDENTES.....	13
	<b>2.1 Estimulación transcraneal.....</b>	<b>13</b>
	<b>2.2 Estimulación eléctrica transcraneal ruidosa .....</b>	<b>20</b>
	2.2.1 Efectos a corto plazo de la estimulación eléctrica ruidosa en neuronas piramidales.....	26
	<b>2.3 Efectos a corto plazo de la estimulación optogenética ruidosa.....</b>	<b>27</b>
	<b>2.4 Efectos a largo plazo de la estimulación eléctrica ruidosa .....</b>	<b>30</b>
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	32
4.	HIPÓTESIS: .....	35
5.	OBJETIVOS.....	36
	<b>5.1 Objetivo general.....</b>	<b>36</b>
	<b>5.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>36</b>
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
	<b>6.1 Modelo de estudio y aspectos éticos .....</b>	<b>38</b>
	<b>6.2 Obtención de potenciales provocados <i>in vivo</i> .....</b>	<b>39</b>
	<b>6.3 Estimulación eléctrica .....</b>	<b>42</b>
	<b>6.4 Estimulación óptica .....</b>	<b>43</b>
	<b>6.5 Propuesta de análisis de datos .....</b>	<b>45</b>
	6.5.2 Examinación de los efectos de la estimulación eléctrica transcraneal sobre los potenciales extracelulares multiunitarios.....	47
	6.5.3 Examinación de los efectos de la estimulación eléctrica transcraneal sobre los potenciales de campo locales .....	49
7.	RESULTADOS.....	52
	<b>7.1 Efecto de la estimulación eléctrica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo de superficie.....</b>	<b>52</b>
	7.1.1 Estimulación con 2 min tRNS de alta frecuencia .....	53
	7.1.2 Estimulación con 4 min tRNS de alta frecuencia .....	56
	7.1.3 Estimulación con 5 min tRNS de alta frecuencia .....	59
	7.1.4 Estimulación con 6 min tRNS de alta frecuencia .....	62
	7.1.5 Estimulación simulada .....	65
	7.1.6 Resumen de efecto de diferentes tiempos de estimulación eléctrica sobre la actividad superficial de la corteza .....	68
	<b>7.2 Efecto de Estimulación eléctrica sobre la actividad unitaria de neuronas .....</b>	<b>71</b>

7.2.1	Efecto de Estimulación con 2 min tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	73
7.2.2	Efecto de Estimulación con 4 min tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	76
7.2.3	Efecto de Estimulación con 5 min tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	79
7.2.4	Efecto de Estimulación con 6 min tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	82
7.2.5	Efecto de Estimulación con 10 min tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	85
7.2.6	Efecto de estimulación simulada tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas .....	88
<b>7.3</b>	<b>Efecto de Estimulación eléctrica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo intracortical .....</b>	<b>92</b>
<b>7.4</b>	<b>Efecto de Estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia y estimulación lumínica ruidosa sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo superficial .....</b>	<b>96</b>
7.4.1	Efecto de Estimulación con 10 min tRNS de alta frecuencia y estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2, VGAT ChR2. ....	96
7.4.2	Efecto de Estimulación con 2 min tRNS de alta frecuencia y estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2, VGAT ChR2. ....	99
<b>7.5</b>	<b>Efecto de Estimulación óptica ruidosa sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales</b>	<b>102</b>
7.5.1	Efecto de Estimulación con 10 min de estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2, VGAT ChR2.....	102
7.5.2	Efecto de Estimulación con 2 min de estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2, VGAT ChR2.....	105
<b>7.6</b>	<b>Efecto de pulsos pareados de luz sobre la amplitud de los potenciales somatosensoriales</b>	<b>109</b>
7.6.1	Efecto de pulso pareados de luz en ratones Thy-ChR2 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales .....	109
7.6.2	Efecto de pulso pareados de luz en ratones VGAT-ChR2 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales .....	111
7.6.3	Efecto de pulso pareados de luz en ratones C57 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales .....	113
7.6.4	Efecto de pulso pareados de luz en ratones Thy-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales.....	115
8.	DISCUSIÓN .....	117

8.1	Integración sensorial de la corteza de los barriles ante la estimulación mecánica de las vibrisas	117
8.2	Origen de potenciales y corrientes extracelulares, relación entre EEG, ECoG y espigas ....	125
8.3	Ajuste de datos de frecuencia de descarga neuronal relacionada a la estimulación eléctrica	129
8.4	Conclusiones .....	144
9.	REFERENCIAS .....	146
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>154</b>
	<b>Wave clus para multiples archivos.....</b>	<b>154</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapas espaciales experimentales y de modelos FEM de voltaje generado en el cuero cabelludo durante la estimulación eléctrica transcraneal utilizando tres montajes de electrodos

Figura 2. El efecto de la polarización anódica en la superficie de la corteza somatosensorial sobre la amplitud máxima (mV) del potencial provocado.

Figura 3. Efecto de la polarización de la materia gris a través de una micropipeta.

Figura 4. Efecto de la polarización negativa de la punta.

Figura 5. Efecto de la estimulación eléctrica sobre la corteza motora

Figura 6. Prueba de rendimiento continuo en pacientes que muestran síntomas de parkinsonismo con y sin estimulación vestibular galvánica ruidosa

Figura 7. La señal de salida del DC-Stimulator PLUS,

Figura 8. Efectos de baja y alta frecuencia de estimulación de ruido aleatorio en los potenciales provocados motrices

Figura 9. Normalización de las amplitudes con estimulación de 4, 5, 6 minutos y simulación,

Figura 10. Efecto de la estimulación ruidosa de alta frecuencia de 10 min

Figura 11. Representación del método para analizar los efectos de RNS eléctrico y optogenético en la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidas por un protocolo de rampa de voltaje en neuronas disociadas de ratas Wistar.

Figura 12 Reducción y recuperación de la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> versus la duración del registro de dichas corrientes.

Figura 13. Obtención de potenciales provocados.

Figura 14. Estimulación eléctrica.

Figura 15 Esquema del experimento en ratones

Figura 16. Esquema del protocolo de pulsos pareados.

Figura 17. Potencial somatosensorial de la corteza de los barriles, provocado por la estimulación mecánica de las vibrisas en la rata.

Figura 18. Descripción general del enfoque de simulación

Figura 19. Esquema de registro de la actividad intracortical.

Figura 20. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 2 min.

Figura 21. Promedio de la estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 2 min.

Figura 22. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 4 min.

Figura 23. Promedio de la estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 4 min.

Figura 24. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 5 min

Figura 25. Promedio de la estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 5 min.

Figura 26. Efecto de estimulación de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 6 min.

Figura 27. Promedio de la estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 6 min.

Figura 28. Efecto de estimulación simulada.

Figura 29. Promedio de la estimulación

Figura 30. Resumen del efecto de la estimulación eléctrica sobre la corteza de los barriles.

Figura 31. Agrupación de neuronas.

Figura 32. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 2 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.

Figura 33. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 4 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.

Figura 34. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 5 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.

Figura 35. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 6 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.

Figura 36. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 10 min sobre la actividad multiunitaria extracelular

Figura 37. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia simula sobre la actividad multiunitaria extracelular.

Figura 38. Efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia simula sobre la actividad intracortical.

Figura 39. Gran promedio del efecto de estimulación con tRNS de alta frecuencia simulada sobre la actividad intracortical.

Figura 40. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación de 10 minutos

Figura 41. Gran promedio de registros individuales de ratones con estimulación eléctrica de alta frecuencia de 10 minutos para ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57.

Figura 42. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación de 2 minutos

Figura 43. Gran promedio de registros individuales de ratones con estimulación eléctrica de alta frecuencia de 2 minutos para ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57.

Figura 44. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación óptica de 10 minutos.

Figura 45. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación óptica de 10 minutos.

Figura 46. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación óptica de 10 minutos

Figura 47. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación óptica de 10 minutos.

Figura 48. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones Thy-ChR2

Figura 49. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones VGAT-ChR2

Figura 50. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones C57

Figura 51. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2, VGAT-ChR2 y C57 con estimulación óptica de 10 minutos.

Figura 52. Representación esquemática de la dinámica del movimiento de vibrisas y específicos potenciales de membrana y de acción para las variantes celulares de la corteza somatosensorial

Figura 53. Circuito sináptico que podrían contribuir a los patrones dependientes del estado de a la actividad de las láminas L2 y L3.

Figura 54. Conectividad de las principales interneuronas con entradas VPM y neuronas E locales.

Figura 55. Registros simultáneos comparados a diferentes profundidades.

Figura 56. Relación entre registros de superficie e intracorticales.

Figura 57. Registros extracelulares e intracelulares.

Figura 58. Conexiones neuronales con estimulación eléctrica y óptica.

Figura 59. Conexiones neuronales para sinapsis excitadora e inhibitoria.

Figura 60. Patrones de descarga neuronal.

Figura 61. Rasters de actividad neuronal simulada

Figura 62. Simulación del efecto de la estimulación eléctrica y óptica.

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 2 min.

Tabla 2. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 4 min.

Tabla 3. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 5 min.

Tabla 4. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 6 min.

Tabla 5. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 10 min.

Tabla 6. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación simulada.

Tabla 7. Valores que se evalúan a la función

# 1. RESUMEN

La estimulación eléctrica transcraneal se aplica de manera rutinaria en el tratamiento de desórdenes neurológicos en el humano, con intervenciones de duración muy diversa y empírica; sin embargo, aún se desconocen sus mecanismos neuronales. Dos trabajos pioneros del grupo de Paulus, en Alemania, motivaron el uso de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa en la clínica, con intervenciones por arriba de los 10 minutos de duración. Terney y colaboradores en el año 2008, encontraron que 10 minutos de dicha estimulación produce una facilitación en la amplitud de los potenciales provocados corticoespinales, la cual se sostiene por más de una hora. Sin embargo, Chaieb y colaboradores en el 2009, encontraron que 4 minutos de dicha estimulación produce una atenuación de la señal dependiente del nivel de oxígeno en la sangre del cerebro (BOLD, por sus siglas en inglés). Ello sugiere, que la estimulación eléctrica ruidosa sobre el cerebro produce efectos facilitadores cuando se aplica con duraciones por más de 4 minutos, y efectos inhibidores cuando se aplica por debajo de los 4 minutos. Para probar esta hipótesis, en la presente tesis examinamos el efecto de la estimulación eléctrica ruidosa sobre la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales, de superficie, local de campo y multiunitario, en tres modelos animales. El primer modelo animal fue la rata adulta, a la que se le removió el cráneo para administrar estimulación eléctrica ruidosa sostenida durante 2, 4, 5, o 6 minutos sobre la corteza cerebral de los barriles (corteza somatosensorial). Los otros dos modelos fueron ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP, a los que también se les removió el cráneo para aplicar estimulación eléctrica ruidosa durante 2 o 5 minutos sobre la misma corteza que en la rata, seguida de una estimulación optogenética ruidosa periódica. Encontramos, que los distintos protocolos de estimulación eléctrica ruidosa logran modular la excitabilidad neuronal a largo plazo, por más de una hora. La aplicación de ruido, con duraciones de 4, 5, y 6 minutos, produce un aumento en la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales; mientras que una duración de 2 minutos inhibe dicha amplitud en ratas y ratones. Los tiempos de 5 y 6 minutos generan un efecto más significativo. También vimos que la estimulación eléctrica ruidosa impacta la actividad intracortical en profundidades de 0 a 600  $\mu\text{m}$

de la corteza somatosensorial de la rata, con un patrón comparable al observado en la superficie cortical. Un hallazgo interesante que nos permitió conocer más acerca de los efectos de la estimulación eléctrica ruidosa es el siguiente. Encontramos que la inhibición del potencial provocado somatosensorial que se produce por la estimulación eléctrica ruidosa de 2 minutos, en ratones VGAT-ChR2-YFP, que liberan GABA al ser estimulados con luz, puede revertirse por la estimulación condicionante periódica de luz optogenética ruidosa. Los resultados permitieron inferir el tipo de conexiones en los microcircuitos corticales y construir modelos computacionales tipo Hodgkin-Huxley. De esta manera, pudimos explicar los efectos facilitadores e inhibidores de la estimulación eléctrica cortical de tipo ruidosa sobre la transmisión de información somatosensorial. Estos hallazgos contribuyen a entender algunos de los mecanismos neuronales de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa que se emplea en la clínica; en particular, los asociados a su duración.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estimulación transcraneal

La estimulación transcraneal con corriente es una técnica de estimulación eléctrica cerebral no invasiva sin intervención farmacológica, que actúa mediante la inducción de neuroplasticidad en diferentes áreas del cerebro. Esta técnica no invasiva se puede emplear para aumentar la excitabilidad de la corteza cerebral (Moliadze et al, 2012); sin embargo, los mecanismos fisiológicos aún se desconocen (Datta et al. 2013; Remedios et al., 2019).

La estimulación eléctrica transcraneal de baja intensidad (TES) abarca una serie de protocolos donde se aplica corriente a través de electrodos del cuero cabelludo con el fin de modular la función cerebral (Calancie et al 1998, Fregni et al 2005, Lisanby 2007, Nitshe y Paulus 2000, Rothwell et al 1994, Schroeder y Barr 2001). Dicha estimulación puede presentarse en diferentes modalidades como la estimulación transcraneal de corriente continua, estimulación transcraneal de corriente pausada (Datta et al 2013), estimulación transcraneal de corriente alterna (tACS), y corriente ruidosa de alta y baja frecuencia (Terney et al 2008).

El trabajo de Datta et al de 2013, revela la importancia de la colocación espacial de los electrodos. Es decir, las zonas donde se coloquen los electrodos pueden activar

neuronas que se encuentre en el camino de la corriente que fluye entre los dos electrodos de estimulación.

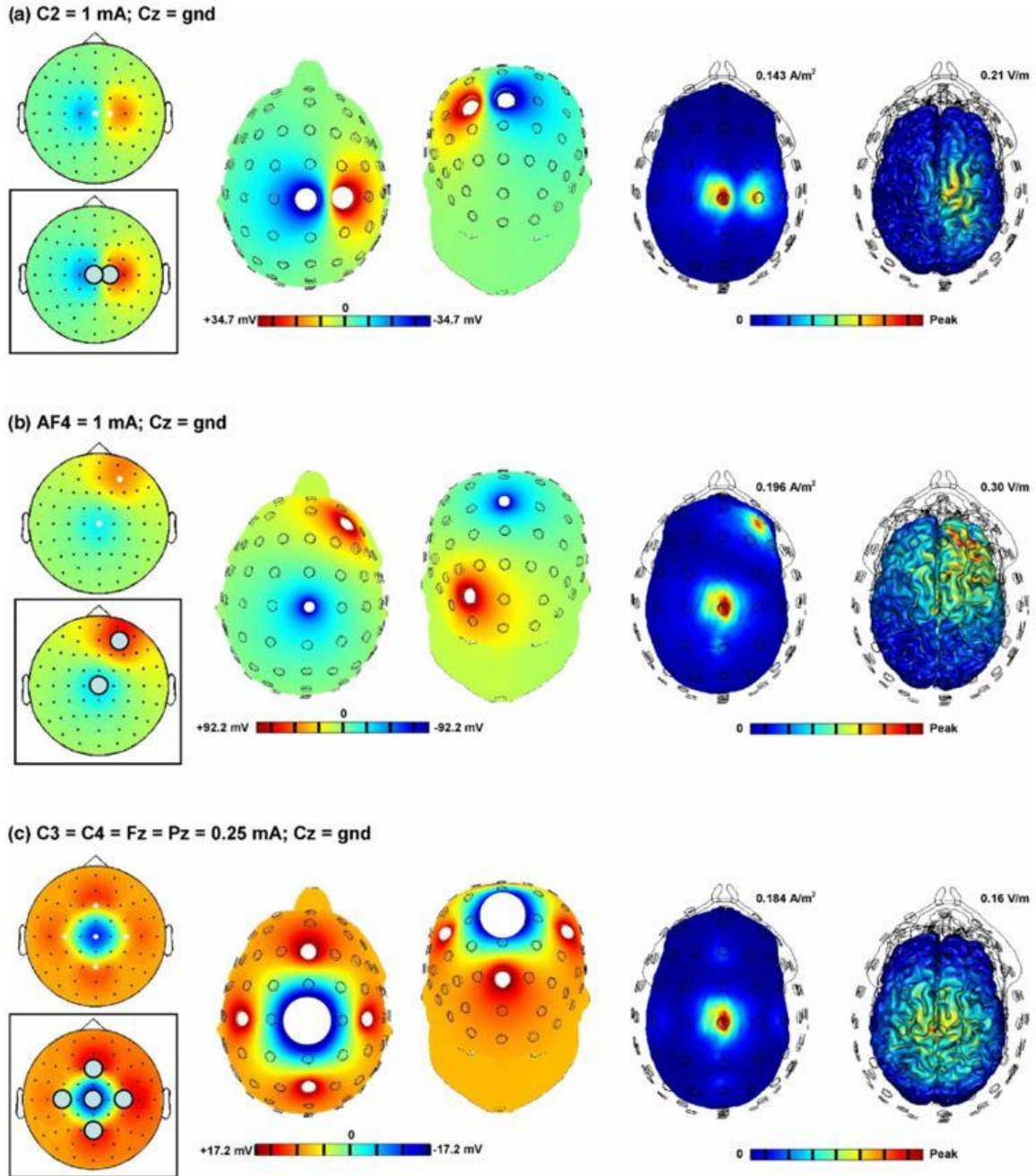


Figura 1. Mapas espaciales experimentales y de modelos FEM de voltaje generado en el cuero cabelludo durante la estimulación

**eléctrica transcraneal, utilizando tres montajes de electrodos.** (a) Proximal-bipolar; (b) Distante-bipolar; (c) 4 × 1 anillo concéntrico. Los electrodos restantes se usaron para medir los voltajes resultantes inducidos en el cuero cabelludo. *En la caja*, las imágenes muestran los mapas experimentales. En cada caso, también se muestra la densidad de corriente en el cráneo y la distribución del campo eléctrico en la superficie de la materia gris según lo predicho por el modelo. Los mapas potenciales del cuero cabelludo predichos por el modelo se representan en 2D, mediante el uso de topoplot. Los electrodos estimulantes en los mapas experimentales se indican mediante círculos cerrados. Datta et al 2013.

El origen del uso de este tipo de estimulación se puede encontrar en el trabajo de Bindman et al en 1964; en el cual realizaron experimentos en 200 ratas albinas, donde se realizó una craneotomía para exponer la corteza de los barriles. Para esto, se anestesiaron a las ratas con uretano intraperitoneal (solución al 36%, 0.5 cc/100g). Posteriormente, se insertaron electrodos de acero inoxidable sobre la superficie de la piel circundante al trepano. Para el registro se usó una micropipeta de vidrio rellena de NaCl al 10% .

Estos experimentos de Bindman et al de 1964 demostraron que los potenciales provocados de la corteza somatosensorial presentan un incremento en su amplitud después de aplicar durante 5 minutos o más estimulación eléctrica anódica de tipo DC (corriente directa polarizada positiva) a la corteza somatosensorial. Este

resultado se correlacionó con el registro de la actividad de descarga neuronal, la cual también incrementó después de la estimulación.

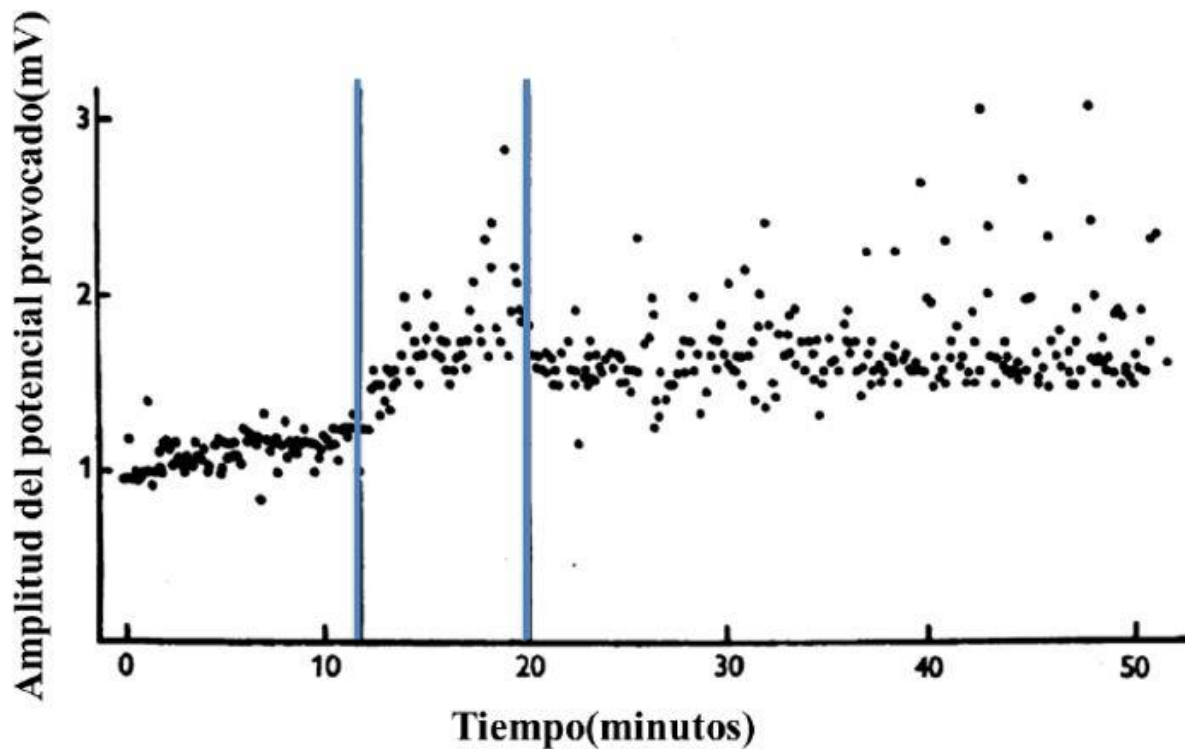


Figura 2. El efecto de la polarización anódica en la superficie de la corteza somatosensorial sobre la amplitud máxima (mV) del potencial provocado. Entre el minuto 12 y el 20 se aplicó una corriente de 25  $\mu$ A a la corteza somatosensorial. Se expuso un área de 12mm<sup>2</sup> y se retiró la pía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

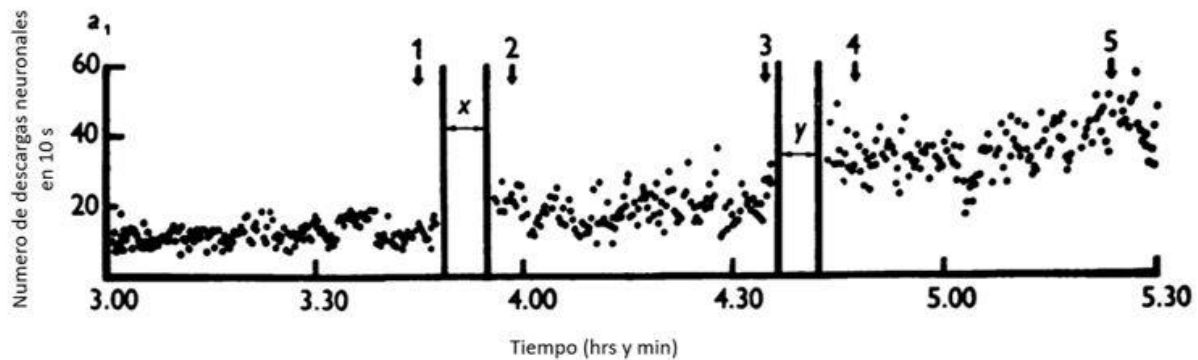
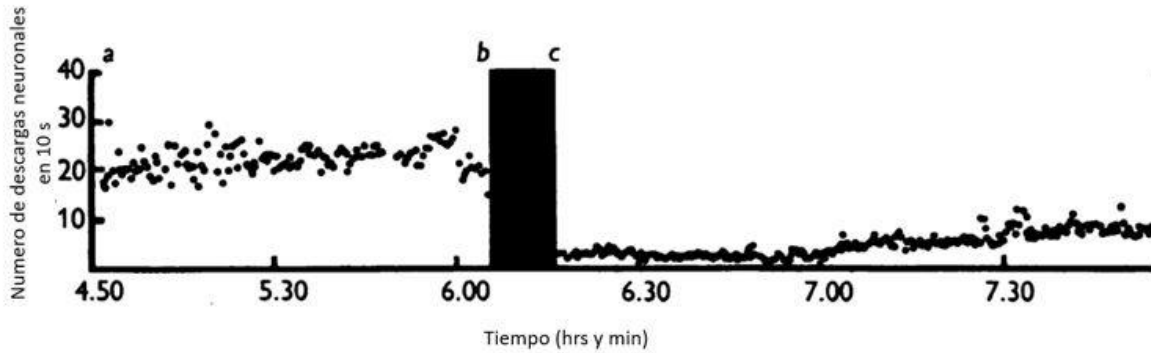


Figura 3. Efecto de la polarización de la materia gris a través de una micropipeta. Los puntos graficados son el número de potenciales de acción en periodos de 10 segundos registrados desde el mismo electrodo. En los tiempos X e Y, se hizo fluir una corriente de 0.25  $\mu$ A de tipo corriente directa positiva. La punta estaba a 500  $\mu$ m de profundidad con respecto a la pía en la corteza somatosensorial de la extremidad delantera (Bindman y cols. 1964)

En esta misma serie experimental, se probó la estimulación eléctrica catódica de tipo DC (corriente directa polarizada negativa) con duración superior a 5 min sobre la corteza somatosensorial. Se encontró una disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas de la corteza de los barriles



**Figura 4. Efecto de la polarización negativa de punta.** Periodo de control a-b. b-c ilustra la etapa de estimulación eléctrica 0-3 uA. La frecuencia de descarga disminuye cuando se desconecta el circuito de corriente. A partir de c la depresión de la actividad de punta persiste durante más de 2 h. Rata con peso de 220 g, anestesiada con 0-9 cc de uretano al 36 %. El registro se realizó desde una profundidad de 500 um por debajo de la piamadre en el área somatosensorial primaria de la extremidad delantera (Bindman y cols. 1964).

Los resultados obtenidos por Bindman fueron comprobados por Nitsche y Paulus en el 2000, cuando realizaron un protocolo de estimulación eléctrica directa no invasiva sobre la corteza motora en humanos. Para esto, aplicaron 1 mA a través de electrodos cuadrados de esponja de 35  $cm^2$ . El estímulo de prueba consistió de un pulso magnético que generaba una respuesta de salida 2 mV en el musculo abductor derecho del dedo meñique

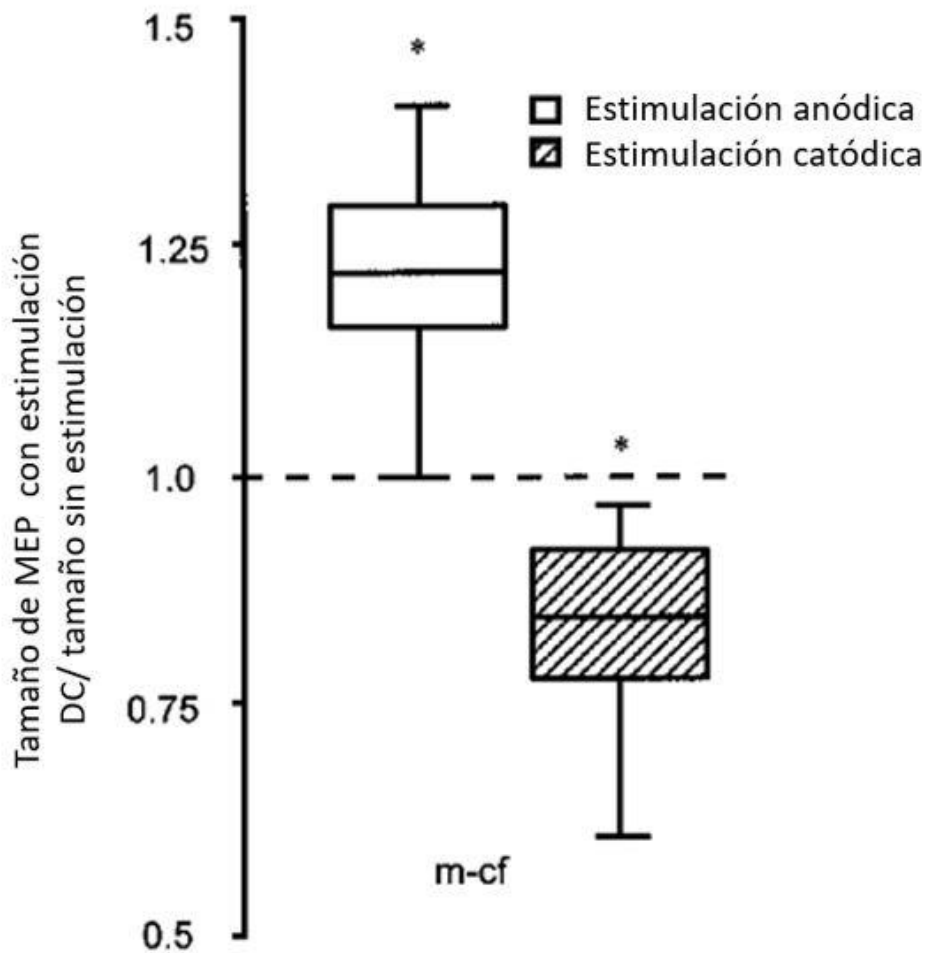


Figura 5. Efecto de la estimulación eléctrica sobre la corteza motora. Las amplitudes MEP normalizadas durante la estimulación se dividen por las amplitudes MEP normalizadas sin estimulación. Durante la estimulación con CC, la amplitud MEP aumentó con la estimulación con corriente anódica y disminuyó con la estimulación con corriente catódica. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los valores con y sin estimulación (prueba t bilateral, muestras pareadas,  $P < 0,05$ ). (Nitsche y Paulus, 2000).

## 2.2 Estimulación eléctrica transcraneal ruidosa

Por otro lado, diversos grupos de investigación han estudiado el efecto de la estimulación con corriente directa y alternante; sin embargo, el primer grupo que estudió los efectos de una corriente ruidosa aplicada sobre el sistema vestibular con pacientes con enfermedad de Parkinson fue el grupo de Yamamoto et al en 2005. Este estudio mostró que la corriente ruidosa de muy baja frecuencia produce mejorías en los síntomas de personas con Parkinson.

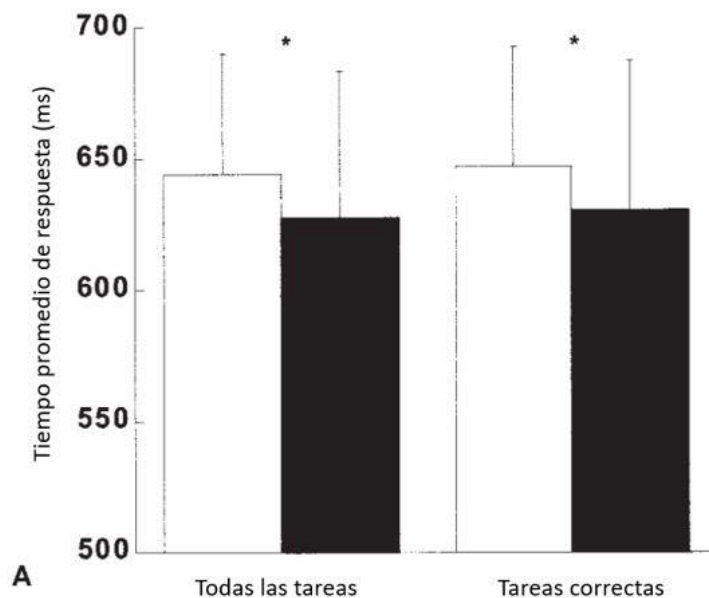


Figura 6. Prueba de rendimiento continuo en pacientes con síntomas de parkinsonismo, con y sin estimulación vestibular galvánica ruidosa. Se muestran los tiempos de reacción promedio en todas las tareas y específicamente en aquellas respondidas correctamente (Yamamoto et al., 2005).

En 2008, Terney et al. demostraron que la estimulación eléctrica ruidosa aplicada sobre la corteza motora puede modificar la actividad neuronal. De esta manera pudieron separar al tipo de estímulo gracias a su espectro de potencia. Por lo que categorizaron el ruido eléctrico de baja frecuencia (0.1-100 Hz, NLF por sus siglas en inglés Noise Low Frequency) y ruido de alta frecuencia (101-640 Hz, NHF por sus siglas en inglés Noise High Frequency). Para esto, en 80 voluntarios sanos se estimuló la corteza motora mediante pulsos magnéticos, generando potenciales motores provocados. Esta estimulación magnética es segura y no induce convulsiones (Wasserman et al. 1998). Se midió la amplitud de los potenciales provocados por la estimulación magnética y se procedió a estimular con dichas variantes de corriente. Mostraron que la estimulación de 10 minutos a 1 mA de NHF produce un incremento en la amplitud de los potenciales, obteniendo el doble de su amplitud a los 60 minutos de haber sido estimulado. En contraparte, el estímulo LNF no generó un efecto significativo sobre la amplitud de dichos potenciales. Esta estimulación ruidosa tRNS puede considerarse como un tipo de estimulación transcraneal alternante, donde las formas de onda sinusoidales se distorsionan de manera aleatoria. Esto se puede interpretar como un cambio en la excitabilidad de la corteza motora producido por la estimulación eléctrica transcraneal.

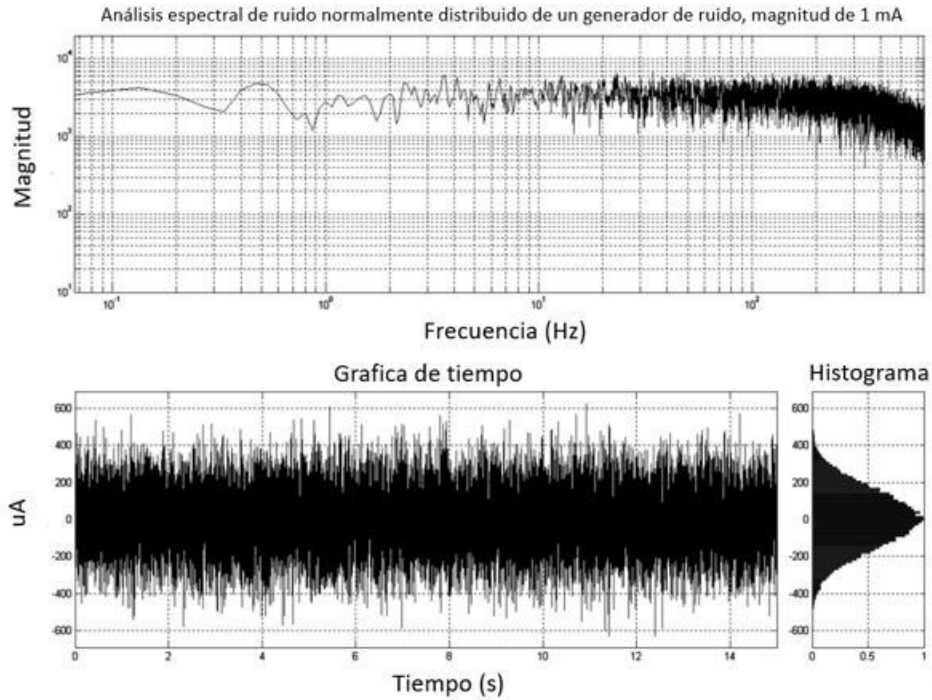


Figura 7. La señal de salida del DC-Stimulator PLUS. Se muestra una distribución de frecuencia de la señal, el gráfico temporal de la señal y un histograma. La señal fue generada por una computadora. En el modo de estimulación “ruido”, hay un nivel aleatorio de corriente generada para cada muestra (frecuencia de muestreo 1280 muestras/s). Los números aleatorios se distribuyen normalmente y la función de densidad de probabilidad sigue una curva en forma de campana. Se aplicó una estimulación de 1 mA (Terney y cols., 2008).

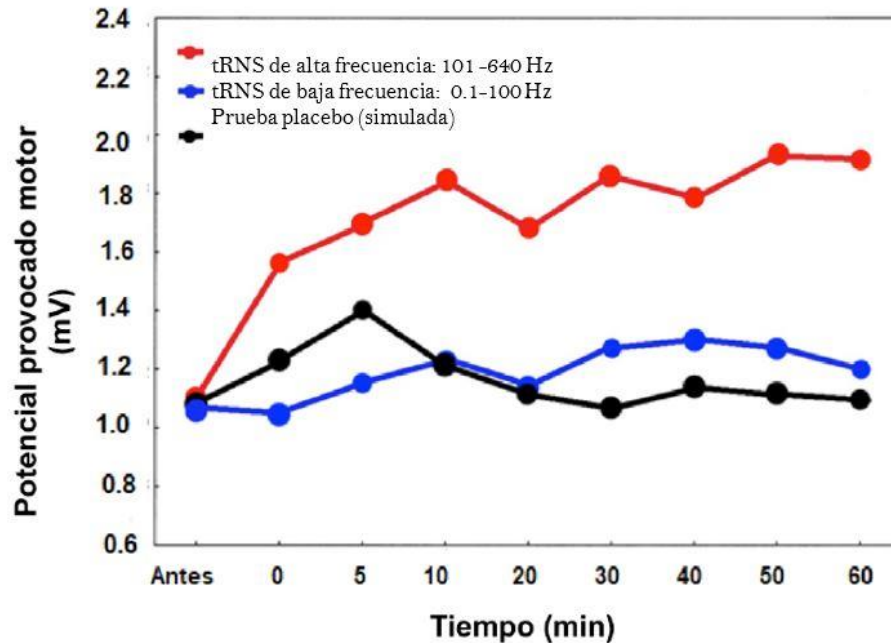
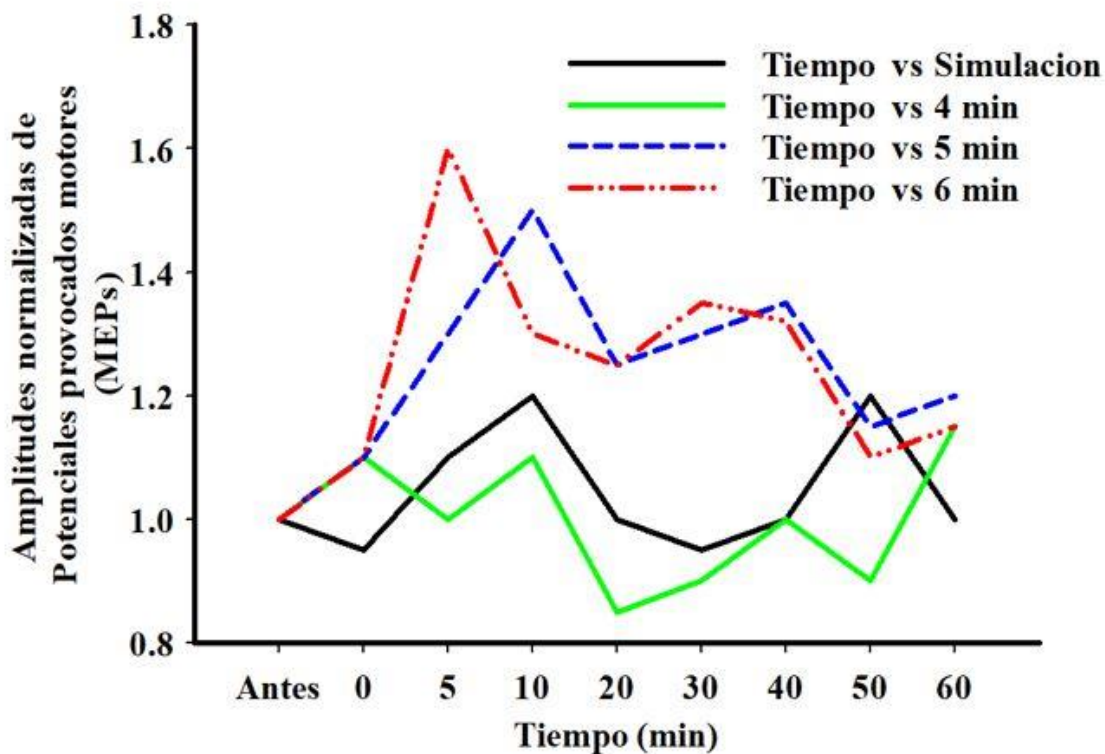


Figura 8. Efectos de baja y alta frecuencia de estimulación de ruido aleatorio en los potenciales provocados motrices. Se muestra el efecto de la estimulación eléctrica tRNS de 10 min y 1mA sobre la amplitud de los potenciales motores, los electrodos fueron colocados sobre el cuero cabelludo de la corteza motora primaria humana (n=12 sujetos). La tRNS a alta frecuencia presenta un comportamiento similar a la estimulación tetánica de corto plazo (Modificado de Terney y cols., 2008).

De acuerdo con lo anterior, Chaieb et al. en 2011 evaluaron el efecto de la tRNS de alta frecuencia similar al protocolo realizado por Terney y cols. (2008), es decir compararon la aplicación de 1000  $\mu$ A de corriente ruidosa de valores entre 101 a 640 Hz, durante 4, 5 y 6 minutos, contra estimulación simulada con las mismas

duraciones, sobre el cuero cabelludo de la corteza motora izquierda de voluntarios. Antes de la estimulación, midieron la amplitud de potenciales provocados motores (MEP) del primer musculo interóseo dorsal derecho. Posterior a la estimulación, registraron cada 10 minutos por una hora, siendo la primera medición a los 0 segundos de haber terminado la estimulación. Observaron que la estimulación de 4 min no produce un cambio en la amplitud del potencial; mientras que para la estimulación de 5 minutos si se observa un incremento de la amplitud del potencial a los 10 min, así como para la estimulación de 6 min. La estimulación durante 6 minutos exhibió un mayor incremento. Este estudio muestra que la modulación de la amplitud depende de la duración de la estimulación.



**Figura 9. Normalización de las amplitudes con estimulación de 4, 5, 6 minutos y simulación.** Se puede apreciar que para la estimulación simulada y de 4 min, no existe diferencia; es decir, la estimulación con tRNS de 4 min no generara ningún cambio en la amplitud de los MEPs. Por otra parte, la estimulación de 5 y 6 min genera un incremento en la amplitud de los MEPs (Modificado de Terney y cols., 2008).

En trabajos de tesis del laboratorio, Lizarraga en 2020 examinó los efectos en la amplitud de los potenciales provocados de la corteza de los barriles posteriores a la estimulación eléctrica ruidosa aleatoria por 10 minutos. Encontró un incremento en la amplitud de los potenciales somatosensoriales provocados por estímulos de protracción de las vibrisas y, por lo tanto, en la excitabilidad. El incremento en la amplitud fue de 170 a 500  $\mu\text{V}$  cuando transcurrieron 70 minutos después de dicha estimulación. Estos resultados son consistentes con los reportados por Bindman y cols., 1964 y por Terney y cols., 2008.

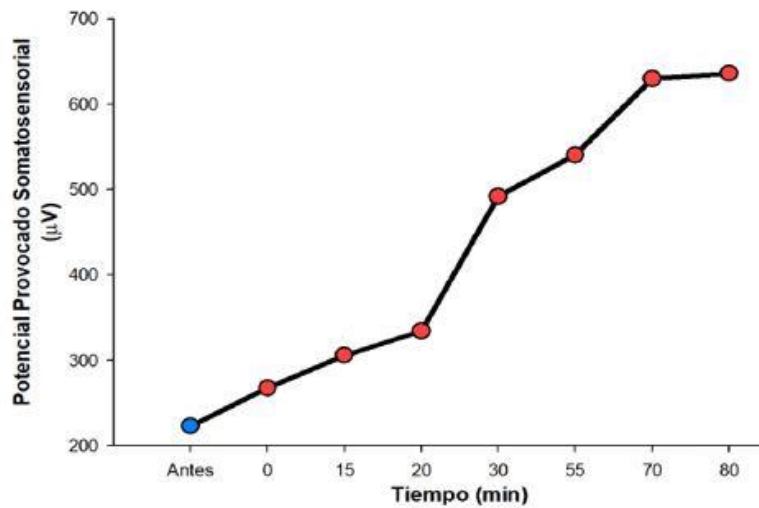


Figura 10. Efecto de la estimulación ruidosa de alta frecuencia de 10 min. Respuesta de los potenciales provocados somatosensoriales de las vibrisas de la rata con respecto al tiempo, antes y después de 10 min de estimulación eléctrica ruidosa sobre la corteza de los barriles (0.3 mA). Nótese el incremento en la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales hasta 80 minutos después de la estimulación (Lizarraga, 2020).

### 2.2.1 Efectos a corto plazo de la estimulación eléctrica ruidosa en neuronas piramidales

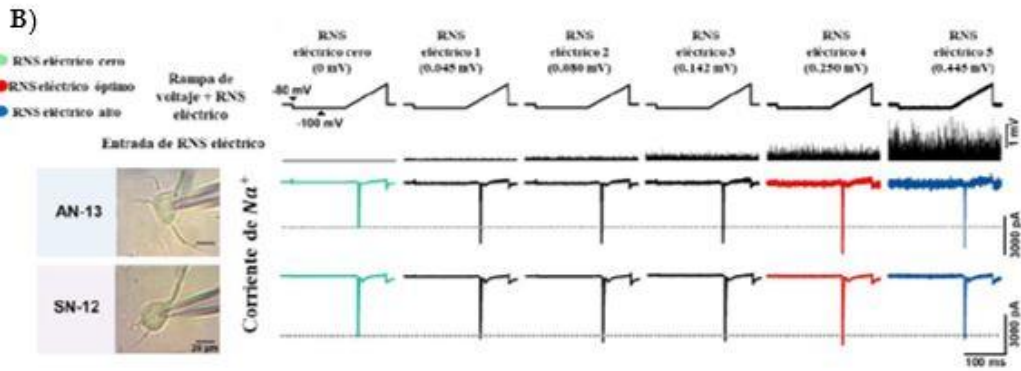
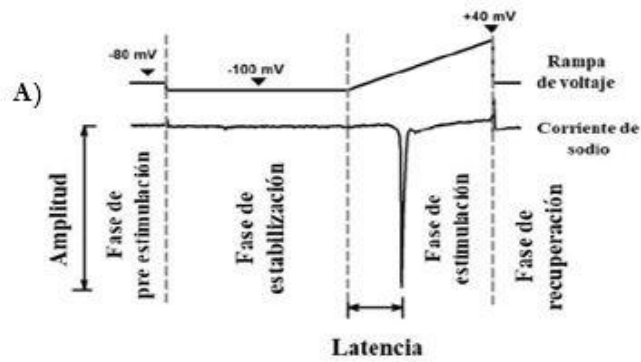
Por otro lado, en el trabajo de Remedios et al. del 2019, se muestran los efectos de la estimulación eléctrica ruidosa aleatoria (RNS por sus siglas en inglés) a corto plazo (250 ms) en neuronas piramidales cerebrales aisladas de forma aguda in vitro de la

corteza cerebral somatosensorial y auditiva. Ellos analizaron la correlación entre la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Na}^+$  y su latencia para diferentes niveles de RNS. Encontraron que en todas las neuronas piramidales registradas, la amplitud de la corriente entrante de  $\text{Na}^+$  sensible a TTX seguía una forma de U invertida en función al nivel de RNS eléctrico a corto plazo. Encontraron también que el RNS ejerce una modulación sobre las compuertas de activación o inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ . Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el RNS eléctrico sobre la corteza cerebral podría inducir la facilitación de la corriente de  $\text{Na}^+$  sensible a TTX a través de un aumento de la excitabilidad a un nivel intermedio de ruido.

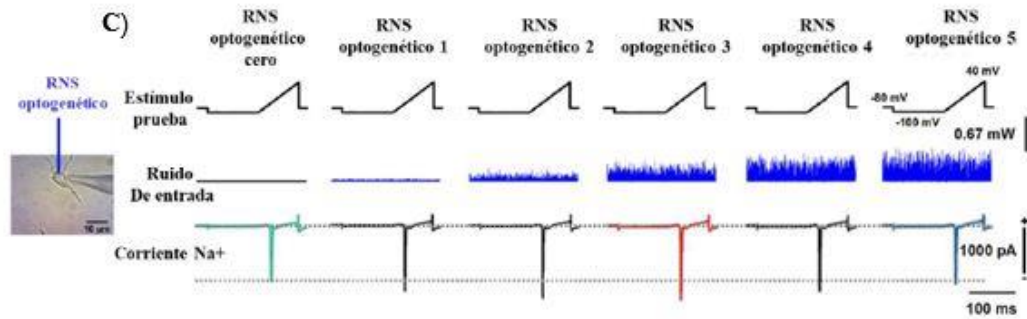
## **2.3 Efectos a corto plazo de la estimulación optogenética ruidosa**

En 2020, Mabil et al. investigaron si la naturaleza del ruido constituye el factor clave en el aumento de la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$ . Utilizando células piramidales genéticamente modificadas y aisladas, demostraron que el ruido optogenético browniano (BONP, 470 nm a 0.06 mW), aplicado a diferentes intensidades, puede incrementar la corriente entrante de  $\text{Na}^+$ .

Encontraron también que la intensidad óptima de ruido BONP reduce la latencia de la corriente de  $\text{Na}^+$ , lo que se asocia con una mayor amplitud de la corriente.

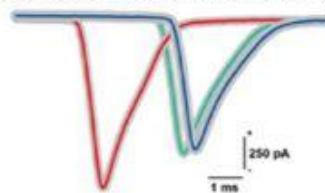


### Corriente de $Na^+$ (Ratón transgénico ChR2)



### Corriente de $Na^+$ (ratón transgénico ChR2)

D)

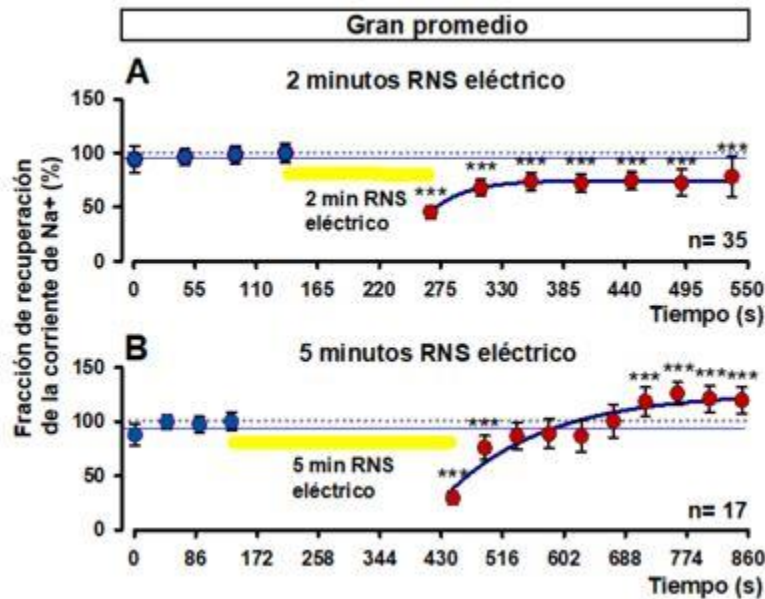


**Figura 11. Representación del método para analizar los efectos de RNS eléctrico y optogenético en la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> producidas por un protocolo de rampa de voltaje en neuronas disociadas de ratas Wistar.** (A) Detalles de la rampa de voltaje y cómo se midieron la amplitud máxima y la latencia de la corriente de Na<sup>+</sup>. (B) 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<sup>+</sup> para las condiciones de RNS eléctrico cero y cinco niveles diferentes de RNS eléctrico. (C) rampas de voltaje (estimulación de prueba) y las corrientes de Na<sup>+</sup> 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 Na<sup>+</sup> y el inverso de su latencia para una intensidad de RNS optogenética intermedia (que ocurre en RNS optogenética 3, en este caso). (D) Registros superpuestos de tres corrientes de Na<sup>+</sup> 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. Remedios y cols 2019.

## 2.4 Efectos a largo plazo de la estimulación eléctrica ruidosa

Profundizando en esto, Mabil et al. en 2020b, mostraron que la corriente de Na<sup>+</sup> de neuronas piramidales aisladas podrían exhibir efectos secundarios similares a los potenciales provocados motores inducidos por estimulación magnética transcraneal (TMS) después de tRNS. En este sentido, las neuronas que se estimularon con RNS eléctrico por 2 minutos, mostraron una reducción estadísticamente significativa en la amplitud máxima de la corriente de Na<sup>+</sup> pero sin recuperación; mientras que, las neuronas con estimulación de 5 minutos mostraron una reducción inicial significativa, seguida de una rápida tendencia a la recuperación y posterior facilitación.



**Figura 12 Reducción y recuperación de la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> sin recuperación. (b) Gran promedio de las corrientes de Na<sup>+</sup> para 17 neuronas piramidales que muestran una disminución más sustancial en la amplitud máxima de las corrientes de Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> durante la etapa de RNS eléctrico cero. Los círculos rojos, son las amplitudes normalizadas de las corrientes de Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, posteriores a la estimulación con RNS eléctrico con respecto al control (Mabil y col 2020b).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo aquí expuesto, se ha estudiado la respuesta neuronal por tRNS de tipo eléctrico a nivel de la corteza motora humana (Terney y cols 2008) y en la corteza somatosensorial de la rata (tesis de Lizarraga 2020). También se han caracterizado los efectos de dicho tipo de estimulación ruidosa en la excitabilidad en neuronas corticales aisladas, ejerciendo modulación sobre las compuertas de activación o inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> (Remedios 2019). Por lo que estos mecanismos explican, en parte, el incremento en el pico de la corriente de entrada de Na<sup>+</sup> como consecuencia de la aplicación de ruido optognético óptimo. De manera consistente, Mabil y cols., (2020b), probaron la inherencia del ruido para generar el incremento en dicha corriente mediante BONP, observando resultados similares a los encontrados por Remedios y cols., 2019.

Por otro lado, es importante mencionar que la estimulación eléctrica transcraneal alternante (tACS, por sus siglas en inglés) es una estimulación eléctrica de tipo sinusoidal, y que la tRNS es un tipo de tACS, pero con variaciones aleatorias en la amplitud y forma de dichas sinusoides. En esta tesis profundizaremos más en el estudio de este tipo de estimulación ruidosa RNS en modelos animales. Además, nos enfocaremos en explorar algunos de los mecanismos fisiológicos asociados, usando la electrofisiología en preparaciones in vivo. Para ello, tomaremos como punto de

partida los avances sobre este tema que hemos obtenido en nuestro laboratorio en los últimos 5 años.

Hemos encontrado que durante la estimulación eléctrica ruidosa (250 ms), la cual es una forma de estimulación eléctrica alternante aleatoria, se produce un incremento en la amplitud de los potenciales provocados por estímulos somatosensoriales (Castro, 2017) y en la amplitud de las corrientes de sodio de neuronas piramidales disociadas (Remedios y cols., 2019). A partir de un modelo del tipo Hodgkin-Huxley de estas neuronas piramidales, sabemos que el incremento en la amplitud de la corriente de sodio se asocia con el impacto del ruido eléctrico sobre las compuertas de activación e inactivación de los canales de sodio. También conocemos que una estimulación eléctrica ruidosa de larga duración de 5 minutos en neuronas piramidales aisladas produce un incremento sostenido en la amplitud de las corrientes de sodio después de la estimulación (Mabil y cols., 2020b). Ello contrasta con la ausencia de facilitación cuando se aplica una estimulación eléctrica ruidosa de más corta duración (de 2 minutos) (Mabil y cols., 2020b). También conocemos que la aplicación de 10 minutos de estimulación eléctrica ruidosa sobre la corteza de los barriles produce un incremento sostenido de hasta una hora en la amplitud de los potenciales provocados por estimulación de las vibrisas (Lizárraga-Cortés, 2020). Lo cual es consistente con estudios en humanos, en los que la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa (tRNS, por sus siglas en inglés) amplifica la amplitud de los potenciales motores provocados por la aplicación de pulsos magnéticos transcraneales en la corteza motora (Terney y cols., 2008).

En el presente trabajo de tesis nos planteamos implementar, en modelos animales, un protocolo de estimulación de tRNS similar al que Terney y colaboradores (2008)

emplearon en humanos. Asimismo, completaremos los experimentos de estimulación cortical eléctrica ruidosa de 2, 4, 5, 6 y 10 minutos en la preparación in vivo de la rata anestesiada, en la que se estimulan las vibrisas para producir potenciales provocados somatosensoriales en la corteza de los barriles. Además, examinaremos estas preguntas en animales transgénicos Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP, con la finalidad de explicar posibles mecanismos de la RNS sobre los circuitos de la corteza de los barriles.

Para ello nos planteamos la siguiente hipótesis:

## 4. HIPÓTESIS:

La estimulación eléctrica ruidosa, sobre el cerebro de la rata y ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP, produce efectos facilitadores en los potenciales provocados somatosensoriales cuando se aplica con duraciones de más de 4 minutos. Sin embargo, produce efectos inhibidores cuando se aplica por debajo de los 4 minutos. Dichos efectos diferenciales dependen de un balance en la activación de neuronas GABAérgicas y Glutamatérgicas en los microcircuitos de la corteza cerebral. Proponemos que un modelo tipo Hodgkin-Huxley de dicho microcircuito, será útil para replicar y explicar los resultados experimentales.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar experimental y teóricamente los post-efectos de la estimulación eléctrica ruidosa de diferentes duraciones sobre la corteza somatosensorial, en la amplitud de los potenciales somatosensoriales provocados por estimulación de las vibrisas en la rata y en ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Reproducir en la rata un protocolo de estimulación análogo al de tRNS de alta frecuencia que Terney y colaboradores (2008) emplearon en humanos. Para ello, se propone completar los experimentos de estimulación tRNS de alta frecuencia de 2, 4, 5, 6 y 10 minutos en la corteza de los barriles, y examinar sus efectos post-estimulación sobre la amplitud de los potenciales somatosensoriales de campo y multiunitarios que se producen por estiramiento de las vibrisas.
2. Caracterizar los cambios en la frecuencia y en los patrones de actividad eléctrica unitaria de neuronas de la corteza de los barriles, para examinar los cambios en excitabilidad de las neuronas corticales después de la aplicación de los estímulos eléctricos de larga duración del objetivo 1.

3. Evaluar como la estimulación eléctrica cortical ruidosa puede afectar a diferentes niveles de la corteza de los barriles.
4. Emplear la estimulación optognética ruidosa en la corteza de los barriles de ratones Thy1-ChR2-YFP relacionadas con la liberación de glutamato, y VGAT-ChR2-YFP, relacionadas con la liberación de GABA, para estudiar su interacción con los efectos de la estimulación eléctrica ruidosa en la misma corteza.
5. Desarrollar un modelo del tipo Hodgkin-Huxley y del modelo de la “bola y la cadena” de Amstrong-Bezanilla, que explique los resultados experimentales y que a su vez permita hacer predicciones para realizar nuevos experimentos en el contexto de los mecanismos funcionales asociados a la estimulación eléctrica ruidosa.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Modelo de estudio y aspectos éticos

El protocolo de experimentación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Neurofisiología Integrativa del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El modelo de estudio fueron ratas Sprague Dawley adultas (de 250g a 300 g) sin distinción de sexo, proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Además de usamos ratones C57 proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, así como ratones transgénicos Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP que fueron obtenidos de Jackson Lab (JAX USA) y proporcionados por el laboratorio de Neurobiología del Apetito, a cargo del Dr. Ranier Gutiérrez, investigador del departamento de Farmacología del CINVESTAV-IPN. El canal ChR2 es un canal catiónico que despolariza la neurona cuando es iluminada con luz azul (Wang et al 2007).

Todos los experimentos cumplieron con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio estipulados en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, la guía contenida del National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (85-23, revisado en 1985) y The European Communities

Council Directive of 24-November-1986 (86/609/EEG). Además, fue evaluado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (protocolo 0495 para rata y 0214 para ratón).

## 6.2 Obtención de potenciales provocados *in vivo*

La rata fue suministrada con una mezcla de Xilazina (13 mg/kg), Acepromazina (1.5 mg/kg) y Ketamina (65 mg/kg) mientras que el ratón fue Xilazina (10 mg/kg), Acepromazina (2 mg/kg) y Ketamina (90 mg/kg) de manera intraperitoneal. El efecto de la anestesia se corroboró a través del reflejo palpebral y del reflejo de retirada después de 20 minutos aplicada la anestesia. Para mantener un adecuado nivel de anestesia, adminstramos dosis de la mezcla de ketamina/xylacina/acepromacina cada 60-90 min (Hudiobro et al. 2017)

Se procedió a hacer un trepano contralateral al estímulo de la vibrisa sobre la corteza de barriles. Además de retirar la dura madre  $\sim 5 \text{ mm}^2$ . El trepano se rellenó con aceite mineral y se mantuvo al animal alrededor de  $37^\circ \text{ C}$ . Posteriormente a esto se registró con electrodo de superficie sobre las corteza de los barriles, mediante electrodo de plata clorurada (Ag-ClAg), el cual estuvo conectado a un amplificador Grass P511 con filtro pasa bandas 0.3 s 10 kHz y amplificación se realizó con Grass P511 AC amplifier a 5000x, con la finalidad de obtener la actividad basal del cerebro, y posteriormente la obtención de los potenciales provocados somatosensoriales. A todos los animales se colocó sistema de registro electrocardiográfico (ECG) para mostrar signos vitales y como parámetro adicional para aplicar anestesia. Las señales fueron digitalizadas con una Digidata System 1440 (Molecular Devices, Axon Instruments).

Por otra parte, una vez realizado el registro de campo se procedió a marcar la zona, y registrar la actividad de los potenciales extracelulares multiunitarios mediante una matriz de 5 microelectrodos de fibra de cuarzo / platino-tungsteno en arreglo puntual (impedancia de 5–7 MOhm y frecuencia de muestreo fue de 50 KHz) con el sistema Minimatrix (SUA-Filter Version, Thomas Recording, GmbH, Giessen, Germany) ( Hudobro, 2018). Las señales fueron amplificadas (100-1000x), filtradas en línea (pasabandas 0.5-5kHz) con el mismo sistema MiniMatrix y digitalizadas con una Digidata System 1440 (Molecular Devices, Axon Instruments).

Los potenciales locales de campo se registraron mediante una micropipeta de vidrio rellena de NaCl 1.2 M y 10 MOhm. Las micropipetas fueron fabricadas con Flaming/Brown Micropipette Puller model P-97 (Manjarrez et al 2000). Se empleó el micromotor a pasos Burleigh 6000 Ichworm Position kit con la finalidad de registrar en diferentes profundidades en un rango de 60 a 600  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.1 Obtención de potenciales somatosensoriales provocados

El estiramiento de las vibrisas de la rata consistió en pulsos protractiles de 1 ms y 1 Hz con 11 intensidades diferentes (Huidobro et al 2017). Esto permitió obtener los potenciales provocados somatosensoriales y así poder realizar las curvas entrada salida. Los potenciales provocados somatosensoriales se registraron mediante un electrodo de superficie sobre la corteza de los barriles.

A)

### Obtención de Potenciales Provocados *in vivo*

#### Anestesia

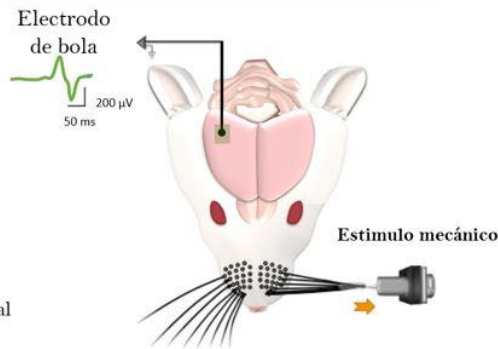
Ratas Sprague Dawley  
Macho, de 3 meses 300 gr  
**Mezcla:**  
Xilacina ..... 10mg/kg  
Ketaminina ..... 70 mg/kg  
Acepromacina.... 1.5 mg/kg

#### Cirugía

**Craneotomía**  
Corteza de los barriles contralateral  
Corteza Motora contralateral

#### Registro

Electrodo de superficie de Ag-AgCl  
Grass modelo P511  
Filtros pasabanda 0.3 a 10 k Hz

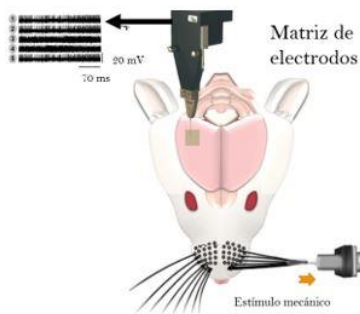


#### Estimulación

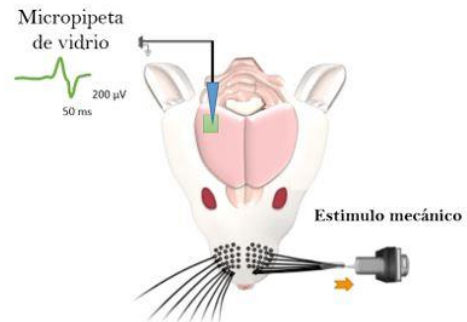
#### Potenciales Provocados Somatosensoriales (SSEP)

5 ms  
f<sub>r</sub> = 1 Hz  
Protracción de vibrisas  
Pulsos Mecánicos  
5 ms, 0.01 a 5x10<sup>-3</sup>N 1Hz

B)



C)

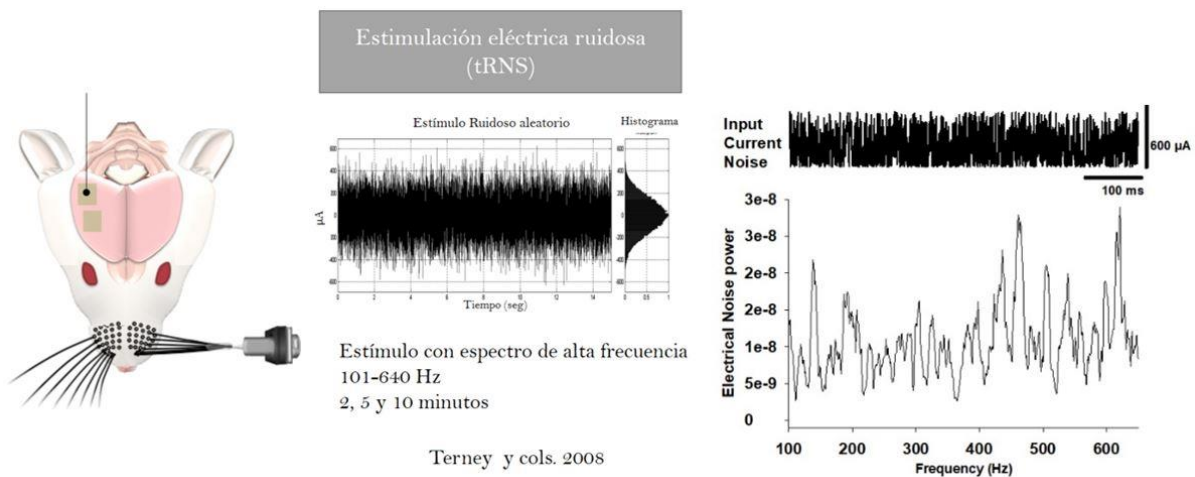


**Figura 13. Obtención de potenciales provocados.** Se muestra el esquema para generar potenciales provocados somatosensoriales en la rata anestesiada. A) se muestra el tipo de registro mediante electrodo de plata (Ag-ClAg) de superficie sobre la corteza de los barriles. B) se muestra el tipo de registro para la actividad eléctrica multiunitaria la cual se hará mediante una matriz de electrodos intracorticales de platino-tungsteno (Pt-W). C) Se muestra el registro con micropipeta de vidrio relleno de solución NaCl al 1.2 M.

## 6.3 Estimulación eléctrica

### 6.3.1 Estimulación eléctrica ruidosa (tRNS)

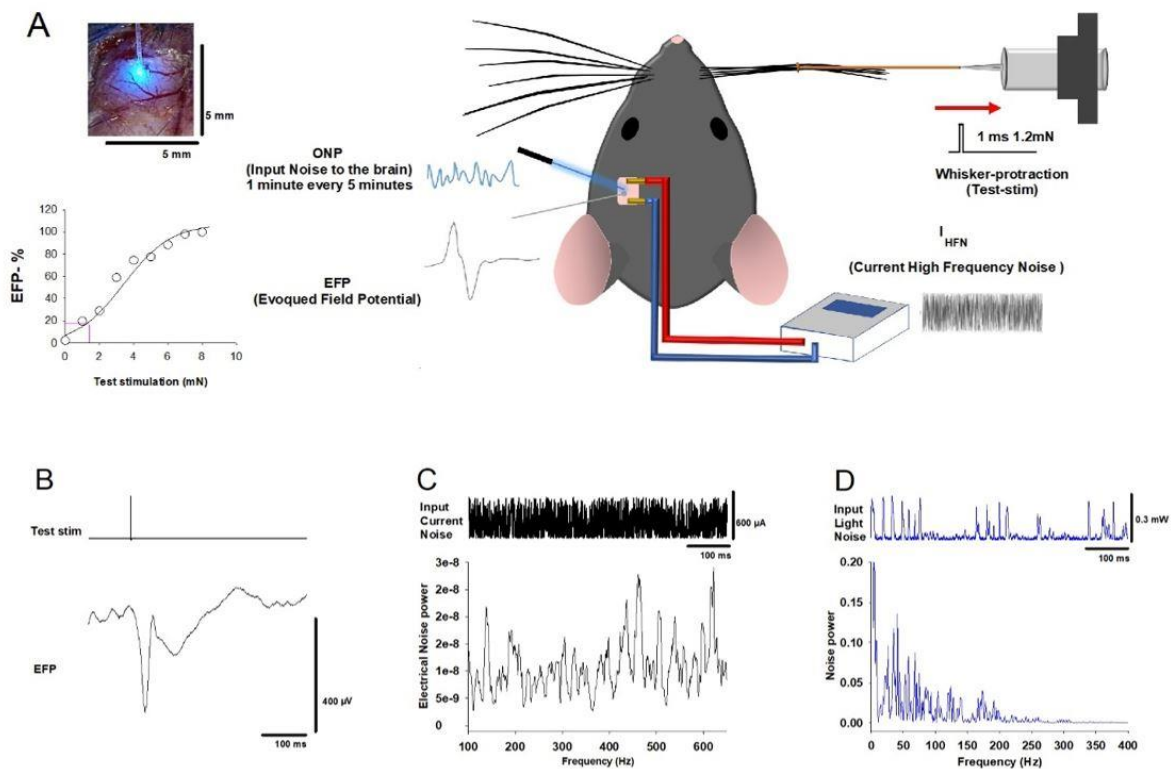
Se procedió a replicar el protocolo de Terney y cols 2008; es decir, se aplicó estímulo eléctrico ruidoso de alta frecuencia (101-640 Hz) sobre la corteza somatosensorial, durante periodos de 2, 4, 5, 6 y 10 minutos de estimulación. Esto se realizó con la finalidad de encontrar resultados similares a los reportados por el grupo de Terney en la corteza motora; es decir, un incremento en los potenciales provocados somatosensoriales.



**Figura 14. Estimulación eléctrica.** Se ilustran los dos tipos de estimulación eléctrica, la tACS y la tRNS de alta frecuencia. Estos tipos de estimulación se aplicaron en la corza de los barriles con la finalidad de encontrar alguna modificación en la amplitud en los potenciales provocados.

## 6.4 Estimulación óptica

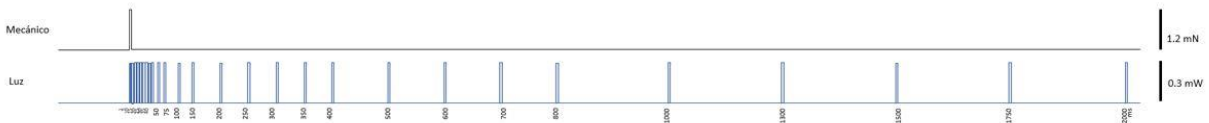
Para este apartado solo se emplearon ratones, ya que sirvió para estudiar el efecto de la estimulación óptica que hace que las neuronas corticales liberen glutamato o GABA, dependiendo del ratón estimulado con luz. Para esto, a los ratones Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP y C57 se estimularon primero con corriente eléctrica, con 2 y 10 min de estimulación, pasados 20 minutos de culminar la estimulación con corriente, se procedió a estimular con luz, por un minuto cada 5 minutos, por 2 horas.



**Figura 15 Esquema del experimento en ratones.** El protocolo de estimulación consistió en la protracción de los bigotes, mientras se aplicaba ruido eléctrico u óptico a la corteza somatosensorial primaria (S1). Se utilizó ruido eléctrico de alta frecuencia en el rango de 100 a 640 Hz. La amplitud de los potenciales evocados por los bigotes se midió antes y después de administrar esta estimulación eléctrica con ruido aleatorio a la corteza somatosensorial primaria (S1). A) Se muestra el trepano sobre la corteza somatosensorial y el radio de iluminación por el láser, además de realizar curvas de estímulo-respuesta para obtener un nivel intermedio de fuerza de estimulación. B) potencial obtenido por la protracción mecánica de las vibrisas con intensidad de 1.2 mN. C) Se muestra el estímulo eléctrico ruidoso de alta frecuencia aplicado sobre la corteza de 600  $\mu$ A. En la parte inferior, se muestra el espectro de potencia de la corriente aplicada. Podemos observar que sus rangos son de 101-640 Hz, similar al que reportó Terney et al en 2008. D) Se muestra la estimulación óptica aplicada por el láser sobre la corteza somatosensorial. La amplitud del estímulo es de 0.3 mW. En la parte inferior se muestra su espectro de potencia en un rango de 1 a 300 Hz.

Por otra parte, se procedió a estimular a los ratones, a través de pulsos pareados, es decir, en una ventana de 2. Se procedió a dar un pulso mecánico, y posteriormente se dio un pulso de luz. El intervalo entre el pulso mecánico y óptico se varió para medir cómo se afecta la respuesta de actividad eléctrica entre la parte mecánica y

óptica. Cabe mencionar que esta sección se utilizó para entender la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores.



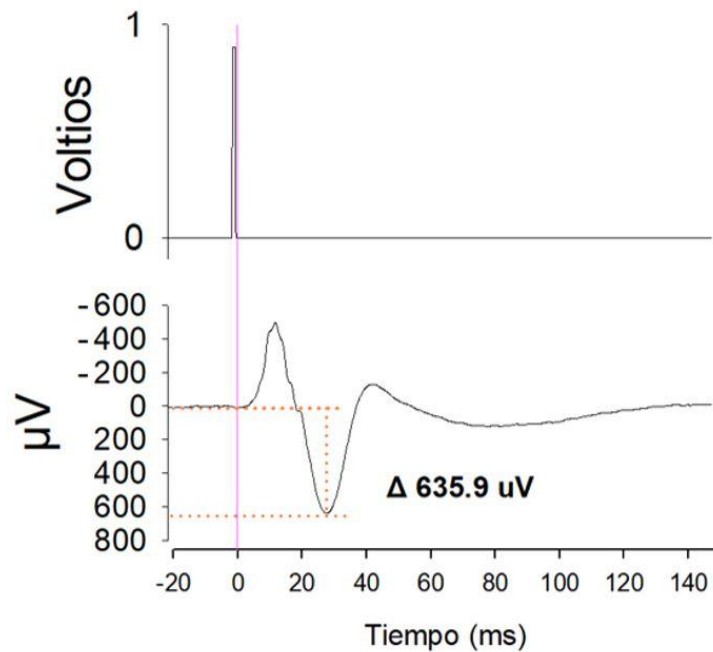
**Figura 16. Esquema del protocolo de pulsos pareados.** La línea superior negra se muestra la proyección mecánica de la vibrisa, mientras que en la parte inferior se muestra pulsos ópticos que aplicaron sobre la corteza somatosensorial. Esto con la finalidad de evaluar el efecto de la liberación de Glutamato y GABA sobre la generación del potencial provocado.

## 6.5 Propuesta de análisis de datos

### 6.5.1 Análisis de registros de campo

Una vez obtenido el valor ideal para la estimulación, se registraron los potenciales provocados. Se analizó la amplitud de la basal al pico, y se comparó entre los potenciales sin estimulación contra los potenciales posteriores a la estimulación. Se eligió tomar la amplitud de la basal hacia el pico positivo ya que este pico (P1) refleja la activación inicial de la corteza por la señal sensorial ascendente y su amplitud está determinada estrictamente por la intensidad del estímulo. Esta elección se basó en la evidencia de que el estímulo fue transmitido con precisión a la corteza. (Cauller L. J. y Kulics A.T. 1991, Jellema y cols., 2004). De acuerdo con Adrian en 1940, este

componente positivo se puede ver reflejado en la corteza somatosensorial, y permanece aun siendo removida la materia gris y registrando directamente sobre la materia blanca. Dicho de otra manera, esta deflexión que compone al potencial corresponde a las fibras ascendentes.



**Figura 17. Potencial somatosensorial de la corteza de los barriles, provocado por la estimulación mecánica de las vibrisas en la rata. Se ilustra la forma en que se midió la amplitud de dicho potencial de la basal al pico positivo.**

Para medir la existencia de variaciones de amplitud del potencial generadas por la estimulación eléctrica, se procedió a normalizar la amplitud de los potenciales provocados. Para ello, se calculó la amplitud promedio de la actividad registrada antes de la estimulación, y cada amplitud medida posteriormente fue normalizada

dividiéndola entre dicho valor promedio. De esta forma, la amplitud previa al estímulo eléctrico se mantuvo alrededor de 1, mientras que la amplitud posterior se pudo medir su variación. La estrategia descrita anteriormente, también se usó para los ratones optogenéticos, para evaluar el efecto de la estimulación óptica por 2 y 10 minutos.

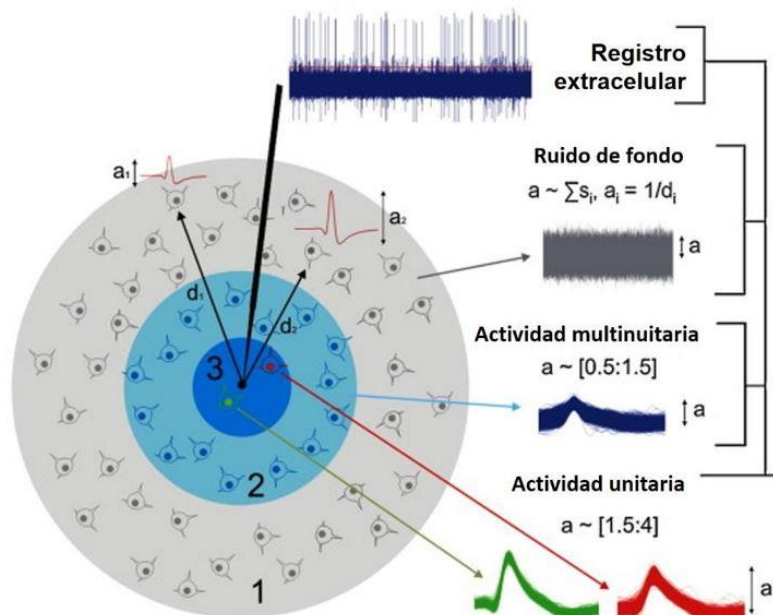
## 6.5.2 Examinación de los efectos de la estimulación eléctrica transcraneal sobre los potenciales extracelulares multiunitarios

Los registros realizados comprenden múltiples canales de voltajes extracelulares muestreados continuamente. Un paso clave para hacer que estos datos sean interpretables es la clasificación de espigas, el proceso de detección de eventos de espigas y la asignación de esos eventos a unidades individuales correspondientes a supuestas neuronas individuales (Einevoll et al., 2012, Harris et al., 2016, Lewicki, 1998, Muller, 1996, Quiroga 2012).

Una serie de desafíos hacen que la clasificación de espigas sea más compleja que la clasificación en otras disciplinas (Chung et al., 2016). Esto se debe a que los datos no son señales de ruido simple. La señal de fondo surge de las combinaciones de múltiples señales complejas, incluyendo pequeñas espigas de cientos de neuronas distantes y que pueden contener ruido eléctrico mezclado con verdaderas señales neuronales (Einevoll et al, 2012). Por otra parte, la variación en las formas de onda para una célula dada puede ser altamente no gaussiana y sesgada, particularmente cuando se produce un estallido de descarga neuronal (Harris et al., 2001, Quirk et al., 2001, Quirk y Wilson, 1999) o cuando las posiciones de la neurona se despolarizan con el tiempo en relación con el electrodo físico (Bar-Hillel et al., 2006,

Calabrese y Paninski, 2011, Chestek et al., 2007, Emondi et al 2004). Además, las neuronas pueden disparar simultáneamente, lo que lleva a señales de picos superpuestos en el tiempo. Aunque esto podría no ocurrir con frecuencia en ciertas áreas del cerebro. Sin embargo, con pequeñas matrices de electrodos se pueden registrar decenas a cientos de neuronas en que las espigas individuales a menudo se superponen en el tiempo con otros eventos (Ekanadham et al., 2014, Franke et al., 2010)

Cada registro presenta múltiples actividades de neuronas, por lo que se agruparon mediante el software libre *Wave Clus* para Matlab. Este software consiste en juntar neuronas en grupos basándose en la similitud de sus formas (amplitud, longitud, pendiente). Dado que, en principio, cada neurona tiende a generar potenciales de acción (espigas) de forma particular, los grupos resultantes corresponden a la actividad de diferentes neuronas putativas.



**Figura 18. Descripción general del enfoque de simulación.** Las neuronas en el área 1 generan la actividad de ruido, que está dada por la superposición de sus picos. Cada amplitud máxima está modulada por su distancia “ $d_i$ ” al electrodo de registro (en el centro de la esfera). La actividad de las neuronas en las áreas 2 y 3 (actividad de unidades múltiples y unidades individuales, respectivamente) se crea agregando picos en la parte superior del ruido de fondo, siguiendo las distribuciones de amplitud típicas medidas para picos de unidades múltiples y unidades únicas (Quiroga y cols. 2004; Martínez y cols. 2009).

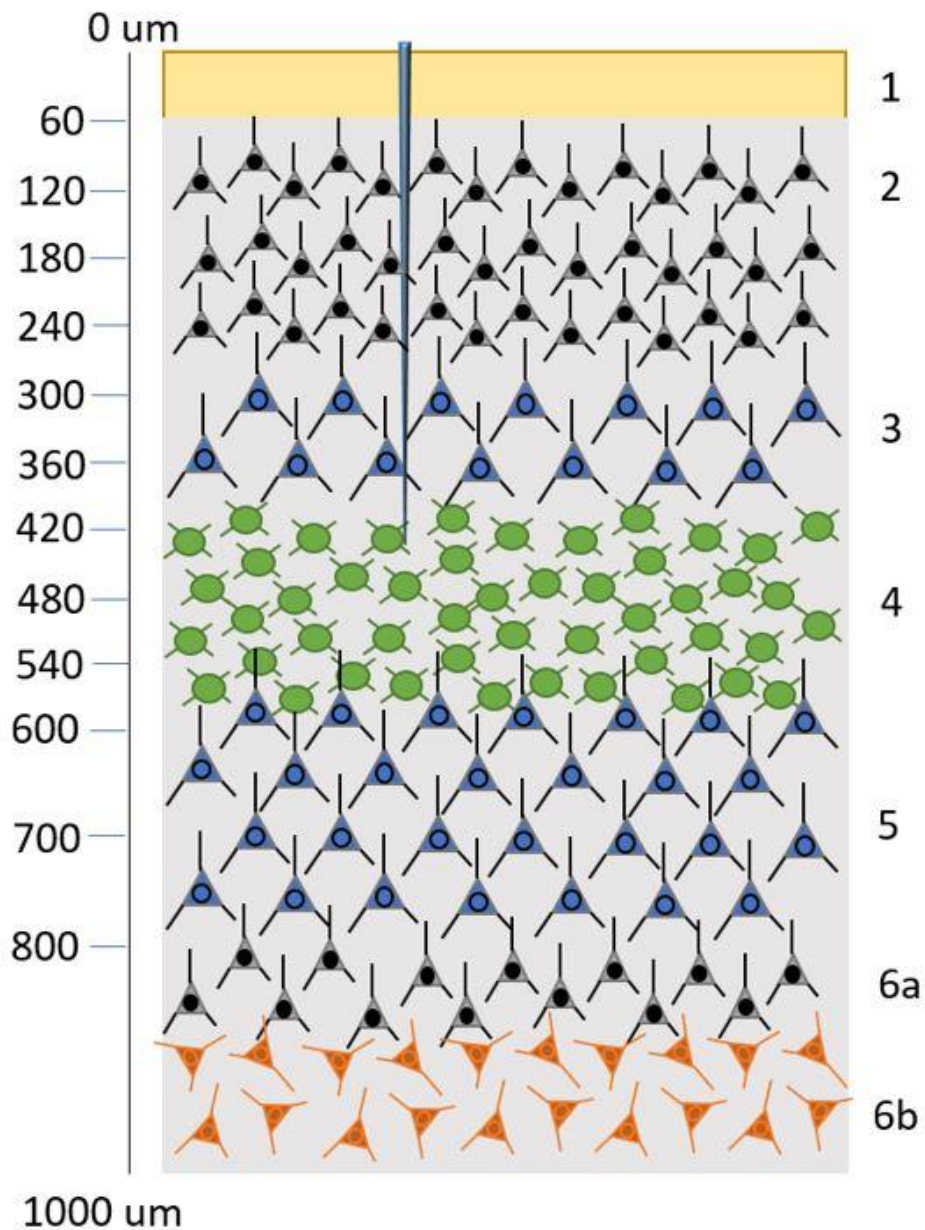
Una vez realizado esto, se procedió a medir la frecuencia instantánea de descarga de las neuronas previas y posteriores a la estimulación eléctrica. Con base en esta medida, se compararon sus frecuencias y patrones de descarga para determinar si existe alguna diferencia.

### 6.5.3 Examinación de los efectos de la estimulación eléctrica transcraneal sobre los potenciales de campo locales

Se registró de manera simultánea la actividad de los potenciales provocados medidos desde la superficie e intracorticalmente. Debido a que solo contábamos con un sistema de registro para micropipeta, tuvimos que esperar a realizar 60 barridos para reconstruir la actividad promedio de los potenciales provocados y posteriormente bajar de profundidad. Realizamos registros desde los 60 hasta los

600  $\mu\text{m}$  en intervalos de 60  $\mu\text{m}$ . Esta situación nos permitió registrar desde lámina 2 hasta la lámina 5, garantizando registro en zonas de interés con aferencias somatosensoriales. Esta técnica de registro nos tomó 15 minutos para completar, desde la parte superior hasta la inferior.

El protocolo consistió en registrar una hora previa, posteriormente se estimuló con corriente ruidosa.



**Figura 19. Esquema de registro de la actividad intracortical.** Se muestra esquemáticamente la estructura de la corteza somatosensorial de la rata. Los registros se realizaron desde los 60 hasta 600  $\mu\text{m}$ , por lo que los registros se obtuvieron de las láminas 2,3, 4 y 5 que corresponden a la parte sensorial de la corteza. Esquema tomado de Luhmann et al 2009, Kanold and Luhmann 2010 y Feldmeyer et al 2012 y modificado con datos de Yu et al. de 2019.

## 7. RESULTADOS

Primero se realizaron experimentos para registrar la actividad basal de la corteza cerebral en la rata anestesiada. Esto se hizo para comprobar la estabilidad de la preparación animal. Posteriormente, se obtuvieron registros de los potenciales provocados somatosensoriales, como a continuación se explica.

### **7.1 Efecto de la estimulación eléctrica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo de superficie**

Se analizó el efecto de la estimulación RNS de alta frecuencia de 30 ratas estimulando directamente la corteza somatosensorial (de los barriles). Verificamos primero la respuesta de la corteza a la protracción de las vibrisas. Posteriormente, se realizaron curvas de estimulación (intensidad vs amplitud) y se procedió a estimular mecánicamente al 30% de intensidad a la respuesta máxima. Se procedió a medir la amplitud basal previa a cualquier estimulación. En particular, medimos la amplitud del voltaje basal al pico del potencial.

Se realizaron cuatro series experimentales con 10 ratas cada una. En cada serie experimental registramos la amplitud basal de los SSEP por una hora. Posteriormente se estimuló con RNS de alta frecuencia (101 a 640 Hz) a 600 $\mu$ A con duración de 2, 4 y 5 min, además de la estimulación simulada. Al término de la

estimulación se continuó con el registro de los potenciales somatosensoriales. Para su análisis, la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales se normalizó a 1, con respecto a la amplitud promedio del control.

### 7.1.1 Estimulación con 2 min tRNS de alta frecuencia

Para la estimulación de 2 min con tRNS de alta frecuencia a 600  $\mu$ A, encontramos una disminución en la amplitud de dichos potenciales casi en todos los sujetos. Dicha disminución fue entre el 60 al 40%; la cual se mantuvo por tiempo prolongado (entre 139 a 240 minutos, ver Figura 20). Posteriormente, se volvió a estimular en la misma zona de la corteza y mismos electrodos con RNS de alta frecuencia a 600  $\mu$ A de 5 min de duración, ya que de acuerdo con Chaieb y cols en 2011, dicho tiempo de estimulación produce incremento en la amplitud de los potenciales. Como se puede apreciar en la figura 19, dicha estimulación facilitó la amplitud basal de los potenciales previa a la estimulación de 2 minutos.

**Estimulación con RNS de alta frecuencia (101-640 Hz)  
de 600µA con duración de 2 minutos**

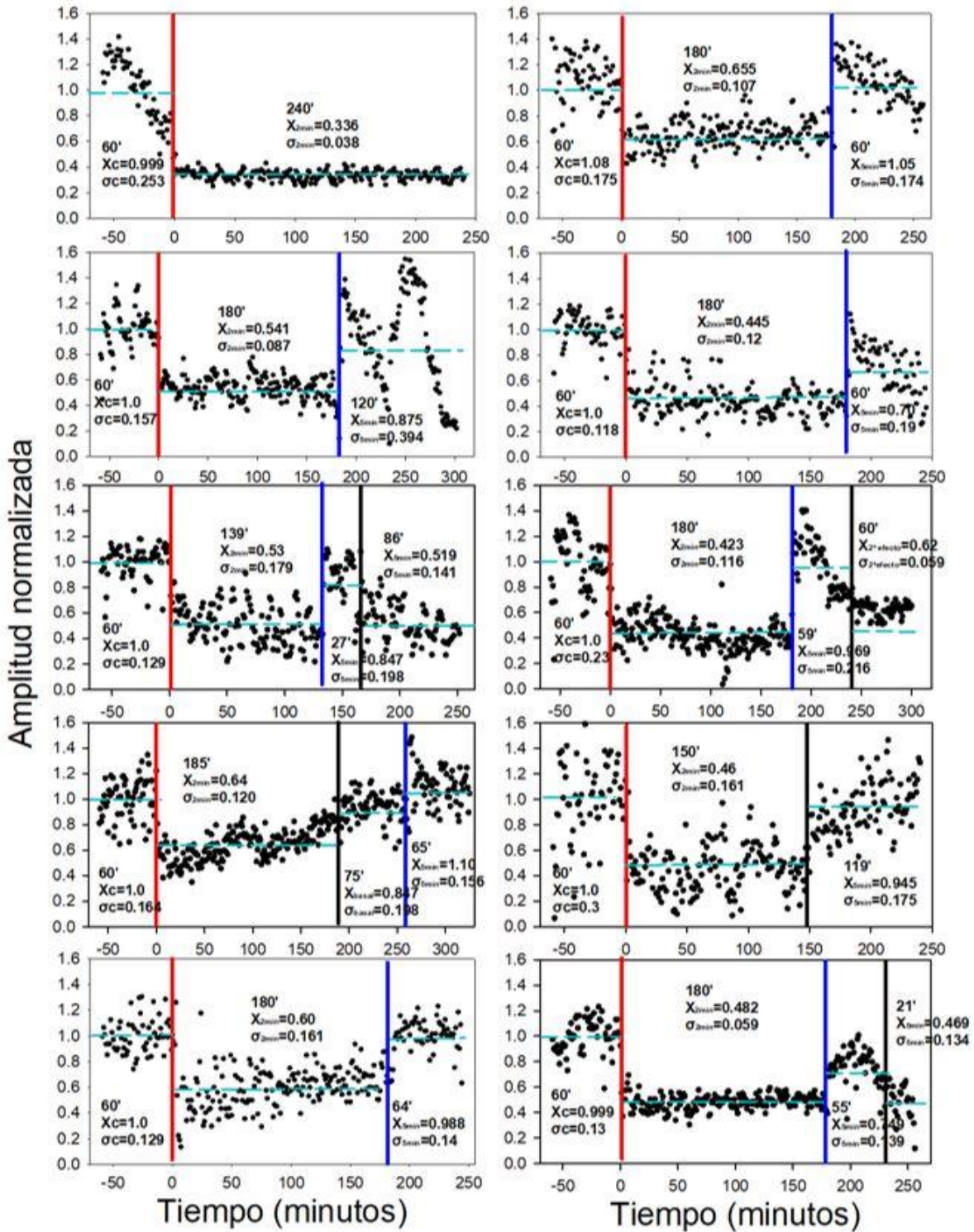


Figura 20. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600µA de 2 min. Se ilustra la estimulación RNS de alta frecuencia de 2 minutos de duración con una línea roja la cual disminuye la amplitud de los potenciales. El efecto de la estimulación disminuye la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. La línea azul indica la estimulación con tRNS de 600µA de 5 min, dicha estimulación incrementa la amplitud de los potenciales.

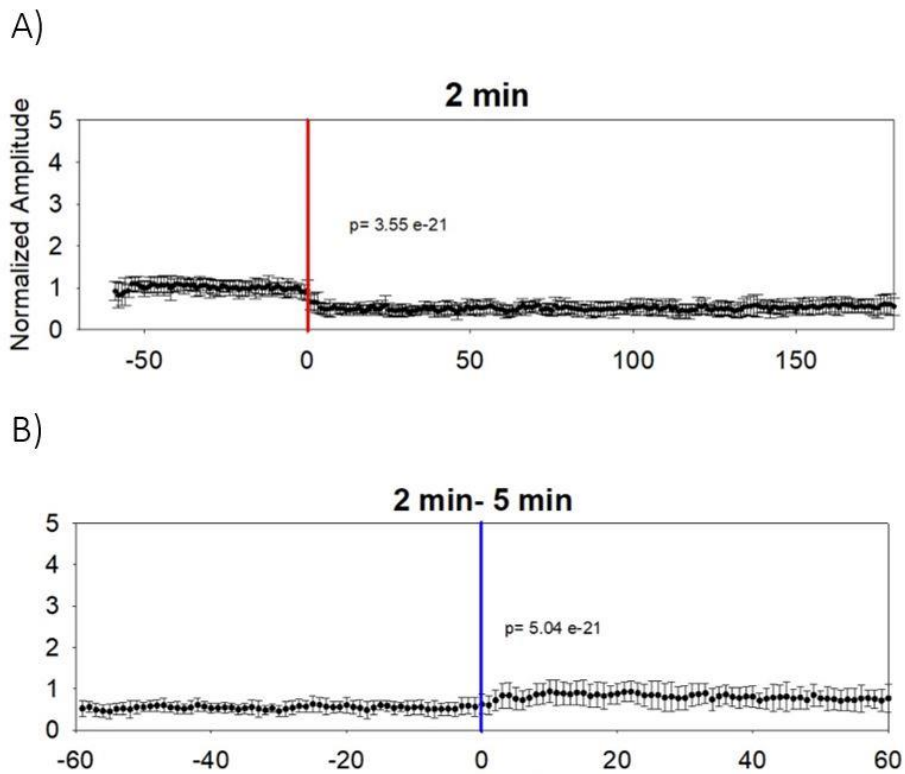


Figura 21. Promedio de la estimulación con RNS de alta frecuencia de 600µA de 2 min. Se ilustra la actividad promedio de las 10 ratas, así como también su desviación estándar. A) La línea en color rojo es cuando se realizó la estimulación de 2

minutos. Posteriormente se mantuvo por más de dos horas disminuidas la amplitud a un 60%. B) Posteriormente se estimuló con 5 min, y se recuperó la amplitud control.

### 7.1.2 Estimulación con 4 min RNS de alta frecuencia

Para la estimulación de 4 min con RNS de alta frecuencia a 600 $\mu$ A, se muestra un ligero incremento con respecto al registro previo a la estimulación. De acuerdo con Chaieb y cols. en 2011, ellos no encontraron un incremento alguno con respecto a potenciales motores en sujetos humanos con dicha estimulación. Sin embargo, el incremento que nosotros mostramos fue del 15%  $\pm$ 13 (figura 14). Consideramos que esto puede deberse al tipo de modelo que usamos; es decir, fue estimulación directa a la corteza somatosensorial de la rata, así como una menor distancia (4 mm) entre electrodos de estimulación. Una vez realizada la estimulación de 4 min, observamos su efecto sobre la amplitud de los SSEP. Se esperó a que la señal regresara a su amplitud basal previa a la estimulación; posteriormente, se aplicó nuevamente estimulación en la misma zona cortical y con los mismos electrodos, utilizando tRNS de alta frecuencia a 600  $\mu$ A durante 2 minutos. Como se puede apreciar en la figura 14, dicha estimulación produjo una disminución en la amplitud de los potenciales en un promedio un 50% respecto a la amplitud basal.

**Estimulación con RNS de alta frecuencia (101-640 Hz) de 600µA duración de 4 minutos**

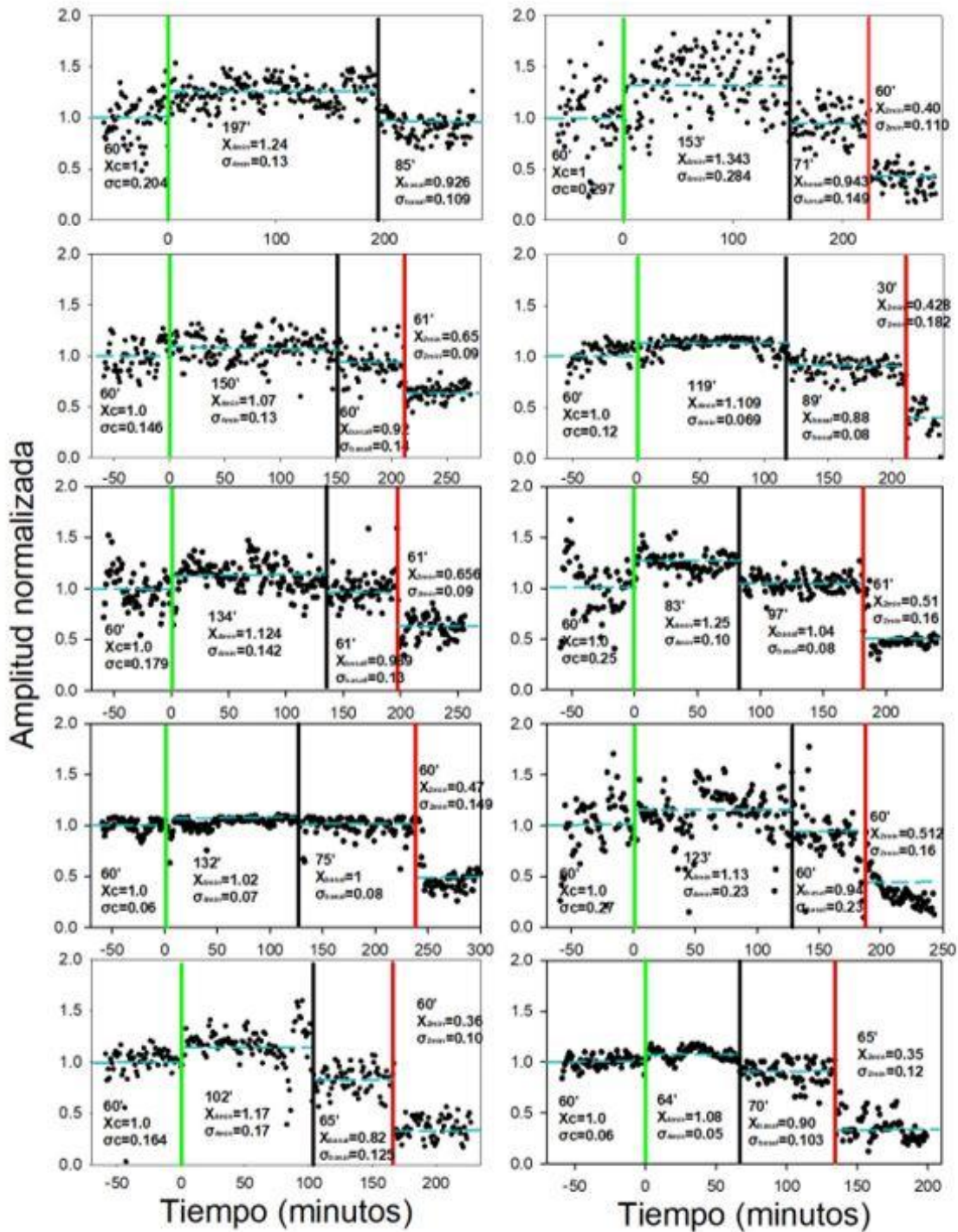
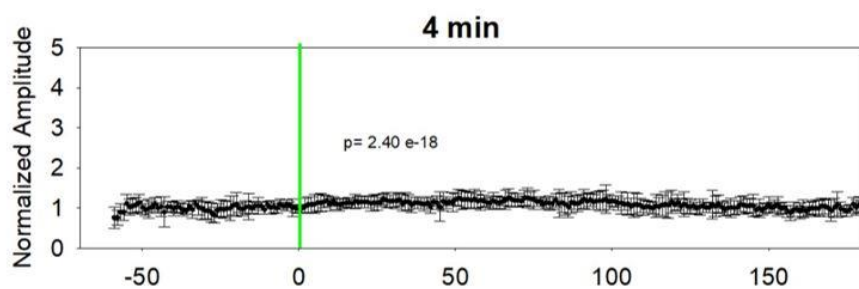


Figura 22. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de  $600\mu\text{A}$  de 4 min. Se ilustra la estimulación RNS de alta frecuencia de 4 minutos de duración con una línea verde la cual incrementa la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. La línea roja indica la estimulación con RNS de  $600\mu\text{A}$  de 2 min, dicha estimulación disminuye la amplitud de los potenciales.

A)



B)

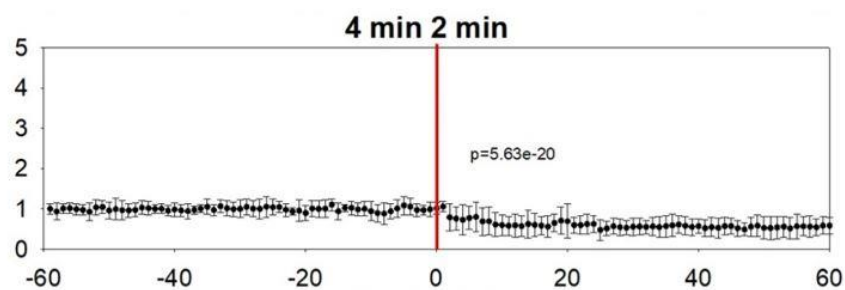


Figura 23. Promedio de la estimulación con RNS de alta frecuencia de  $600\mu\text{A}$  de 4 min. Se ilustra la actividad promedio de las 10 ratas, así como también su desviación estándar. A) La línea en color verde es cuando se realizó la estimulación de 4 minutos. Posteriormente se mantuvo por más de dos horas sin

un incremento visible, sin embargo, a hacer la estadística, se muestra cambios significativos. B) Posteriormente se estimuló con 2 min, y se disminuyó la amplitud a lo anteriormente reportado.

### 7.1.3 Estimulación con 5 min RNS de alta frecuencia

La estimulación de 5 minutos con ruido de alta frecuencia (tRNS) a 600  $\mu$ A mostró un incremento en la amplitud respecto al registro previo, lo cual es consistente con lo reportado por Chaieb et al. (2011). Este incremento fue del 90 %  $\pm$  35 % en comparación con la línea basal. Una vez finalizada la estimulación, se evaluó su efecto sobre la amplitud de los potenciales somatosensoriales evocados (SSEP). Posteriormente, se esperó a que la señal regresara a su amplitud basal y se aplicó nuevamente estimulación en la misma zona cortical y con los mismos electrodos, utilizando tRNS de alta frecuencia a 600  $\mu$ A durante 2 minutos. Como se muestra en la Figura 15, esta segunda estimulación redujo la amplitud de los potenciales en un promedio del 50 % respecto a la línea basal.

## Estimulación con RNS de alta frecuencia (101-640 Hz) de 600 $\mu$ A duración de 5 minutos

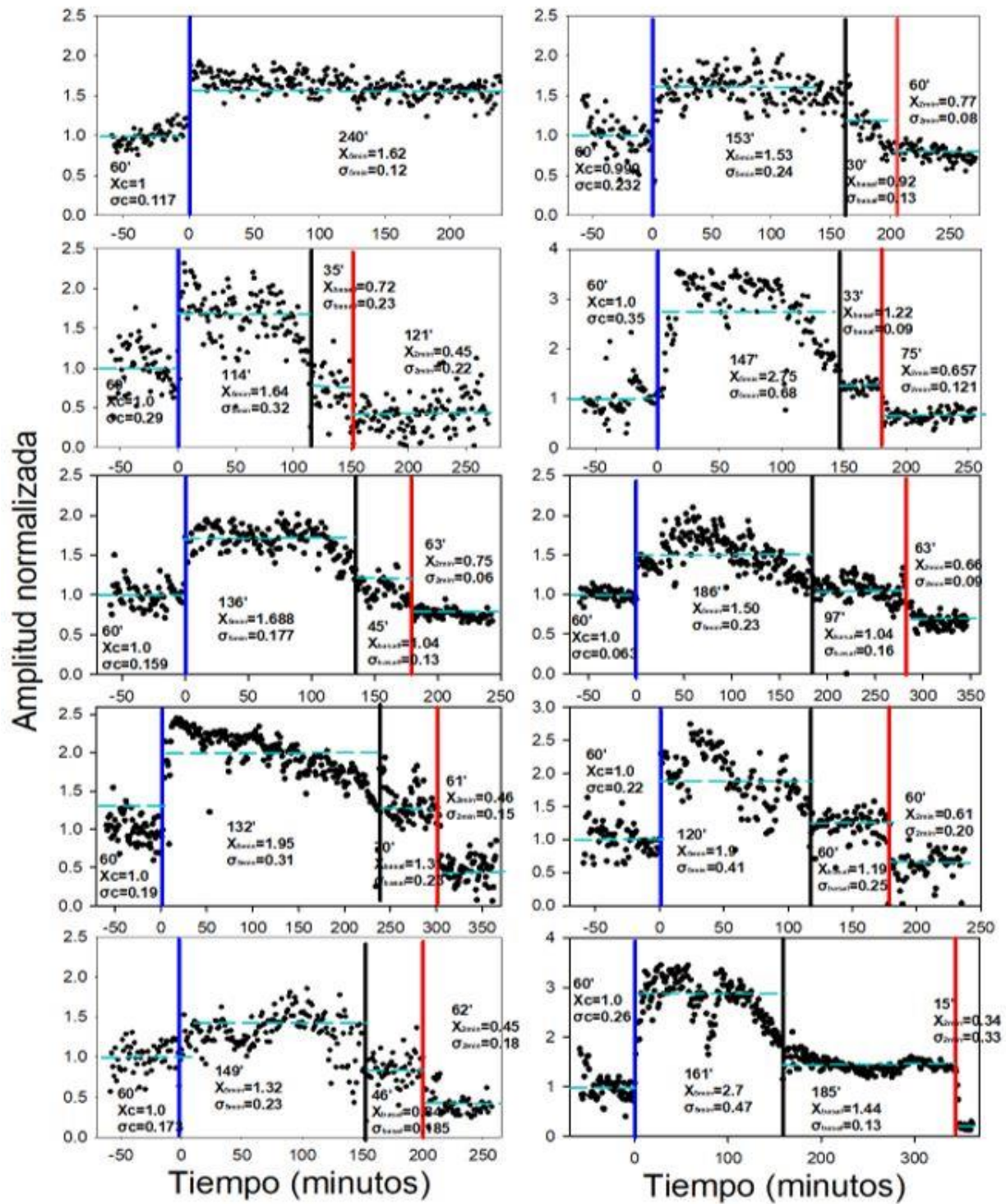
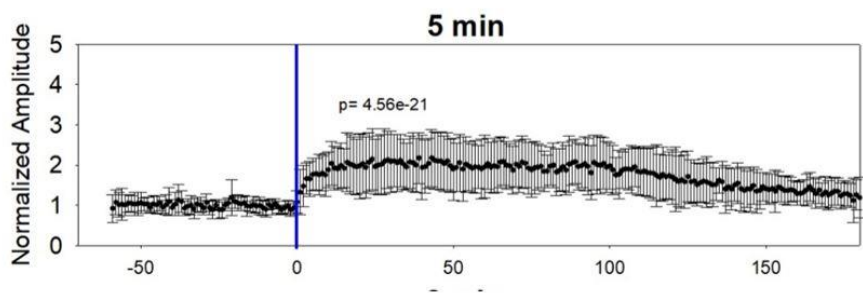


Figura 24. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de  $600\mu\text{A}$  de 5 min. Se ilustra la estimulación RNS de alta frecuencia de 5 minutos de duración con una línea azul la cual incrementa la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. La línea roja indica la estimulación con RNS de  $600\mu\text{A}$  de 2 min, dicha estimulación disminuye la amplitud de los potenciales.

A)



B)

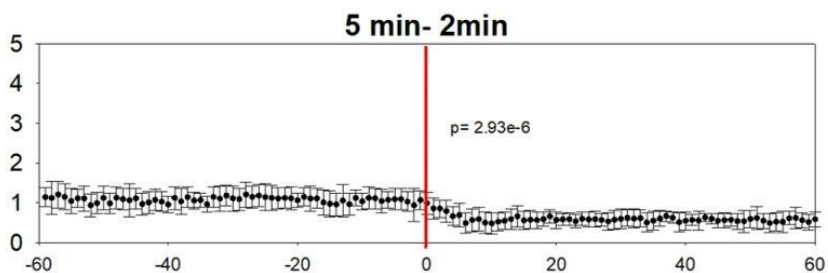


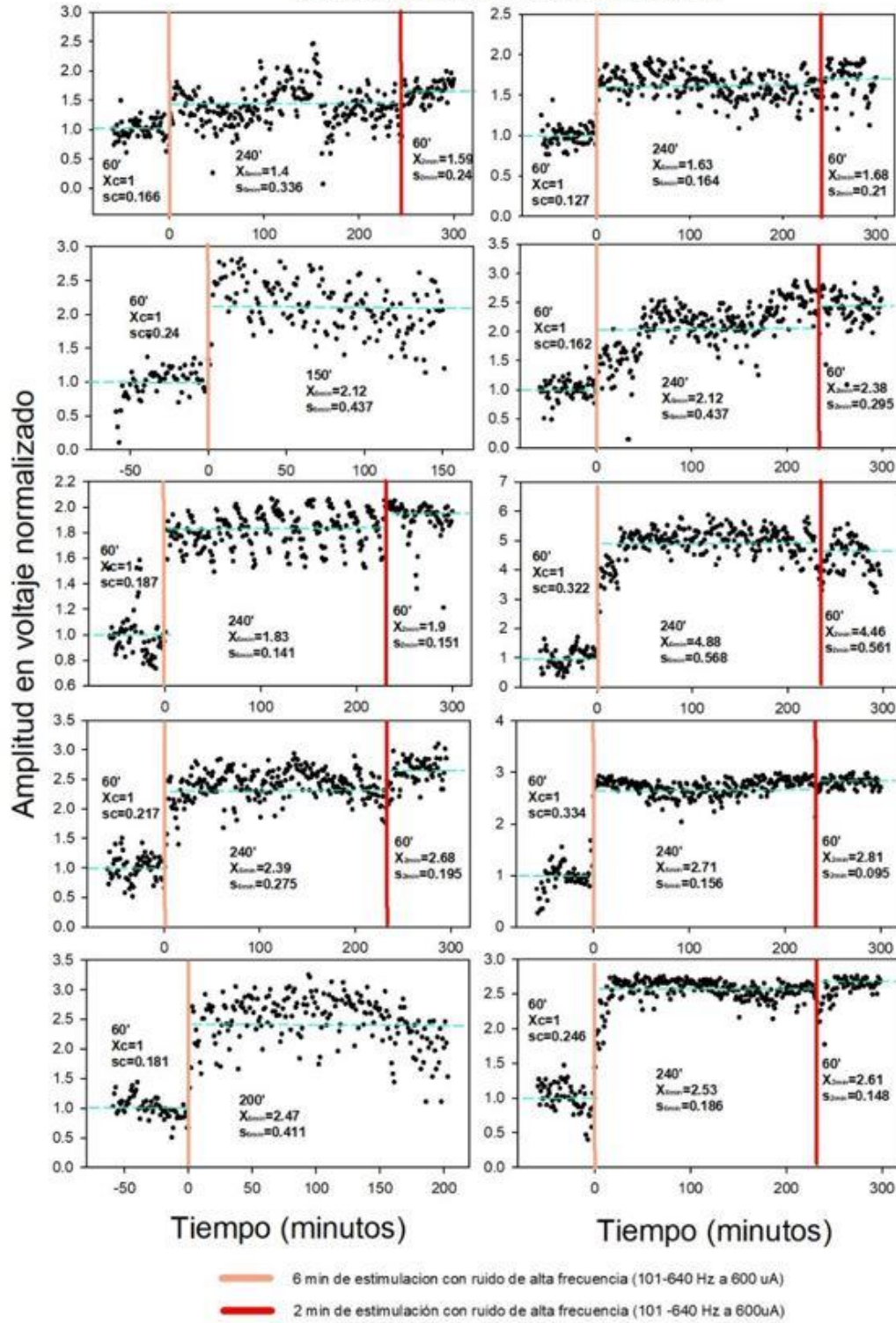
Figura 25. Promedio de la estimulación con RNS de alta frecuencia de  $600\mu\text{A}$  de 5 min. Se ilustra la actividad promedio de las 10 ratas, así como también su desviación estándar. A) La

línea en color azul es cuando se realizó la estimulación de 5 minutos. Posteriormente se observó un incremento de 2 veces con respecto a control, pasada hora y media mostró un decremento paulatino hacia la amplitud control. B) Posteriormente se estimuló con 2 min disminuyendo la amplitud con respecto a lo anteriormente reportado.

#### 7.1.4 Estimulación con 6 min RNS de alta frecuencia

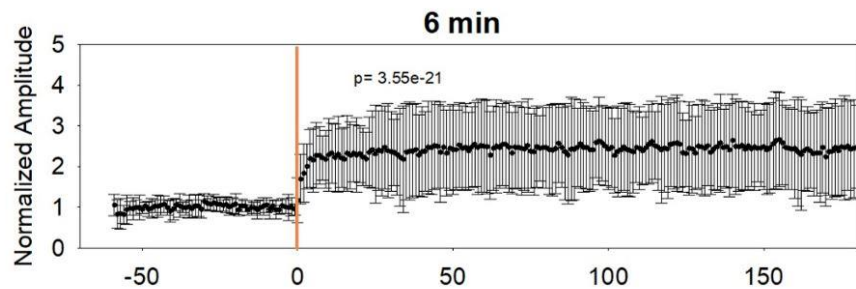
La estimulación durante 6 minutos con ruido de alta frecuencia (tRNS) a 600  $\mu$ A produjo un incremento en la amplitud respecto al registro previo, en concordancia con lo reportado por Chaieb et al. (2011). Este incremento fue de 2.4 veces  $\pm$  0.30 en comparación con la línea basal. Tras la estimulación de 6 minutos, se evaluó su efecto sobre la amplitud de los potenciales somatosensoriales evocados (SSEP). Aproximadamente 4 horas después, se aplicó nuevamente tRNS a 600  $\mu$ A durante 2 minutos, sin que se observara un efecto sobre la amplitud de los potenciales.

**Estimulación con RNS de alta frecuencia (101-640 Hz)  
de 600 uA con duración de 6 min**

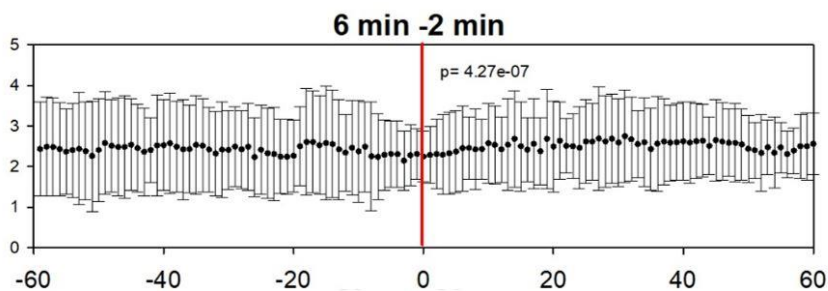


**Figura 26. Efecto de estimulación de alta frecuencia de 600µA de 6 min.** Se ilustra la estimulación RNS de alta frecuencia de 6 minutos de duración con una línea naranja la cual incrementa la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. La línea roja indica la estimulación con RNS de 600µA de 2 min, dicha estimulación no afecta la amplitud de los potenciales.

A)



B)

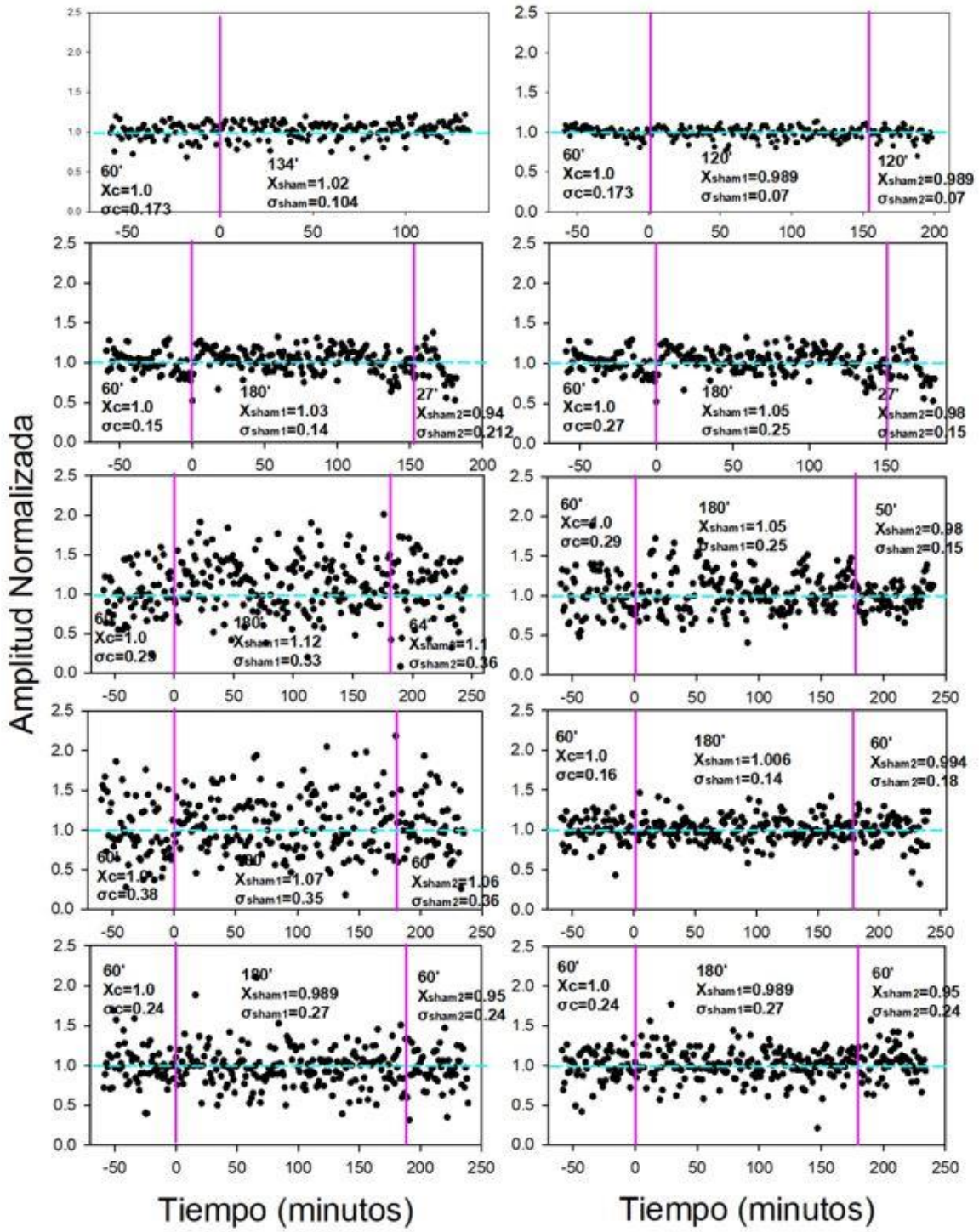


**Figura 27. Promedio de la estimulación con RNS de alta frecuencia de 600µA de 6 min.** Se ilustra la actividad promedio de las 10 ratas, así como también su desviación estándar. A) La línea en color naranja es cuando se realizó la estimulación de 6 minutos. Posteriormente se observó un incremento de 2.5 veces con respecto a control, el cual se mantuvo a lo largo del tiempo. B) Posteriormente se estimuló con 2 min, y no afectó la amplitud incrementada, aunque su variación si disminuyó.

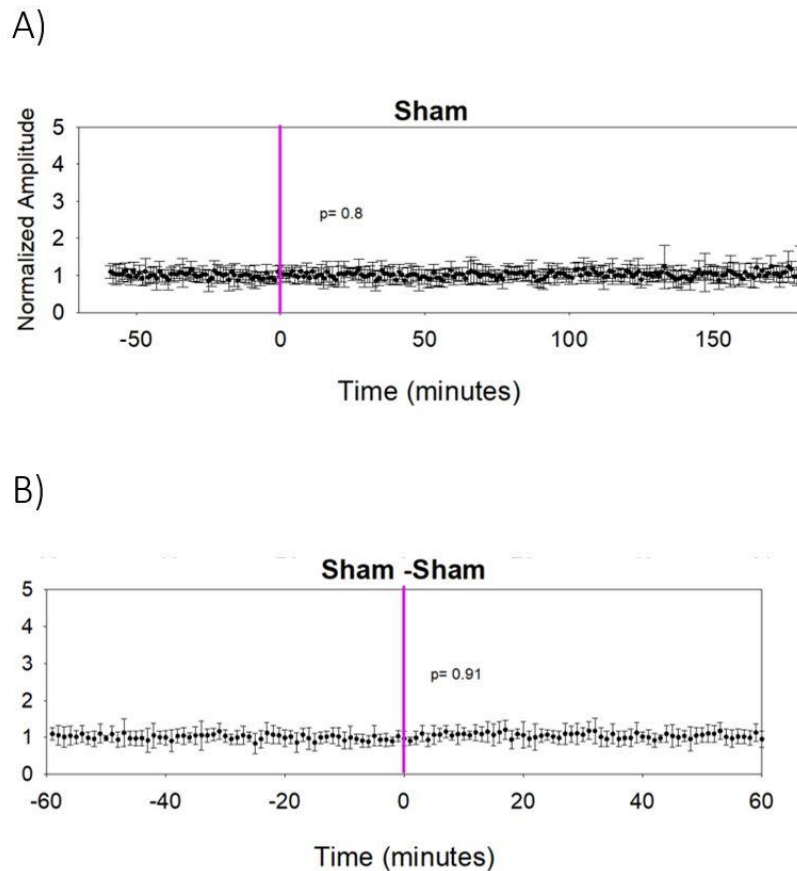
### 7.1.5 Estimulación simulada

Como parte de la serie experimental, se realizaron protocolos de estimulación simulada; es decir, se realizó la misma preparación para exponer la corteza somato sensorial y se montaron los electrodos en la misma ubicación en la que se indujo flujo de corriente. Se procedió a registrar por una hora la amplitud de los potenciales. Posteriormente, dejamos de jalar las vibrisas con la finalidad de emular el tiempo en que se realiza la estimulación eléctrica de 5 min. Se continuó con la protracción de vibrisas y se pudo observar que no existe diferencia aparente entre la estimulación simulada con respecto a dicha estimulación.

## Estimulación simulada con ruido de alta frecuencia (101-640)



**Figura 28. Efecto de estimulación simulada.** Se ilustra la estimulación simulada (5 min de duración) línea rosa la cual no produce ningún cambio aparente en la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. Se realizaron dos estimulaciones simuladas con el fin de replicar los protocolos anteriormente descritos; es decir, con doble estimulación. En ambas estimulaciones simuladas, podemos notar ningún efecto sobre la amplitud de los SSPS.

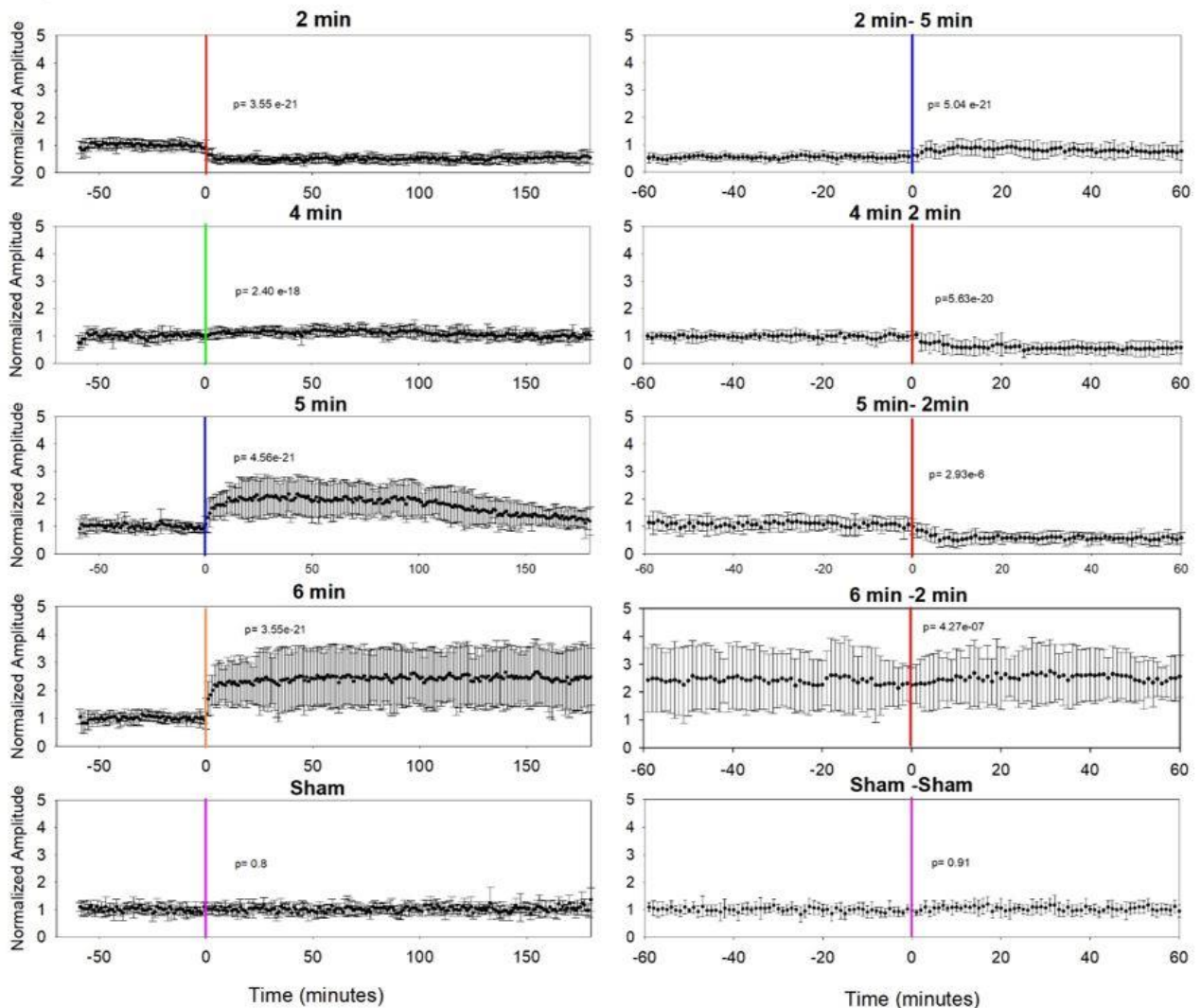


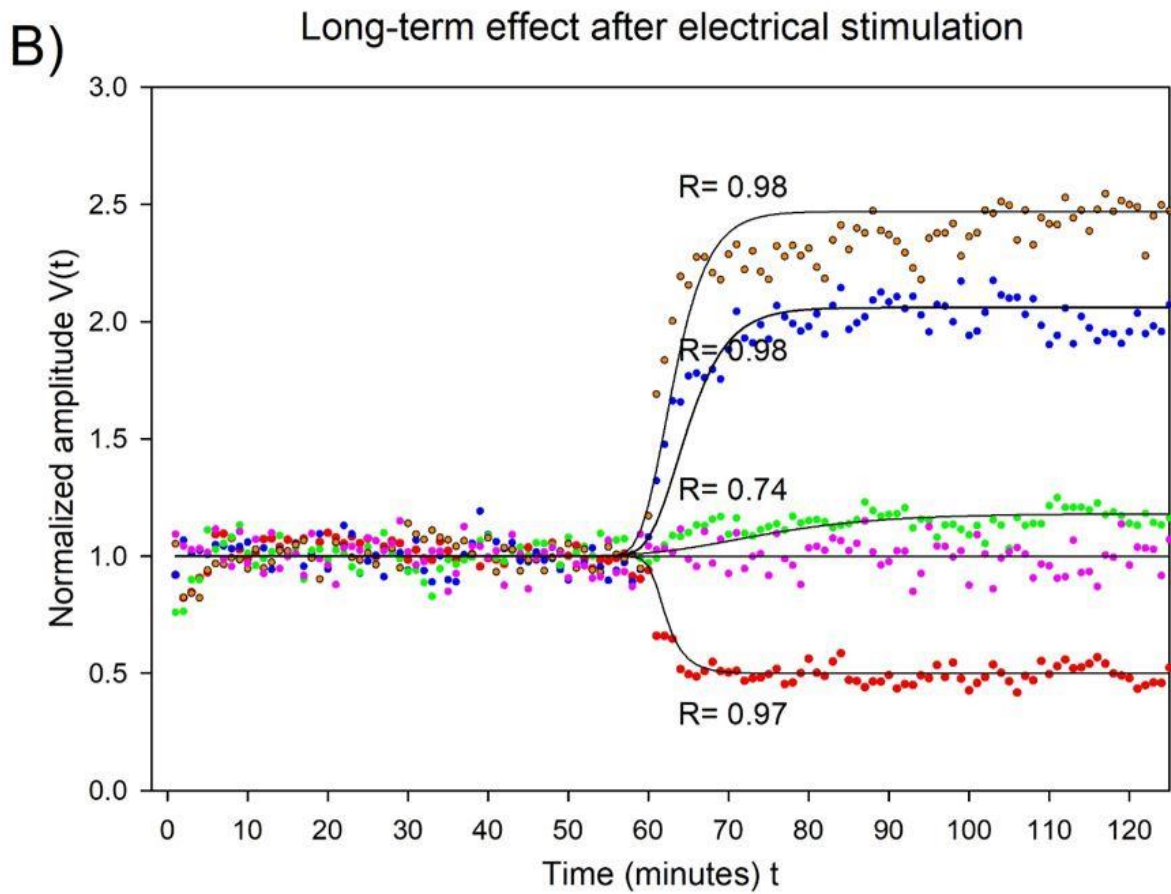
**Figura 29. Promedio de la estimulación.** Se ilustra la actividad promedio de las 10 ratas, así como su desviación estándar. A) La línea en color rosa representa el tiempo inicial de la estimulación

simulada. Se observa que no existe variación de la amplitud. B) Segunda estimulación simulada aplicada a los 120 min de la primera estimulación simulada; tampoco se muestra alguna variación en la amplitud.

### 7.1.6 Resumen de efecto de diferentes tiempos de estimulación eléctrica sobre la actividad superficial de la corteza

A)





$$V(t) = A + \frac{K - A}{(C + Qe^{-Bt})^{1/V}}$$

	2 MIN	4 MIN	5 MIN	6 MIN	SHAM	
A	0.5	1	1	1	1	1
K	1	1.2599	2.06	2.47	1	1
B	-1.5	0.05	0.3	0.3	1	1
v	3	1	0.1	0.1	1	1
Q	0.3	5	0.3	0.3	1	1
C	1	1	1	1	1	1

Figura 30. Resumen del efecto de la estimulación eléctrica sobre la corteza de los barriles. A) Se muestra la actividad ponderada por minutos de todos los sujetos. En cada minuto se indicó su

desviación estándar. Para los minutos que generan un incremento de la amplitud (4, 5 y 6 min), se observa también un incremento en la dispersión de los datos, no así para los 2 minutos que generan disminución en la amplitud del potencial.

Se ilustra la estimulación simulada (5 min de duración) puntos rosas la cual no produce ningún cambio aparente en la amplitud de los SSEP. Se muestra el curso temporal del efecto de la estimulación. Se realizaron dos estimulaciones simuladas con el fin de replicar los protocolos anteriormente descritos, es decir con doble B) Se muestra el ajuste de los datos experimentales a funciones sigmoideas donde se toma el grado de crecimiento de los datos, los valores mínimos/máximos promedio y la correlación del ajuste con los datos experimentales. Este ajuste no es explicativo sino descriptivo para el manejo de los datos.

Por otra parte, se consideró los primeros 120 minutos, los primeros 60 min son de control y los siguientes 60 min son de post estimulación. Dichos datos se ajustaron a una expresión de tipo sigmoidea

$$V(t) = A + \frac{K - A}{(C + Qe^{-Bt})^{1/V}}$$

Donde:

*A = Asintota inferior*

*K = Asintota superior*

*B = Tasa de crecimiento*

## 7.2 Efecto de Estimulación eléctrica sobre la actividad unitaria de neuronas

Con la finalidad de entender como la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia afecta a la excitabilidad neuronal, se registró la actividad multi unitaria extracelular (MUA) de las neuronas a una profundidad de 300 a 600  $\mu\text{m}$  con el sistema de registro de Thomas Recording. El protocolo de registro fue similar al registrado al electrodo de superficie, es decir, registro por un minuto a una frecuencia de 1 Hz de estimulación, obteniendo 60 registros de MUA por minuto. Cabe mencionar que el tiempo total de registro en un experimento es en promedio de 300 minutos, lo que se traduce a analizar a 18,000 registros de MUA por experimento. Se optó por analizar los efectos de la estimulación eléctrica de 2, 4, 5, 6, 10 y simulación de estimulación eléctrica sobre la frecuencia de descarga neuronal.

La discriminación de espigas puede ser realizada por diferentes tipos de software de clasificación, sin embargo, en nuestro grupo de trabajo hemos optado por utilizar el software de clasificación neuronal semi automatizado llamado Wave\_clus desarrollado por Quiroga y cols. en 2004 y posteriormente mejorado en 2009 por Martinez y cols, ya que permite obtener la morfología del potencial a través de la transformada Wavelet y su tiempo de aparición. Sin embargo, el software mencionado solo permite cargar y analizar un archivo a la vez en un tiempo promedio de 4 minutos por archivo. Considerando que la serie experimental

constaría de 12 experimentos, generaría 216,000 archivos en total, lo que tomaría aproximadamente 600 días naturales continuos en analizar dichos experimentos.

Por tales razones se optó por modificar el código desarrollado por Martinez y cols de 2009 para automatizar la tarea de clasificación. Dicha modificación la presento en la parte de anexos. A manera de resumen, se modificó el selector de archivos, de pasar de cargar un archivo, pasar a abrir la carpeta donde se encuentran los archivos, en listarlos y abrirlos uno a uno conforme vaya avanzando en la lista. Los valores para discriminar las espigas se consideraron intermedios para evitar un sobreajuste de clasificación y generar múltiples tipos de neuronas o un solo grupo de clasificación donde no hubiera diferencias entre neuronas. En la corteza de los barriles existen alrededor de 5 tipos de neuronas, por tal razón empleamos parámetros intermedios para tener una clasificación similar (Petersen 2019, Pachitariu et al., 2024)

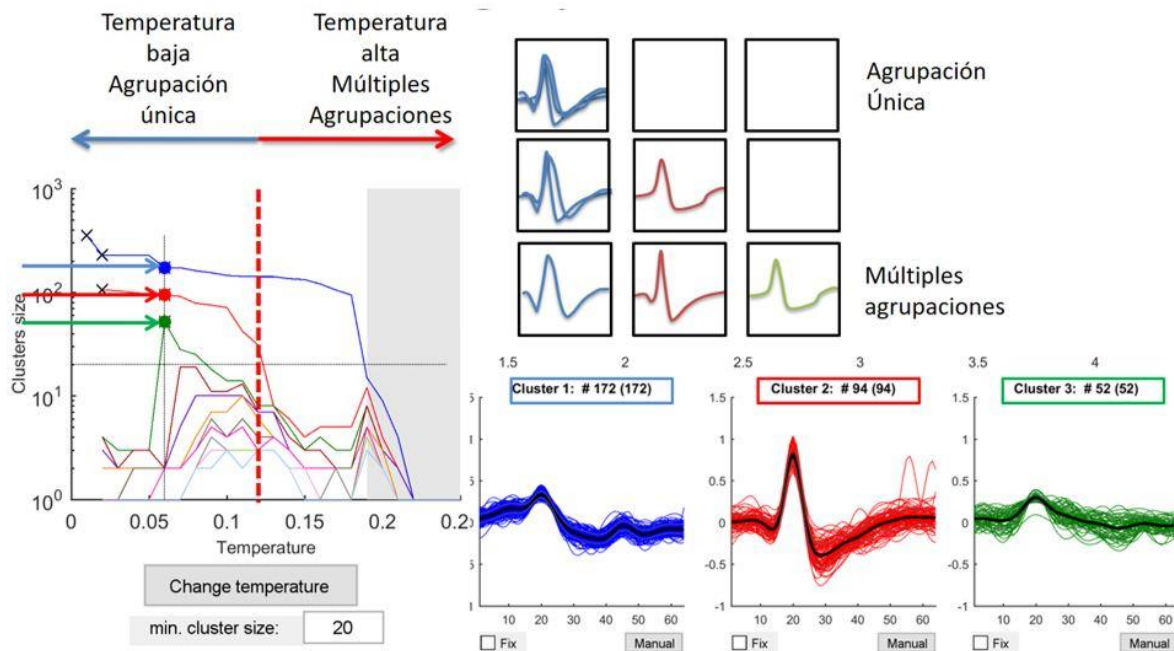


Figura 31. Agrupación de neuronas. Se muestra como se hace

el ajuste para cada grupo de neuronas, si uno se desplaza para temperaturas más frías, se genera un solo grupo de neuronas, lo que implica que no exista una diferenciación entre los potenciales extracelulares, mientras que, si nos desplazamos a temperaturas más cálidas, se realiza un sobreajuste. El eje de las Y muestra la cantidad de neuronas que existe en cada grupo. Tomado y modificado de Quiroga y cols. 2004, Martínez y cols. 2009

### 7.2.1 Efecto de Estimulación con 2 min RNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

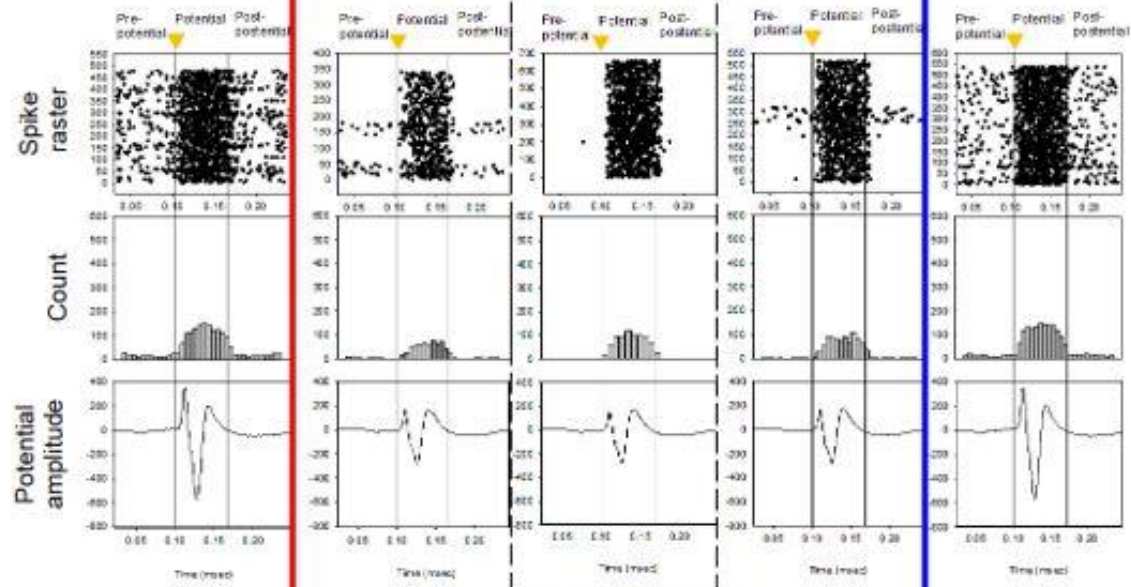
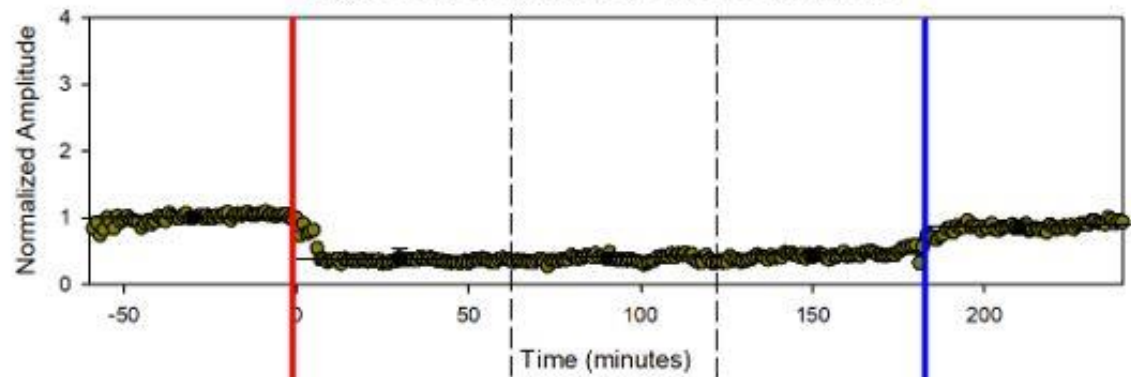
Se procedió a evaluar el efecto de la estimulación de 2 min de alta frecuencia sobre la descarga neuronal. Para esto, se emplearon 2 ratas para hacer la prueba, las cuales mostraron efecto similar a lo reportado en el anterior apartado. Debido a que se evaluó con el estímulo mecánico, se pueden obtener tres zonas para comparar la frecuencia de descarga instantánea. Dichas zonas las nombramos Pre potencial, Potencial, Post potencial. Se registraron inicialmente 480 neuronas sumando las neuronas de las dos ratas. Posterior a la estimulación de 2 min, la cantidad de neuronas registradas disminuyó a 350 neuronas, sumando las neuronas de las dos ratas. Aunque en el registro de superficie se observa la amplitud disminuida casi constante, en el registro de actividad multiunitaria se observa un ligero incremento. El intervalo de registro post estimulación de 2 minutos, fue de 3 horas, por lo que se segmentó cada hora para obtener la actividad de descarga neuronal. Cada ventana

es de igual duración que el registro control. Se puede observar que la cantidad de neuronas va incrementando a 650 neuronas para la segunda hora, y 530, para la tercera hora. Sin embargo, la actividad de descarga pre y post potencial visualmente está disminuida. Por tal razón, medimos la frecuencia instantánea para cada segmento. Estos resultados se muestran en la tabla 1.

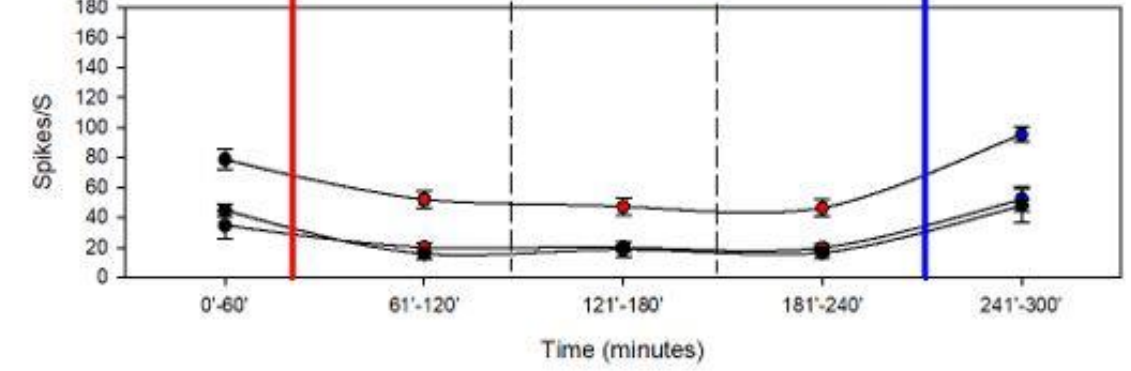
	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	34.82	9.11	78.75	6.73	44.96	4.25
61'-120'	20.11	3.20	52.02	5.92	15.85	3.88
121'-180'	20.14	3.48	47.35	5.68	18.78	5.08
181'-240'	19.81	2.27	46.46	5.65	16.54	3.78
241'-300'	52.22	7.99	95.44	5.43	48.00	11.03

**Tabla 1. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 2 min.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control, posterior a la estimulación de 2 min y posterior a la estimulación de 5 minutos. se puede observar una caída en la frecuencia para cada fase, mientras que, para la estimulación de 5 min posterior a la estimulación de 2 minutos, se puede observar un incremento de la frecuencia de descarga a un nivel similar con la fase control.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



Cortex spike train



	Normal test, p-value				Friedman	
	0'-60'	61'-120'	121'-180'	181'-240'	241'-300'	
Pre-potential	0.00037	0.41002	0.36439	0.01288	7.2505E-14	0.171201
Potential	7.1351E-95	2.6264E-92	3.73E-91	1.0141E-89	1.087E-122	3.8104E-15
Post-potential	6.4636E-7	0.00042	0.00041	0.00032	2.5919E-26	0.00220

**Figura 32. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 2 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.** En la gráfica superior, se muestra el registro de la amplitud normalizada de registros de campo. La amplitud del potencial disminuye con la estimulación eléctrica de 2 min, como se describió en el apartado anterior. Las gráficas de abajo representa cualitativamente los rasters de actividad de descarga neuronal, y cuantitativamente sus histogramas. Se observa cómo se correlaciona la disminución de la amplitud del potencial y la frecuencia de descarga de las neuronas para cada fase del potencial. También se observa la recuperación de la amplitud del potencial y su frecuencia de descarga neuronal con estimulación eléctrica de 5 min.

### 7.2.2 Efecto de Estimulación con 4 min RNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

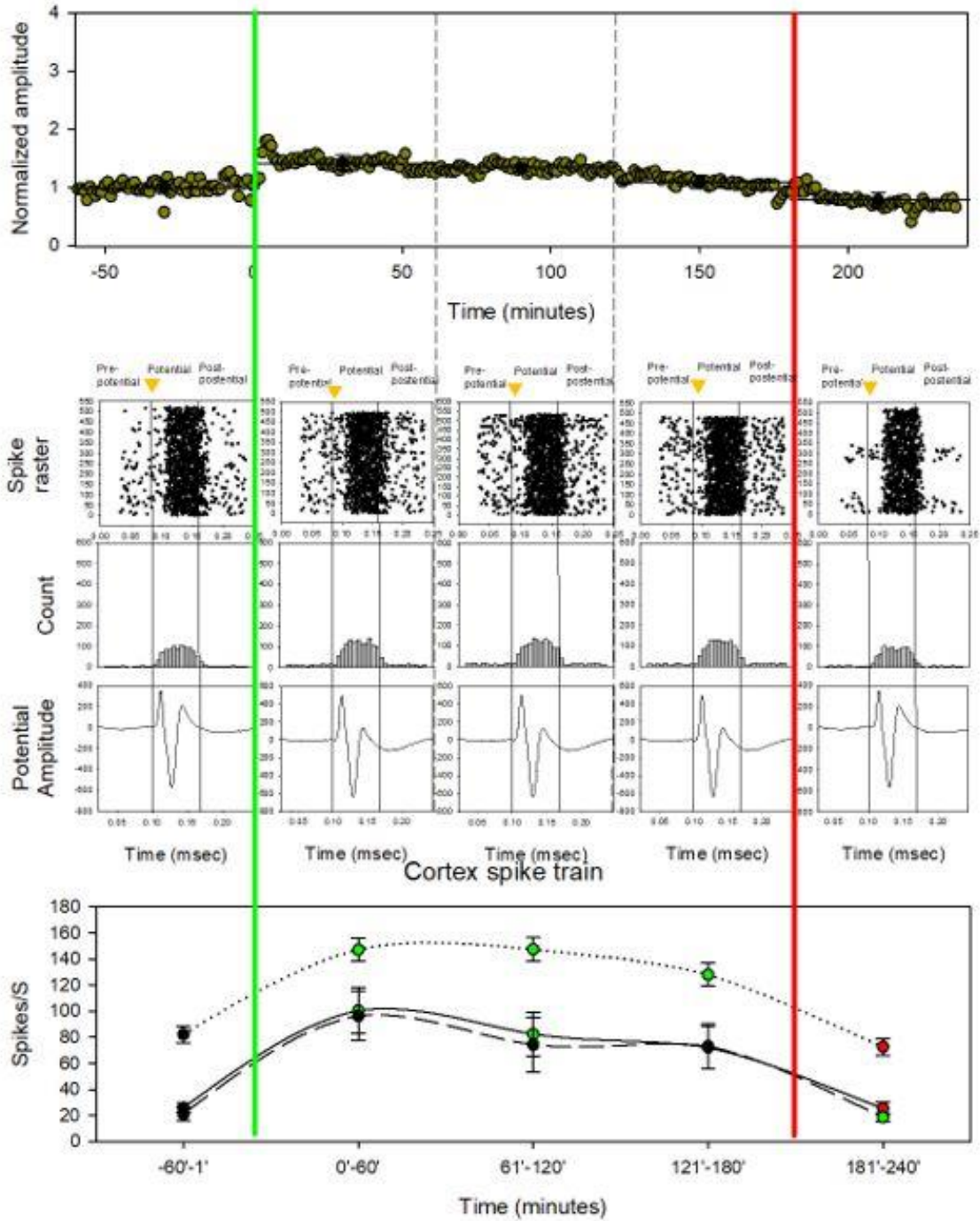
Se evaluó el efecto de la estimulación aplicada durante 4 minutos. De acuerdo con el trabajo de Chaieb et al., 2011, se muestra un nulo efecto de la estimulación de 4 minutos sobre la amplitud del potencial somatosensorial. Sin embargo, debido a que nuestro modelo y preparación experimental nos permiten registrar neuronas intracorticales, evaluamos el efecto de la estimulación sobre la corteza de 4 minutos con

ruido de alta frecuencia. El hallazgo fue un incremento significativo en la amplitud del potencial y también en la frecuencia de descarga.

	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	25.78	3.96	82.2000	6.4337	21.0763	4.9184
61'-120'	100.4519	17.72	147.1965	8.9571	96.3307	18.8396
121'-180'	82.4592	16.85	147.4564	8.9463	74.1718	21.0644
181'-240'	72.2429	16.15	127.9600	8.7971	73.0960	16.9974
241'-300'	25.3645	4.85	72.5861	6.4665	18.6131	3.0345

**Tabla 2. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 4 min.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control, posterior a la estimulación de 4 min se puede observar un incremento en la descarga neuronal, mas no en el número de neuronas que descargan. Este efecto se mantiene por 3 horas incluso si el potencial somatosensorial tiende a disminuir con el tiempo. Posterior a la estimulación de 2 minutos, se observa una disminución en la frecuencia de descarga para regresar a la frecuencia control.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



	Normal test, p-value					Friedman
Pre-potential	8.5989E-75	2.6487E-13	6.1507E-29	4.8244E-25	6.395E-77	2.359E-54
Potential	5.3866E-84	2.6687E-132	2.0159E-132	9.7757E-150	8.147E-95	2.8161E-7
Post-potential	3.3128E-58	4.849E-12	4.1511E-26	1.1148E-29	7.4629E-65	3.0052E-42

**Figura 33. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 4 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.** En la gráfica superior, se muestra el registro de la amplitud normalizada de registros de campo. La amplitud del potencial no varía con la estimulación de 4 min, como se describió en el apartado anterior. Las gráficas de abajo representa cualitativamente los rasters de actividad de descarga neuronal, y cuantitativamente sus histogramas. Si bien, se observa un incremento no significativo en la amplitud de los potenciales, la frecuencia de descarga de las neuronas si lo hace. De tal manera que incrementa casi al doble, la cual disminuye paulatinamente con forme pasa las horas.

### 7.2.3 Efecto de Estimulación con 5 min RNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

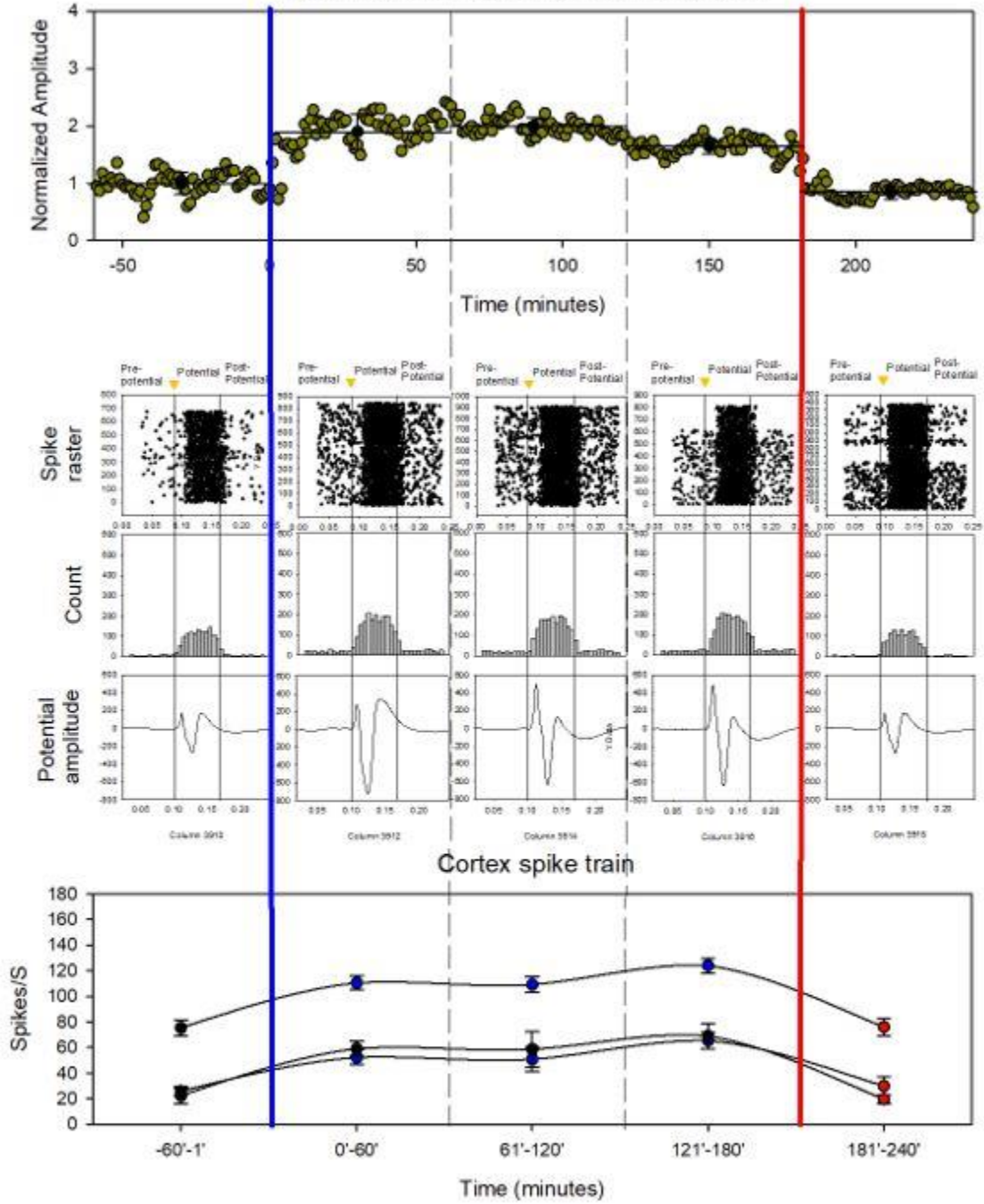
Se estudió el efecto de la estimulación eléctrica de 5 minutos de alta frecuencia. De acuerdo con el apartado anterior, se observa un incremento en la amplitud del potencial cuando se estimula con dicha duración. Esto es contundente con lo reportado por Chaieb et al en 2011. Nuestro objetivo es observar si existe un efecto sobre la frecuencia de descarga de las neuronas. Por lo que usamos la misma preparación antes mencionada. Posterior a la estimulación con 5 minutos, se observa un incremento del doble de la amplitud del potencial somatosensorial. Este

mantiene incrementado por hora y media, donde se observa una ligera disminución en la amplitud. Posteriormente, se aplicó estimulación de 2 minutos y la amplitud del potencial somatosensorial disminuyó. Respecto a la frecuencia de descarga neuronal, se observa una actividad basal. Posterior a la estimulación de 5 min, su frecuencia incrementa al doble, la cual tiende a incrementar conforme pasa el tiempo, incluso si la amplitud del potencial se estabiliza. Posterior a la estimulación de 2 minutos, la frecuencia de descarga disminuye, de manera similar a la frecuencia control. Sin embargo, la cantidad de neuronas descargando incrementó. En la tabla 3 se muestran a detalle las frecuencias de descarga.

	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	25.99	3.52	75.34	5.96	22.42	6.02
61'-120'	52.30	5.73	110.50	5.41	59.16	5.72
121'-180'	50.83	9.83	109.19	5.99	58.64	13.73
181'-240'	65.43	6.66	124.02	5.64	69.08	9.95
241'-300'	30.05	7.05	76.05	6.68	19.80	3.35

**Tabla 3. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 5 min.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control, posterior a la estimulación de 5 min y posterior a la estimulación de 2 minutos. se puede observar una caída en la frecuencia para cada fase, mientras que, para la estimulación de 5 min posterior a la estimulación de 2 minutos, se puede observar un incremento de la frecuencia de descarga a un nivel similar con la fase control.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



Normal test, p-value

Pre-potential 0.000002  
 Potential 1.8337E-148  
 Post-potential 0.000010

Time (minutes)

3.5177E-27	2.5732E-44	7.9066E-31
5.7967E-233	7.0305E-228	5.0525E-230
1.7019E-27	1.1117E-54	3.3053E-44

Friedman

4.6E-76	5.3675E-47
9.6998E-160	9.377E-73
0.000339	8.5078E-82

**Figura 34. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 5 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.** En la gráfica superior, se muestra el registro de la amplitud normalizada de registros de campo. La amplitud del potencial incrementa más del doble después de ser estimulada la corteza con 5 min de NHF. Las gráficas de abajo representan cualitativamente los rasters de actividad de descarga neuronal, y cuantitativamente sus histogramas. Se observa un incremento significativo en la amplitud de los potenciales, así como en la frecuencia de descarga de las neuronas y el número de neuronas que descargan.

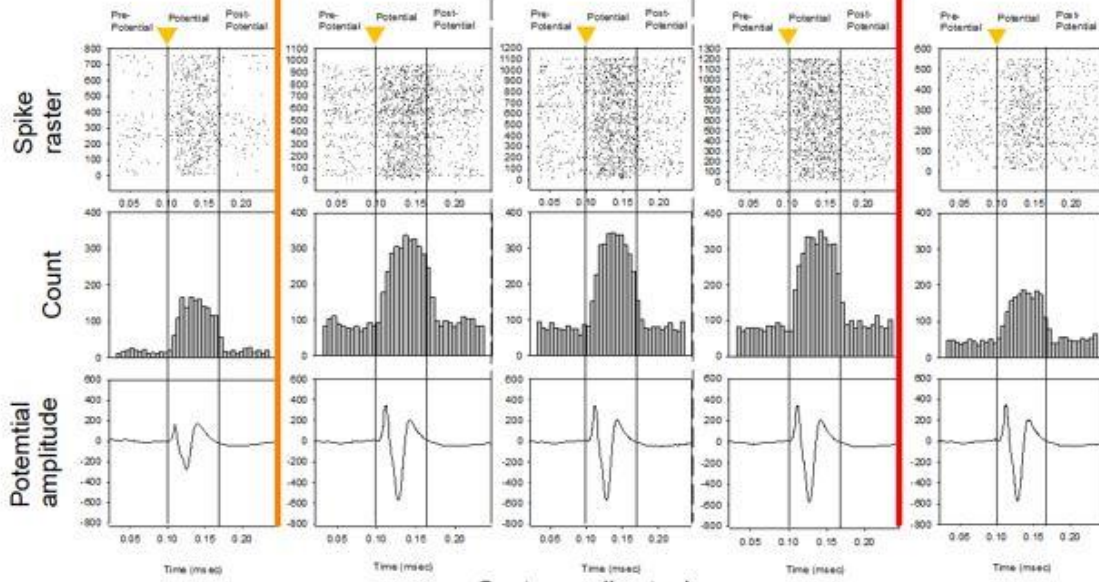
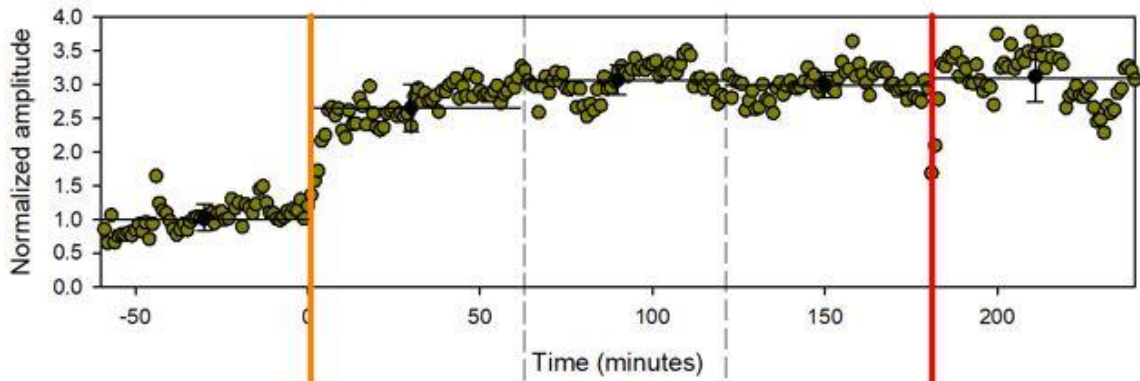
#### 7.2.4 Efecto de Estimulación con 6 min RNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

Se analizó el efecto de la estimulación eléctrica de 6 minutos sobre la corteza somatosensorial. Con esta duración, se observa un incremento similar al descrito en la sección anterior; es decir, de casi el triple de incremento en la amplitud de los potenciales somatosensoriales medidos desde la superficie de la corteza. Con este resultado, analizamos el efecto de la estimulación de 6 minutos sobre la frecuencia de descarga. Se observa un incremento en la frecuencia de descarga para cada una de las fases, así como en la cantidad de neuronas. Posteriormente, se estimuló con 2 min, lo cual no generó ningún cambio sobre la amplitud del potencial ni en las neuronas que descargan.

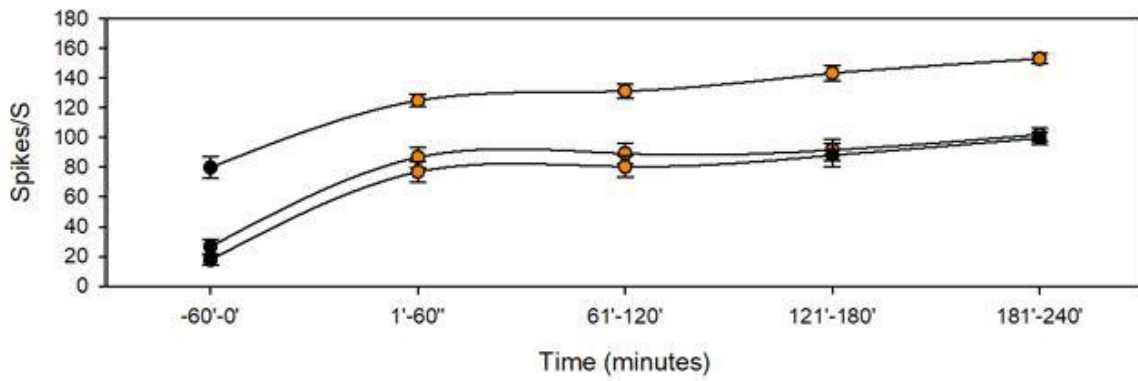
	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	26.6730	5.1299	79.9026	7.4759	17.7044	3.4282
61'-120'	86.7786	6.8475	124.9227	4.2816	76.9714	6.7248
121'-180'	89.2449	7.0570	131.1848	4.6697	80.4419	7.0666
181'-240'	91.7210	7.3519	143.2569	5.1834	88.1892	7.6538
241'-300'	102.0000	4.1599	153.0000	3.5956	99.5862	4.3987

**Tabla 4. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 6 min.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control, posterior a la estimulación de 6 min y posterior a la estimulación de 2 minutos. Se puede observar un incremento significativo de la frecuencia de descarga neuronal para cada fase, mientras que, para la estimulación de 2 min posterior a la estimulación de 6 minutos, se puede observar que no disminuye la frecuencia de descarga.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



Cortex spike train



	Normal test, p-value				Friedman	
Pre-potential	0.005716	4.5282E-80	2.9615E-75	2.6773E-79	5.1551E-98	3.3028E-151
Potential	1.6479E-70	5.9083E-105	1.7788E-177	1.7184E-197	5.1551E-98	1.1881E-13
Post-potential	0.200000	1.9815E-85	3.712E-75	6.8952E-68	1.4344E-79	1.6724E-78

**Figura 35. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 6 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.** En la gráfica superior se muestra el registro de la amplitud normalizada de los potenciales de campo. La estimulación cortical con ruido de alta frecuencia (NHF) durante 6 minutos produjo un incremento superior al doble en la amplitud del potencial, como se describió en el apartado anterior. A diferencia de la estimulación de 5 minutos, la aplicación de 6 minutos no generó una disminución progresiva de la amplitud con el tiempo tras el aumento inicial. Las gráficas inferiores representan cualitativamente los rasters de actividad de descarga neuronal y, de forma cuantitativa, sus respectivos histogramas. Se observa un aumento significativo en la amplitud de los potenciales, en la frecuencia de descarga neuronal y en el número de neuronas activas.

### 7.2.5 Efecto de Estimulación con 10 min RNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

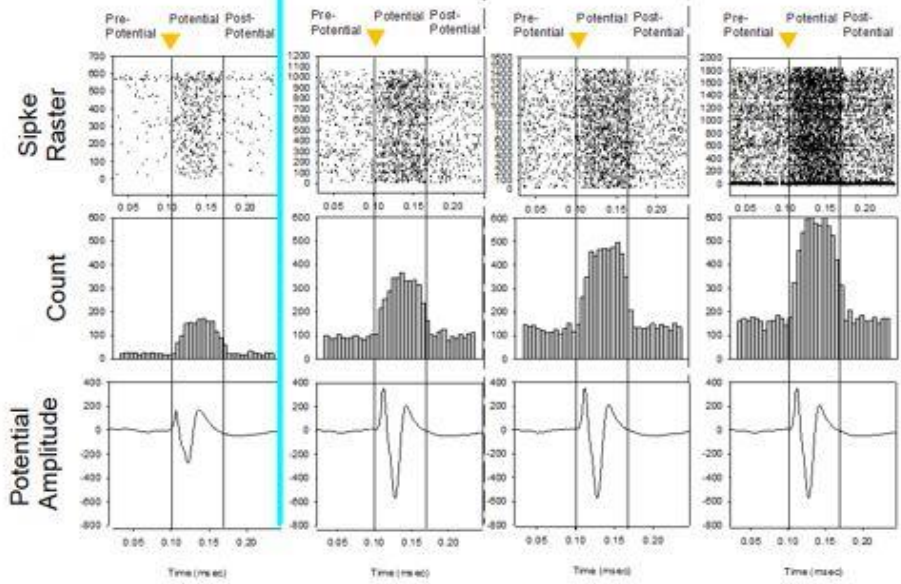
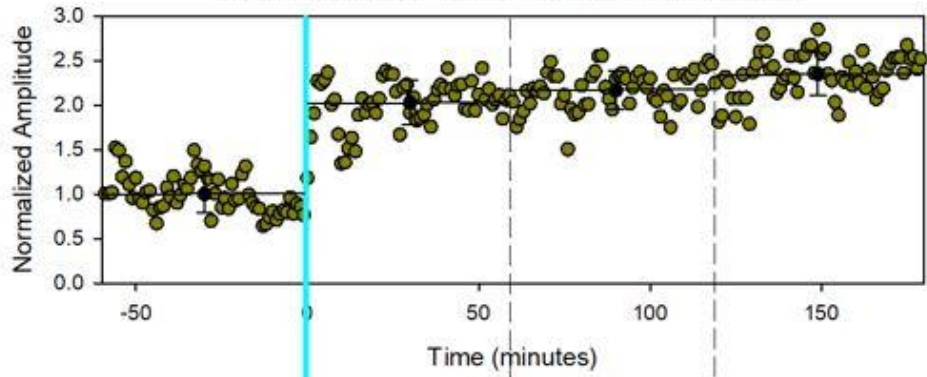
Una vez realizadas la serie experimentales con 2, 4, 5, y 6 minutos se pretendió comprender el efecto de la estimulación de 10 min. tanto en la parte de registros superficiales como en la actividad de descarga neuronal. El efecto de la estimulación de 10 minutos sobre la corteza somatosensorial fue medido inicialmente en la tesis de Lizárraga en 2020. En esta tesis se observó que dicho tiempo de estimulación genera un incremento de tres veces la amplitud de potencial medido previamente, en una ventana de tiempo de una hora. De acuerdo con nuestro paradigma

experimental, registramos una hora previa a la estimulación y tres horas post estimulación. En la imagen 36 se muestra la actividad promedio de dos ratas. Los resultados son similares a los reportados por Lizárraga, donde se presenta un incremento del potencial cercano a los 10 minutos post estimulación y este mantiene un incremento paulatino con forme pasa el tiempo. Por la parte de la descarga neuronal, también se ve incrementada para las tres fases y también en el número de neuronas que descargan.

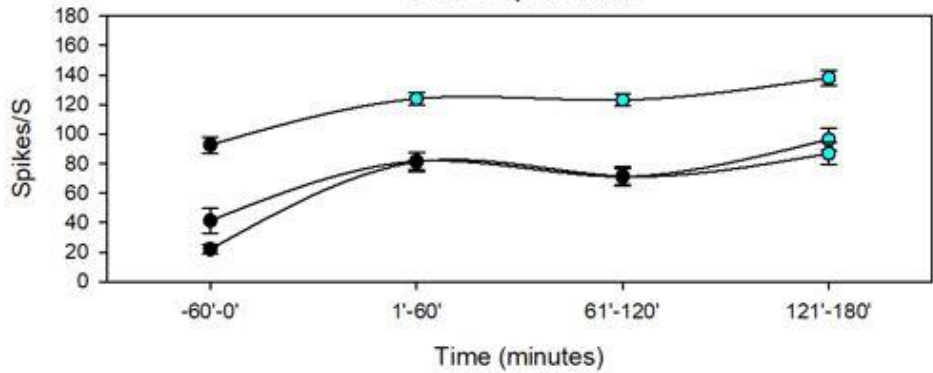
	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	26.6730	5.1299	79.9026	7.4759	17.7044	3.4282
61'-120'	86.7786	6.8475	124.9227	4.2816	76.9714	6.7248
121'-180'	89.2449	7.0570	131.1848	4.6697	80.4419	7.0666
181'-240'	91.7210	7.3519	143.2569	5.1834	88.1892	7.6538

**Tabla 5. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación de 10 min.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control y posterior a la estimulación de 10 min. Se puede observar un incremento significativo de más del doble en la frecuencia de descarga neuronal para cada fase, así como también en el número de neuronas.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



### Cortex spike train



	Normal test, p-value				Friedman	
Pre-potential	5.4095E-14	1.0934E-117	3.8207E-238	2.0192E-110	9.0834E-245	
Potential	4.3804E-251	8.4228E-99	3.3318E-99	5.2379E-102	3.4143E-118	
Post-potential	0.000660	8.4228E-99	3.3318E-99	5.2379E-102	0.023348	

**Figura 36. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia de 600 $\mu$ A de 10 min sobre la actividad multiunitaria extracelular.**

En la gráfica superior se muestra la amplitud normalizada de los potenciales de campo. La estimulación cortical con NHF durante 10 minutos incrementó la amplitud más del doble. A diferencia de la estimulación de 5, este protocolo no generó una disminución posterior, patrón similar al observado con 6, aunque en ese caso el aumento fue de cuatro veces, frente a tres en el de 10. Las gráficas inferiores ilustran cualitativamente los rasters de descarga neuronal y cuantitativamente sus histogramas. Se observa un aumento significativo en la amplitud de los potenciales, la frecuencia de descarga y el número de neuronas activas.

### 7.2.6 Efecto de estimulación simulada tRNS de alta frecuencia sobre la actividad unitaria de neuronas

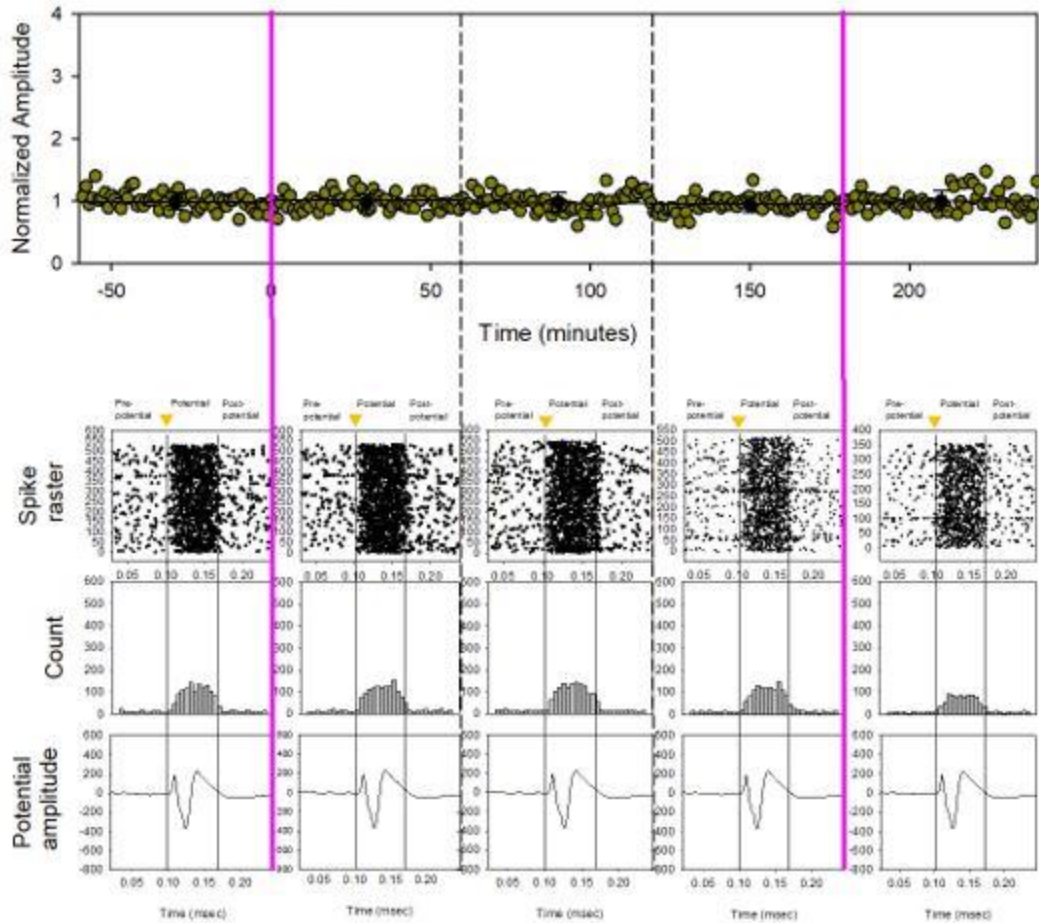
Se procedió a medir el efecto de la estimulación simulada sobre la frecuencia de descarga neuronal para comparar el efecto de los diferentes tiempos de estimulación. De igual manera se tomaron 2 ratas para obtener dichos registros. En la figura 37 (gráfica superior) se muestra la amplitud promedio del potencial somatosensorial, el cual no cambia su amplitud a lo largo de las 5 horas del experimento. Por otra parte, la frecuencia de descarga neuronal no varía estadísticamente durante el experimento en ninguna de las tres fases: pre potencial, potencial y post potencia. Por lo tanto, los cambios reportados en esta sección se

relacionan con el tiempo de estimulación eléctrica. En la siguiente tabla se puede observar las frecuencias de descarga neuronal a lo largo del experimento.

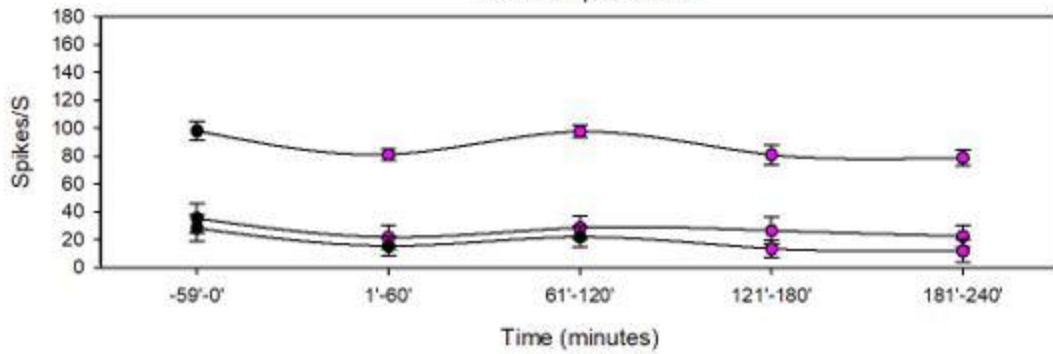
	Pre-potencial		Potencial		Post-potencial	
	Promedio	±	Promedio	±	Promedio	±
0'-60'	35.35	10.67	98.00	6.88	28.25	9.70
61'-120'	21.74	8.59	81.04	4.17	15.43	7.05
121'-180'	28.66	8.34	97.50	4.32	22.02	7.59
181'-240'	26.51	10.02	80.75	7.34	13.51	6.22
241'-300'	22.50	7.70	78.70	5.62	11.90	8.21

**Tabla 6. Frecuencia de descarga instantánea para estimulación simulada.** Se muestra la frecuencia de descarga neuronal, espigas/segundo para las tres fases: pre-potencial, potencial, post-potencial. Así como también en la fase control, posterior a la estimulación simulada. Se puede observar que no existe diferencia significativa de la frecuencia de descarga neuronal para cada fase, así como tampoco para el número de neuronas.

### High Frequency Noisy Electrical Stimulation



### Cortex spike train



	Normal test, p-value				Friedman	
Pre-potential	3.4122E-26	2.662E-19	3.7369E-24	4.9545E-22	2.8138E-20	0.222814
Potential	3.4035E-111	4.5323E-127	2.1688E-122	7.8729E-115	1.2559E-118	0.149045
Post-potential	5.688E-27	3.5687E-13	6.4285E-30	3.1916E-29	2.3994E-25	0.808071

**Figura 37. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia simulada sobre la actividad multiunitaria extracelular.** En la gráfica superior, se muestra el registro de la amplitud normalizada de registros de campo. La amplitud del potencial se mantiene a lo largo del experimento. Al momento de revisar la frecuencia de descarga, esta no presenta variación estadística para ninguna de las tres fases: pre potencial, potencial, post potencial.

### 7.3 Efecto de Estimulación eléctrica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo intracortical

Para medir los efectos de la estimulación eléctrica a nivel intracortical sobre los potenciales somatosensoriales, se procedió a registrar mediante una pipeta de borosilicato, con una resistencia de 10 M $\Omega$ . Las micropipetas fueron fabricadas mediante un estirador de pipetas modelo P-97 de la marca Sutter Instruments, con los siguientes parámetros: P=500, Heat= 564, PULL= 70, Vel= 40, Time= 250. Una vez fabricada la micropipeta, se rellenó con solución NaCl al 3 M. y montarla en un micromotor Burleigh, a su vez se introdujo un alambre de plata en al interior de la pipeta, el cual se conectó al sistema de registro Intra 767 de World Precision Instruments, el cual se acopló a un amplificador Grass con filtros pasa bajas en 3 Hz y pasa altas en 3 kHz.

El registro consistió en insertar la micropipeta de registro en la corteza de los barriles junto con el electrodo de superficie. Posteriormente se procedió a registrar en 10 diferentes profundidades (57, 114, 171, 228, 285, 342, 400, 457, 514, 571  $\mu$ m), con duración de 1 min. El tiempo de registro fue de una hora previo a la estimulación y 2 horas posterior a la estimulación. Los mapas de calor indican entre más cálido, mayor amplitud y entre más azul oscuro menor amplitud del potencial.

Se puede apreciar que la estimulación de 2 min disminuye la amplitud del potencial somatosensorial registrado sobre la superficie de la corteza, así como también el potencial registrado intra corticalmente. Por otra parte, los registros superficiales e intracorticales, la estimulación con 4 min provoca un pequeño incremento del potencial somatosensorial con respecto a la hora previa de registro. Y finalmente,

los registros superficiales e intracorticales de 5, 6 y 10 min, incrementaron la amplitud del potencial, mientras también en los registros intracorticales se puede apreciar el incremento de área tisular, el cual está relacionado al incremento de la amplitud del potencial.

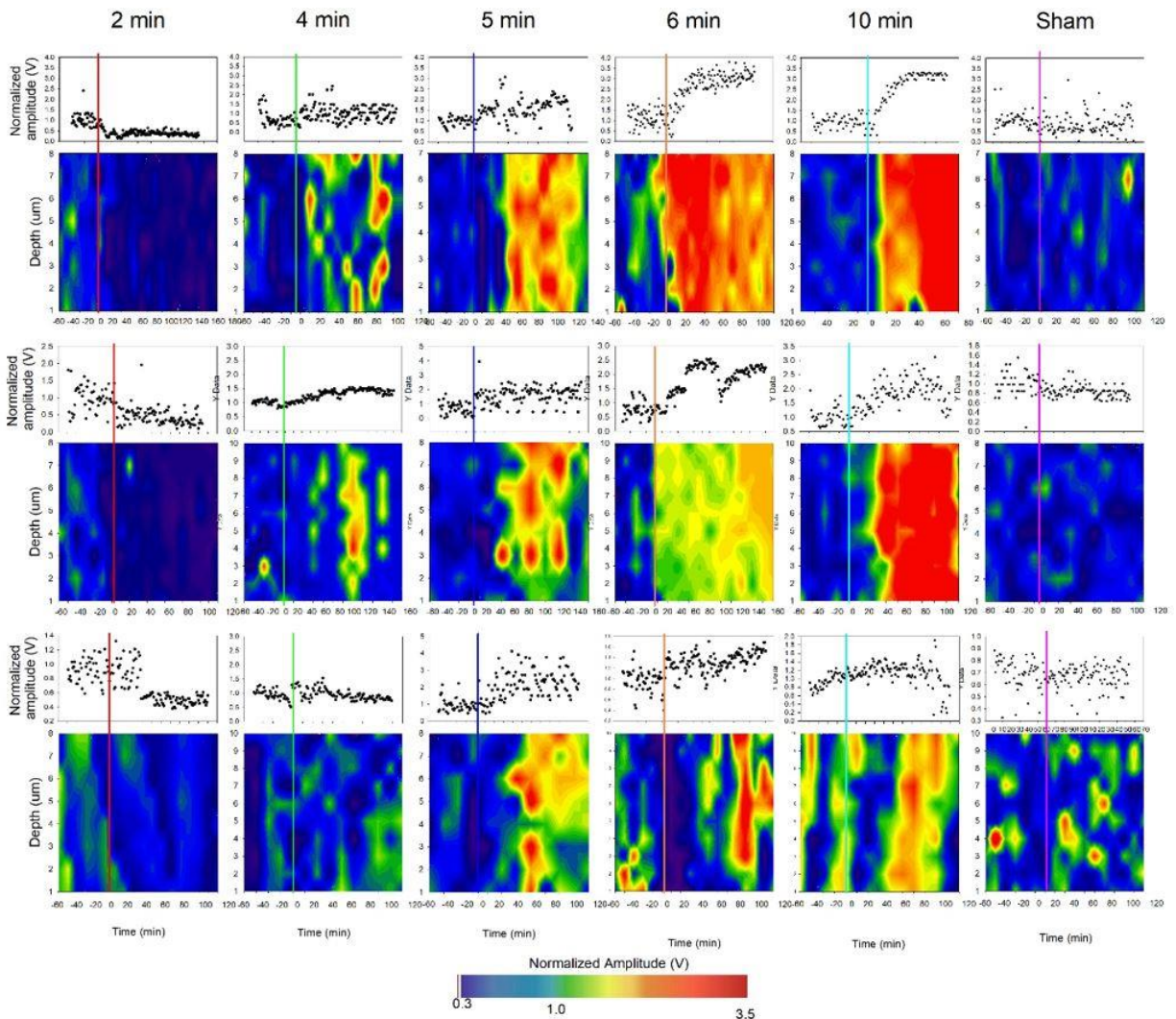
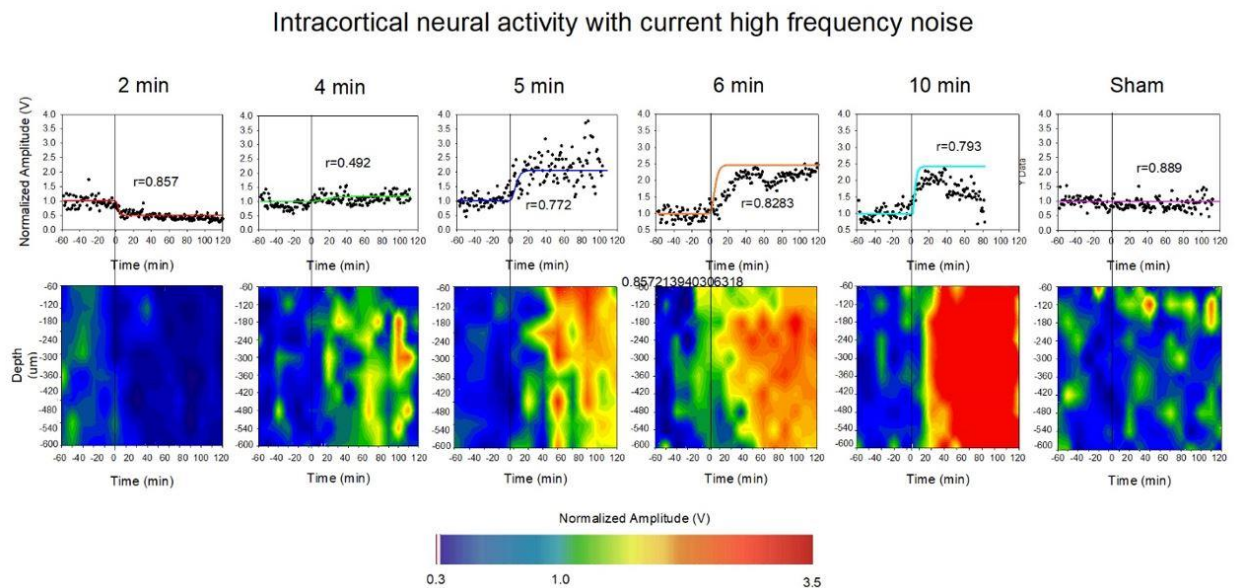


Figura 38. Efecto de estimulación con RNS de alta frecuencia simulada sobre la actividad intracortical. Se muestra los registros individuales de cada para cada tiempo uno de estimulación. En la parte superior de cada conjunto de graficas, se muestra el registro con electrodo de superficie, mientras

que, en la parte inferior, se muestra los registros intracorticales en forma de mapas de calor. En estos mapas, los colores cálidos indican mayor amplitud del potencial. Los registros se realizaron con una sola micropipeta, desde 60 hasta 600  $\mu\text{m}$  de profundidad, manteniéndose un minuto por sitio. El recorrido completo tomó 15 minutos. En todas las ratas se observó un efecto consistente de la estimulación eléctrica.

Continuando con el análisis, obtuvimos el promedio de los registros con electrodo de superficie e intracortical. Con base en esto, se exagera el efecto de la estimulación eléctrica lo cual se muestra en la figura 39.



**Figura 39.** Promedio general del efecto de la estimulación con ruido de alta frecuencia (tRNS) sobre la actividad intracortical. Se presentan los promedios de los registros obtenidos tanto en la superficie como en profundidad. A partir de los 4 minutos de estimulación, se observa un incremento en la amplitud del potencial registrado en superficie, ajustado a la función sigmoidea

descrita previamente. En los registros intracorticales, ciertas regiones superficiales ya muestran aumentos desde los 4 minutos, incluso cuando en superficie no se evidencian grandes cambios. Conforme se prolonga la estimulación, se reclutan capas más profundas, observándose un incremento progresivo hasta alcanzar una distribución homogénea a los 10 minutos.

## 7.4 Efecto de Estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia y estimulación lumínica ruidosa sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales registrados con electrodo superficial

Para comprender el efecto de los diferentes tiempos de estimulación eléctrica, utilizamos dos variantes de ratones, los Thy1-ChR2-YFP para modular la liberación de glutamato y los VGAT-ChR2-YFP para la liberación de GABA.

### 7.4.1 Efecto de Estimulación con 10 min RNS de alta frecuencia y estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT ChR2-YFP.

Por otra parte, se procedió a usar ratones del tipo Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP, que son ratones genéticamente modificados para expresar canalrodopsina, que se activa por estimulación lumínica. El paradigma experimental consistió en registrar los potenciales somatosensoriales por una hora control y posteriormente se estimuló con corriente ruidosa de alta frecuencia por 10 minutos. Una vez terminando la estimulación eléctrica, se procedió a registrar los potenciales somatosensoriales por 20 minutos, y posteriormente se suministró ruido óptico por un minuto cada cinco minutos, durante hora y media.

Tanto para los ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 muestran un incremento en la amplitud posterior a la estimulación de 10 minutos. Sin embargo, para los ratones Thy1-ChR2-YFP mostraron un incremento de 7 veces.

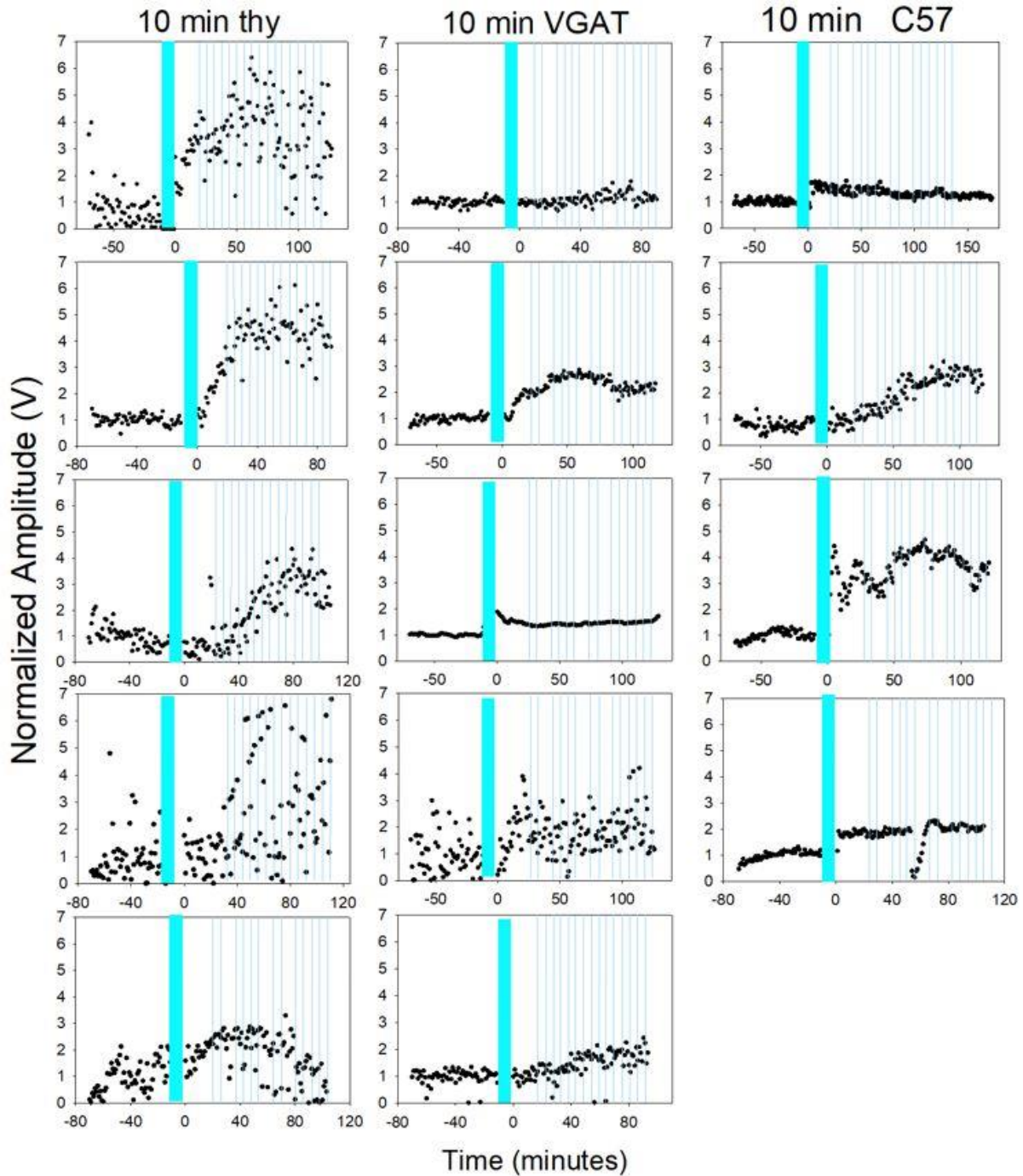


Figura 40. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación de 10 minutos. Se muestra el registro individual del efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia sobre potenciales somatosensoriales. Posterior

a la estimulación eléctrica, se registraron los potenciales por 20 minutos y se suministró ruido óptico un minuto cada cinco minutos. Para todos los tipos de animales se muestra un incremento en la amplitud.

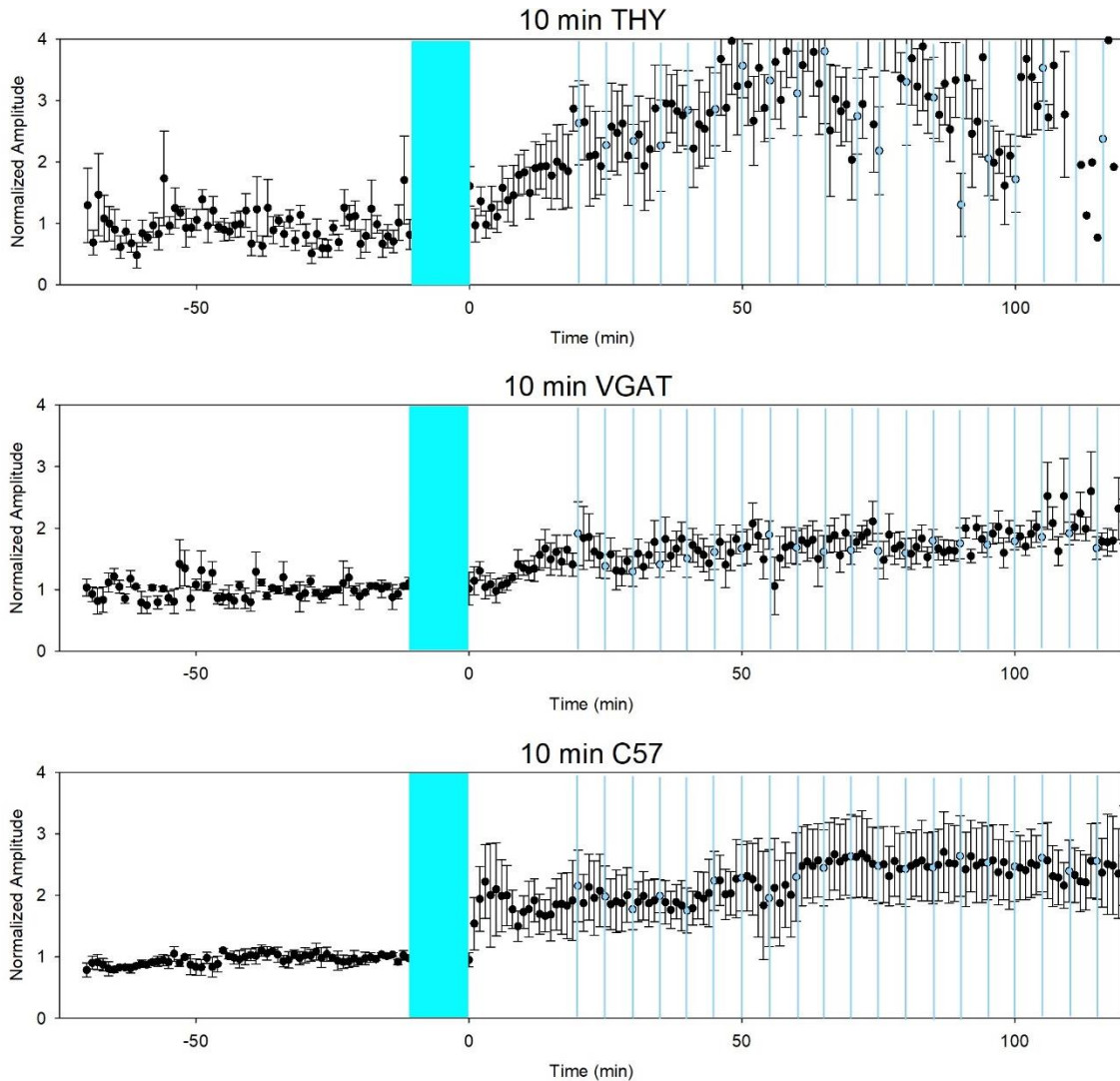
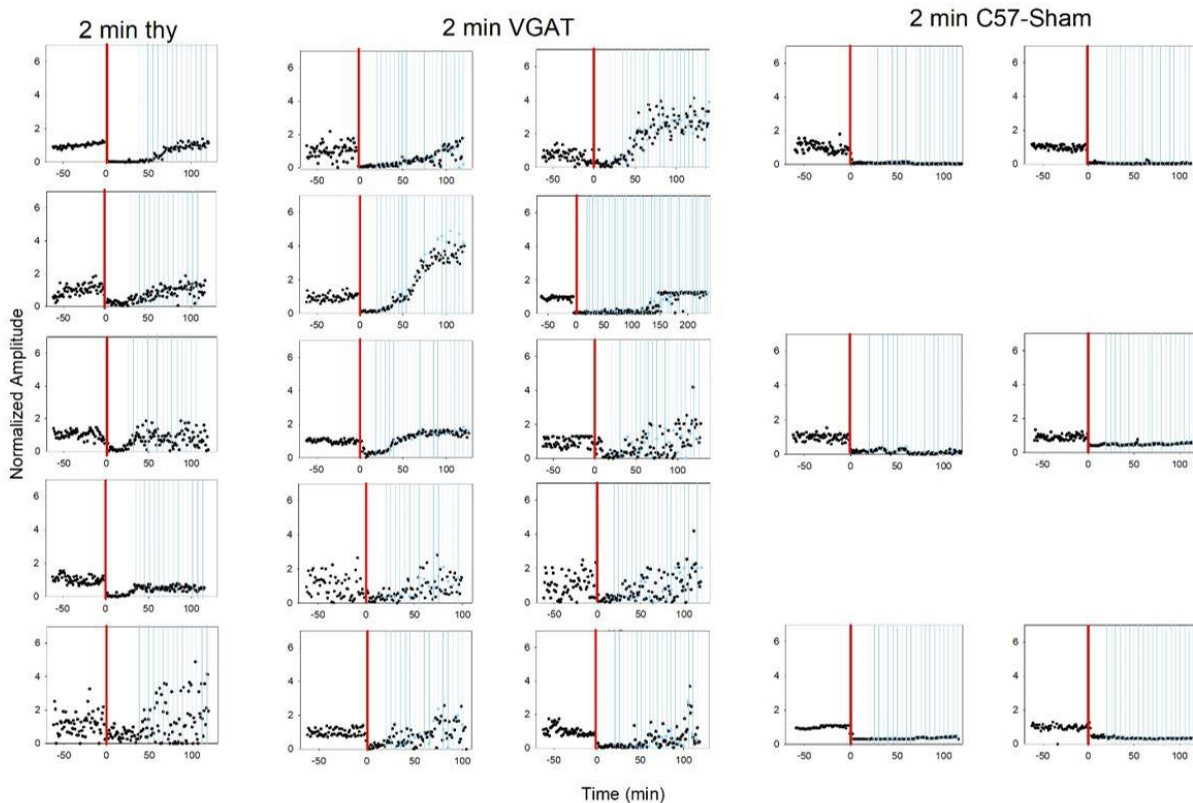


Figura 41. Gran promedio de registros individuales de ratones con estimulación eléctrica de alta frecuencia de 10 minutos para ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57. Se muestra el promedio de los registros individuales. Para todos los casos se

muestra incremento de la amplitud. Para Thy1-ChR2-YFP su incremento de 3.5 veces, VGAT-ChR2-YFP fue de 1.9 veces, y para ratones C57 incrementó 3 veces.

7.4.2 Efecto de Estimulación con 2 min RNS de alta frecuencia y estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP. Se procedió a usar ratones del tipo Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP para evaluar el efecto de la estimulación de 2 minutos, por lo que se registró por una hora control la amplitud de los potenciales. Posteriormente, se estimuló con corriente eléctrica de alta frecuencia.



**Figura 42. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación de 2 minutos.** Se muestra el registro individual del efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia sobre potenciales somatosensoriales. Se registró una hora control, posteriormente se estimuló con 2 minutos de corriente de ruidosa de alta frecuencia. Al termino, se registraron los potenciales por 20 minutos, en este intervalo se observa disminución del potencial para todos los tipos de animal, consecutivamente se suministró con ruido óptico y se muestra para los ratones Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP un incremento paulatino de la amplitud del potencial mientras que para los ratones C57, no mostró ningún cambio

Posteriormente a esto, pasados 20 minutos, se suministró ruido óptico por un minuto cada 5 minutos. Los ratones C57 no mostraron diferencia con lo reportado en el apartado anterior para la estimulación de 2 minutos en ratas. En contraste, los ratones Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP mostraron una recuperación en la amplitud del potencial con la estimulación ruidosa óptica. En la figura 42 se muestran los registros para cada ratón.

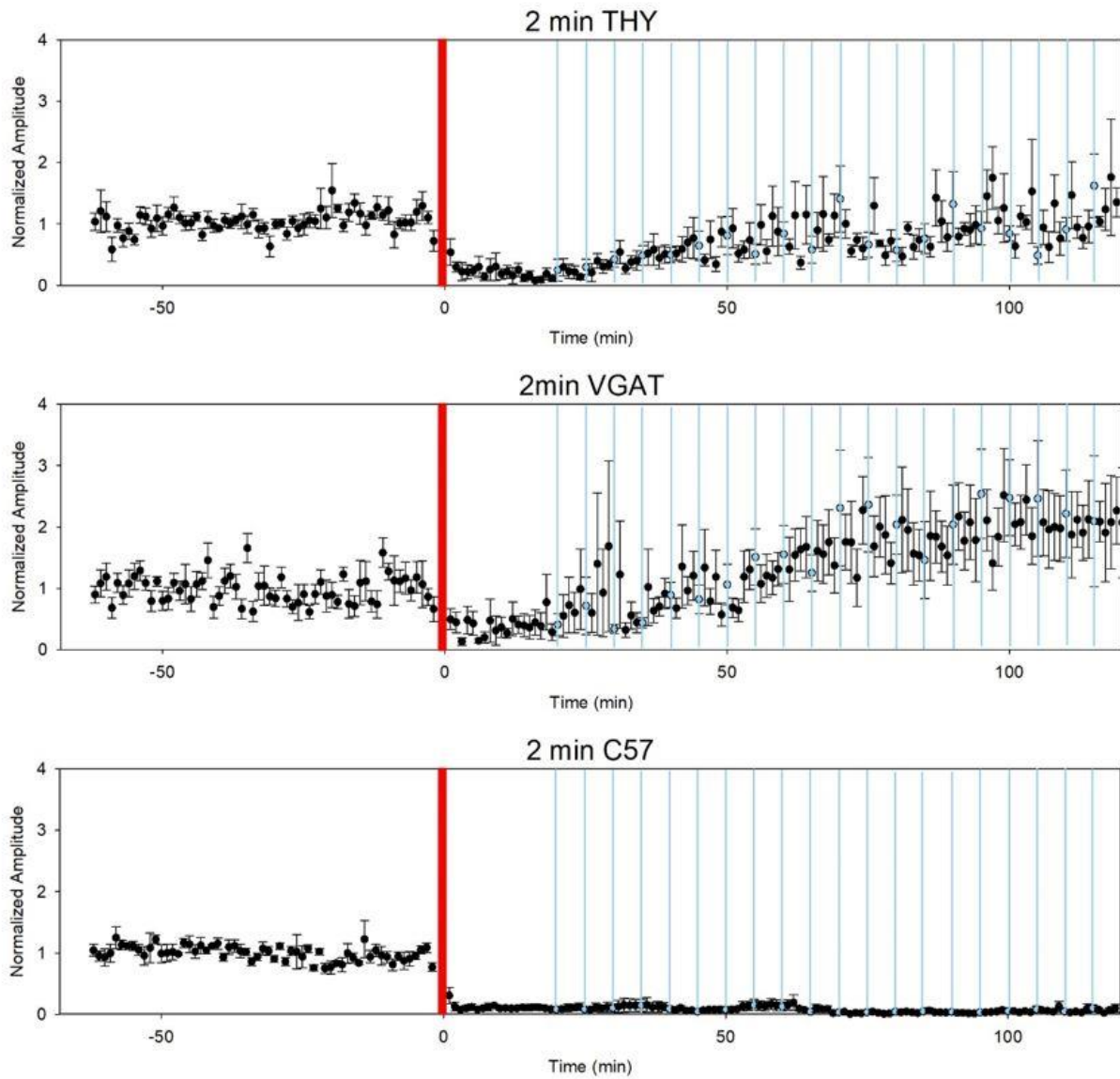


Figura 43. Gran promedio de registros individuales de ratones con estimulación eléctrica de alta frecuencia de 2 minutos para ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57. Se muestra el registro promedio del efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia sobre potenciales somatosensoriales

## 7.5 Efecto de Estimulación óptica ruidosa sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales

### 7.5.1 Efecto de Estimulación con 10 min de estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP.

Para evaluar el efecto del ruido, se procedió a realizar un protocolo similar al de estimulación eléctrica. Sólo que esta vez con estimulación óptica sobre ratones genéticamente modificados Thy-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP. El protocolo consistió en registrar por media hora la amplitud del potencial somatosensorial provocado. Posteriormente, se estimuló con un láser de 450 nm con variación ruidosa en la frecuencia, mientras se generaban potenciales somatosensoriales por 10 minutos. Finalmente, se evaluó el efecto de dicha estimulación en un rango de una a dos horas. Se compararon los datos de los ratones transgénicos con ratones de esta sepa (C57) sin modificaciones genéticas.

En la figura 44 se puede ver el compendio de experimentos realizados para todos los ratones. Para los ratones Thy1-ChR2-YFP, se observa un incremento de hasta siete veces en la amplitud de los potenciales posterior a los 10 min de estimulación la cual perdura en el tiempo, y una vez finalizada la estimulación óptica. Por otra parte, en los ratones VGAT-ChR2, también se muestra un ligero incremento en la amplitud de los potenciales. Finalmente, los ratones C57, no muestran ninguna variación en la amplitud de los potenciales; esto era lo esperado, ya que no cuentan con ninguna proteína fotosensible.

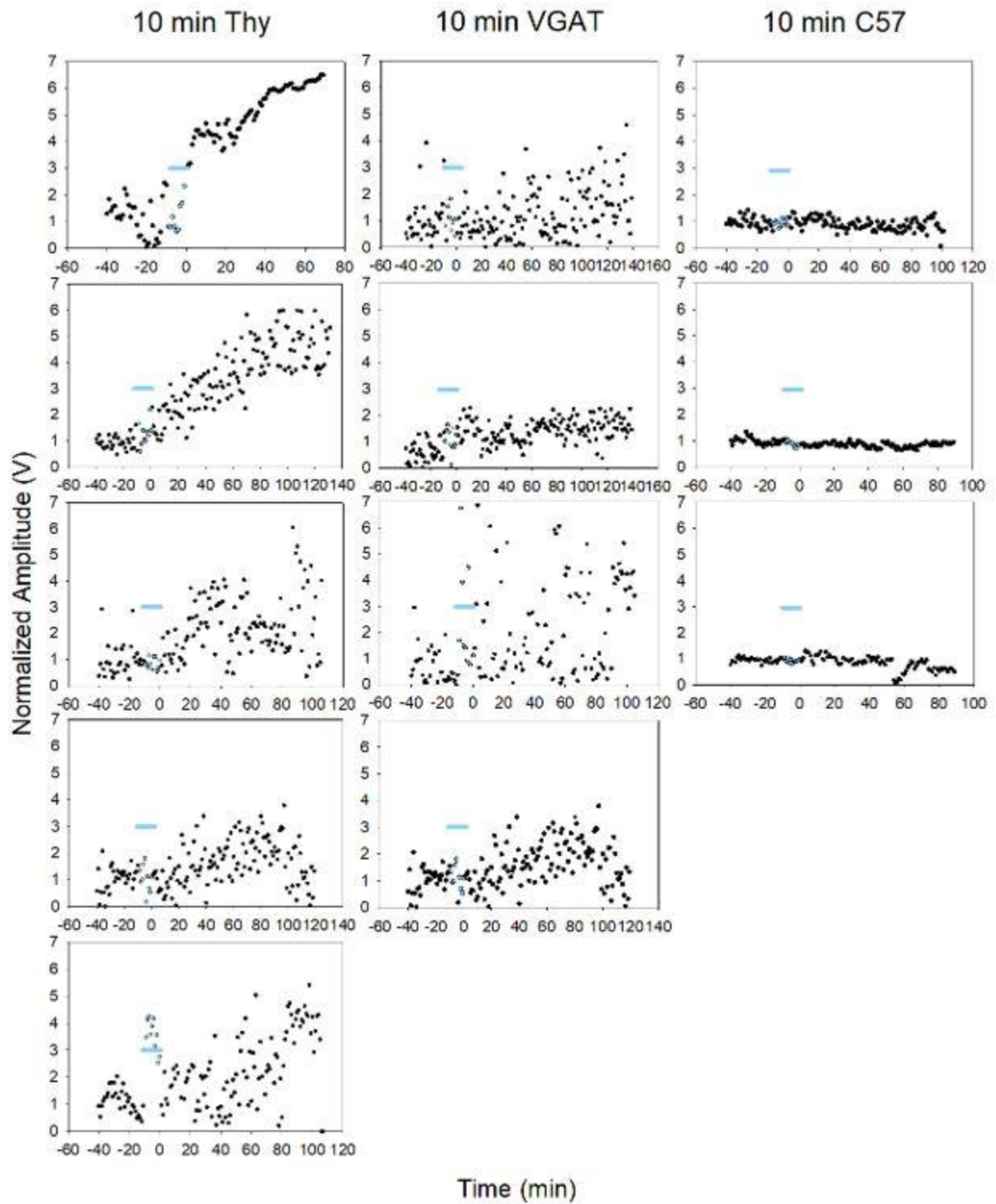


Figura 44. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación óptica de 10 minutos. Se

muestra la amplitud normalizada de los potenciales para cada animal empleado en el experimento. Se puede observar que para los ratones Thy-ChR2-YFP existe un incremento evidente de dichos potenciales posterior a la estimulación óptica. Mientras que para los ratones VGAT-ChR2-YFP muestran un menor incremento en la amplitud de los potenciales. Los ratones C57 no muestran cambios en la amplitud de los potenciales.

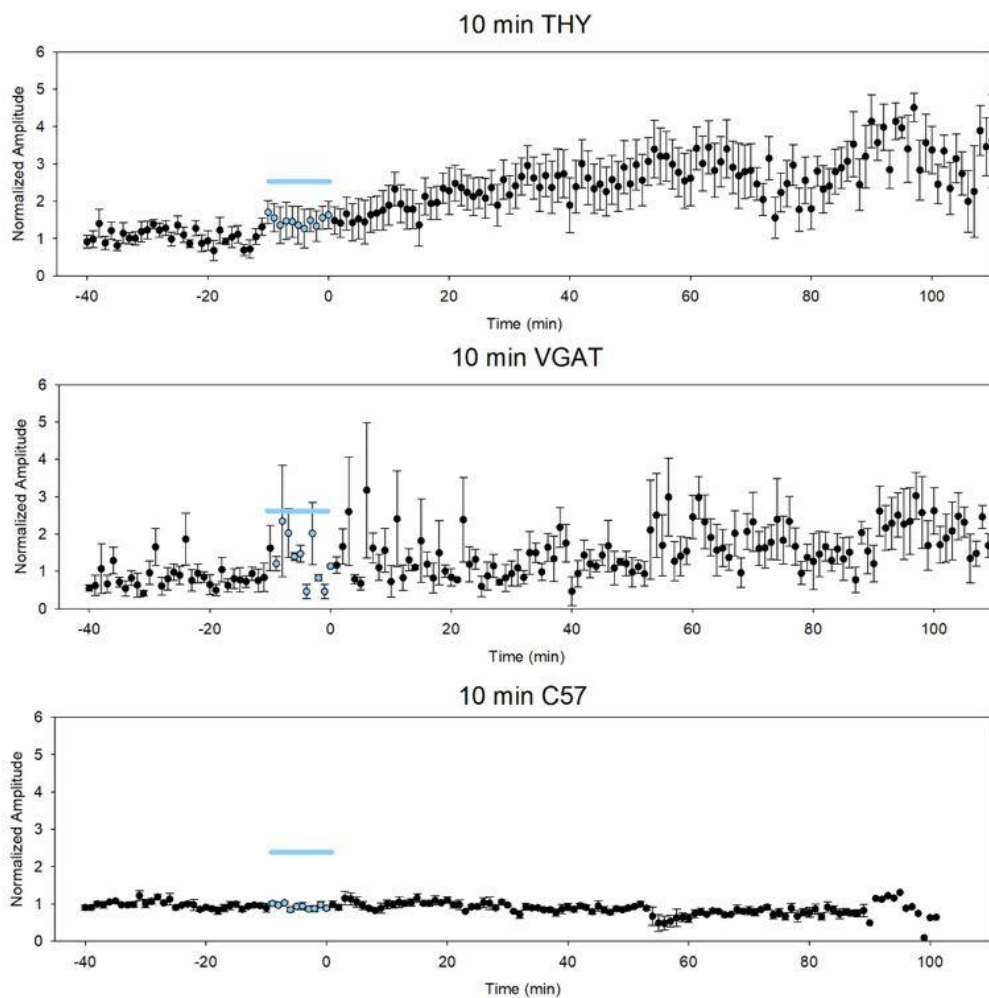


Figura 45. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación óptica de

**10 minutos.** Se muestra la amplitud normalizada promedio de los potenciales de toda la población de animales experimentales. Se mantiene el incremento de los potenciales de los ratones Thy-ChR2-YFP en un máximo de 5 veces a la amplitud control. Dicho incremento tiende a ser paulatino hasta llegar a un máximo de amplitud. De manera similar, los ratones VGAT-ChR2-YFP muestran un incremento significativo después de la estimulación óptica; sin embargo, no existe un gran incremento comparado con los ratones Thy-ChR2-YFP. Finalmente, los ratones C57 que no presentan modificación genética, no muestran variación a largo del tiempo, incluso después de la estimulación óptica.

### 7.5.2 Efecto de Estimulación con 2 min de estimulación lumínica sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP.

Para continuar con la evaluación descrita en el apartado anterior, se procedió a realizar un protocolo similar al de 2 minutos de estimulación eléctrica. Sólo que esta vez con estimulación óptica sobre ratones genéticamente modificados Thy-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP. El protocolo consistió en registrar por media hora la amplitud del potencial somatosensorial provocado. Posteriormente, se estimuló con un láser de 450 nm con variación ruidosa en la frecuencia mientras se generaban potenciales somatosensoriales por 2 minutos. Finalmente, se evaluó el efecto de dicha estimulación en un rango de una a dos horas. Se compararon los datos de los ratones transgénicos con ratones de esta cepa (C57) sin modificaciones genéticas.

En la figura 46 se puede ver el compendio de experimentos realizados para todos los ratones. Para los ratones Thy1-ChR2 se observa un ligero incremento en algunos animales experimentales; mientras que para los ratones VGAT-ChR2, no se muestran incrementos significativos; así como tampoco para los ratones C57.

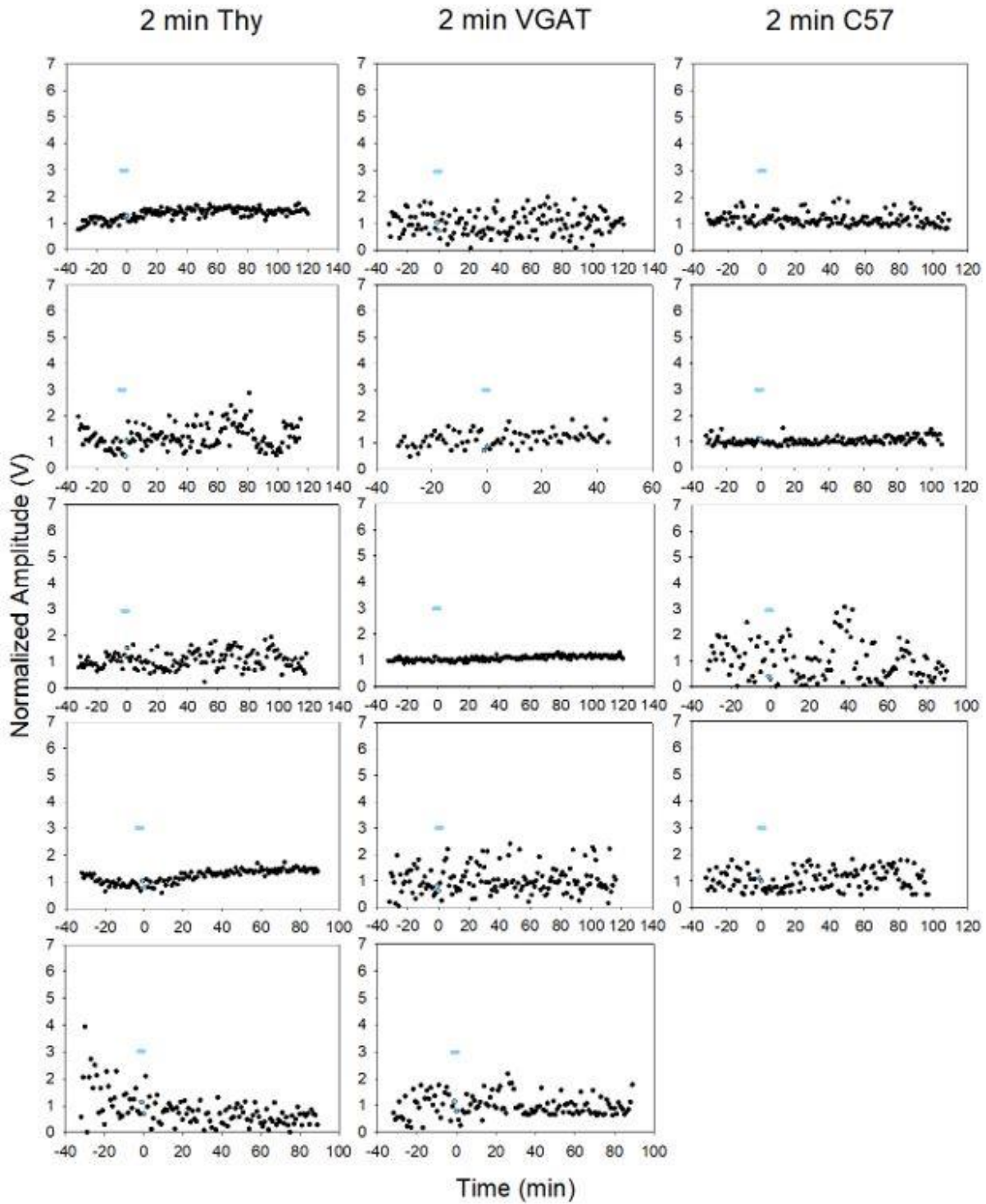


Figura 46. Registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación óptica de 10 minutos. Se muestra la amplitud normalizada de los potenciales para cada

animal empleado en el experimento. Se puede observar que para los ratones Thy-ChR2-YFP existe un incremento significativo de dichos potenciales posterior a la estimulación óptica para algunos de los ratones. Mientras que los ratones VGAT-ChR2-YFP, no muestran un incremento significativo en la amplitud de los potenciales. Los ratones C57 no muestran cambios en la amplitud de los potenciales.

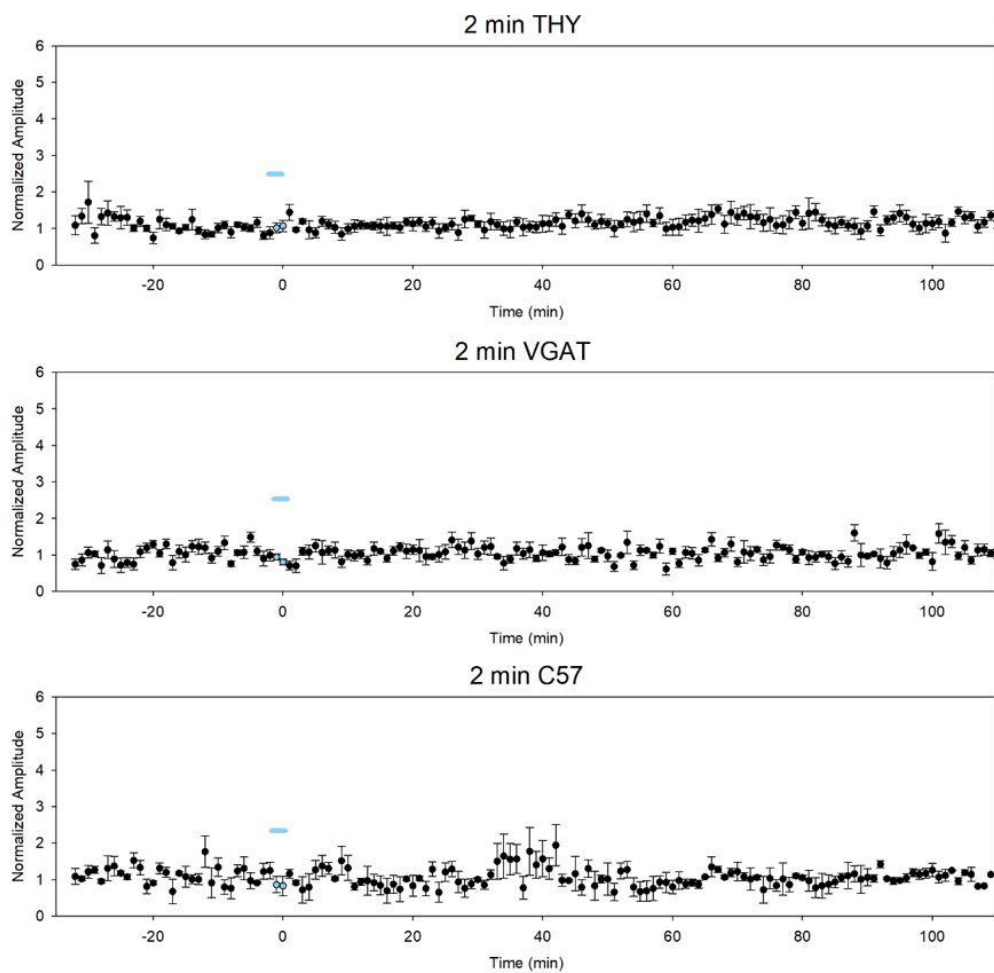


Figura 47. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación óptica de 10 minutos. Se muestra la amplitud normalizada promedio de los

potenciales de toda la población de animales experimentales. Los ratones Thy-ChR2-YFP, no muestran un incremento significativo, así como los ratones VGAT-ChR2-YFP y C57.

## **7.6 Efecto de pulsos pareados de luz sobre la amplitud de los potenciales somatosensoriales**

### **7.6.1 Efecto de pulso pareados de luz en ratones Thy-ChR2-YFP sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales**

Se procedió a evaluar el efecto de la liberación de neurotransmisores en la corteza relacionado al estímulo mecánico de vibrisas y pulsos pareados de luz, mediante el protocolo descrito en la sección de material y métodos (ver Figura 16). Para esta primera sección, se utilizaron ratones Thy-ChR2-YFP, donde se midió la amplitud del potencial y se normalizó con respecto a la amplitud del potencial generado mecánicamente. En la Figura 48, cada gráfica muestra un animal experimental. Cada gráfica muestra la relación entre el trigger (estímulo mecánico para protracción de vibrisas en color negro) y la latencia del estímulo únicamente óptico. Esta estimulación va incrementada desde 1 ms hasta los 2000 ms en color azul, como se muestra en la Figura 16. Finalmente, el color naranja ilustra ambos estímulos con la latencia descrita previamente.

## Thy-ChR2

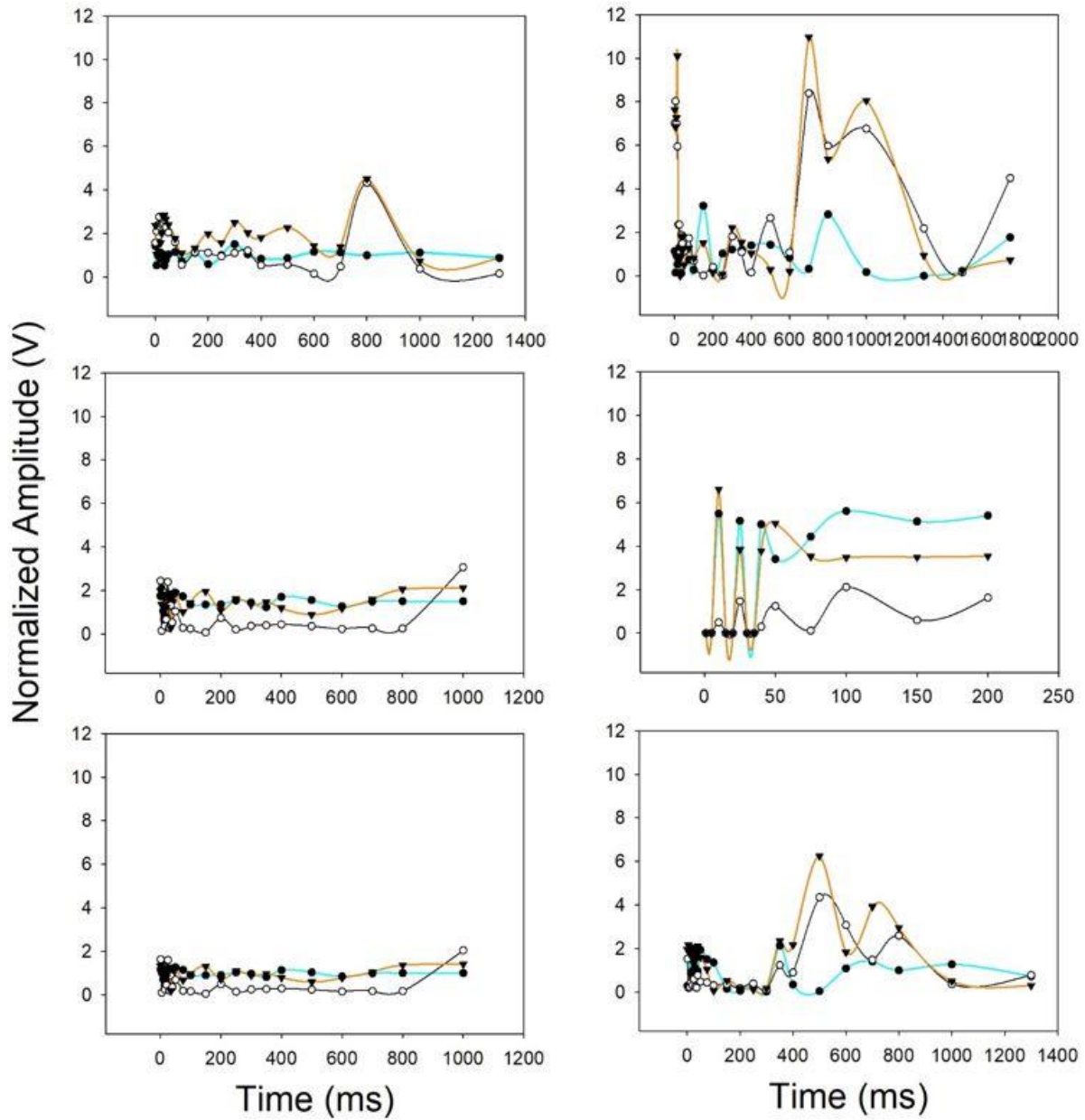


Figura 48. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones Thy-ChR2-YFP. Se muestra la amplitud normalizada de cada ratón empleado. Se observa en color negro el estímulo mecánico comandado por el trigger. Por otra parte, en color azul, se muestra

únicamente el estímulo óptico efectuado con latencia al trigger, desde un intervalo de 1 ms hasta 2000 ms. Mientras que en color naranja, se muestra el estímulo mecánico comandado por el trigger, más el estímulo óptico con latencia respecto al trigger. Las amplitudes de los potenciales están normalizados respecto a la amplitud promedio del potencial generado mecánicamente. Se puede observar que el potencial somatosensorial generado cercano al trigger, presenta mayor amplitud, y este disminuye conforme incrementa la latencia entre el trigger y el estímulo óptico. Así mismo, si la latencia es suficientemente grande alrededor de unos 600 ms, el potencial se ve incrementado. Esto sugiere que las neuronas han terminado su periodo refractario y están disponibles para responder al estímulo mecánico.

### 7.6.2 Efecto de pulso pareados de luz en ratones VGAT-ChR2-YFP sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales

Se aplicó el protocolo descrito en la sección anterior en animales VGAT-ChR2-YFP, con el objetivo de entender cómo la liberación de neurotransmisores inhibitorios afecta el potencial y cómo, posteriormente, la estimulación ruidosa —eléctrica de alta frecuencia y óptica— puede modular la amplitud de los potenciales somatosensoriales (Figura 49).

## Thy-ChR2

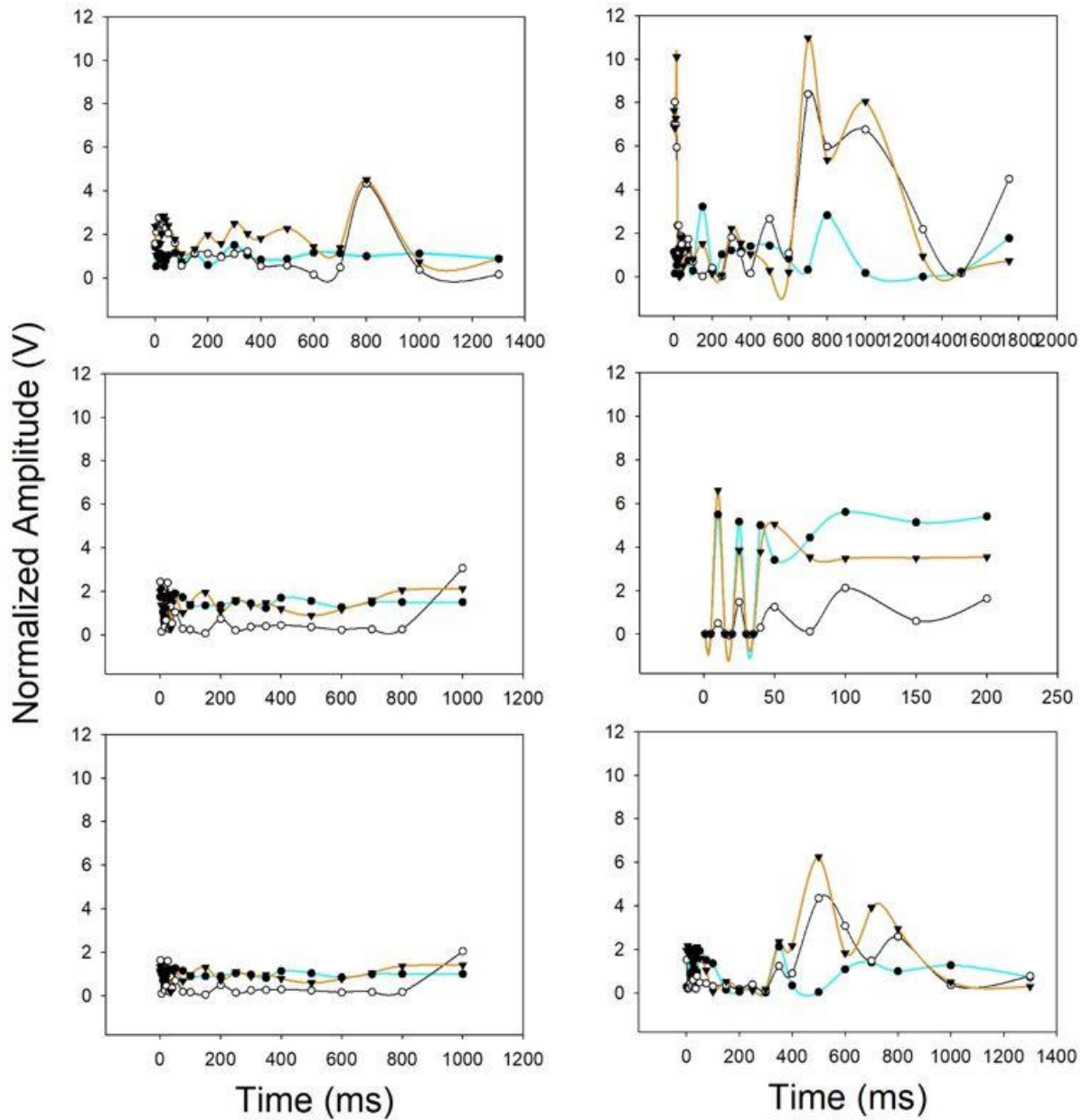


Figura 49. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones VGAT-ChR2. Se muestra la amplitud normalizada de cada ratón VGAT empleado. Se observa en color negro el estímulo mecánico comandado por el trigger. Por otra parte, en color azul, se muestra únicamente el estímulo óptico efectuado con latencia al trigger,

desde un intervalo de 1 ms hasta 2000 ms. Mientras que en color naranja se muestra el estímulo mecánico comandado por el trigger más el estímulo óptico con latencia respecto al trigger. Las amplitudes de los potenciales están normalizados respecto a la amplitud promedio del potencial generado mecánicamente. Se puede observar que el potencial somatosensorial generado cercano al trigger presenta mayor amplitud, y este disminuye conforme incrementa la latencia entre el trigger y el estímulo óptico. Por lo que la liberación de neurotransmisores inhibitorios afecta la amplitud del potencial; es decir, se encuentran mayor cantidad de neuronas inhibidas que no estarían disponibles para generar un potencial.

### 7.6.3 Efecto de pulso pareados de luz en ratones C57 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales

Para continuar con el estudio del efecto de la liberación de neurotransmisores, se procedió a usar ratones de la misma cepa C57 sin ninguna modificación transgénica que expresara proteínas fotoestimulables. Se empleó el protocolo experimental previamente descrito. En la figura 50 se muestra las gráficas de los animales empleados para esta sección.

## C57

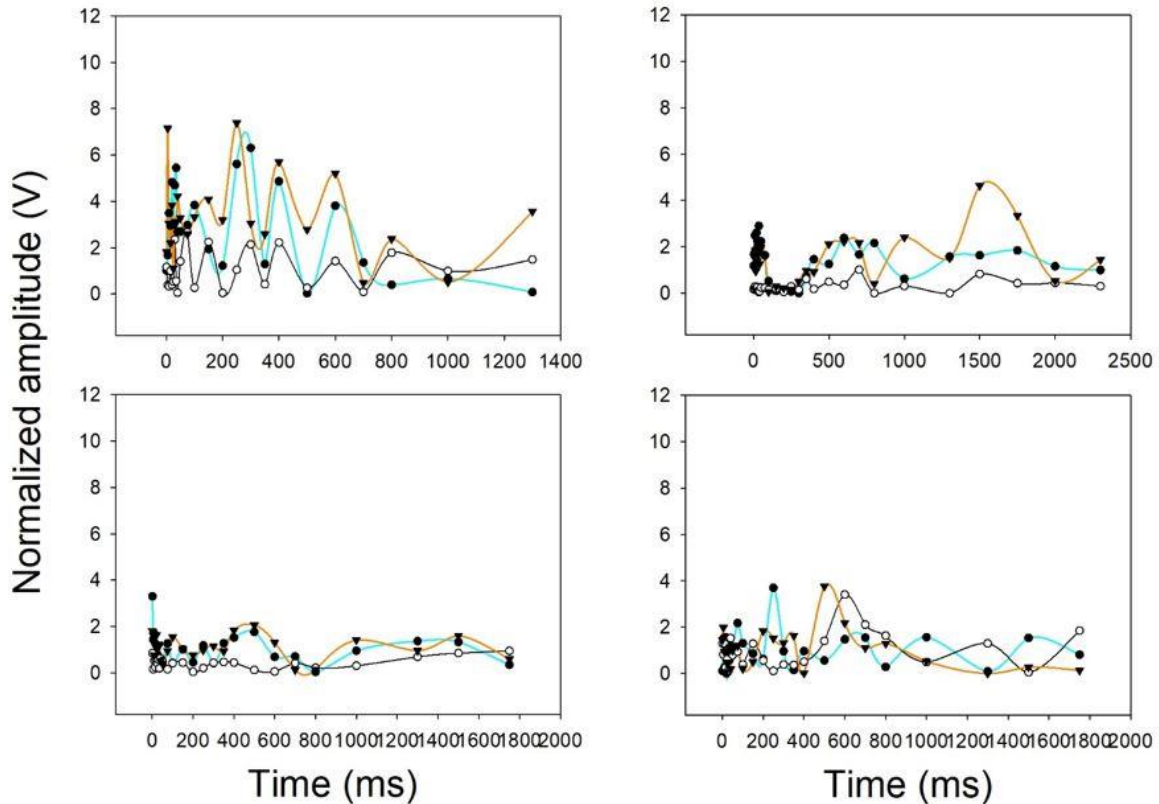


Figura 50. Curva de estimulación de pulsos pareados en ratones C57. Se presenta la amplitud normalizada de los potenciales registrados en cada ratón C57 utilizado. En color negro se indica el estímulo mecánico sincronizado con el *trigger*; en azul, el estímulo óptico aplicado con diferentes latencias respecto al *trigger* (de 1 a 2000 ms); y en naranja, la combinación del estímulo mecánico con el estímulo óptico aplicado con retardo. Las amplitudes están normalizadas respecto al valor promedio del potencial evocado por el estímulo mecánico. No se observan variaciones en la amplitud del potencial somatosensorial en función de la latencia

del pulso óptico, lo cual es consistente con la ausencia de proteínas fotoestimulables en estos animales.

#### 7.6.4 Efecto de pulso pareados de luz en ratones Thy-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 sobre la amplitud de potenciales somatosensoriales

Se calcularon los promedios generales de la amplitud del potencial para compararlos entre los grupos Thy-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57. En la Figura 51 se muestra la comparación global, donde se observa un incremento en el potencial alrededor de los 900 ms en los ratones VGAT-ChR2-YFP y Thy-ChR2-YFP. Este aumento podría estar asociado con la liberación de neurotransmisores inhibitorios y excitadores en regiones corticales.

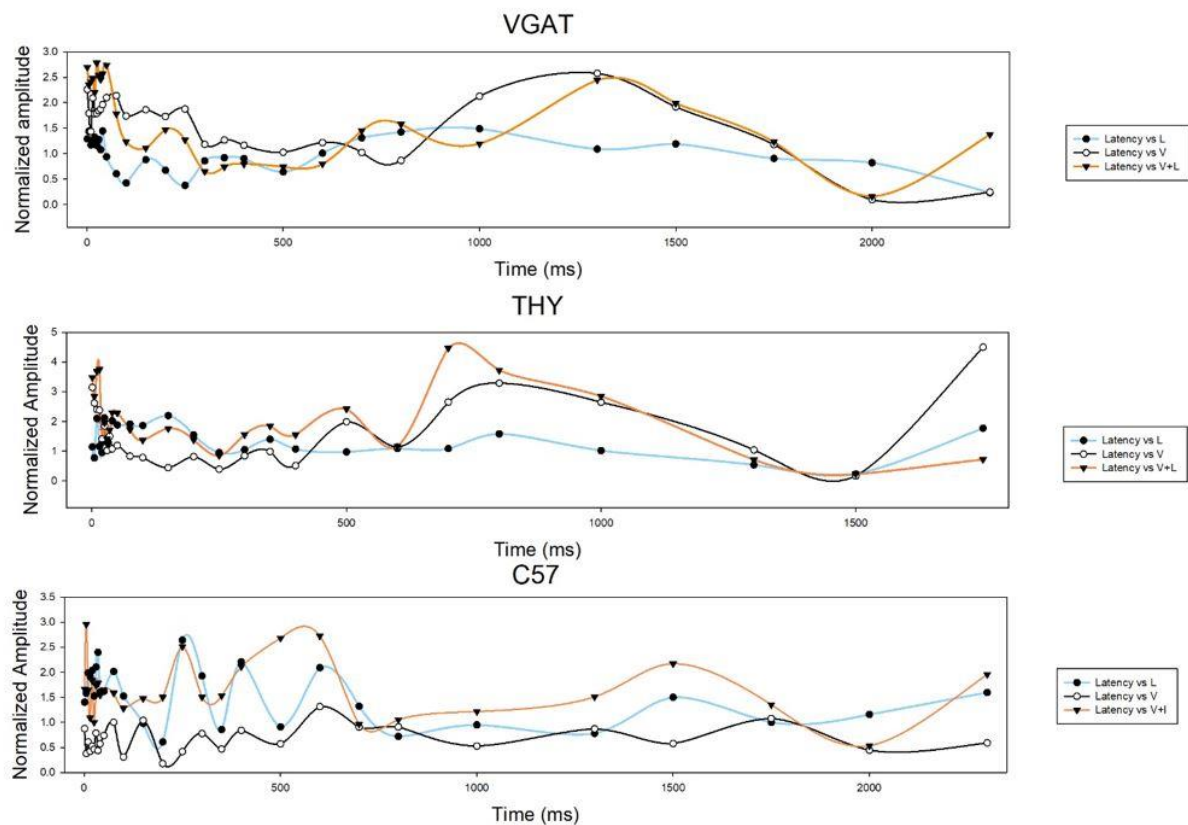


Figura 51. Gran promedio de registros individuales de ratones Thy1-ChR2-YFP, VGAT-ChR2-YFP y C57 con estimulación óptica de **10 minutos**. Se muestra la amplitud normalizada promedio de los potenciales de toda la población de animales experimentales. Los ratones Thy-ChR2-YFP, muestran un incremento significativo a partir de los 900 ms, así como los Ratones VGAT-ChR2-YFP. Por otra parte, los ratones C57, muestran una amplitud variable del potencial a las diferentes latencias.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Integración sensorial de la corteza de los barriles ante la estimulación mecánica de las vibrisas

Una vez comprendido el panorama general del efecto de la estimulación eléctrica cortical de alta frecuencia, es necesario profundizar en los mecanismos subyacentes a este efecto, especialmente en lo relacionado con la actividad neuronal, los neurotransmisores implicados y la organización de circuitos de la corteza somatosensorial. Como se describió en la sección de resultados, el tiempo de estimulación es un factor clave para modular la excitabilidad neuronal, así como para influir en el tipo de neurotransmisores liberados.

Para abordar esta cuestión, es fundamental entender primero el funcionamiento y la organización de la corteza somatosensorial, en particular su distribución y conexiones neuronales. En este sentido, estudios como el de Sermet et al. (2019), utilizando optogenética y electrofisiología, describen las proyecciones tálamo-corticales desde los núcleos ventral posteromedial y posterior del tálamo hacia la lámina 4 de la corteza de barriles.

A nivel superior del procesamiento sensorial, Staiger y Petersen (2020) describen un circuito local dentro de la corteza somatosensorial que integra la información táctil

proveniente de las vibrisas. Este procesamiento es llevado a cabo por una red de neuronas excitatorias e inhibitorias, donde tanto la integración dendrítica como la especificidad de las neuronas desempeñan un papel fundamental. En términos de integración dendrítica, se ha demostrado que la presencia de canales catiónicos en las dendritas puede inducir despolarizaciones que generan eventos regenerativos locales, como espigas de NMDA (Schiller et al., 2000), de calcio (Lankum et al., 1999) y de sodio (Smith et al., 2013). Estos eventos han sido asociados con la modulación de respuestas a estímulos de las vibrisas en neuronas de la lámina 4 (Lavzin et al., 2012), así como con tareas de detección y localización de objetos dependientes de la información táctil (Takahashi et al., 2016; Ranganathan et al., 2018; Xu et al., 2013).

En cuanto a la especificidad neuronal, se destacan las propiedades particulares de las neuronas inhibitorias y excitatorias de la lámina 5. Esta capa se puede dividir funcionalmente según los objetivos de proyección de sus neuronas: las neuronas de proyección del tracto piramidal (PT), localizadas principalmente en la capa 5B, proyectan a regiones subcorticales; mientras que las neuronas intratelencefálicas (IT), ubicadas sobre todo en la capa 5A, se proyectan a otras áreas corticales y al cuerpo estriado (Hattox y Nelson, 2007; Larsen et al., 2008; Naka et al., 2016). Las conexiones entre estas neuronas son asimétricas: las neuronas IT establecen sinapsis excitatorias tanto con otras IT como con neuronas PT, mientras que las PT se conectan preferentemente con otras neuronas del mismo tipo (Brown y Hestrin, 2009; Lefort et al., 2009; Perin et al., 2011). Además, tanto las PT como las IT pueden subdividirse aún más según los subconjuntos específicos de regiones subcorticales o corticales a las que se proyectan (Hattox y Nelson, 2007).

Por otro lado, las interneuronas corticales constituyen una población diversa que puede clasificarse ampliamente según su morfología, conectividad, identidad molecular, origen del desarrollo, y propiedades electrofisiológicas y sinápticas (Markram et al., 2004; Ascoli et al., 2008; DeFelipe et al., 2013).

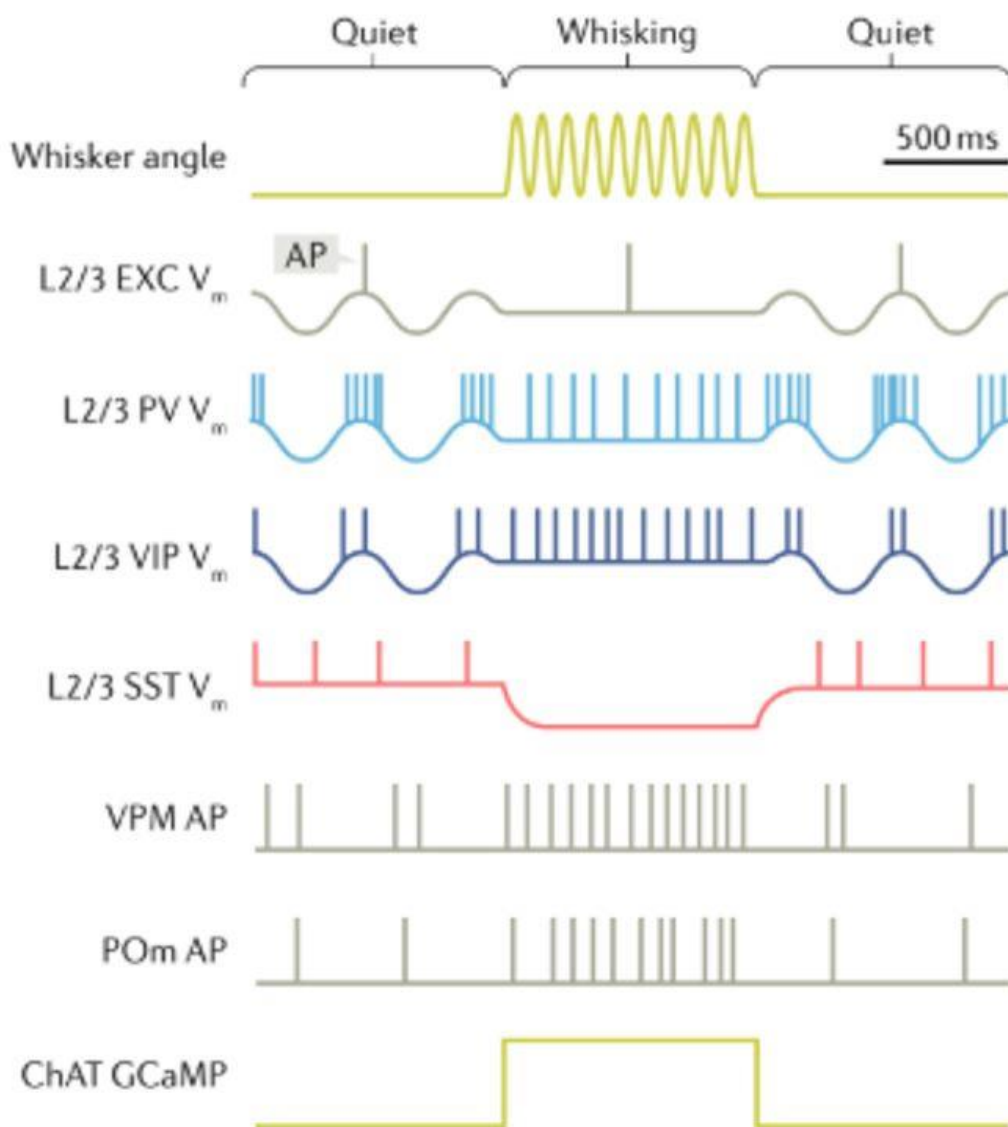


Figura 52. Representación esquemática de la dinámica del movimiento de vibrisas y específicos potenciales de membrana y de acción para las variantes celulares de la corteza somatosensorial. Durante periodos de reposo, cuando las vibrisas no están en movimiento, sincronizaciones de fluctuaciones lentas de voltaje son encontradas en células excitadoras (EXC), neuronas que expresan parvalbumina (PV) y neuronas que expresan péptido intestinal vasoactivo (VIP). Las neuronas que expresan somatostatina (SST) muestran menor fluctuación de voltaje que las que están menos correlacionadas con su cercanía. Durante el movimiento de vibrisas, las neuronas talámicas incrementan su frecuencia de descarga en el núcleo medial posterior ventral (VPM) y núcleo posteromedial (POm), así como un incremento en las entradas colinérgicas (ChAT). Fluctuaciones lentas corticales de voltaje de membrana son suprimidas durante el movimiento de vibrisas. Neuronas VIP despolarizan e incrementan su frecuencia de potenciales de acción, mientras que las neuronas SST se hiperpolarizan y disminuye su frecuencia de descarga. Tomado de Petersen, 2019

Las interneuronas corticales se pueden separar a grandes rasgos en tres grupos esencialmente no superpuestos en función de su expresión de los marcadores moleculares: Parvalbumina (PV), somatostatina (SST), o el receptor de serotonina 5 HT3aR (Rudy et al 2011).

Con base en lo anterior, podemos encontrar diversos trabajos que proponen las conexiones entre neuronas para llevar a cabo diferentes integraciones de la percepción táctil. Tal es el caso del trabajo de Petersen en 2019, donde recopila los microcircuitos ubicados en la corteza somatosensorial de los roedores. La lamina L1, contiene exclusivamente neuronas inhibitorias GABAérgicas, mientras que en las capas L2-L6 contienen diversos tipos de neuronas excitadoras e inhibitorias. Las neuronas provenientes del núcleo posterior medial del tálamo (VPM, por sus siglas en inglés) proyectan prominentemente a la lámina L4 y estas es donde la corteza de los barriles esta más claramente identificado. Las neuronas VPM también inervan a la lámina L3 de la corteza inmediatamente arriba de la lámina L4, y provee axones colaterales a las láminas L5 y L6 (Leford et al 2009, Jensen et al 1987). Las neuronas excitadoras e inhibitorias están conectadas sinápticamente con neuronas cercanas en la misma columna de barril, dentro del cual alrededor del 10% son neuronas excitadoras glutamatérgicas. Estas últimas, conectan con neuronas inhibitorias y excitadoras, mientras que las neuronas inhibitorias son típicamente en mayor proporción (50%) (Gibson et al, 1999, Avermann et al 2012, Holmgren et al 2003, Helmstaedter et al 2008, Urban-Clecko et al 2018).

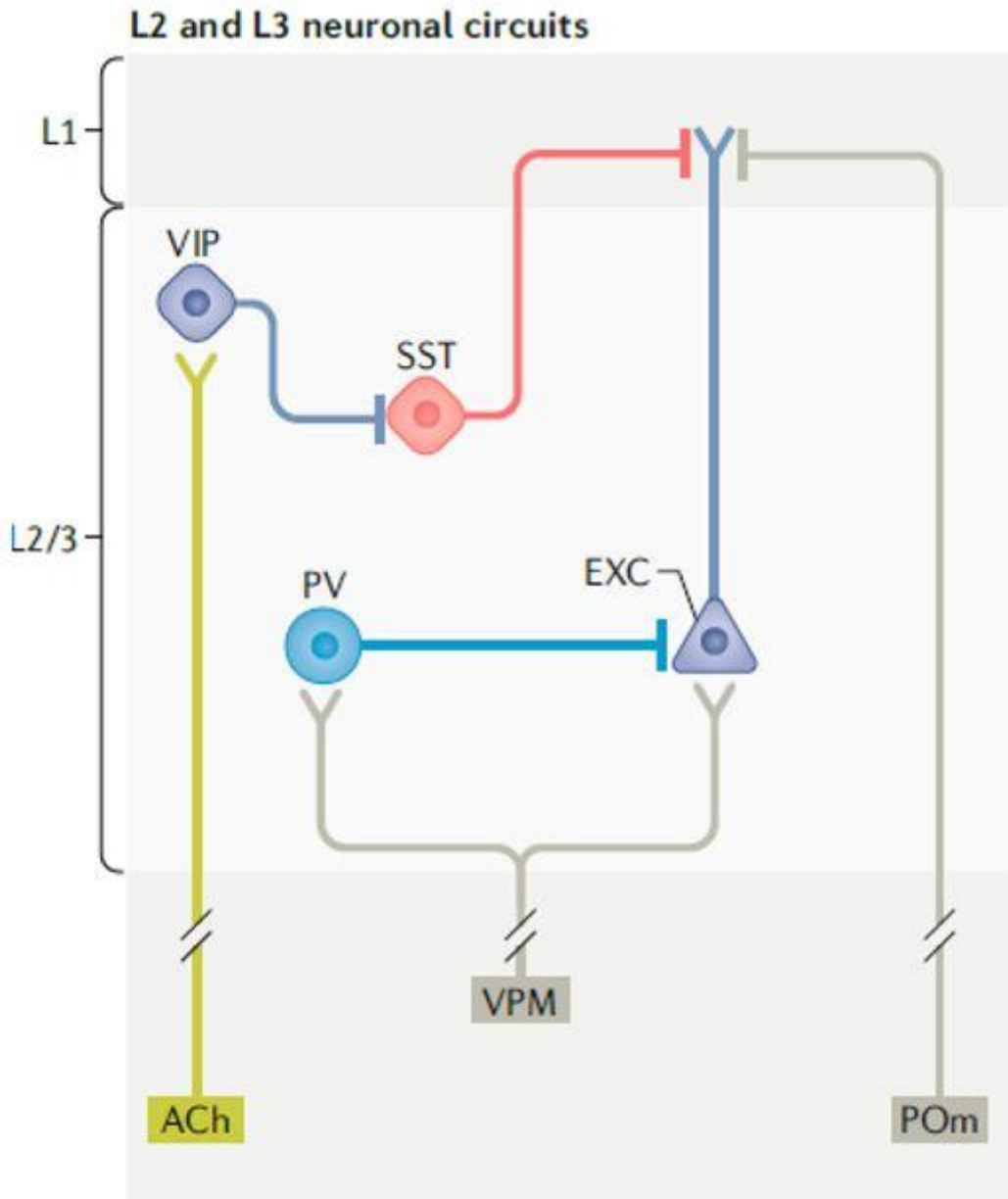


Figura 53. Circuito sináptico que podrían contribuir a los patrones dependientes del estado de a la actividad de las láminas L2 y L3. Entradas colinérgicas pueden despolarizar a las neuronas VIP, las cuales expresan receptores nicotínicos (ACh). Neuronas VIP inhiben a las neuronas SST. Entradas talámicas provenientes de los

VPM y POm para neuronas excitadoras y neuronas PV conducen despolarización, fluctuaciones desincronizadas de Vm; la combinación de glutamato y GABA conducen a que estas respuestas reduzcan la variación de Vm en la mayoría de las células. Tomado de Petersen 2019.

Durante la vigilia, varias clases de neuronas excitadoras e inhibitorias de las láminas L2/L3 expresan correlación alta a lentas fluctuaciones del potencial de membrana. En contraste, neuronas que expresan somatostatina (SST) de las láminas L2/L3 muestran baja respuesta a las fluctuaciones lentas de Vm (Gentet et al 2012, Pala et al, 2012) Estas neuronas SST son inusualmente las que reciben fuerte inhibición proveniente de otra clase de neuronas GABAérgicas caracterizadas por su expresión de péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Lee et al 2013, Pfeffer et al 2013, Pi et al 2013) Por otra parte, evidencia experimental usando ratones genéticamente modificados, mostraron que las neuronas VIP se dirigen principalmente hacia las neuronas SST, y en menor medida, a las neuronas FS (Hioki et al ., 2013, Lee et al., 2013, Pfeffer et al., 2013). Es difícil predecir la función de las neuronas VIP de la corteza, aunque en estudios in vitro, su activación puede producir desinhibición en los circuitos corticales (Lee et al., 2013, Pi et al., 2013).

## Microcircuit in the barrel cortex

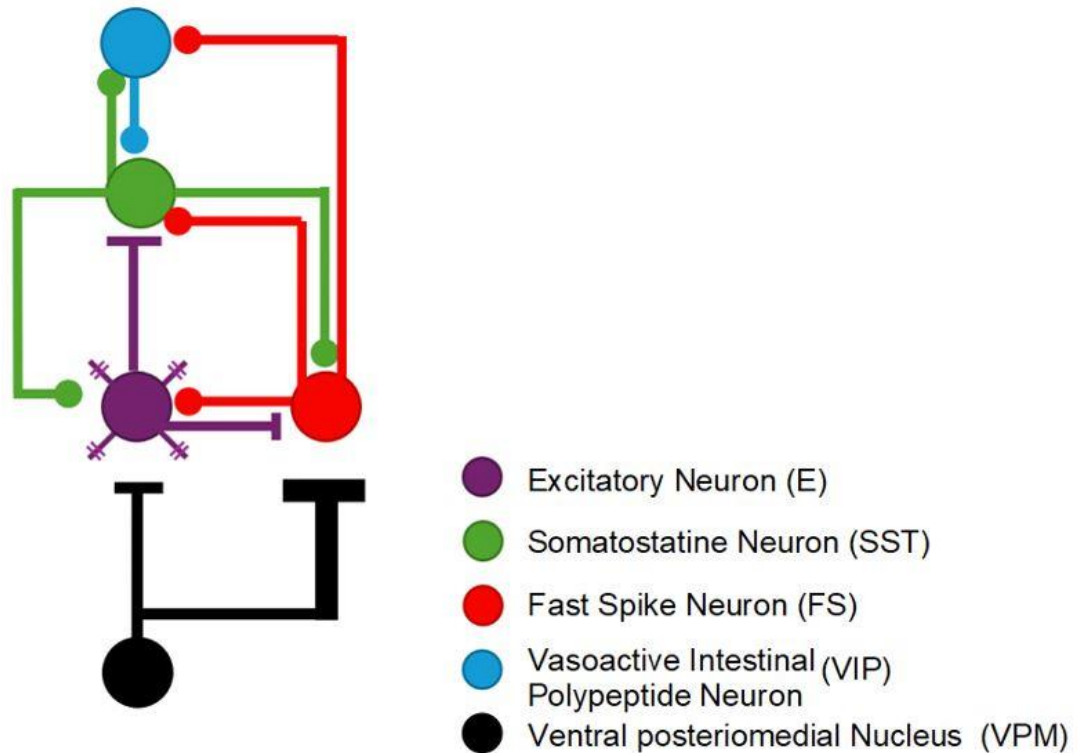


Figura 54. Conectividad de las principales interneuronas con entradas VPM y neuronas E locales. Se muestran las principales neuronas que se encuentran en la corteza de barriles y sus conexiones entre ellas. Se muestran neuronas excitadoras (E) y neuronas inhibitorias (SST, FS, VIP) tomado de Yu et al, 2019.

Yu et al, en 2019 aplicaron fotoestimulación de alta frecuencia (pulsos de 5 ms a 50 Hz) para aumentar la tasa de picos de las neuronas VIP. La estimulación de las neuronas VIP inhibe a las neuronas SST en láminas L4/5. Por otra parte, esta misma estimulación de neuronas VIP activó las neuronas FS L2/3 (100%), L4 (70%) y L5/6(50%). En particular, al comienzo de la estimulación (0-170 ms desde el inicio del láser. Esta misma estimulación de las neuronas VIP aumentó la tasa de picos de

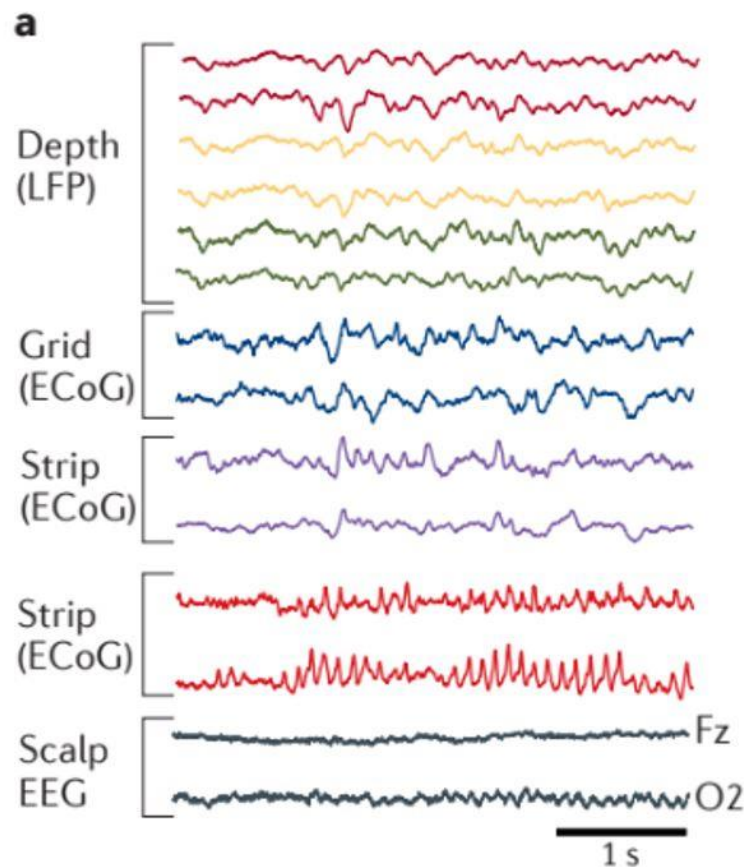
las neuronas E en láminas L5/6. Estos resultados sugieren que la activación de las neuronas VIP durante la protracción de vibrisas produce un efecto específico del tipo de célula y de la capa en una escala de tiempo lenta ( $> 100$  ms) (Yu et al., 2019). Mientras que para el efecto de la estimulación rápida ( $<10$  ms) de neuronas VIP bloquea la activación de las neuronas E y FS (L5/6). Ello revela una inhibición monosináptica selectiva de las interneuronas FS L5/6 y una menor inhibición en la lámina L4. Este trabajo sugiere que la relación entre la inhibición directa VIP sobre FS supera el efecto desinhibitorio indirecto a través de la vía  $VIP \rightarrow SST \rightarrow FS$ , generando un efecto dominó y causando un aumento de la activación de las neuronas FS en otras capas.

## 8.2 Origen de potenciales y corrientes extracelulares, relación entre EEG, ECoG y espigas

En el estudio que hemos realizado, se han usado diferentes técnicas de registro electrofisiológico, desde los registros de superficie, los potenciales de campo locales y la actividad multinitaria. Esto con la finalidad de entender de mejor manera el efecto del ruido eléctrico de alta frecuencia y ruido óptico.

De acuerdo al trabajo de Buzsaki et al 2012, existe una relación entre la actividad de superficie (ECoG) y la actividad intracortical la cual puede ir variando dependiendo de la profundidad registrada (figura 55). En nuestros registros de actividad intracortical realizados en rata, podemos observar la existencia y correlación del potencial de campo somatosensorial con respecto al registrado en la superficie. De acuerdo a nuestros resultados, podemos encontrar diferente amplitud del potencial

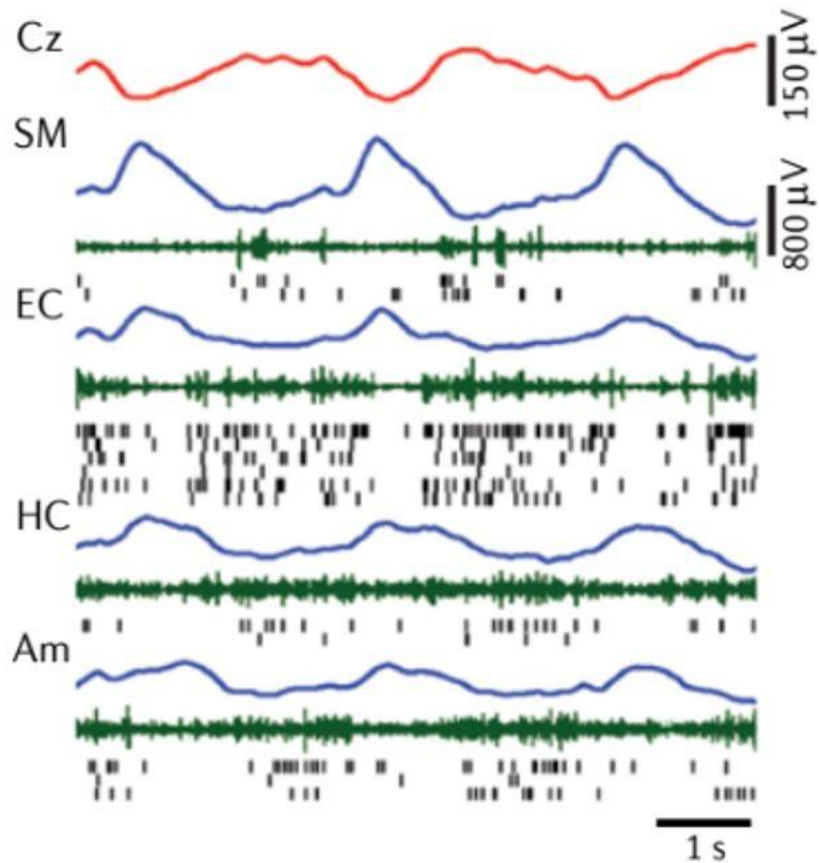
dependiente de la profundidad. De acuerdo a las figuras 38 y 39, es contundente con el trabajo de Buzsaki et al 2012



**Figura 55. Registros simultáneos comparados a diferentes profundidades.** Registros simultáneos proveniente de tres electrodos de profundidad (dos sitios seleccionada cada uno) en la amígdala izquierda y el hipocampo (que miden el potencial de campo local (LFP)). Una matriz de electrodos de rejilla subdural de 3x8 colocada sobre la corteza temporal lateral izquierda (que mide el electrocorticograma (ECoG)); dos tiras de cuatro contactos colocados debajo de la superficie temporal inferior (ECoG); una tira de ocho contactos colocados sobre la superficie orbitofrontal

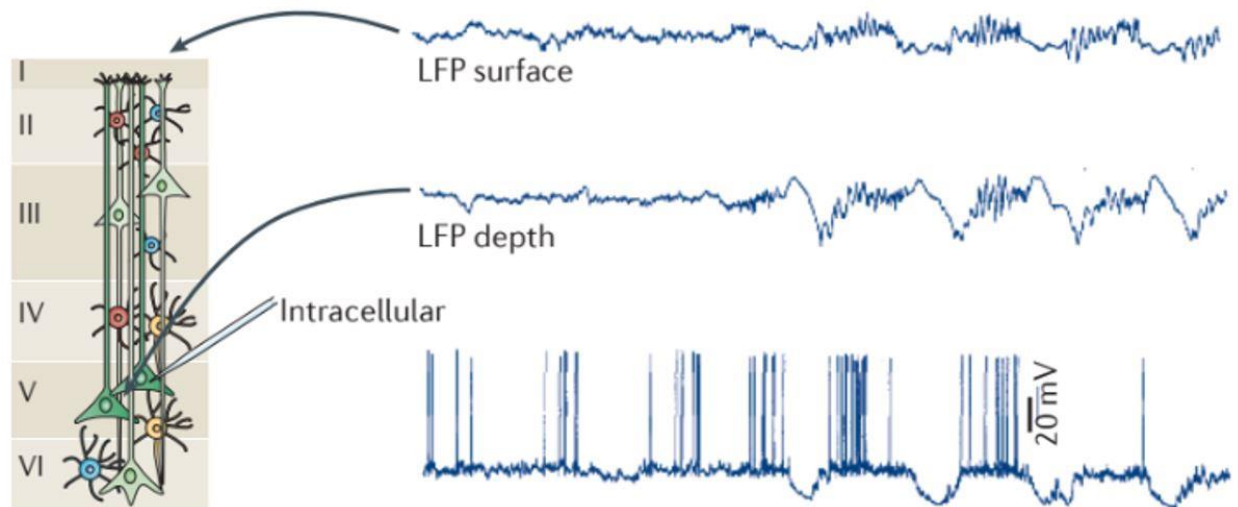
izquierda y electroencefalográfica (EEG) del cuero cabelludo sobre ambos hemisferios (los sitios seleccionados son Fz y O2) en un paciente con epilepsia resistente a fármacos. Las señales de amplitud son más grandes y los patrones de frecuencia tienen mayor resolución en los sitios intracerebrales (LFP) y ECoG en comparación con el EEG del cuero cabelludo. (Buzsaki et al 2012).

Por otra parte, el trabajo de Nir et al en 2011 muestra la relación entre el registro de superficie mediante EEG y su relación con el potencial local de campo (LFP) en diferentes cortezas y órganos subcorticales. Allí se puede apreciar cómo la variación de la frecuencia de descarga está relacionada con la variación del potencial registrado por el EEG y por LFPs. Como se muestra en su estudio, el incremento de frecuencia de descarga neuronal se relaciona con deflexiones positivas en el EEG mientras que negativas en LFPs.



**Figura 56. Relación entre registros de superficie e intracorticales.** 6 s de registro de ondas lentas registradas por EEG (Cs, red) y LFP (azul) registrado por electrodos profundos ubicados en laminas profundas de la corteza motora suplementaria (SM) y corteza entorrinal (EC), hipocampo (HC) y amígdala (Am). También se muestra actividad mutiunitaria (verde) y espigas de neuronas aisladas (marcas negras) (Nir et al 2011)

La profundidad influye en la morfología del registro; es decir, a registros de mayor superficie se eliminan variaciones de voltaje de neuronas activadas. En situación inversa, los registros de LFP cercanos a la neurona descargando, reflejan con mejor fidelidad las variaciones de onda y la frecuencia de descarga.



**Figura 57. Registros extracelulares e intracelulares.** Registros simultáneos de LFP provenientes de la superficie y laminas profundas de la corteza motora en gatos anestesiados y un registro intracelular de neurona de la laminas 5. Se observa alternancia de la hiperpolarización y despolarización (oscilación lenta) de la neurona de la lámina 5 y corresponde a cambios en el LFP. Las ondas positivas en la lámina profunda (cercanas a la neurona) son también conocidas como ondas delta, iEEG, EEG intracraneal (Contreras et al 1995)

### 8.3 Ajuste de datos de frecuencia de descarga neuronal relacionada a la estimulación eléctrica

Con base en los resultados reportados por la parte experimental, se propone un modelo de ecuaciones diferenciales estilo Hodgkin y Huxley de 1952. Dicho modelo replica la frecuencia de descarga neuronal relacionada al estímulo mecánico, previo y posterior a la estimulación eléctrica ruidosa. Para esto nos basamos en los trabajos

realizados por Mainen y cols de 1995, Hay y cols. de 2011, y Remedios y cols. de 2019. El sistema de ecuaciones diferenciales es el siguiente:

Velocidades de intercambio de estado para canal de potasio:

$$\alpha_n = \frac{0.01(V - 55)}{0.125e^{-\left(\frac{V+55}{10}\right)}}$$

$$\beta_n = \frac{0.1(V + 40)}{1 + e^{-\frac{V+65}{80}}}$$

Velocidades de intercambio de estado para canal de Sodio:

Activado

$$\alpha_m = \frac{0.1(V + 40)}{1 - e^{-\frac{V+40}{10}}}$$

$$\beta_m = 4e^{-\frac{V+65}{20}}$$

Inactivado

$$\alpha_h = 0.07e^{-\frac{V+65}{20}}$$

$$\beta_h = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V+35}{10}}}$$

Velocidades de intercambio de estado para canal de Calcio:

$$\frac{dM}{dt} = \tau_M^{-1}(-M + M_\infty)$$

$$\frac{dH}{dt} = \tau_H^{-1}(-H + H_\infty)$$

Probabilidades entre estados iniciales

$$n = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}$$

$$m = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}$$

$$h = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h}$$

$$M_\infty = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+57}{6.2}\right)}}$$

$$H_\infty = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+81}{4}\right)}}$$

Probabilidades entre estados ya iniciados

$$n = \frac{S_2\alpha_n}{S_2\alpha_n + S_1\beta_n}$$

$$m = \frac{S_2\alpha_m}{S_2\alpha_m + S_1\beta_m}$$

$$h = \frac{S_2\alpha_h}{S_2\alpha_h + S_1\beta_h}$$

$$\tau_M = 0.612 + \frac{1}{e^{-\frac{V+132}{16.7}} + e^{-\frac{V+16.8}{18.2}}}$$

Si el  $V < -80$  mV

$$\tau_H = e^{\frac{V+467}{66.6}}$$

Si el  $V \geq -80$  mV

$$\tau_H = 28 + e^{\frac{-V+22}{10.5}}$$

Donde  $S_2$  y  $S_1$  respectivamente son la probabilidad de modificar  $\alpha$  y  $\beta$  para un determinado estado de apertura, cierre o inhibición de los canales.

Para resolver el sistema de ecuaciones, y con la finalidad de simular la actividad natural del sistema, se usaron los parámetros descritos por Mainen y cols de 1995

$$g_{Na} = 36 \pm 14$$

$$g_K = 120 \pm 40$$

$$g_{Ca} = 3$$

$$g_L = 0.3$$

$$E_{Na} = 60$$

$$E_{Ca} = 120$$

$$E_k = -88$$

$$E_L = -54.387$$

$$C = 1$$

Para emular la actividad aleatoria de descarga en el entorno, se usó la siguiente corriente:

$$I_{app}(t) = a_i + 9.5$$

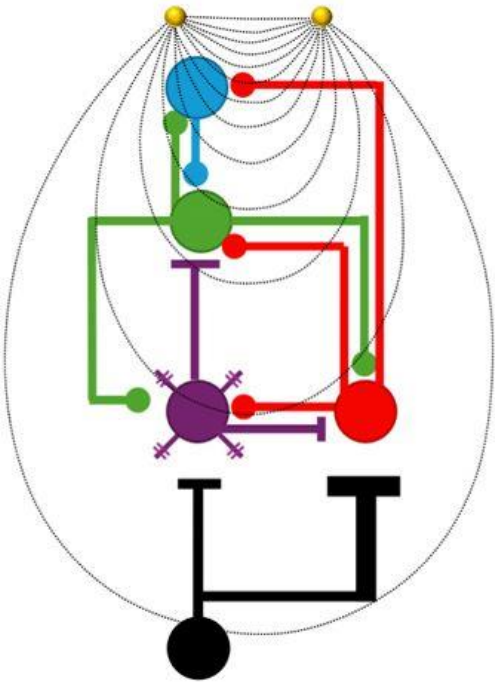
Donde  $a_i$  es un número aleatorio ( $i \in \{0,1, \dots, 300\}$ ) siguiendo una distribución con promedio igual a  $x_{mean}$  y varianza  $\sigma^2$ .

Para simular la estimulación mecánica realizada en las vibrisas, se empleó el siguiente parámetro, si  $t > 100\text{ms}$  y  $150\text{ms} < t$ :

$$I_{app}(t) = a_i + 25$$

De acuerdo con Yu J et al. (2019) y Petersen (2019), se propone que la corteza somatosensorial de los barriles presenta una circuitería entre neuronas capaz de integrar la información mecánica del medio. Por tal razón, se realizaron acoplamientos entre diferentes tipos de neuronas, como lo son las neuronas excitadoras (E), descarga rápida con expresión de parvalbumina (FS), expresión de somatostatina (SST) y la expresión del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).

### Electrical Noise High Frequency



### Selective Optical Noise

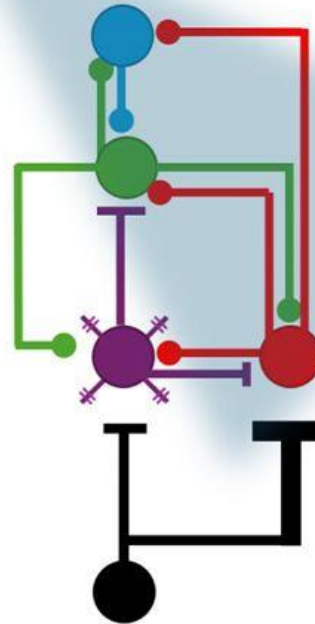


Figura 58. Conexiones neuronales con estimulación eléctrica y óptica. Se toma el circuito de Yu et al de 2019 y se aplica estimulación eléctrica y estimulación óptica. Para la estimulación eléctrica (izquierda) el campo eléctrico activa inespecíficamente a todas las neuronas. Para el estímulo óptico, se ilumina a todas las neuronas. Ello produce descargas únicamente de aquellas neuronas que tengan la proteína Ch-R2, para el caso de los ratones VGAT-ChR2-YFP. En este caso se estimulan inespecíficamente a todas las neuronas Gabaérgicas, como lo ilustra la imagen derecha. En contra parte las neuronas Glutamatérgicas, se activan ópticamente únicamente a las neuronas excitadoras.

Para realizar este acoplamiento sináptico entre neuronas, nos basamos en los trabajos de Mainen et al 1995, Moore et al 1999, Feldmeyer et al 2012 y Martinez et al 2006. Donde se propone que el voltaje de membrana es:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C_m} (I_{app} + I_{ion} + I_{syn})$$

Para esto, se propone que la corriente sináptica se defina como (Destexhe et al 1994 y Destexhe et al 2001, Han y cols, 2015):

$$I_{syn} = g_{syn} * r_j * (V_m - E_{syn})$$

Donde:

$$g_{syn} = 6$$

$$E_{syn} = 0$$

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

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

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son constante de incremento y decaimiento respectivamente. Aquí también  $t_{on}$  representa el tiempo en el cual la conexión sináptica esta activa.

De acuerdo con Fatt y Katz 1951, la liberación cuántica de neurotransmisor en la placa motora sigue una distribución de tipo Poisson y Redman en 1990. Donde el potencial cuántico tiene una variación muy pequeña y se han propuesto diferentes mecanismos para que esta respuesta de todo o nada se libere en un solo sitio activo. Dichos mecanismos pueden seguir la distribución Poisson o Binomial. Para nuestro modelo nos hemos basado en la distribución Poisson clásica.

$$n = \frac{N\Delta t}{T} \exp(-t/T)$$

Donde:

$n = \text{Número de observaciones}$

$N = \text{Observaciones esperadas}$

$\Delta t = \text{Ventana de tiempo}$

$T = \text{Curso temporal de la simulacion}$

Una vez obtenidas las observaciones, se procede a obtener la función de probabilidad de Poisson, donde:

$$P(n) = \frac{\exp(-\mu) * \mu^n}{n!}$$

Donde:

$P = \text{funcion de probabilidad de Poisson}$

$\mu = \text{Valor esperado de } n$

En el circuito que procedimos a evaluar, realizamos la evaluación de la neurona excitadora en función de la corriente aplicada. Posteriormente, su voltaje lo derivamos y obtenemos el producto con la distribución de Poisson para obtener la corriente aplicada sobre las neuronas SST y FS. Este mismo arreglo se ocupó para las neuronas inhibitorias

$$I_{excitadora} = \left( \frac{dV_n}{dt} + \left| \frac{dV_n}{dt} \right| \right) / 2 * (1 + P(n))$$

$$I_{inhibitoria} = \left( \frac{dV_n}{dt} - \left| \frac{dV_n}{dt} \right| \right) / 2 * (1 + P(n))$$

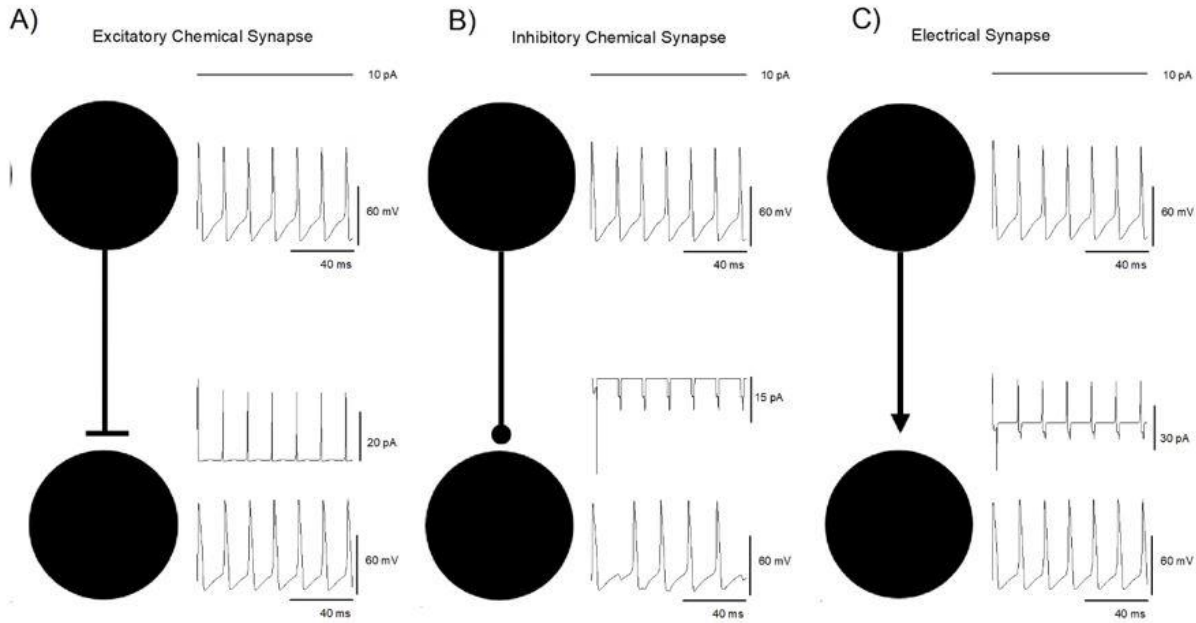


Figura 59. Conexiones neuronales para sinapsis excitadora e inhibitoria. El sistema de ecuaciones propuesto para la actividad neuronal se procede a usar para acoplar dos neuronas, mediante sinapsis química y eléctrica. Para fines de nuestro estudio, se empleó la combinación de sinapsis excitatoria e inhibitoria y un sistema recurrente donde la actividad de la neurona está determinada por la suma del voltaje de dichas sinapsis.

Con este arreglo, se obtienen 4 corrientes principales que se actualizan conforme al bucle de retroalimentación de neuronas conectadas sinápticamente va avanzando:

$$I_0 = I_{app}$$

$$I1_0 = NeuronE(I_0)$$

$$I1_1 = NeuronE(I_0 + I3_0)$$

$$I1_1 = NeuronE(I_0 + I3_1 + I2_0)$$

$$I2_0 = \text{NeuronSST}(I1_0)$$

$$I2_1 = \text{NeuronSST}(I1_1 + I3_0 + I4_0)$$

$$I2_1 = \text{NeuronSST}(I1_1 + I3_1 + I4_1)$$

$$I3_0 = \text{NeuronFS}(I_0)$$

$$I3_1 = \text{NeuronFS}(I_0 + I1_0 + I2_0)$$

$$I3_1 = \text{NeuronFS}(I_0 + I1_1 + I2_1)$$

$$I4_0 = \text{NeuronVIP}(I3_0 + I_0)$$

$$I4_1 = \text{NeuronVIP}(I3_1 + I_0 + I2_0)$$

$$I4_1 = \text{NeuronVIP}(I3_1 + I_0 + I2_1)$$

De acuerdo con Yu et al 2019, las neuronas presentan diferentes patrones de descarga. Estas frecuencias de descarga neuronal se muestran en la tabla 1. También se muestran los parámetros que se modificaron dentro del modelo para lograr asemejar dichos patrones. Una vez evaluado el sistema de ecuaciones, encontramos el siguiente comportamiento de la descarga neuronal

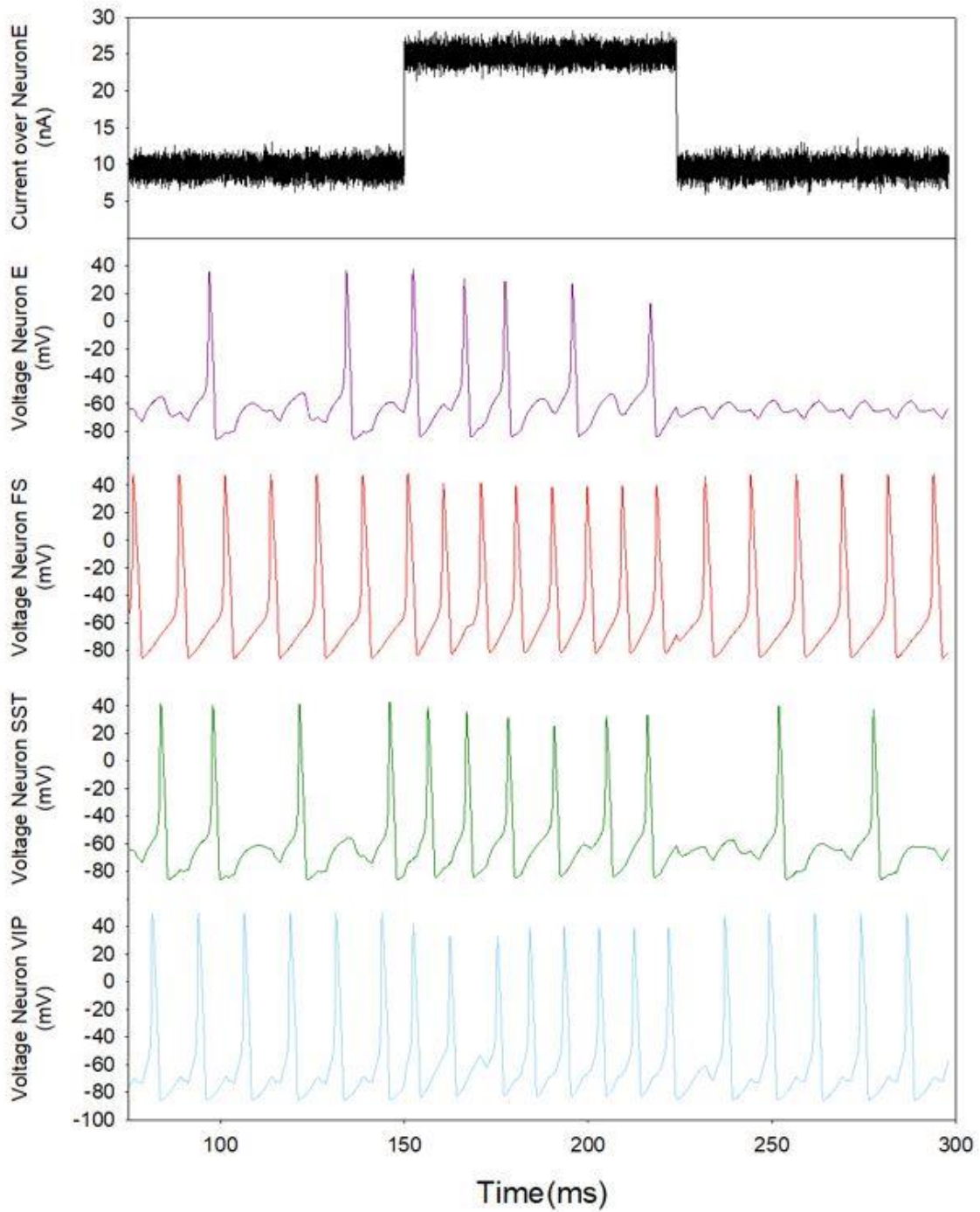


Figura 60. Patrones de descarga neuronal. Considerado los patrones de descarga neuronal descritos por Yu et al en 2019, se procedió modificar parámetros con forme a la tabla anterior y haciendo conexiones neuronales excitatorias e inhibitorias se

encuentran los patrones de descarga obtenidos por las neuronas dentro del modelo de ecuaciones.

Evaluando el modelo para simular la estimulación eléctrica, se procede a hacer las conexiones entre neuronas. Probamos el grado de estimulación de todas las neuronas. La forma en que se estimula con corriente, y se genera un cambio en la actividad neuronal, depende de la siguiente fórmula para simular el tiempo de estimulación eléctrica:

$$Y = A + \frac{K - A}{(C + Qe^{-BN})^{1/v}}$$

Donde los valores son:

*N = minutos de estimulación*

*A = asíntota inferior, 0.5*

*K = asíntota superior, 2.5*

*B = tasa de crecimiento*

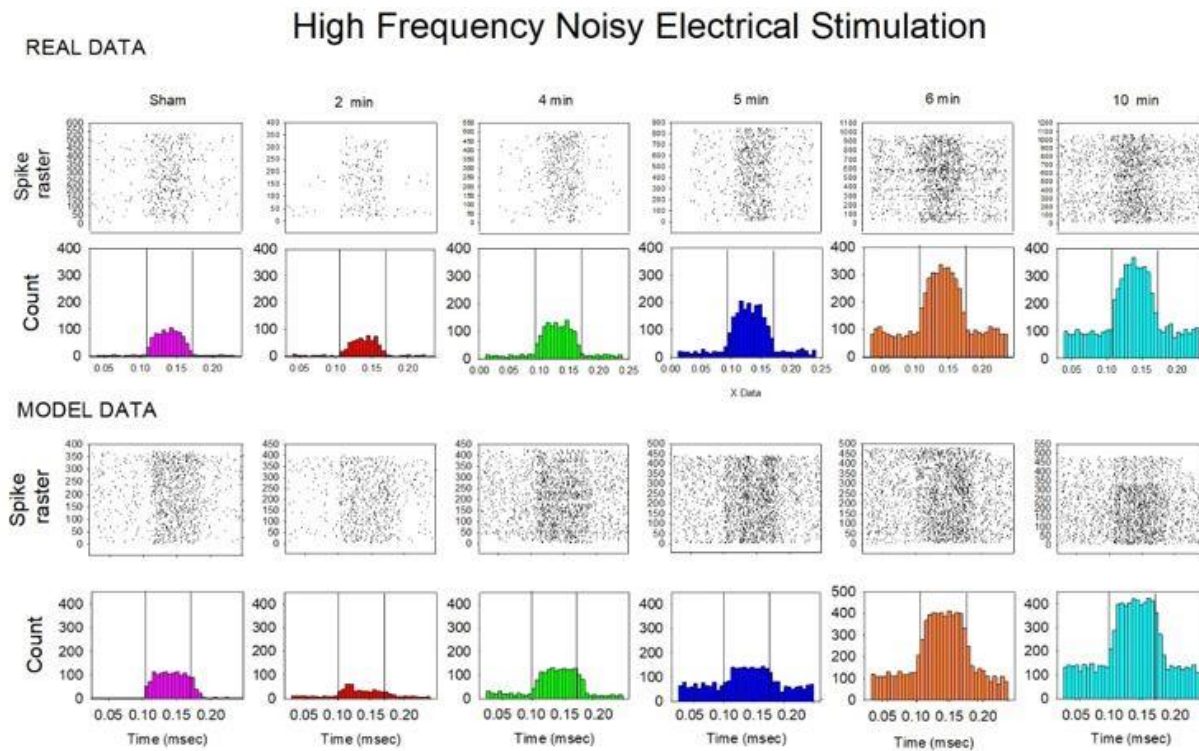
$$v = 1$$

$$Q = 50$$

$$C = 1$$

Una vez evaluado el modelo, se procede a realizar rasters de actividad de cada tiempo de estimulación. En la figura 61, se muestran los registros reales comparados con los registros provenientes del modelo. La amplitud de los histogramas se usó como parámetro para medir el incremento o disminución en la amplitud del

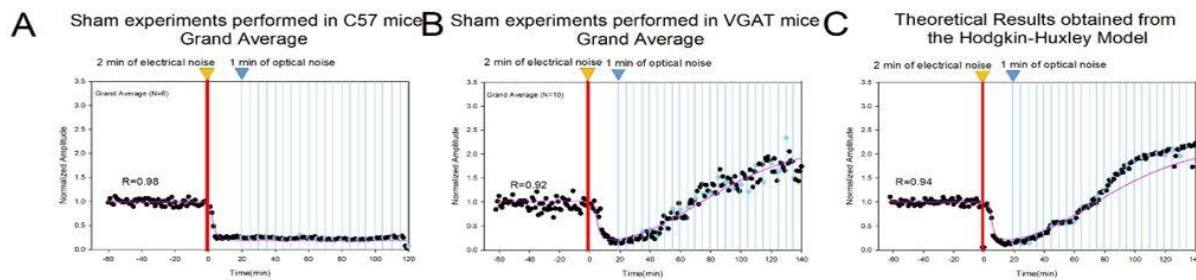
potencial provocado. En este caso, la amplitud del potencial depende de la modulación de las velocidades de intercambio de un estado abierto cerrado e inactivado de los canales.



**Figura 61. Rasters de actividad neuronal simulada.** En las gráficas superiores, se muestra los registros reales de actividad multiunitaria junto con su histograma para cada tiempo de estimulación. En las gráficas inferiores son los rasters de actividad del modelo evaluado en cada tiempo de estimulación eléctrica junto con el histograma.

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 43, cuando se estimula la corteza con 2 minutos, la amplitud del potencial disminuye. Posteriormente, cuando se aplican pulsos de luz por un minuto cada cinco minutos, a partir del minuto 20, tanto para ratones Thy-ChR2-YFP como VGAT-ChR2-YFP, se produce un incremento

del potencial, hasta recuperar su amplitud original y eventualmente mayor. Para entender la causa de como la estimulación de neuronas Gabaérgicas logran revertir la inhibición generada por la estimulación eléctrica, realizamos modificaciones en el modelo de circuitería neuronal.



**Figura 62. Simulación del efecto de la estimulación eléctrica y óptica.** A) Se muestran los datos reales del registro durante una hora control, el efecto de la estimulación eléctrica de 2 minutos (en rojo), y la estimulación óptica en líneas y puntos en azul. Se puede observar cómo se mantiene disminuida la amplitud del potencial B) Mismo protocolo descrito en A aplicado en ratones VGAT, se observa restauración e incremento de la amplitud del potencial simulado. Los datos se ajustaron a una función sigmoidea compuesta que describen su comportamiento (tabla 1). C) Datos generados por el modelo propuesto, donde se evalúa la estimulación eléctrica de 2 minutos y se estimulan las neuronas únicamente Gabaérgicas. En este sentido, se observa un incremento gradual de la amplitud, que supera a la amplitud control. En este mismo gráfico se muestra el ajuste de datos reales del índice B con correlación del 0.94.

$$V(t) = A + \left( \frac{K - A}{C + (Qe^{-Bt})^{\frac{1}{v}}} \right)$$

	$t < 20$		$t \geq 20$
<b>A</b>	0.2	<b>A</b>	0.1
<b>K</b>	1	<b>K</b>	2.25
<b>B</b>	-1.5	<b>B</b>	0.025
<b>v</b>	3	<b>v</b>	0.10
<b>Q</b>	0.30	<b>Q</b>	0.30
<b>C</b>	1	<b>C</b>	1

Tabla 7. Valores que evalúan a la función Parte superior se muestra la función para hacer el ajuste de datos, parte inferior, se muestra los valores con los que se evalúa la función.

En este sentido, las neuronas son evaluadas en función de dos minutos de estimulación de corriente eléctrica en el modelo neuronal. El modelo logra replicar los datos experimentales. Posteriormente, se evalúan en el modelo únicamente a las neuronas Gabaérgicas, lo que se refleja como un incremento en la amplitud del potencial (figura 63). La primera evaluación que se realiza considera que todas las neuronas disminuyen su excitabilidad, esto con base a lo observado experimentalmente por Mabil 2021. La segunda evaluación, cuando se lleva a cabo la estimulación óptica, la estimulación de cada minuto podría acumularse y sumarse, lo que provoca una inhibición sumada de las neuronas Gabaérgicas. Con ello se observa en conjunto, una recuperación e incremento del potencial.

## 8.4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados mostrados en esta tesis, tenemos las siguientes conclusiones:

Es posible replicar en ratas y ratones el protocolo de estimulación eléctrica y resultados descritos por Terney et al 2008, y Chaieb et al, 2011 en humanos.

Los diferentes protocolos de estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia pueden modular la excitabilidad neuronal a largo plazo, siendo la estimulación superior a los 4 minutos de duración la que logra incrementar la amplitud de potenciales somatosensoriales provocados. Por otro lado, la duración de 2 minutos disminuye la amplitud de dicho potencial en la rata y ratón anestesiados. En este sentido, observamos un mayor efecto de la estimulación ruidosa de alta frecuencia para tiempos de 6 y 10 minutos.

Observamos que la estimulación eléctrica ruidosa produce un incremento significativo sobre la actividad intracortical de potenciales de campo en profundidades de 0 a 600  $\mu\text{m}$  de la corteza somatosensorial de la rata. Dicho efecto es similar al registrado en la superficie.

Por otra parte, encontramos que las estimulaciones ópticas tanto de 2 y 10 minutos logran producir un incremento significativo en la amplitud de los potenciales provocados en ratones Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP, siendo la estimulación de 10 minutos la que genera un mayor cambio.

Se observa que con la estimulación eléctrica de 2 minutos, seguida por pulsos ópticos repetidos, se logra incrementar la amplitud de los potenciales

somatosensoriales en ratones Thy1-ChR2-YFP y VGAT-ChR2-YFP. Para el caso de los ratones VGAT-ChR2-YFP, estos resultados sugieren que hay un proceso inhibitorio de la inhibición que logra recuperar la amplitud. Esto es consistente con el circuito neuronal de la corteza de los barriles del trabajo de Yu et al de 2019.

Con base en los resultados mostrados, construimos un modelo tipo Hodgkin-Huxley para evaluar la circuitería neuronal propuesta por Yu et al de 2019, el cual logra representar los efectos observados del ruido eléctrico y óptico de esta tesis.

## 9. REFERENCIAS

1. Adrian ED (1940) Afferent discharges to the cerebral cortex from peripheral sense organs. *J Physiol* 100:15-191
2. Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568. doi: 10.1038/nrn2402
3. Avermann, M., Tomm, C., Mateo, C., Gerstner, W. & Petersen, C. C. H. (2012) Microcircuits of excitatory and inhibitory neurons in layer 2/3 of mouse barrel cortex. *J. Neurophysiol.* 107, 3116–3134
4. Bar-Hillel, A. · Spiro, A. · Stark, E.(2006) Spike sorting: Bayesian clustering of non-stationary data *J. Neurosci. Methods.* ; 157:303-316
5. 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
6. Brown, S. P., and Hestrin, S. (2009). Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 457, 1133–1136. doi: 10. 1038/nature07658
7. Buszaki, G., Anastassiou A, Koch C. (2012) The origin of extracellular fields and currents -EEG, ECoG, LFP and spikes, *Nature Reviews Neuroscience*
8. Calabrese, A. · Paninski, L. (2011) Kalman filter mixture model for spike sorting of non-stationary data *J. Neurosci. Methods.* ; 196:159-169
9. Calancie B, Harris W, Broton J G, Alexeeva N and Green B A 1998 Threshold-level multipulse transcranial electrical stimulation of motor cortex for intraoperative monitoring of spinal motor tracts: description of method and comparison to somatosensory evoked potential monitoring *J. Neurosurg.* 88 457–70
10. Castro, G., (2017) Efectos del ruido eléctrico aplicado en la corteza cerebral sobre la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales y auditivos en la rata. Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología BUAP, Noviembre 2017

11. Cauller L.J.; Kulics A. T. (1991) The neural basis of the behaviorally relevant N1 component of the somatosensory-evoked potential in SI cortex of awake monkeys: evidence that backward cortical projections signal conscious touch sensation, *Exp. Brain Res* 84:607-619
12. Chaieb, L. Paulus, W., Antal, A., (2011) Evaluating aftereffects of short duration transcranial random noise stimulation on cortical excitability, *Hindawi Neural Plasticity*
13. Chestek, C.A. · Batista, A.P. · Santhanam, G. (2007)..Single-neuron stability during repeated reaching in macaque premotor cortex *J. Neurosci.* ; 27:10742-10750
14. Chung E., Magland J., Barnett A., Felix S., Frank L., Greengrand L., (2016) A full automated approach to spike sorting
15. Contreras D. & Steriade M. (1995).Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *J. Neurosci.* 15, 604–622
16. Datta, A., Zhou, X., Su, Y., Parra, L. C., & Bikson, M. (2013). Validation of finite element model of transcranial electrical stimulation using scalp potentials: implications for clinical dose. *Journal of Neural Engineering*, 10(3), 036018. doi:10.1088/1741-2560/10/3/036018
17. DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., et al. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 202–216. doi: 10.1038/nrn3444
18. Destexhe A, Mainen ZF, Sejnowski TJ.( 1994) An efficient method for computing synaptic conductances based on a kinetic model of receptor binding. *Neural Comput* 6: 14–18,.
19. Destexhe A, Rudolph M, Fellous J-M, Sejnowski TJ. Fluctuating synaptic conductances recreate in vivo-like activity in neocortical neurons. *Neuro-science* 107: 13–24, 2001.
20. Einevoll, G.T. · Franke, F. Hagen,( 2012) E.Towards reliable spike-train recordings from thousands of neurons with multielectrodes *Curr. Opin. Neurobiol.* ; 22:11-17
21. Ekanadham, C. · Tranchina, D. · Simoncelli, E.P. A unified framework and method for automatic neural spike identification *J. Neurosci. methods.* 2014; 222:47-55
22. Emondi, A.A. · Rebrik, S.P. · Kurgansky, A.V. .Tracking neurons recorded from tetrodes across time *J. Neurosci. Methods.* 2004; 135:95-105
23. Fatt, P. Katz B., (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings, *J. Physiol*, 117, 109-128

24. Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmechen F., et al. (2012) Barrel cortex function, *Progress in Neurobiology*, 1-25
25. Franke, F. · Natora, M. · Boucsein, C. An online spike detection and spike classification algorithm capable of instantaneous resolution of overlapping spikes *J. Comput. Neurosci.* 2010; 29:127-148
26. Fregni F *et al.* (2005) Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory *Exp. Brain Res.* 166 23–30.
27. Gentet, L. J., Avermann, M., Matyas, F., Staiger, J. F. & Petersen, C. C. H. (2010) Membrane potential dynamics of GABAergic neurons in the barrel cortex of behaving mice. *Neuron* 65, 422–435
28. Gibson, J. R., Beierlein, M. & Connors, B. W. (1999) Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75–79
29. Jensen, K. F. & Killackey, H. P. (1987) Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J. Neurosci.* 7, 3529–3543
30. Harris, K.D. · Hirase, H. · Leinekugel, X. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells *Neuron.* 2001; 32:141-149
31. Harris, K.D. · Quiroga, R.Q. Freeman, J. (2016). Improving data quality in neuronal population recordings *Nat. Neurosci.* ; 19:1165-1174
32. Han, F., Wang, Z., Du, Y., Sun, X., Zhang, B., (2015) Robust synchronization of bursting Hodgkin-Huxley neuronal systems coupled by delayed chemical synapses, *International Journal of non-linear mechanics*, pp 105-111
33. Hattox, A. M., and Nelson, S. B. (2007). Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J. Neurophysiol.* 98, 3330–3340. doi: 10.1152/jn.00397.2007
34. Hay, E., Hill, Schürmann, F., Markram, H., Segev, I. (2011) Models of neocortical layer 5b Pyramidal Cells Capturing a wide Range of dendritic and Perisomatic Active Properties, *PlosComputational Biology* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002107>

35. Helmstaedter, M., Staiger, J. F., Sakmann, B. & Feldmeyer, D. (2008) Efficient recruitment of layer 2/3 interneurons by layer 4 input in single columns of rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 28, 8273–8284
36. Hioki, H. · Okamoto, S. · Konno, M. Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron *J. Neurosci.* 2013; 33:544-555
37. Hodgkin A.L., Huxley A.F., (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.* 117, 500-544.
38. Holmgren, C., Harkany, T., Svennenfors, B. & Zilberter, Y. (2003) Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J. Physiol.* 551, 139–153
39. 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, *Frontiers in Neuroscience* <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00464>
40. 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, *Neuroscience Letters*
41. Jellema, T., Brunia, C.H.M., Wadman, J., (2004) Sequential activation of microcircuits underlying somatosensory-evoked potentials in rat neocortex. *Neuroscience*, 129 (2004) 283-295
42. Kanold, P.O., Luhmann, H.J., 2010. The subplate and early cortical circuits. *Annual Review of Neuroscience* 33, 23–48.
43. Lankum ME, Zhu JJ, Sakmann B, (1999) A new mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398:338-341, doi: 10.1038/18686
44. Larsen, D. D., Wickersham, I. R., and Callaway, E. M. (2008). Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex. *Front. Neural Circuits* 1:5. doi: 10.3389/neuro.04.005.2007

45. Lavzin M, Rapoport S., Posky A, Garion L, Schiller J., (2012) Nonlinear dendritic processing determines angular tuning of barrel cortex neurons in vivo. *Nature* 490: 397-401, 2012. Doi: 10.1038/nature 1 1451
46. Lee, S., Kruglikov, I., Huang, Z. J., Fishell, G. & Rudy, B. (2013). A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* 16, 1662–1670
47. Lefort, S., Tomm, C., Floyd Sarria, J.-C., and Petersen, C. C. H. (2009). The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61, 301–316. doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.020
48. Lewicki, M.S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials *Network*. 1998; 9:R53-R78
49. 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.
50. Lisanby S H 2007 Electroconvulsive therapy for depression *New Engl. J. Med.* 357 1939–45
51. Luhmann, H.J., Kilb, W., Hanganu-Opatz, I.L., 2009. Subplate cells: amplifiers of 1956 neuronal activity in the developing cerebral cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 1957 3, 19ff.
52. Mabil P, Huidobro N, Torres-Ramirez O, Flores-Hernandez J, Flores A, Gutierrez R, Manjarrez E (2020a) Noisy Light Augments the Na<sup>+</sup> Current in Somatosensory Pyramidal Neurons of Optogenetic Transgenic Mice. *Frontiers in neuroscience* 14: 490.
53. Mabil P, Torres-Ramirez O, Huidobro N, Flores-Hernandez J, Flores A, Manjarrez E (2020b) The impact of long-term random noise stimulation on isolated pyramidal cells (en revisión).
54. Mabil, P., (2021) Efectos de la estimulación ruidosa eléctrica y optogenética sobre corrientes de Na de neuronas piramidales aisladas, BUAP, Instituto de fisiología
55. Mainen, Z., Joerges, J., Huguenard, J., Sejnowski, T., (1995) A model of spike initiation in neocortical Pyramidal Neurons, *Neuron*, Vol. 15, 1427-1439

56. Manjarrez E., Rojas-Piloni, GR., Jimenez I., Rudomin P. (2000) Modulation of synaptic transmission from segmental afferents by spontaneous activity of dorsal horn spinal neurons in the cat, *J. Physiology* <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00445.x>
57. Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. doi: 10.1038/nrn1519
58. Martínez, J., Pedreira, C., Ison, MJ y Quiñero, R. (2009). Realistic simulation of extracellular recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, 184 (2), 285–293. doi: 10.1016 / j.jneumeth.2009.08.017
59. Martinez L., Pérez, T., Mirasso, C., Manjarrez, E., (2006) Stochastic resonance in the motor system: Effects of noise on the Monosynaptic Reflex Pathway of the cat spinal cord, *J. Neurophysiol.*
60. 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(4), 505–511. doi:10.1016/j.brs.2011.11.004
61. Moore, C., Nelson, S., Sur, M., (1999) Dynamics of neuronal processing in rat somatosensory cortex, *Trends Neurosci*, 22, 513-520
62. Muller, R (1996). A quarter of a century of place cells *Neuron*; 17:813-822
63. Naka, A., & Adesnik, H. (2016). Inhibitory circuits in cortical layer 5. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 10, Article 35. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00035>
64. Nir, Y et al.(2011) Regional slow wave and spindles in human sleep. *Neuron*, 70, 153-169
65. Nitsche M A and Paulus W 2000 Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation *J. Physiol.* 527 633–39
66. Pala, A. & Petersen, C. C. H. (2018). State-dependent cell-type-specific membrane potential dynamics and unitary synaptic inputs in awake mice. *eLife* 7, e35869
67. Perin, R., Berger, T. K., and Markram, H. (2011). A synaptic organizing principle for cortical neuronal groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 5419–5424. doi: 10.1073/pnas.101605110
68. Petersen, C. C. H. (2019.). *Nature reviews | Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0200-y>

69. Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J. & Scanziani, M. (2013) Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1068–1076
70. Pi, H.-J. et al. (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503, 521–524
71. Quirk, M.C. · Wilson, M.A.(1999) Interaction between spike waveform classification and temporal sequence detection *J. Neurosci. Methods.* ; 94:41-52
72. Quirk, M.C. · Blum, K.I. · Wilson, M.A .(2001) Experience-dependent changes in extracellular spike amplitude may reflect regulation of dendritic action potential back-propagation in rat hippocampal pyramidal cells *J. Neurosci.* ; 21:240-248
73. Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., & Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Computation*, 16(8), 1661–1687. doi:10.1162/089976604774201631
74. Quiroga, R.Q. (2012) Spike sorting *Curr. Biol.* ; 22:R45-R46
75. Redman, S., (1990) Quantal Analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous System, *Physiological Reviews*, vol 70 no. 1.
76. 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.
77. Rothwell J, Burke D, Hicks R, Stephen J, Woodforth I and Crawford M 1994 Transcranial electrical stimulation of the motor cortex in man: further evidence for the site of activation *J. Physiol.* 481 243–50
78. Rothwell J, Burke D, Hicks R, Stephen J, Woodforth I and Crawford M 1994 Transcranial electrical stimulation of the motor cortex in man: further evidence for the site of activation *J. Physiol.* 481 243–50
79. Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61. doi: 10.1002/dneu.20853
80. Schroeder M J and Barr R E 2001 Quantitative analysis of the electroencephalogram during cranial electrotherapy stimulation *Clin. Neurophysiol.* 112 2075–83

81. Sermet, B. S., Truschow, P., Feyerabend, M., Mayrhofer, J. M., Oram, T. B., Yizhar, O., Staiger, J. F., & Petersen, C. Ch. (2019). Pathway-, layer- and cell-type-specific thalamic input to mouse barrel cortex. <https://doi.org/10.7554/eLife.52665>
82. Schiller J, Major G, Koester HJ, Schiller Y.(2000) NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Natures*, 404:285-289, doi: 10.1038/35005094.
83. Smith SL, Smith IT, Branco T, Hausser M, (2013) Dendritic spikes enhance stimulus selectivity in cortical neurons in vivo. *Nature* 503: 115-120, 2013 doi: 10.1038/nature12600
84. Takahashi N, Oertner TG Hegemann P, Larkum ME. (2016) Active cortical dendrites modulate perception. *Science* 354: 1587-1590, doi: 10.1126/science.aah6066.
85. 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.
86. Urban-Ciecko, J., Jouhannau, J.-S., Myal, S. E., Poulet, J. F. A. & Barth, A. L. (2018). Precisely timed nicotinic activation drives SST inhibition in neocortical circuits. *Neuron* 97, 611–625
87. Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., et al. (2007). High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8143–8148. doi: 10.1073/pnas.0700384104
88. Wassermann, E. M. (1998). Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5–7, 1996. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 108(1), 1–16. doi:10.1016/s0168-5597(97)00096-8
89. Xu NL, Harnett MT, Williams SR, Huber D, O'Connor DH, Svoboda K, Magee JC, (2012) Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature* 492: 247-251 doi: 10.1038/nature 1 1601
90. Yamamoto Y, Struzik ZR, Soma R, Ohashi K, Kwak S (2005) Noisy vestibular stimulation improves autonomic and motor responsiveness in central neuro-degenerative disorders. *Ann Neurol* 58:175–181
91. Yu, J, Hu, H., Agmon, A., Svoboda K., (2019) Recruitment of GABAergic interneurons in the Barrel Cortex during active Tactile Behavior, *Neuron*, vol 104, issue 2, 23, pp 412-427

## 10. ANEXOS

### Wave clus para multiples archivos.

```
Editor - D:\Vorge\DOCTORADO\Experimentos de rata\Analisis de spikes\wave_clus-master\wave_clus.m
+11 Amplitud.m x NEUROch.m x wave_clus.m x autocor.m x After_Wave_clus_VII.m x After_Wave_clus_VIII.m x Analisis.m x IMC.m x kstest.m x wave_clus.m x lmc.m x +
1 %ESTE ES EL SCRIPT PARA ANALIZAR VARIOS ARCHIVOS, NO UNO
2 function varargout = wave_clus(varargin) ...
66 % End initialization code - DO NOT EDIT
67 function Close_requestFcn(hObject, handles) ...
80
81
82 % --- Executes just before wave_clus is made visible.
83 function wave_clus_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin) ...
110
111 % UIWAIT makes wave_clus wait for user response (see UIRESUME)
112 % uiwait(handles.figure1);
113
114
115 % --- Outputs from this function are returned to the command line.
116 function varargout = wave_clus_OutputFcn(hObject, eventdata, handles) ...
131
132
133 % --- Executes on button press in load_data_button.
134 function load_data_button_Callback(hObject, eventdata, handles)
135 % select file
136
137 if ischar(eventdata)
138     if isempty(fileparts(eventdata))
139         filename = eventdata;
140         pathname = [pwd filesep];
141     else
142         [pathname filename ext]=fileparts(eventdata);
143         pathname = [pathname filesep];
144         filename = [filename ext];
145     end
146     hObject = handles.load_data_button;
147 else
148     % [filename, pathname] = uigetfile('*.*', 'Select file'); % Use only the supported extensions can bring case-sensitive related problems.
149     [filename pathname] = uigetfile('*.mat', 'seleccion archivos .mat', 'Multiselect', 'on'); %CAMBIAMOS ESTA LINEA
150 end
151
152 % filename = filename'; %generamos una columna con los nombres de los datos
153 number = length(filename(1,:)); %LINEA AGREGADA
154 %number = length(filename); % LINEA AGREGADA
155 contador = 1; % contador para avanzar entre archivos
156 while contador <= number
157
158
159 % if any file was selected, cancel the loading
160 if ~ischar(pathname)
```

```

Editor - D:\Jorge\DOCTORADO\Experimentos de rata\Análisis de spikes\wave_clus-master\wave_clus.m
155 - contador = 1; % contador para avanzar entre archivos
156 - while contador <= number
157 -
158 -
159 - % if any file was selected, cancel the loading
160 - if ~ischar(pathname)
161 -     return
162 - end
163 -
164 - %LA SIG LINEA ES LA ORIGINAL
165 - %set(handles.file_name,'string',['loading: ' pathname filename]); drawnow
166 - set(handles.file_name,'string',['loading: ' pathname cell2mat(filename(:),contador)]; drawnow % esta linea la modificamos
167 -
168 -
169 - cla(handles.cont_data);
170 - clear functions % reset functions, force to reload set_parameters next
171 - handles.par = set_parameters();
172 -
173 - cd(pathname);
174 -
175 - %handles.par.filename = filename; %LINEA ORIGINAL
176 - handles.par.filename = cell2mat(filename(contador));
177 -
178 - for i = 1:3
179 -     si = num2str(i);
180 -     set(eval(['handles.isi' si '_accept_button']), 'value', 1);
181 -     set(eval(['handles.isi' si '_reject_button']), 'value', 0);
182 -     set(eval(['handles.fix' si '_button']), 'value', 0);
183 -     eval(['set(handles.isi' si ' nbins, 'string', handles.par.nbins);']);
184 -     eval(['set(handles.isi' si ' bin_step, 'string', handles.par.bin_step);']);
185 - end
186 -
187 - set(handles.isi0_nbins, 'string', handles.par.nbins);
188 - set(handles.isi0_bin_step, 'string', handles.par.bin_step);
189 -
190 - % Sets to zero fix buttons from aux figures
191 - for i=4:33
192 -     eval(['handles.par.fix' num2str(i) '=0;'])
193 - end
194 -
195 - for i =0:33
196 -     si = num2str(i);
197 -     eval(['handles.par.nbins' si ' = handles.par.nbins;']); % # of bins for the ISI histograms
198 -     eval(['handles.par.bin_step' si ' = handles.par.bin_step;']); % percentage number of bins to plot
199 - end
200 -
201 - data_handler = readInData(handles.par);
202 - handles.par = data_handler.par;
203 -
204 - handles.par.fname_in = 'tmp_data_wc'; % temporary filename used as input for SPC
205 - handles.par.fname = ['data_' data_handler.nick_name];
206 - handles.par.nick_name = data_handler.nick_name;
207 - handles.par.fname_save = handles.par.fname; %filename if "save clusters" button is pressed
208 - handles.par.fname_spc = 'data_wc';
209 - handles.par.spikes_file = data_handler.spikes_file;
210 - handles.par = data_handler.update_par(handles.par);
211 - check_WC_params(handles.par) %<- ES UNA FUNCION
212 -
213 - if data_handler.with_results %data have times files
214 -     [clu, tree, spikes, index, inspk, lpermut, classes, forced, temp] = data_handler.load_results();
215 -     temp = [15:15]; %-----ESTÁ LINEA FUE BORRADA AL CENTRO
216 -     rejected = data_handler.load_rejected();
217 -     handles.setclass = 1;
218 -     if isempty(lpermut)
219 -         handles.par.permut = 'n';
220 -     end
221 -
222 - else
223 -
224 -     if data_handler.with_spikes %data have some time of _spikes files
225 -         [spikes, index] = data_handler.load_spikes();
226 -         if ~data_handler.with_wc_spikes
227 -             [spikes] = spike_alignment(spikes, handles.par);
228 -         end
229 -     else
230 -         set(handles.file_name, 'string', 'Detecting spikes ...'); drawnow
231 -         index = [];
232 -         spikes = [];
233 -         for n = 1:data_handler.max_segments
234 -             x = data_handler.get_segment();
235 -             [new_spikes, temp_aux_th, new_index] = amp_detect(x, handles.par);
236 -             index = [index data_handler.index{length(new_index)}]; %new_index to me
237 -             spikes = [spikes; new_spikes];
238 -         end

```

```

239 -     handles.par.detection_date = datestr(now);
240 - end
241 -
242 - if size(spikes,1) < 15
243 -     ME = MEException('MyComponent: notEnoughSpikes', 'Less than 15 spikes detected');
244 -     throw(ME)
245 - end
246 -
247 - set(handles.file_name,'string','Calculating spike features ...'); drawnow
248 - [inspk] = wave_features(spikes,handles.par); %Extract spike features.
249 - handles.par.inputs = size(inspk,2); % number of inputs to the clustering
250 -
251 - if handles.par.permut == 'y'
252 -     if handles.par.match == 'y'
253 -         naux = min(handles.par.max_spk,size(inspk,1));
254 -         ipermut = randperm(length(inspk));
255 -         ipermut(naux+1:end) = [];
256 -     else
257 -         ipermut = randperm(length(inspk));
258 -     end
259 -     inspk_aux = inspk(ipermut,:);
260 - else
261 -     if handles.par.match == 'y'
262 -         naux = min(handles.par.max_spk,size(inspk,1));
263 -         inspk_aux = inspk(1:naux,:);
264 -     else
265 -         inspk_aux = inspk;
266 -     end
267 - end
268 -
269 - %
270 - % Interaction with SPC
271 - set(handles.file_name,'string','Running SPC ...'); drawnow
272 - fname_in = handles.par.fname_in;
273 - save(fname_in,'inspk_aux','-ascii'); %Input file for SPC
274 -
275 - %
276 - [clu,tree] = run_cluster(handles.par);
277 - forced = false(size(spikes,1),1);
278 - rejected = false(1,size(spikes,1));
279 - handles.setclus = 2; %uses min cluster size but doesn't reset force
280 - end %-- MODIFICAR
281 -
282 - handles.par.file_name_to_show = [pathname filename];
283 -
284 - if (data_handler.with_raw || data_handler.with_psegment) && handles.par.cont_segment %raw exists
285 -     [xd_sub, sr_sub] = data_handler.get_signal_sample();
286 -     Plot_continuous_data(xd_sub, sr_sub, handles); drawnow
287 -     clear xd_sub
288 - end
289 - %
290 - %Fixing lost elements of clu . Skipped elements will be class -1 because in
291 - %all the uses of clu are like: clu(temp,3:end)+1
292 - if handles.par.permut == 'y' && ~isempty(clu)
293 -     if isempty(ipermut) %load from old result without ipermut or par, but par.permut=='y'.
294 -         naux = size(clu,2)-2;
295 -         ipermut = 1:naux;
296 -     end
297 -     clu_aux = zeros(size(clu,1),2 + size(spikes,1) -1); %when update classes from clu, not selected elements go to cluster 0
298 -     clu_aux(:,ipermut+2) = clu(:,(1:length(ipermut))+2);
299 -     clu_aux(:,1:2) = clu(:,1:2);
300 -     clu = clu_aux;
301 -     clear clu_aux
302 - elseif ~isempty(clu)
303 -     naux = size(clu,2)-2;
304 -     clu_aux = zeros(size(clu,1),2 + size(spikes,1) -1); %when update classes from clu, not selected elements go to cluster 0
305 -     clu_aux(:,1:naux+2) = clu(:,(1:naux)+2);
306 -     clu_aux(:,1:2) = clu(:,1:2);
307 -     clu = clu_aux;
308 -     clear clu_aux
309 - end
310 - USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
311 - USER_DATA(1) = handles.par;
312 - USER_DATA(2) = spikes;
313 - USER_DATA(3) = index;
314 - USER_DATA(4) = clu;
315 - USER_DATA(5) = tree;
316 - USER_DATA(7) = inspk;
317 - if exist('ipermut','var') && ~isempty(ipermut)
318 -     USER_DATA(12) = ipermut;
319 - end
320 - USER_DATA(13) = forced;
321 - USER_DATA(14) = rejected;
322 - USER_DATA(15) = rejected; %the clusters numbers are sorted
323 - USER_DATA(16) = rejected; %the clusters numbers are sorted
324 - %
325 - set(handles.min_clus_edit,'string',num2str(handles.par.min_clus));
326 - setappdata(handles.temperature_plot,'auto_sort_info',{});
327 -
328 - if data_handler.with_gui_status
329 -     [saved_gui_status, CURRENT_TEMP, auto_sort_info] = data_handler.get_gui_status();
330 -     temp = [15:15]; %AGREGAMOS ESTA LINEA

```

```

329 - current_temp=max(temp); %<-----ESTA LINEA FUE AGREGADA PARA FORZIAR AL CENTRO
330 - current_temp = 15; %<-----ESTA LINEA FUE AGREGADA PARA FORZIAR AL CENTRO
331 - setappdata(handles.temperature_plot,'auto_sort_info',auto_sort_info);
332 - clustering_results = zeros(length(classes),4);
333 - clustering_results(:,1) = repmat(current_temp,length(classes),1);
334 - for i=1:max(classes)
335 -     clustering_results(classes==i,3) = temp(i);
336 - end
337
338 - clustering_results(:,2) = classes'; % GUI classes
339 - clustering_results(:,4) = saved_gui_status;
340 - handles.undo = 1;
341
342 - elseif data_handler.with_results
343 -     current_temp = 1;
344
345 -     current_temp = 15; %<-----ESTA LINEA FUE AGREGADA PARA FORZIAR AL CENTRO
346
347 -     clustering_results(:,1) = repmat(current_temp,length(classes),1); % GUI temperatures
348 -     clustering_results(:,2) = classes'; % GUI classes
349 -     if exist('temp','var')
350 -         for i=1:max(classes)
351 -             clustering_results(classes==i,3) = temp(i);
352 -         end
353 -     else
354 -         for i=1:max(classes)
355 -             clustering_results(classes==i,3) = current_temp;
356 -         end
357 -     end
358 -     clustering_results(:,4) = classes'; % original classes
359 -     handles.undo = 1;
360
361 - else
362 -     %Selects temperature. %2 en algunos casos
363 -     [clust_num temp AUTO_SORT] = find_temp(tree,clu, handles.par);
364 -     %clust_num = [1,2,3,4];
365 -     %temp = [15;15]; %AGREGAMOS ESTA LINEA
366 -     current_temp = max(temp); %<-----ESTA LINEA FUE AGREGADA PARA FORZIAR AL CENTRO por el autor (ORIGINAL)
367 -     current_temp = 15; %<-----ESTA LINEA FUE AGREGADA PARA FORZIAR AL CENTRO
368 -     classes = zeros(1,size(clu,2)-2);
369 -     for c =1: length(clust_num)
370 -         aux = clu(temp(c),3:end) +1 == clust_num(c);
371 -         classes(aux) = c;
372 -     end
373 -     if handles.par.permut == 'n'
374 -         classes = [classes zeros(1,max(size(spikes,1)-size(clu,2)-2,0))];
375 -     end
376 -     Temp = [];
377 -     % Classes should be consecutive numbers
378 -     classes_names = nonzeros(sort(unique(classes)));
379 -     for i = 1:length(classes_names)
380 -         c = classes_names(i);
381 -         if c== 1
382 -             classes(classes == c) = 1;
383 -         end
384 -     end
385 -     Temp(i) = temp(i);
386 - end
387 - setappdata(handles.temperature_plot,'auto_sort_info',auto_sort);
388 - % definition of clustering_results
389 - clustering_results = [];
390 - clustering_results(:,1) = repmat(current_temp,length(classes),1); % GUI temperatures
391 - clustering_results(:,2) = classes'; % GUI classes
392
393 - for i=1:max(classes)
394 -     clustering_results(classes==i,3) = temp(i);
395 -     clustering_results(classes==i,4) = clust_num(i); % original classes
396 - end
397
398 - handles.undo = 0;
399 - end
400
401
402 - if data_handler.with_results && ~ data_handler.with_spc
403 -     temp = -1; % This will work as a flag for not drawing the temperature diagram
404 -     cla(handles.temperature_plot,'reset');
405 - end
406
407 - clustering_results(:,5) = repmat(handles.par.min_clus,length(classes),1); % minimum number of clusters
408 - USER_DATA(6) = classes(:)';
409 - if exist('current_temp','var')
410 -     USER_DATA(8) = current_temp;
411 - else
412 -     USER_DATA(8) = temp(i);
413 - end
414 - USER_DATA(10) = clustering_results;
415 - USER_DATA(11) = clustering_results;
416 - handles.force = 0;
417 - handles.merge = 0;
418

```

```

419 handles.minclus = handles.par.min_clus;
420 handles.minclus = 7; %ESTA LINEA FUE AGRAGADA PARA FORZAR AL CENTRO EN y
421 set(handles.wave_clus_figure,'userdata',USER_DATA);
422
423 clear clustering_results classes rejected_spikes
424 % mark clusters when new data is loaded
425 guidata(hObject, handles); %this is need for plot the isi histograms
426
427 plot_spikes(handles); %This function edits userdata
428 USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
429 set(handles.wave_clus_figure,'userdata',USER_DATA);
430
431
432 if isfield(handles,'force_unforce_button') && (nns(forced)>0)
433     set(handles.force_unforce_button,'Value',1)
434     set(handles.force_unforce_button,'String','FORCED')
435     %set(handles.change_temperature_button,'enable','off');
436 elseif isfield(handles,'force_unforce_button')
437     set(handles.force_unforce_button,'Value',0)
438     set(handles.force_unforce_button,'String','Force')
439 end
440 if isfield(handles,'edit_max_force_dist')
441     set(handles.edit_max_force_dist,'string',num2str(handles.par.template_ednum));
442 end
443
444 %% RECALCULAR LA TEMPERATURA
445 %gets the mouse input
446 if exist('impoint','class')
447     %point = impoint(handles.temperature_plot);
448     % if isempty(point)
449     %     return
450     % end
451     % pos = point.getPosition();
452     temp = 0.15;%pos(1);
453     aux = 6.15;%pos(2);
454     point.delete();
455 else
456     [temp,aux,button] = ginput(1);
457     if button == 3
458         return
459     end
460 end
461
462
463 if temp <= handles.par.mintemp+0.5*handles.par.temptep
464     temp = 1;
465 elseif temp>handles.par.maxtemp
466     temp = floor((handles.par.maxtemp-handles.par.mintemp)/handles.par.temptep);
467 else
468     temp = round((temp-handles.par.mintemp)/handles.par.temptep); %temp from value to index
469 end
470
471 min_clus = round(aux);
472 set(handles.min_clus_edit,'string',num2str(min_clus));
473
474 USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
475 rejected = USER_DATA(15);
476 USER_DATA(16) = rejected;
477 clu = USER_DATA(4);
478 classes = clu(temp, 3:end) + 1;
479 classes(rejected) = 0;
480 USER_DATA(6) = classes(:)';
481 USER_DATA(8) = temp;
482
483 handles.minclus = min_clus;
484 set(handles.wave_clus_figure,'userdata',USER_DATA);
485 handles.setclus = 0;
486 handles.force = 0;
487 handles.merge = 0;
488
489 handles.undo = 0;
490 handles.new_spc_classes = classes(:)';
491 plot_spikes(handles);
492 if isfield(handles,'force_unforce_button')
493     set(handles.force_unforce_button,'Value',0)
494     set(handles.force_unforce_button,'String','Force')
495 end
496
497 %% final
498 set(handles.file_name,'string',handles.par.file_name_to_show);
499 set(handles.file_name,'string',['Archivo: ' pathname Cell2mat(filename(:),contador)]);
500 b=1; %variable tonta solo para hacer pausa
501
502
503 %% INICIAMOS PROCESO DE SAVE DATOS
504 USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
505 classes = USER_DATA(6);
506 clustering_results = USER_DATA(10);
507 rejected = USER_DATA(15);
508

```

```

509 - USER_DATA(16) = rejected; %update bx of rejected spikes
510 - USER_DATA(15) = false(size(rejected));
511 - set(handles.wave_plus_figure,'userdata',USER_DATA);
512 - handles.setolus = 1;
513 - handles.force = 0;
514 - handles.merge = 0;
515
516 - handles.undo = 0;
517 - plot_spikes(handles)
518
519 - USER_DATA = get(handles.wave_plus_figure,'userdata');
520 - spikes = USER_DATA(2);
521 - used_par = USER_DATA(1);
522 - index = USER_DATA(3);
523 - classes = USER_DATA(6);
524 - gui_classes_data = USER_DATA(10);
525
526 - % Classes should be consecutive numbers
527 - classes_names = nonzeros(sort(unique(classes)));
528 - for i = 1:length(classes_names)
529 -     c = classes_names(i);
530 -     if c == 1
531 -         classes(classes == c) = i;
532 -     end
533 - end
534
535 - %Saves clusters
536 - cluster_class = zeros(size(spikes,1),2);
537 - cluster_class(:,1) = classes(:);
538 - cluster_class(:,2) = USER_DATA(3)';
539
540 - outfile=[ 'times_' used_par.nick_name];
541
542 - par = struct;
543 - par = update_parameters(par,used_par,'relevant');
544 - par = update_parameters(par,used_par,'batch_plot');
545 - par.sorting_date = datestr(now);
546
547 - gui_status = struct();
548 - gui_status.current_temp = gui_classes_data(1,1);
549 - gui_status.original_classes = gui_classes_data(1:end,4);
550 - gui_status.auto_sort_info = getappdata(handles.temperature_plot,'auto_sort_info');
551
552 - Temp = zeros(length(classes_names),1);
553 - for i = 1:length(classes_names)
554 -     Temp(i) = gui_classes_data(find(classes==i,1,'first'),3);
555 - end
556 - forced = USER_DATA(13);
557
558 - var_list = 'cluster_class','par','gui_status','forced','Temp';
559
560 - if ~isempty(USER_DATA(7))
561 -     inapik = USER_DATA(7);
562 -     var_list = strcat(var_list , ',' , 'inapik');
563 - end
564
565 - if ~isempty(USER_DATA(12))
566 -     ipermut = USER_DATA(12);
567 -     var_list = strcat(var_list , ',' , 'ipermut');
568 - end
569
570 - % if developer_mode
571 - % var_list = strcat(var_list , ',' , 'rejected');
572 - % end
573
574 - if isempty(handles.par.spikes_file)
575 -     var_list = strcat(var_list , ',' , 'spikes');
576 - else
577 -     spikes_file = handles.par.spikes_file;
578 -     var_list = strcat(var_list , ',' , 'spikes_file');
579 - end
580
581 - ver = '';
582 - currentver = version;
583 - if currentver(1) >= 7
584 -     ver = ',' , '-v6';
585 - end
586 - try
587 -     eval(['save('' outfile '' ,'' var_list '' ver ')']);
588 - catch
589 -     eval(['save('' outfile '' ,'' var_list '' ,'-v7.3')']);
590 - end
591 - if exist([handles.par.fnamepsc '.dg_01.lab'],'file')
592 -     movefile([handles.par.fnamepsc '.dg_01.lab'], [handles.par.fnamepsave '.dg_01.lab'], 'f');
593 -     movefile([handles.par.fnamepsc '.dg_01'], [handles.par.fnamepsave '.dg_01'], 'f');
594 - end
595
596 - set(hObject,'value',0);
597
598 - contador = contador+1;

```

```

599 - end % este corresponde al while LA SIGUIENTE LINE PERTENECE AL ORIGINAL
600
601 % --- Executes on button press in change_temperature_button.
602 function change_temperature_button_Callback(hObject, eventdata, handles)...
603
604 % --- Change min_clus_edit
605 function min_clus_edit_Callback(hObject, eventdata, handles)...
606
607
608 % --- Executes on button press in save_clusters_button.
609 function save_clusters_button_Callback(hObject, eventdata, handles, developer_mode)
610
611 USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
612 classes = USER_DATA(6);
613 clustering_results = USER_DATA(10);
614 rejected = USER_DATA(15);
615
616 USER_DATA(14) = rejected; %update bk of rejected spikes
617 USER_DATA(15) = false(size(rejected));
618 set(handles.wave_clus_figure,'userdata',USER_DATA);
619 handles.setclus = 1;
620 handles.force = 0;
621 handles.merge = 0;
622
623 handles.undo = 0;
624 plot_spikes(handles);
625
626 USER_DATA = get(handles.wave_clus_figure,'userdata');
627 spikes = USER_DATA(2);
628 used_par = USER_DATA(1);
629 index = USER_DATA(3);
630 classes = USER_DATA(6);
631 gui_classes_data = USER_DATA(10);
632
633 % Classes should be consecutive numbers
634 classes_names = nonzeros(sort(unique(classes)));
635 for i = 1:length(classes_names)
636     c = classes_names(i);
637     if c==i
638         classes(classes==c) = i;
639     end
640 end
641
642 %Saves clusters
643 cluster_class = zeros(size(spikes,1),2);
644 cluster_class(:,1) = classes(:);
645 cluster_class(:,2) = USER_DATA(3)';
646
647 outfile=[ 'times_' used_par.nick_name];
648
649 par = struct;
650 par = update_parameters(par,used_par,'relevant');
651 par = update_parameters(par,used_par,'batch_plot');
652 par.sorting_date = datestr(now);
653
654 gui_status = struct();
655 gui_status.current_temp = gui_classes_data(1,1);
656 gui_status.original_classes = gui_classes_data(1:end,4);
657 gui_status.auto_sort_info = getappdata(handles.temperature_plot,'auto_sort_info');
658
659 Temp = zeros(length(classes_names),1);
660 for i = 1:length(classes_names)
661     Temp(i) = gui_classes_data(find(classes==i,1,'first'),3);
662 end
663 forced = USER_DATA(13);
664
665 var_list = 'cluster_class','par','gui_status','forced','Temp';
666
667 if ~isempty(USER_DATA(7))
668     inapik = USER_DATA(7);
669     var_list = strcat(var_list , ',' , 'inapik');
670 end
671
672 if ~isempty(USER_DATA(12))
673     ipermut = USER_DATA(12);
674     var_list = strcat(var_list , ',' , 'ipermut');
675 end
676
677 if developer_mode
678     var_list = strcat(var_list , ',' , 'rejected');
679 end
680
681 if isempty(handles.par.spikes_file)
682     var_list = strcat(var_list , ',' , 'spikes');
683 else
684     spikes_file = handles.par.spikes_file;
685     var_list = strcat(var_list , ',' , 'spikes_file');
686 end
687
688 ver = '';
689 currentver = version;

```

```

750 - if currentver() >= 7
751 -     ver = 'v7-06'';
752 - end
753 -
754 -  cxy
755 -     eval(['save('' outfile ''', '' var_list '' ver '')]);
756 - catch
757 -     eval(['save('' outfile ''', '' var_list '' v7-06'')]);
758 - end
759 -
760 - if exist([handles.par.fnamepc '.dq_01.lab'],'file')
761 -     movefile([handles.par.fnamepc '.dq_01.lab'], [handles.par.fnamepc '.dq_01.lab'], 'f');
762 - else
763 -     movefile([handles.par.fnamepc '.dq_01'], [handles.par.fnamepc '.dq_01'], 'f');
764 - end
765 -
766 - %save figures
767 - % fig_names = 'figure','aux','aux1','aux2','aux3','aux4','aux5';
768 - % file_names = {'a','b','c','d','e','f'};
769 - %
770 - % h_fig = get(0,'children');
771 - % for i=1:length(fig_names)
772 - %     h_fig = findobj(h_fig,'tag',{'wave_clus','fig_names{i}});
773 - %     new_file_name = ['figPrint_' outfile(?end) file_names{i} '.png'];
774 - %     if ~isempty(h_fig)
775 - %         figure(h_fig); set(gcf, 'PaperUnits', 'inches', 'PaperType', 'A4', 'PaperPositionMode', 'auto','PaperOrientation','portrait');
776 - %         print(h_fig, '-dpng', new_file_name, '-r300');
777 - %     else
778 - %         if exist(new_file_name, 'file')==2
779 - %             delete(new_file_name);
780 - %         end
781 - %     end
782 - % end
783 - % end
784 -
785 - set(hObject,'value',0);
786 -
787 - % --- Executes on button press in set_parameters_button.
788 -  function set_parameters_button_Callback(hObject, eventdata, handles)
789 -
790 -  function force_unforce_button_Callback(hObject, eventdata, handles)
791 -
792 -  function manual_clus_button_Callback(hObject, eventdata, handles_local, cl)

```

