



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurofisiología Integrativa

“Efectos de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre la excitabilidad cortical somatosensorial”

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

L.B.M. Héctor Halin Carbajal Guevara

Director de tesis:

Dr. Elias Manjarrez López

Mayo 2023



ÍNDICE

Índice de figuras.....	4
Lista de abreviaturas.....	7
Resumen	12
Abstract	14
CAPÍTULO 1.....	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
ANTECEDENTES.....	15
La corteza somatosensorial: El reconocimiento de nuestro entorno	16
El sistema somatosensorial del ratón: De las vibrisas a la corteza de los barriles	19
La médula espinal: Morfología y función, del humano al ratón.....	25
La estimulación eléctrica: De la electrofisiología a la terapéutica.....	28
La estimulación eléctrica de la médula espinal.....	30
La estimulación eléctrica no invasiva.....	32
Estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria.....	33
La estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal	37
CAPÍTULO 2.....	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
CAPÍTULO 3.....	43
HIPÓTESIS.....	43



CAPÍTULO 4.....	44
OBJETIVOS.....	44
Objetivo general.....	44
Objetivos específicos	44
CAPÍTULO 5.....	45
METODOLOGÍA.....	45
Selección de la muestra	45
Aclaraciones bioéticas	45
Técnicas y procedimientos.....	46
Cirugía estereotáxica.....	46
Estimulación mecánica de las vibrisas	49
Método de registro	50
Estimulación eléctrica transcutánea espinal.....	51
Análisis de datos.....	52
Análisis estadístico	53
CAPÍTULO 6.....	54
RESULTADOS.....	54
Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal en la actividad espontánea de la corteza somatosensorial primaria.....	54
Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal sobre los potenciales provocados de la corteza somatosensorial.....	59
CAPÍTULO 7.....	70
DISCUSIÓN	70



CAPÍTULO 8.....	78
PERSPECTIVAS.....	78
CAPÍTULO 9.....	80
CONCLUSIÓN.....	80
CAPÍTULO 10.....	81
BIBLIOGRAFÍA	81
CAPÍTULO 11.....	88
ANEXOS	88



Índice de figuras

Figura 1. | Vías ascendentes sensoriales

Figura 2. | Funciones de la mano y las vibrisas.

Figura 3. | Innervación de la vibrisa.

Figura 4. | Vía de señalización de la vibrisa a la corteza.

Figura 5. | Nomenclatura y distribución de las vibrisas.

Figura 6. | Vías talámico-corticales para la señalización sensorial de las vibrisas.

Figura 7. | Activación de S1, por la estimulación de una vibrisa.

Figura 8. | Comparación anatómica y morfológica de la médula espinal en el ratón y humano.

Figura 9. | Estimulación eléctrica aleatoria ruidosa transcraneal

Figura 10. | El efecto de EETRA en la corteza motora primaria

Figura 11. | Efecto de la EETRA en la precisión de estímulos visuales.

Figura 12. | Efecto inmediato de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre la excitabilidad corticoespinal y el reflejo H.

Figura 13. | Efecto de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre la función de la mano en pacientes con lesión espinal.

Figura 14. | Anestesia y traqueotomía de los sujetos experimentales.

Figura 15. | Montaje del sujeto experimental en el aparato estereotáxico.

Figura 16. | Representación estereotáctica de la colocación del electrodo para el registro de los potenciales provocados somatosensoriales.

Figura 17. | Montaje del protocolo experimental

Figura 18. | Registro y procesamiento de la actividad espontánea de la corteza somatosensorial.

Figura 19. | Actividad espontánea previa y posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal.

Figura 20. | Curva entrada-salida Potenciales Provocados Somatosensoriales.

Figura 21. | Potenciales provocados somatosensoriales.

Figura 22. | Comparación de los potenciales provocados somatosensoriales previo y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal

Figura 23. | Representación de la amplitud promedio de los potenciales provocados somatosensoriales previo y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal

Figura 24. | Efecto de la EERAF transcutánea de la médula espinal, en la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales

Figura 25. | Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal.

Lista de abreviaturas

ECNI | Estimulación Cerebral no Invasiva

EERA | Estimulación Eléctrica Ruidosa Aleatoria

EET | Estimulación Eléctrica Transcraneal

EETCD | Estimulación Eléctrica Transcraneal con Corriente Directa

EETRA | Estimulación Transcraneal Ruidosa Aleatoria

ETME | Estimulación Transcutánea de la Médula Espinal

ETRAF | Estimulación Transcutánea Ruidosa de Alta Frecuencia

M1 | Corteza Motora Primaria

ME | Médula Espinal

NPB| Núcleo Parabraquial

POM | Núcleo Postero Medial del Tálamo

PPS | Potencial Provocado Somatosensorial

S1 | Corteza Somatosensorial Primaria

S2 | Corteza Somatosensorial Secundaria

SNC | Sistema Nervioso Central

SOL | Músculo Sóleo

TA | Músculo Tibial Anterior

VPM | Núcleo Ventral Postero Medial del Tálamo



Research is to see what everybody else has seen and to think what nobody else has thought. -Albert Szent-Györgyi

*La ciencia y la creatividad son la fuente de todo conocimiento, permanezcamos resilientes, atentos y la inspiración la encontraremos en todo lo que nos rodea.
-H.H.*



Agradecimientos

Agradezco a mis padres y hermanas por el apoyo incondicional otorgado siempre, agradezco su amor y cariño. Por motivarme a cumplir nuevas metas y objetivos. Sin mi familia esto no sería posible.

Al Dr, Elias Manjarrez López, por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartirme su tiempo, experiencia y conocimiento. Gracias por su paciencia, enseñanzas y su valioso tiempo. Aprender de usted en todos los aspectos, científico, laboral y personal han sido un completo privilegio para mí. Gracias por permitirme trabajar codo a codo con usted y por su colaboración y acompañamiento constante. Gracias por inspirarme y acompañarme en este camino científico.

Al Dr. José Ramon Eguibar Cuenca y al Dr. Gonzalo Flores Alvarez por ser parte de mi comité tutorial. Sus comentarios y revisiones me brindaron perspectivas distintas de mi trabajo y me abrieron la oportunidad a cuestionarme todas las opciones para lograr los objetivos aquí propuestos.

Al Dr. Eduardo Monjaraz, por su acompañamiento directo durante todos mis estudios y procesos de la maestría. Gracias por su paciencia y serenidad, por todas las enseñanzas de temas que no conocía desde mi formación como biomédico y ahora maestría. Gracias por la comunicación y el constante apoyo en todos los aspectos de mi formación.

A mi novia Dany, gracias por todo tu apoyo y por siempre sacar la mejor versión de mi. Gracias por impulsarme en todos mis proyectos y por tu amor incondicional. Gracias a ti soy una mejor persona, pareja y profesionista. Gracias por inspirarme a diario.

A mi amiga y mi primer alumna Karen Juárez, gracias por permitirme transmitirme un poco de mis conocimientos y experiencia, sin tu apoyo en cada uno de los experimentos y el presente trabajo no hubiera sido posible, gracias por tu cariño y apoyo.



A mis amigos Abraham, Mayra, Derek, Ángel, y Anaí, gracias por su apoyo durante todo mi camino científico y profesional en el laboratorio, y fuera de él, sus enseñanzas las llevaré siempre conmigo, gracias por su tiempo, compañía y consejos en los distintos ámbitos de mi vida.

A mis compañeros y excompañeros del laboratorio de Neurofisiología Integrativa: Naye, Pedro, Jenny, Hannia, Ana, Martín, Jorge y Luis. Gracias por todo su apoyo y enseñanzas.

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y especialmente al Instituto de Fisiología, el cuál ha sido mi hogar desde hace muchos años, a todos sus académicos por su incansable dedicación y a todo el personal, por haberme permitido realizar mis estudios de licenciatura, maestría y por permitirme la realización del presente proyecto de tesis

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca durante el periodo 2021-2022

A todos mis amigos y personas que formaron parte de esta grata experiencia.



Para mi abuelito.



Resumen

La estimulación transcutánea de la médula espinal consiste en la aplicación de corriente eléctrica al tejido nervioso espinal a través de la piel, con el objetivo de provocar una respuesta fisiológica. Dicha técnica, se ha empleado para investigar los mecanismos neuronales que subyacen a los procesos fisiológicos y conductuales, incluyendo el control motor y el procesamiento sensorial.

Aunque existen diversos tipos de estimulación eléctrica transcutánea, en el presente trabajo, solo empleamos la Estimulación Eléctrica Ruidosa de Alta Frecuencia sobre la piel a nivel espinal, la cual consiste en la aplicación de ruido eléctrico aleatorio. En particular, empleamos dicho tipo de estimulación para modular la actividad de la médula espinal de manera no invasiva. Históricamente, este tipo de estímulos se han empleado para el tratamiento de numerosas patologías relacionadas al sistema somatosensorial, principalmente aquellas relacionadas al dolor. Sin embargo, aún se desconoce el impacto neuromodulador de dicha estimulación espinal para mejorar la función del sistema somatosensorial.

En el presente trabajo, se muestran datos originales que apoyan la hipótesis de un papel facilitador de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre los potenciales provocados de la corteza somatosensorial, producidos por la estimulación mecánica de las vibrisas en el ratón anestesiado.

En el presente trabajo se demuestra por primera vez un efecto de potenciación en las propiedades fisiológicas activas y pasivas de la corteza somatosensorial producido por la Estimulación Eléctrica Ruidosa de Alta Frecuencia transcutánea de la médula espinal, la actividad espontánea de la corteza somatosensorial y los potenciales provocados producidos por la protracción mecánica de las vibrisas se observan significativamente aumentados en el ratón anestesiado. Mostrando así un impacto neuromodulador en la corteza somatosensorial.



Nuestros resultados son consistentes con la teoría aumentativa de la Estimulación Eléctrica Ruidosa de Alta Frecuencia sobre los procesos sensoriales. Consideramos que el protocolo experimental de esta tesis también permitirá estudiar mecanismos fisiológicos asociados a la propiedad aumentativa de este tipo de estimulación ruidosa. Ello a su vez, podría permitir el desarrollo futuro de nuevas intervenciones terapéuticas no invasivas sobre la médula espinal en el humano, para incrementar la sensibilidad del sistema somatosensorial.



Abstract

Transcutaneous spinal cord stimulation involves applying electrical current to the spinal nerve tissue through the skin to elicit a physiological response. This technique has been used to investigate the neural mechanisms underlying physiological and behavioral processes, including motor control and sensory processing.

Although there are several types of transcutaneous electrical stimulation, in the present study, we only employed High-Frequency Noise Electrical Stimulation on the skin at the spinal level, which involves the application of random electrical noise. Specifically, we used this type of stimulation to non-invasively modulate the activity of the spinal cord. Historically, such stimuli have been used to treat numerous somatosensory system-related pathologies, mainly those related to pain. However, the neuromodulatory impact of spinal stimulation on improving somatosensory system function is still unknown.

In the present study, original data supporting the hypothesis of a facilitative role of transcutaneous spinal cord stimulation on the somatosensory cortex-evoked potentials produced by mechanical stimulation of whiskers in anesthetized mice are presented.

For the first time, this study demonstrates a potentiation effect on the active and passive physiological properties of the somatosensory cortex produced by high-frequency noise electrical stimulation of the spinal cord through the skin, as evidenced by significantly increased spontaneous activity and evoked potentials produced by mechanical protrusion of whiskers in anesthetized mice. This indicates a neuromodulatory impact on the somatosensory-cortex.

Our results are consistent with the augmentative theory of high-frequency noise electrical stimulation on sensory processes. We believe that the experimental protocol of this thesis will also allow the study of physiological mechanisms associated with the augmentative property of this type of noise stimulation. This, in turn, could allow for the future development of new non-invasive therapeutic interventions on the spinal cord in humans to increase the sensitivity of the somatosensory system.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

ANTECEDENTES

La forma en que el sistema nervioso discrimina las diversas formas de experiencia sensorial ha sido un tema central desde el comienzo de la fisiología sensorial.

Un descubrimiento fundamental fue la separación de las funciones sensoriales y motoras en las raíces dorsales y ventrales de la médula espinal, más tarde denominada Ley de Bell y Magendie.

La evidencia que respalda la noción de que la doctrina de las energías nerviosas específicas se aplica a los diferentes sentidos cutáneos provino de las observaciones de Blix en 1884, quien descubrió que la estimulación de puntos localizados separados en la piel producía distintas sensaciones de presión, calor, frío, o dolor. Con el fortalecimiento de la evidencia de que los receptores sensoriales desempeñan funciones sensoriales específicas, se propuso una teoría en la que la información específica de los órganos de los sentidos genera la actividad del generador central de patrones (Melzack y Wall, 1965). El modelo de Melzack y Wall se conoce como la teoría de la compuerta del dolor. Sin embargo, esta teoría no intenta dar cuenta de otras modalidades de sensación cutánea que no sean el dolor.

Todos los avances realizados con respecto a la íntima relación que existe entre el proceso fisiológico de la sensación y la médula espinal fueron logrados gracias a la estimulación eléctrica. Hoy en día, la estimulación eléctrica no invasiva juega un rol fundamental para dilucidar los fenómenos fisiológicos tanto de la corteza somatosensorial, como de la médula espinal; asimismo, fortalecen el conocimiento que ayuda a la implementación terapéutica de diversos procesos fisiopatológicos.

La corteza somatosensorial: El reconocimiento de nuestro entorno

El sistema somatosensorial nos permite contestar preguntas tan esenciales como: ¿Hay algo a mi alrededor?, ¿Qué es? y ¿Qué cambió? Para responder dichas preguntas necesitamos que se realicen dos funciones básicas: detección y discriminación. Con esta información, el sistema nervioso central (SNC), puede responder, adaptarse, o aprender de todos los estímulos físicos externos de nuestro entorno.

Desde tiempos ancestrales en nuestra historia, el ser humano se ha fascinado con la naturaleza de nuestra experiencia sensorial. Aristóteles, en el año 350 A.C., sentó las bases para explicar el proceso fisiológico de la percepción, delimitando en su momento los cinco sentidos (audición, vista, olfato, gusto y tacto). Sin embargo, el sentido del tacto plantea un problema fundamental, ya que la información que recibe es realmente amplia y con rangos cualitativamente diferentes; es decir, discernir entre caliente-frío, húmedo-seco, blando-duro, etc.

Así, los primeros estudios neurofisiológicos individuales de las modalidades sensoriales se realizaron en el sistema somatosensorial, por lo que se le definió, como el sistema que transmite información codificada por receptores distribuidos en todo el cuerpo.



Sir Charles Sherrington, uno de los primeros investigadores del sistema somatosensorial, señaló que el sistema cumple con tres funciones principales: propiocepción, exterocepción e interocepción.

La propiocepción, es el sentido de uno mismo (del latín *proprius*, propio). Los receptores en el músculo esquelético, las cápsulas articulares y la piel nos permiten tener conciencia de la postura y los movimientos de nuestro propio cuerpo, en particular, las cuatro extremidades y la cabeza.

La exterocepción, es el sentido de interacción directa con el mundo externo a medida que impacta en el cuerpo. Los componentes sensoriales y motores del tacto están íntimamente conectados anatómicamente en el cerebro y son importantes para guiar el comportamiento.

El sistema somatosensorial adquiere información acerca de estímulos físicos externos que impactan en el cuerpo en distintas modalidades como presión, vibración y temperatura, o en un extremo el dolor (Kandel, 2021).

Desde un punto de vista anatómico, definimos al sistema somatosensorial como un conjunto de redes neuronales que proporcionan al humano la capacidad de reconocer objetos, discriminar texturas, generar retroalimentación sensorial y motora. Dichas redes neuronales están distribuidas desde la raíz dorsal de la médula espinal hasta la corteza somatosensorial, en la denominada vía ascendente (Figura 1).

Si bien nuestro deseo es la comprensión de la fisiología en nuestra especie, lo que hoy en día sabemos de los procesos neurofisiológicos proviene de investigaciones en otras especies animales. Asimismo, nuestra comprensión del sistema somatosensorial proviene de modelos animales como el ratón. En particular, las bases neuronales del sistema somatosensorial provienen de numerosos estudios realizados en el sistema de vibrisas de ratones y ratas. Dichos resultados nos brindan una amplia visión de la fisiología del sistema somatosensorial, gracias a la interpolación entre especies.

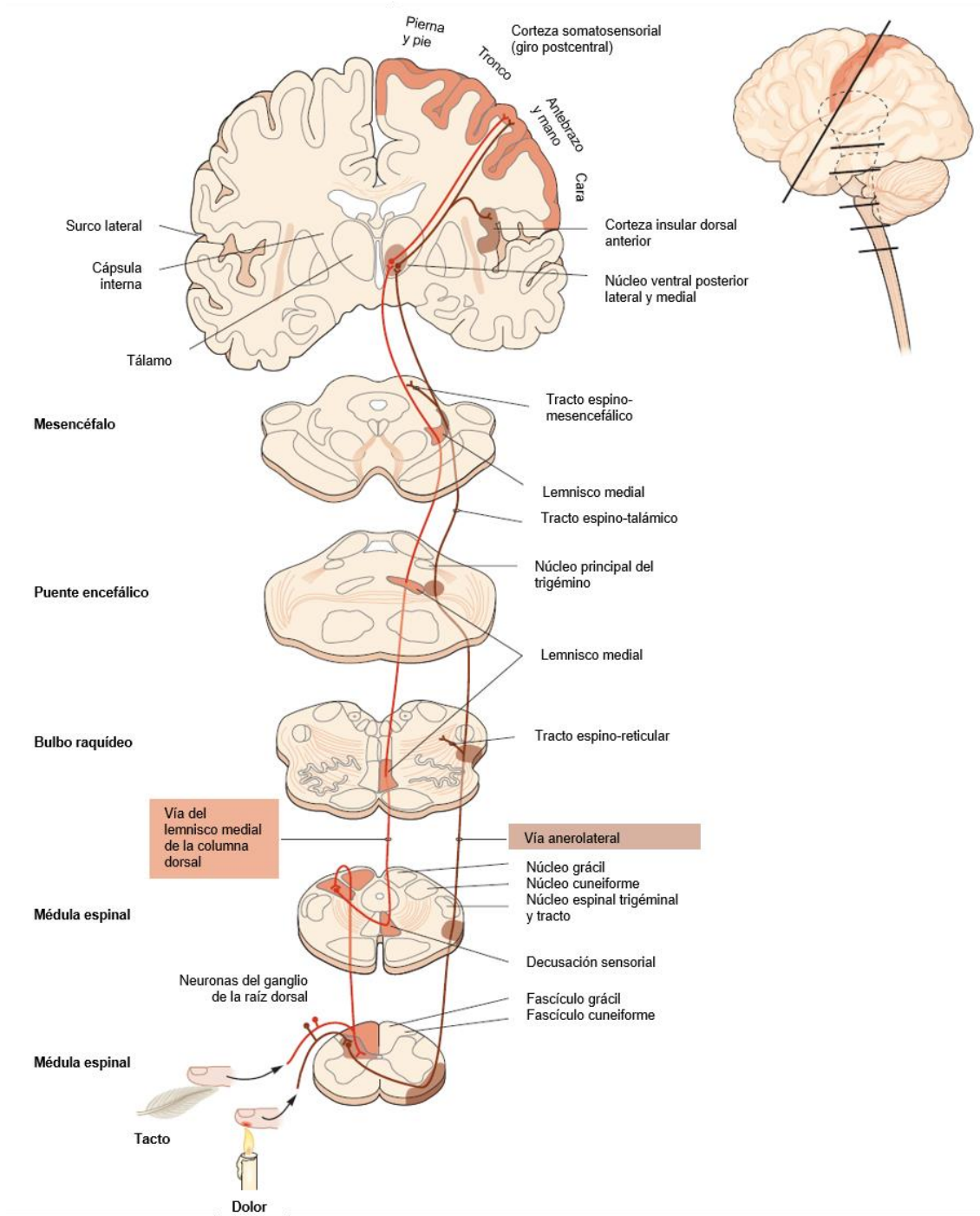


Figura 1. Vías ascendentes sensoriales. La vía de la columna dorsal del lemnisco medial (naranja) transmite las señales sensoriales asociadas al tacto, por fibras largas mielinizadas, mientras que el sistema anterolateral (café), transmite señales nociceptivas, de temperatura, las cuales se transmiten por fibras amielínicas (Modificado de Kandel E. y cols. 2021)

El sistema somatosensorial del ratón: De las vibrisas a la corteza de los barriles

Comprender y comparar el procesamiento somatosensorial en ratones y humanos requiere colocar los respectivos sistemas sensoriales en contexto de su función. Los humanos utilizamos principalmente nuestras manos para obtener información de nuestro entorno, mientras que los ratones que son animales nocturnos dependen en gran medida de la información táctil que obtienen de sus vibrisas. (Figura 2)



Figura 2. Funciones de la mano y las vibrisas. Tanto las vibrisas como las manos pueden percibir las propiedades de un objeto como lo son la textura, y forma, pero solo las manos pueden tomar y manipular objetos (O'Connor y cols. 2021)

De esta forma, las interacciones causan deformaciones tanto en la piel o en las vibrisas, que transmiten la información a los mecanorreceptores, la cual convierte esta información en señales eléctricas. Las propiedades mecánicas de las vibrisas y la piel juegan así un rol fundamental en formar las señales sensoriales que se transmiten en el SNC. (O'Connor y cols. 2021)

Morfológicamente las vibrisas son rayos cónicos que transmiten al folículo de las vibrisas las tensiones producidas durante las interacciones vibrisa-objeto (Birdwell et al., 2007; Solomon y Hartmann, 2006). Existe una variedad de diferentes tipos de receptores en el folículo de la vibrisa, cada uno sensible a diferentes aspectos del movimiento de ésta, que traducen las tensiones locales en potenciales de acción. Los folículos de las vibrisas

tienen una estructura compleja en la que los receptores se forman en lugares específicos que los exponen a distintas características de la entrada mecánica (Ebara et al., 2002).

La disposición más elaborada de mecanorreceptores en el ratón se observa en el folículo de la vibrisa. Cada vibrisa principal está envuelta en una estructura capsular compleja con un abundante suministro de sangre y está inervada por 100 a 200 axones (Figura 3) (Lee y Woolsey, 1975).

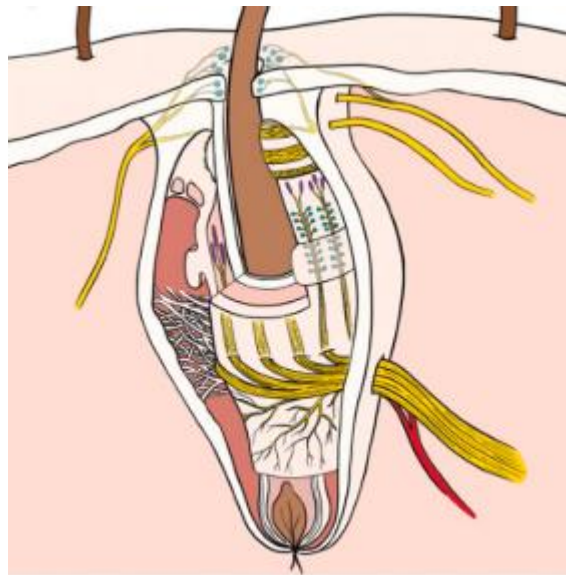


Figura 3. Innervación de la vibrisa. Las vibrisas son estructuras complejas que se encuentran encapsuladas y contienen ~8 diferentes mecanorreceptores, incluidas las terminaciones de células de Merkel (cian) y de tipo lanceolado (púrpura). Todo el folículo gira junto con el bigote durante el movimiento, debido a la acción de los músculos intrínsecos y extrínsecos. (Ebara y cols., 2002)

Para transmitir las señales que obtiene la vibrisa hacia el cerebro, específicamente a la corteza somatosensorial primaria (S1), son necesarias dos sinapsis, una a nivel de tronco encefálico y otra en el tálamo (Figura 4).

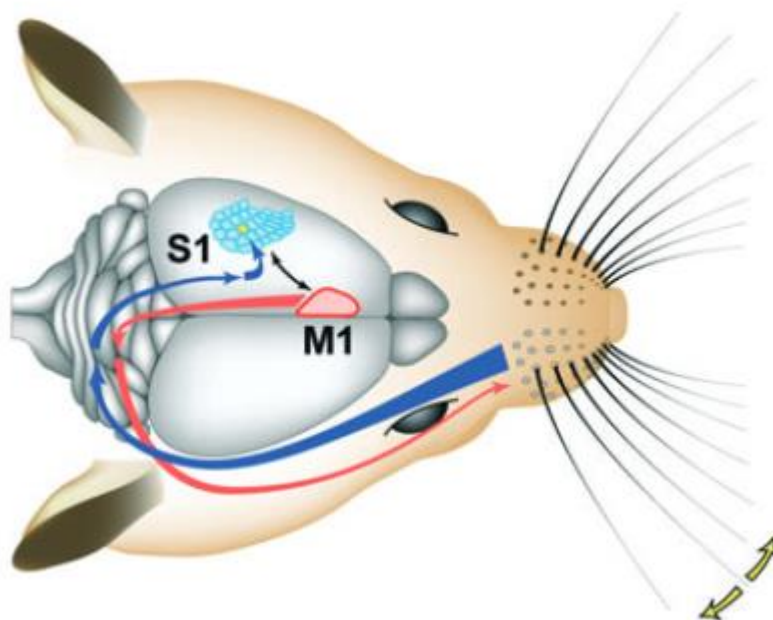


Figura 4. Vía de señalización de la vibrisa a la corteza. La deflexión de la vibrisa provoca potenciales de acción en las neuronas del ganglio del nervio trigémino, éstas liberan glutamato en las neuronas trigeminales del tronco encefálico que a su vez proyectan al tálamo donde liberan glutamato en las neuronas talámico-corticales, que envían sus proyecciones a la corteza somatosensorial primaria o corteza de los barriles (S1). De S1, las señales sensoriales pueden ser después distribuidas a otras áreas cerebrales, incluyendo el área motora primaria (M1), esta señalización puede activar un asa de retroalimentación para activar núcleos del tronco encefálico que contribuyen al movimiento activo de las vibrisas (Petersen 2007).

La corteza somatosensorial primaria (S1), está funcionalmente constituida por columnas que se extienden perpendiculares a la superficie de esta corteza. Estas columnas están conformadas por células asociadas a la misma modalidad de estimulación. Además, las neuronas halladas en estas columnas están relacionadas con el mismo o casi siempre el mismo campo receptivo en la superficie corporal (Mountcastle, 1957), lo cual representa la particularidad del estudio en ratones.

Woolsey y Van der Loos en 1970 observaron la corteza somatosensorial del ratón y concluyeron que cada vibrisa está representada individualmente por un campo de terminación segregado de axones talamocorticales dispuestos somatotópicamente que definen el mapa de la corteza, a dichas estructuras las denominaron barriles (Figura 5).

Propusieron también que los barriles son la manifestación morfológica de las columnas en las que la corteza somatosensorial primaria del ratón se organiza, a su vez determinaron que cada vibrisa se corresponde con un solo barril en S1 contralateral del ratón.

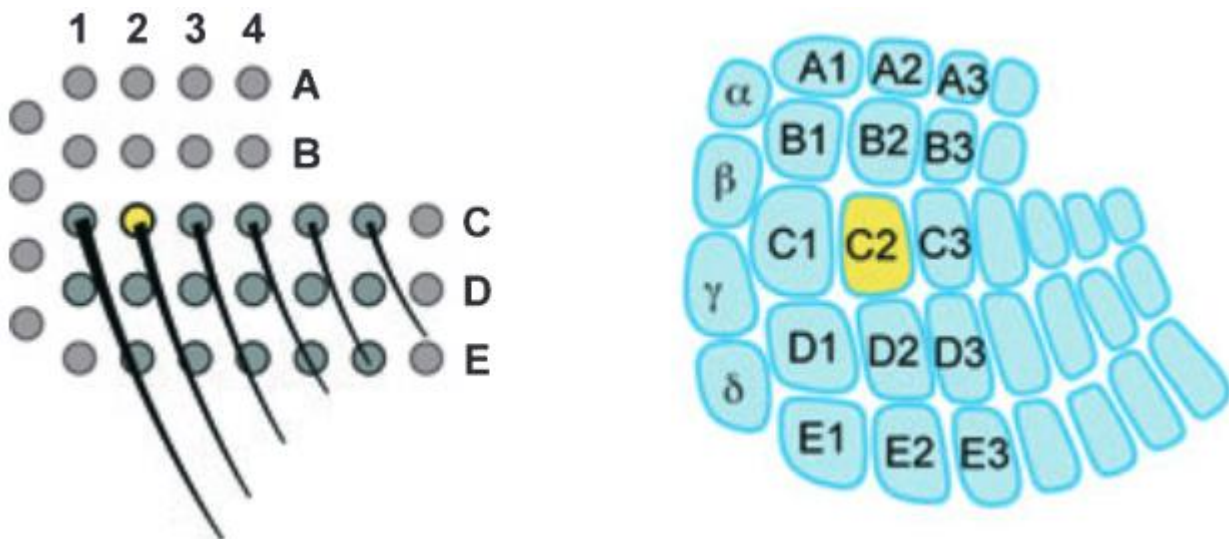


Figura 5. Nomenclatura y distribución de las vibrisas. Las vibrisas emergen de los folículos que están dispuestos en un patrón estereotípico en el hocico del ratón, se encuentra resaltado el folículo de la vibrisa C2, mientras que del lado derecho observamos la corteza de somatosensorial primaria (S1), o la corteza de los barriles, la cual contiene una serie de barriles dispuestos somatotópicamente, que se disponen en un patrón casi idéntico a los folículos de las vibrisas en el hocico. El barril C2 está resaltado en amarillo. (Petersen 2007).

La corteza de los barriles (S1) se puede dividir a lo largo de su profundidad en capas definidas anatómicamente, desde la capa superficial 1 hasta la capa profunda 6.

Las neuronas talamocorticales ubicadas en los llamados "barreloides" del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) inervan densamente la capa 4 (con una inervación más escasa de la capa superior 6), (Figura 6). con cada vibrisa representada individualmente por un campo de terminación segregado de axones talamocorticales dispuestos somatotópicamente que definen el mapa del barril cortical (Woolsey & Van der Loos, 1970). Los axones del núcleo VPM excitadores proporcionan la vía más importante para llevar la información sensorial relacionada con los movimientos de las vibrisas individuales a S1

Los avances en las técnicas electrofisiológicas y de imagen ayudaron a dilucidar las funciones de las vibrisas en relación con la corteza somatosensorial. La respuesta cortical más temprana a la desviación de un solo bigote surge en la columna de barril relacionada en el hemisferio contralateral. Si se desvía el bigote en específico del lado derecho, entonces comienza el procesamiento sensorial cortical en la columna de barril del hemisferio izquierdo con una latencia de ~10 ms (Fig. 7).



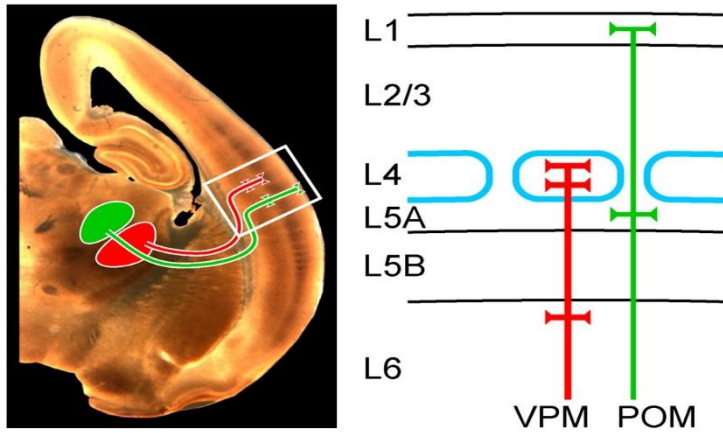


Figura 6. Vías talámico-corticales para la señalización sensorial de las vibrisas. Las neuronas en el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) (rojo), son neuronas glutamatérgicas y provienen de la actividad de una sola vibrisa, terminan predominantemente en la capa 4 y con menor inervación en la capa 6 de S1. El núcleo posteromedial del tálamo (POM) también están implicadas en la actividad de los campos receptivos de las vibrisas, pero no proyectan a la capa 4, donde se encuentran los barriles, sino que sus proyecciones van a la capa 1 y 5A (verde). Knott y cols. 2002

Estímulo en la vibrisa C2 derecha

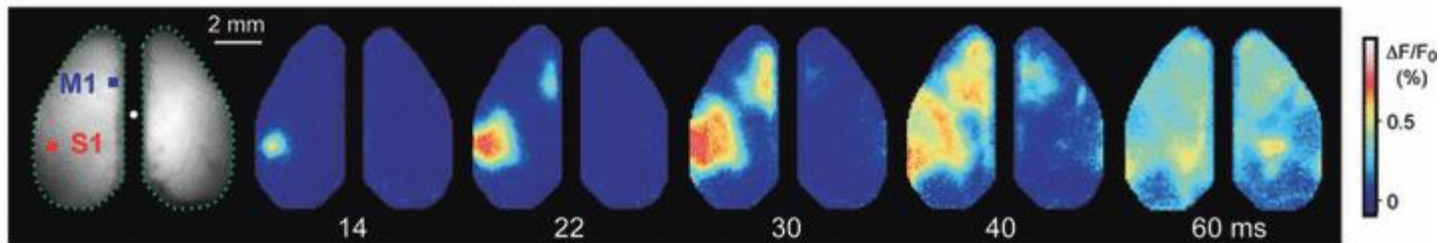


Figura 7. Activación de S1, por la estimulación de una vibrisa. Una sola y breve desviación de la vibrisa C2 provoca una respuesta compleja en la corteza somatosensorial primaria (S1) impulsada por la actividad en la columna del barril C2. En el tiempo 0 ms, se entregó una única y breve desviación al bigote C2 derecho. La respuesta provocada se ilumina con tinte sensible al voltaje en una gran extensión de la corteza sensoriomotora dorsal. La despolarización más temprana se localizó en la columna de barril C2 en el contralateral S1 (Modificada de Frezou y cols. 2007).

La importancia del estudio de las respuestas somatosensoriales nos ha brindado conocimiento muy valioso de la neurofisiología moderna, esto quiere decir, mediante abordamientos cada vez más sofisticados, combinando distintas técnicas de inmunohistoquímica, optogénica o clasificación molecular, teniendo como vía principal las proyecciones talámico corticales, es pertinente resaltar a su vez una estructura fundamental para los procesos fisiológicos del sistema somatosensorial, observamos que las proyecciones talámico corticales juegan un rol fundamental en la transmisión de señales sinápticas somatosensoriales, pero la médula espinal es el primer relevo para dichas señales, por lo que es inherente asumir que dicha estructura toma un protagonismo esencial en dichos procesos.

La médula espinal: Morfología y función, del humano al ratón

La médula espinal representa una de las partes más complejas y a la vez fascinantes del sistema nervioso central. Sus complejas conexiones, implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas representan un reto para la neurociencia moderna y amerita una mejor comprensión de su naturaleza anatómica y funcional.

La médula espinal es un aspecto integral del sistema nervioso central, morfológicamente tiene forma cilíndrica y de estructura alargada. Es uno de los contenidos más importantes del canal vertebral y se presenta como una extensión inferior del tronco encefálico; es decir, el bulbo raquídeo. En el humano la médula espinal tiene 31 segmentos (8 cervicales, 12 torácicos o dorsales, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo), cada uno de los cuales (excepto el primer segmento cervical, que tiene solo una raíz ventral) tiene un par de raíces dorsales y ventrales y un par de nervios espinales. No hay límites definidos entre los segmentos dentro de la médula, pero las ampliaciones cervicales y lumbares, que dan lugar a raíces nerviosas para brazos y piernas, respectivamente, son claramente



evidentes. Cada raíz dorsal y ventral se une en los agujeros intervertebrales para formar un nervio espinal. (Afifi Y Bergman, 1998).

En el ratón, la médula espinal es delgada, casi cilíndrica, con una estructura blanca, ligeramente aplanada dorsoventralmente. Se extiende desde el extremo caudal del rombencéfalo en el agujero magno hasta la parte inferior de la columna vertebral. La parte más caudal de la médula espinal alcanza el nivel de la sexta vértebra lumbar y la duramadre espinal se extiende hasta la segunda vértebra caudal. (Yaksh, 1999). Hay de 25 a 30 vértebras entre el cráneo y el extremo caudal del sacro. El número de vértebras son generalmente, 7 cervicales, 13 torácicas, 6 lumbares, 4 sacras y 28 caudales. (Cook, 1965; Green, 1941;1962). La parte más distal de la médula espinal se llama *conus medullaris*. El extremo cónico del *conus medullaris* continúa como un filamento delgado; el *filum terminale*, que se compone de tejido fibroso derivado de la pia madre y cubierto por una continuación de la aracnoides. El *filum terminale*, conecta el extremo inferior de la médula espinal con la columna vertebral, debido a que el extremo distal de la médula espinal no llega al final de la columna vertebral.

Las similitudes anatómicas y morfológicas de las estructuras óseas y funcionales de la médula espinal entre ambas especies se ilustran en la figura 8.



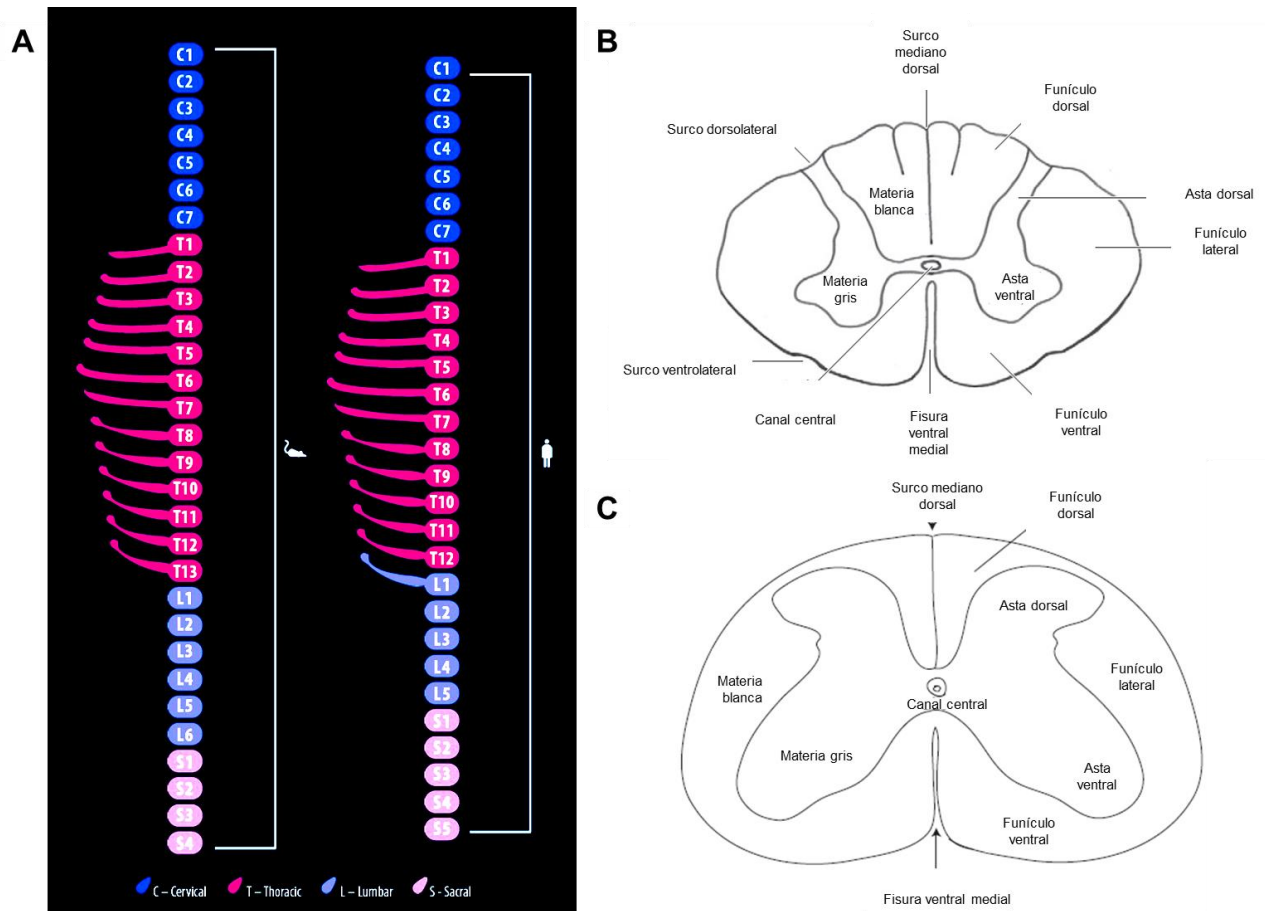


Figura 8. Comparación anatómica y morfológica de la médula espinal en el ratón y humano. En A están representados los segmentos vertebrales a la izquierda del ratón y la derecha del humano. B y C corresponden a diagramas de un corte transversal a nivel T1, en ratón y humano, respectivamente

La médula espinal es la parte del sistema nervioso central que conduce la información sensorial desde la periferia hacia el encéfalo y la información motora desde el cerebro hacia el tejido muscular o glandular.

La vía que lleva información sensorial de la médula espinal a estructuras superiores y corticales es la vía ascendente sensorial, la cual está conformada por distintos tractos, todos ellos tienen una estructura de inicio común, la asta dorsal de la médula espinal.

Los núcleos de mayor importancia en la asta dorsal de la médula espinal son los núcleos cuneado y grácil (Franklin and Paxinos, 2008). En el ratón, el núcleo cuneado recibe información de las extremidades superiores y el núcleo grácil de las extremidades inferiores, así como del cuello y hombros; sin embargo, toda la información de la cara proviene de la vía trigeminal.

Gran parte del conocimiento logrado hasta ahora con relación a la íntima relación de la médula espinal como parte del sistema somatosensorial, se ha logrado gracias a la historia de la electrofisiología, que nace con realizar estímulos eléctricos y realizar un correlato con la función de los organismos.

La estimulación eléctrica: De la electrofisiología a la terapéutica

Pocas investigaciones han sido un parteaguas que han despertado la imaginación o que han ejercido una influencia tan grande en la historia del estudio de la física y la fisiología, como los experimentos de Luigi Galvani en el s. XVIII. Galvani exploró por primera vez los efectos de la electricidad en un sistema biológico. El modelo animal que empleó era la rana, demostrando por primera vez que la estimulación eléctrica podía inducir contracción muscular, y que existe electricidad intrínseca en todos los seres vivos (Galvani, 1791).

Años después Fritsch y Hitzig en 1870, demostraron que el movimiento de las extremidades se producía al estimular la corteza motora del perro, demostrando la excitabilidad del cerebro.

En 1874, Bartholow realizó la primera documentación de estimulación eléctrica del cerebro de un ser humano despierto. Sin embargo, el primer uso práctico de la estimulación eléctrica intraoperatoria fue realizado por Sir Víctor Horsley, quien aplicó la estimulación del tejido dentro de una encefalocele occipital y observó los movimientos oculares conjugados en 1884.



Cuando las técnicas estereotáxicas animales fueron introducidas en 1908 por Horsley y Clarke, introdujeron simultáneamente la estimulación estereotáctica localizada de las estructuras cerebrales profundas en el humano.

Hassler fue fundamental al sugerir que las observaciones realizadas sobre la estimulación en el quirófano podrían tener algunas implicaciones a largo plazo. Había sido estudiante de posgrado de Rudolph Hess en Suiza a fines de la década de 1940, donde la estimulación crónica se administraba de forma rutinaria a través de electrodos implantados permanentemente a gatos despiertos. Reconocieron que, aunque la estimulación podría producir efectos reversibles que eran esencialmente los mismos que la producción de lesiones en el mismo sitio, cambiar la frecuencia de la estimulación podría producir una mejora en lugar de una inhibición.

Mientras tanto, se habían logrado avances significativos en la comprensión de la percepción del dolor. El concepto que impulsó la introducción de la neuromodulación para el tratamiento del dolor fue la introducción de la teoría histórica de Melzack y Wall en 1965. Ellos propusieron que la percepción del dolor involucra una compuerta que puede abrirse o cerrarse dependiendo del equilibrio entre el disparo de pequeñas y grandes fibras neurales. Si se estimularan las fibras táctiles grandes, la puerta se cerraría y el dolor disminuiría. La sensación táctil transmitida por los grandes nervios también se podía simular aplicando una estimulación eléctrica suave a los electrodos adheridos a la piel, la llamada estimulación transcutánea fue reinventada.



La estimulación eléctrica de la médula espinal

En 1967, Norman Shealy, en la Escuela de Medicina de Western, tuvo la idea de estimular las fibras nerviosas grandes donde estaban reunidas de manera única en las columnas dorsales de la médula espinal. Él teorizó que el impulso viajaría retrógrado por la médula espinal a aquellos niveles en los que estaba entrando la sensación de dolor y la compuerta en la zona de entrada de la raíz dorsal estaría cerrada para aliviar el dolor. Junto a Thomas Mortimer, diseñaron un estimulador implantable. El primer modelo requería una fuente de alimentación externa conectada por agujas que se pasaban a través de la piel.

Los primeros estimuladores de la médula espinal fueron modificaciones de dispositivos utilizados para la estimulación cardiovascular, diseñados por Medtronic años antes, con electrodos de platino. Pacientes de Shealy, usaron este estimulador y tuvieron alivio del dolor crónico durante 4 años. Este dispositivo estuvo disponible comercialmente a través de Medtronic en 1968.

Los primeros estimuladores venían en dos partes. La parte implantable era pasiva y consistía en un electrodo conectado a una antena enrollada circular implantada subcutáneamente. La parte externa tenía una fuente de alimentación que funcionaba con baterías y una caja de control conectada a una antena externa similar pegada con cinta adhesiva en la piel que cubría la antena interna. En 1981, la tecnología de las baterías había mejorado hasta el punto en que Medtronic pudo proporcionar un estimulador de la médula espinal completamente implantable.

En 1971, Gildenberg obtuvo estimuladores modificados para proporcionar frecuencias de 800 a 1200 Hz, que fueron útiles para el tratamiento de la tortícolis espasmódica, el primer uso de estimuladores implantados para un trastorno motor.



Aunque la estimulación de la médula espinal se usó principalmente para el dolor, en 1976, tanto Cook como Dooley reconocieron una mejoría en la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple, a los que se les había implantado estimuladores para el dolor del espasmo muscular. Además, Dooley reconoció un aumento en el flujo sanguíneo a las extremidades de los pacientes sometidos a estimulación de la médula espinal para el tratamiento del dolor, una observación que sería significativa dos décadas después.

En 1985, Augustinsson observó que los pacientes que tenían estimulación de la médula espinal para el dolor de la enfermedad vascular periférica no solo tenían alivio del dolor, sino que a menudo tenían una mejoría en la circulación y una mejoría en los signos de isquemia, una observación que se remonta a la de Dooley. En 1987, Murphy informó un alivio similar del dolor en la angina. Sin embargo, existía la preocupación de que el alivio del dolor pudiera hacer posible que el paciente se esforzara más allá de la capacidad circulatoria del miocardio y aumentara el riesgo de enfermedad arterial coronaria. En 1996, Hautvast documentó que la perfusión miocárdica aumentaba con la estimulación de la médula espinal, lo que consecuentemente brindaba una protección considerable contra la isquemia.

Sin embargo, existe la necesidad de estudiar los efectos de la estimulación eléctrica, sin el hecho tan invasivo de recurrir a una cirugía. Así nace una alternativa a la estimulación eléctrica directa de estructuras tan vitales como el encéfalo o la médula espinal, la estimulación eléctrica no invasiva, la cual evita al sujeto de cualquier procedimiento quirúrgico, ya que estas técnicas no son invasivas y no implican un riesgo al paciente tratado. Es así como en los últimos años la estimulación eléctrica transcutánea ha tomado gran importancia en la terapéutica, pero a su vez nos ayuda a dilucidar los fenómenos neurofisiológicos que de ella subyacen

La estimulación eléctrica no invasiva.

El desarrollo de las técnicas no invasivas de estimulación del cerebro nacieron desde el cuestionamiento, si se podrían obtener logros similares a aquellos alcanzados con técnicas invasivas, como la terapia electroconvulsiva o la estimulación profunda cortical, en patologías como depresión o Parkinson, sin la necesidad de una cirugía tan invasiva del cerebro.

La estimulación transcraneal con corriente directa (EET), se remonta a la década de 1960, con los trabajos de Costain, el cuál utilizó pequeños electrodos en la superficie de la cabeza de pacientes con trastornos depresivos, y en 1967 Lifshitz utilizó dicha estimulación como tratamiento de pacientes esquizofrénicos, ambos obtuvieron resultados prometedores como una gran alternativa para la estimulación invasiva.

La estimulación cerebral no invasiva, involucra la aplicación de pequeñas corrientes en la superficie del cráneo. Diversos tipos de estimulación eléctrica transcraneal se han utilizado para influenciar el comportamiento humano, incluyendo tanto la estimulación con corriente directa y la estimulación con corriente alterna

En los últimos 30 años, la estimulación cerebral no invasiva (ECNI), ha sido uno de los métodos mayormente utilizados, para dilucidar el rol de cierta área cortical, ya sea cognitivo, sensorial, motor, perceptual o cognitivo. La ECNI produce efectos de tipo neuroplásticos en la corteza humana, lo que lleva a la modificación dependiente de la actividad de la transmisión sináptica (Kadosh, 2014)



Estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria

La estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria (EETRA) es una forma específica de estimulación eléctrica transcraneal, que es en sí, uno de los tipos de estimulación eléctrica no invasiva.

Diversos estudios han demostrado que la EETRA tiene una mayor influencia neuromoduladora en comparación con otros métodos de EET, lo que se refleja en efectos posteriores neurofisiológicos y conductuales más grandes (Inukai et al., 2016; Moliadze et al., 2014; Prete et al., 2018), lo que hace que es un método prometedor para mejorar el comportamiento humano. La EETRA también se ve menos afectado por el plegamiento cortical, lo que reduce la variabilidad en los resultados debido a las diferencias anatómicas entre los participantes.

La EETRA también permite la estimulación de una mayor población de neuronas (tanto excitatorias como inhibitorias). Por ejemplo, con la Estimulación eléctrica transcraneal con corriente directa (EETCD), las corrientes de corriente continúa tangenciales aplicadas a un árbol dendrítico simétrico se cancelarán entre sí en la colina del axón, mientras que con EETRA la célula se despolarizaría independientemente de la orientación del flujo de corriente (Terney et al., 2008).

La EETRA implica la aplicación de corrientes alternas en una combinación de frecuencias, entre 0,1 y 100 Hz para estimulación de "baja" frecuencia, y entre 101 Hz y 640 Hz para estimulación de "alta" frecuencia. La división arbitraria de frecuencias "bajas" y "altas" se basa en uno de los primeros artículos de EETRA (Terney et al., 2008). Estos niveles de corriente aleatorios se distribuyen normalmente (Figura 10) y dan como resultado un ruido blanco gaussiano de media cero.



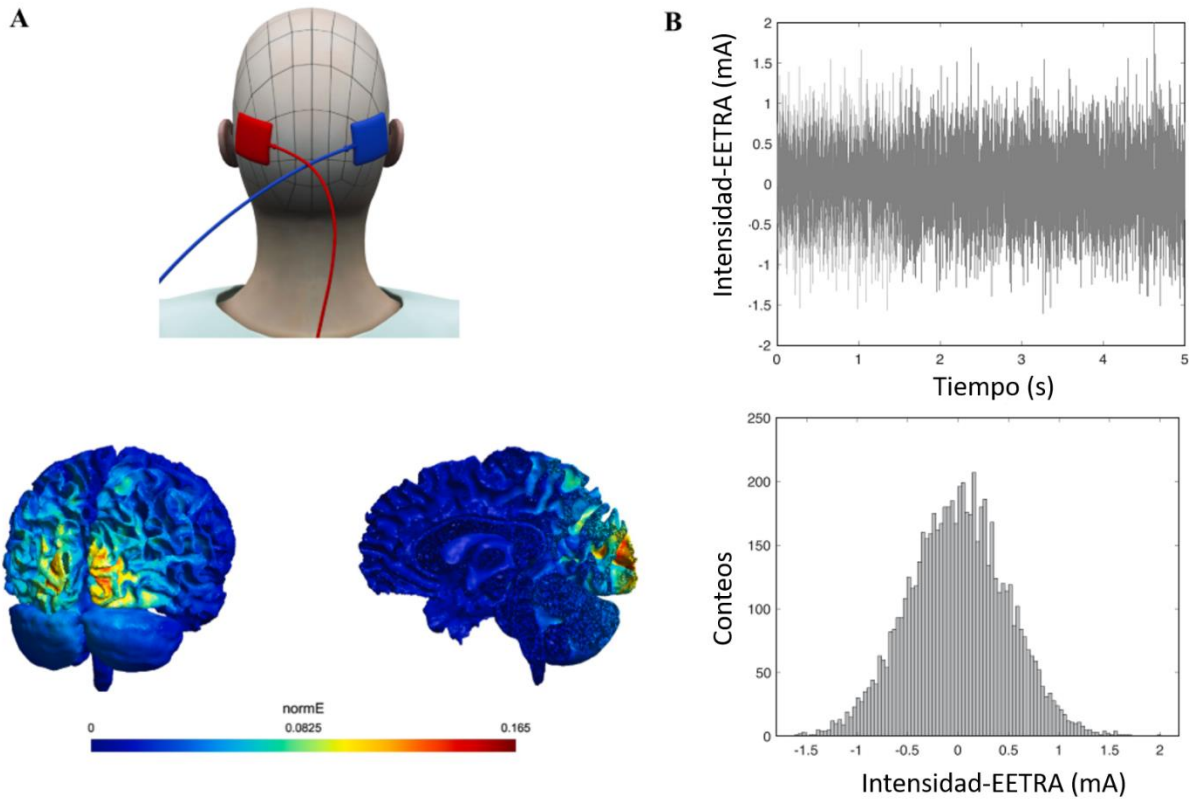


Figura 9. Estimulación Eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria. En A observamos un montaje clásico de electrodos para la Estimulación Eléctrica Transcraneal Ruidosa Aleatoria (EETRA), y la fuerza del campo eléctrico modelado (normE), en la corteza visual y en B se observa la generación de una corriente aleatoria para cada muestra. Los números aleatorios provienen de una distribución normal y la corriente promedio es 0, la corriente varia de entre 1mA a -1mA. El histograma en la parte inferior muestra la distribución con un promedio de 0 (Modificado de van der Groen, 2022).

Precisamente Terney y cols., en 2008, demostraron el efecto de la EETRA aplicando dicha estimulación en el cuero cabelludo de personas sanas, colocando los electrodos de estimulación a nivel de la corteza motora primaria (M1). Los resultados mostraron un incremento significativo en la excitabilidad de M1 (Figura 11).

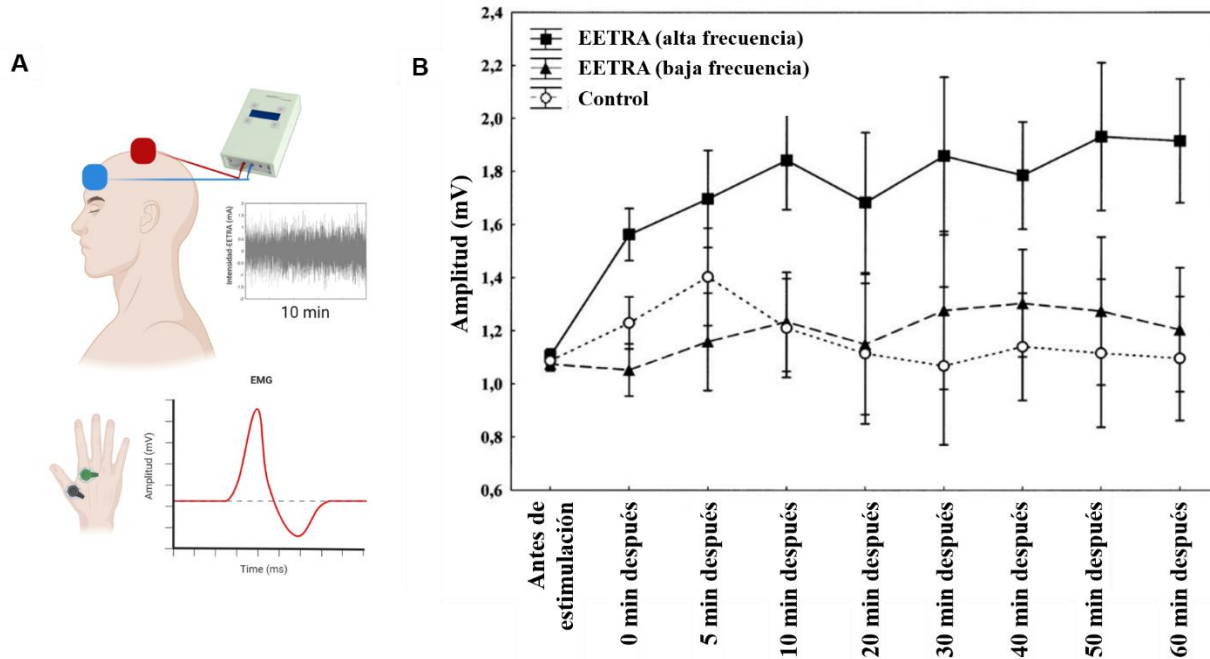


Figura 10. El efecto de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria en la corteza motora primaria. En A, se observa la preparación experimental que consistió en el registro del potencial provocado motor del primer músculo interóseo dorsal de la mano, seguido de la estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria durante un periodo de 10 minutos aplicada sobre el cuero cabelludo. En B, observamos el efecto de la estimulación eléctrica transcraneal aleatoria (EETRA) a lo largo del tiempo, notando un aumento significativo con la EETRA de alta frecuencia en la amplitud del potencial provocado motor (Modificado de Terney et al. 2008).

Además, Van der Groen y Wenderoth, en 2016, observaron el efecto de EETRA, pero en la corteza visual primaria del humano, demostrando así que dicha estimulación es capaz de aumentar la excitabilidad también a nivel sensorial, aumentando así la precisión de detección de estímulos visuales subumbrales (Figura 12).

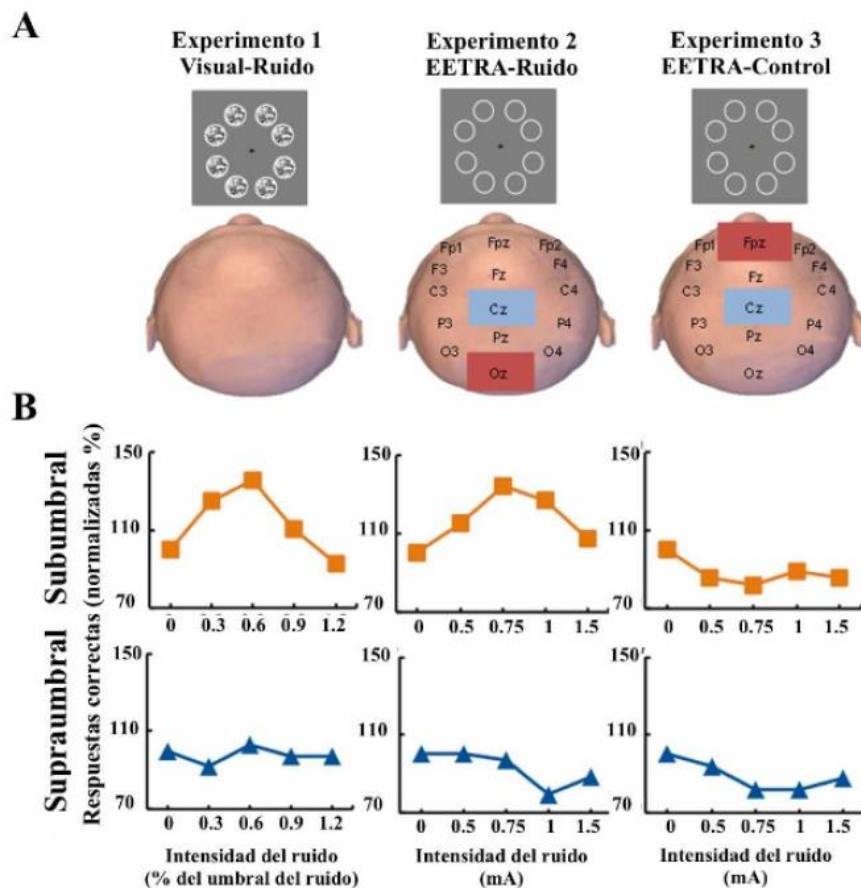


Figura 11. Efecto de la Estimulación Eléctrica Transcraneal Ruidosa Aleatoria en la precisión de estímulos visuales. A. Muestra la representación de la detección visual de los experimentos, así como la EETRA en la corteza visual primaria. B. muestra los datos representativos de sujetos individuales, donde observamos un aumento en la detección, reflejado en el porcentaje de respuestas correctas en presencia de ruido y EETRA. Dicho efecto se observa cuando el estímulo aplicado a discriminar es subumbral (gráficas del panel superior, línea naranja), pero no para las respuestas producidas por un estímulo supraumbral (gráficas del panel inferior, línea azul) (Modificado de Van der Groen y Wenderoth, 2016).

La estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal

La estimulación espinal eléctrica, a través de electrodos implantados en el espacio epidural, se ha utilizado para el tratamiento del dolor crónico complejo en virtud de su supuesto efecto neuromodulador sobre los aferentes nociceptivos que entran en el asta dorsal de la médula espinal (Gildenberg, 2009; Shealy et al. 1967). Sin embargo, también se ha estudiado el efecto de la estimulación espinal en los trastornos motores que cursan con patologías y lesiones, como la esclerosis múltiple (Cook, 1976) y la lesión espinal (Angeli et al. 2014; Harkema et al. 2011). Tanto los estudios preclínicos, como los humanos, han concluido que la estimulación epidural espinal desencadena patrones de actividad muscular rítmica alternantes (Wenger et al. 2014). Además, estos estudios informaron un aumento en la amplitud de los movimientos voluntarios en las extremidades paralizadas y una reducción de la espasticidad entre los pacientes con lesión medular incompleta. (Dimitrijevic et al. 1986; Minassian et al. 2012). La activación de la actividad motora por debajo de la lesión motora completa o incompleta de la médula espinal puede estar relacionada con una mayor excitabilidad del grupo motor mediada por varios mecanismos neuromoduladores (McKay-Lyons et al. 2002), que incluyen, una mayor entrada espinal y supra espinal residual a los grupos de motoneuronas (Taccola et al. 2018).

A nivel espinal, la estimulación espinal transcutánea aumenta la actividad refleja espinal similar a la que se obtiene con la estimulación epidural (Minassian et al. 2007). La actividad del reflejo de tipo Hoffmann evocado (reflejo H), puede resultar de la activación de aferentes propioceptivos dentro de las raíces dorsales. Dichos resultados se muestran en la figura 9.

Danner et al. 2011 y Ladenbauer et al. 2010 han propuesto resultados que apoyan la teoría de que la estimulación espinal no invasiva también puede provocar actividad motriz al facilitar las vías motoras espinales y supra espinales residuales.

Teniendo en cuenta estos estudios, la activación de los grupos motores a través de la activación de las raíces dorsales o las interneuronas, en personas con lesión de la médula espinal, podría reducir su umbral de activación por la entrada supra espinal residual (Taccola et al. 2018).

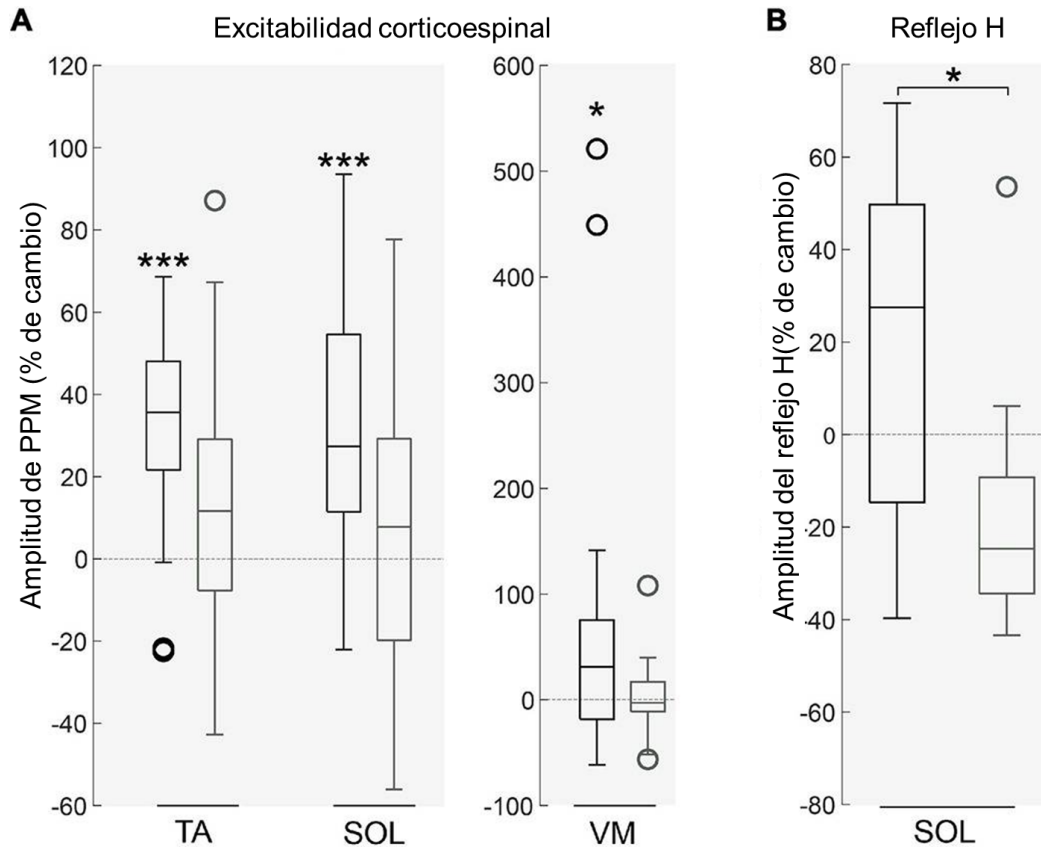


Figura 12. Efecto inmediato de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre la excitabilidad corticoespinal y el reflejo H. Se muestran los cambios fisiológicos tras la estimulación transcutánea de la médula espinal a nivel T12/L1, en sujetos sanos con corriente directa a 300Hz de frecuencia durante 300ms. Los resultados muestran en A, un aumento en la excitabilidad de los músculos Tibial Anterior (TA), Sóleo (SOL) y Vasto Medial, tras la estimulación periférica de los nervios de dichos músculos. En B, se ilustra un reflejo H en el músculo Sóleo significativamente incrementado (Modificado de Al'joboori et al. 2021).

La posibilidad de activar redes neuronales dentro de la médula espinal, por medio de un método de estimulación no invasivo abre una ventana terapéutica para el tratamiento de trastornos motores posteriores a una lesión de la médula espinal.

La estimulación transcutánea de la médula espinal (ETME) aplicada sola o en combinación con programas de rehabilitación basados en actividades para mejorar la función motora de personas con lesión crónica de la médula espinal se ha estudiado durante los últimos 10 años. Recientemente, ha recibido considerable atención científica, clínica y mediática. Inanici y colaboradores, recientemente, en 2021, publicaron el efecto de la estimulación transcutánea de la médula espinal para el restablecimiento de la función de la mano y el brazo en pacientes que tuvieron una lesión espinal. Estos autores demostraron el efecto terapéutico de la ETME en combinación con entrenamiento y rehabilitación. Dichos resultados se muestran en la figura 10.

En resumen, se ha demostrado ampliamente el efecto de la ETME sobre la corteza motora, tanto en pacientes sanos, como en pacientes con lesión de la médula espinal; sin embargo, existen pocos estudios acerca del efecto de la ETME sobre otras áreas corticales íntimamente relacionadas como la corteza somatosensorial primaria.

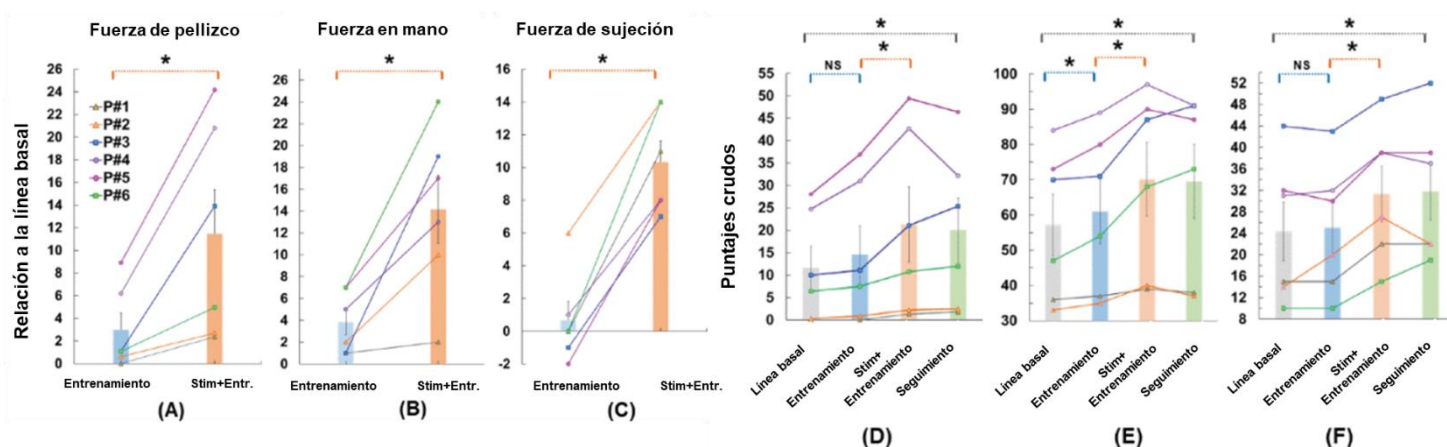


Figura 13. Efecto de la estimulación transcutánea de la médula espinal sobre la función de la mano en pacientes con lesión espinal. Se muestran los resultados para los 6 participantes con lesión de médula espinal y parálisis de la mano, los cuáles mejoraron la función de la mano tras la estimulación transcutánea de la médula espinal y el entrenamiento. Las pruebas realizadas fueron la fuerza de pellizco (A), fuerza de la mano (B) y fuerza de sujeción (C), mostrando una mejoría significativa con una $p < 0.001$. En D, E y F, podemos observar que el entrenamiento solo produce una mejoría, pero la adición de la Estimulación transcutánea de la médula espinal (ETME), produce una mejoría significativa en la función de la mano en los pacientes con una $p < 0.0045$, y ésta se mantiene a lo largo de los días (Modificado de Inanici y cols., 2021)

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A lo largo de la historia de la electrofisiología moderna la estimulación eléctrica del SNC ha representado uno de los principales acercamientos para la comprensión de los procesos fisiológicos, así como fisiopatológicos que ocurren a nivel central. Ello ha representado un avance significativo en la terapéutica de diversas patologías, como lo son dolor crónico, trastornos psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas (Cerletti y Bini, 1938), (Shealy, 1968), (Costein, 1964) (Lifshitz, 1968).

Por otro lado, la estimulación eléctrica requería principalmente una cirugía invasiva en los pacientes, y esto representa un alto riesgo en los sujetos a tratar. Fue así, que el uso de la estimulación eléctrica pudo orientarse hacia límites de mayor seguridad como lo es la estimulación eléctrica no invasiva.

La estimulación eléctrica transcraneal, la cual es un tipo de estimulación eléctrica no invasiva, ha demostrado producir un incremento significativo en la excitabilidad neuronal. Es así como Terney y cols., en 2008, demostraron este efecto a nivel de la corteza motora, utilizando estimulación eléctrica transcraneal ruidosa aleatoria. Demostraron que este tipo de estimulación a nivel cortical es altamente eficaz para aumentar la respuesta motora en sujetos sanos.

Asimismo, Wenderoth y cols. En 2016, observaron este efecto aumentativo en una modalidad sensorial; específicamente, la corteza visual, aumentando la precisión en la detección de estímulos visuales.



La estimulación ruidosa aleatoria de alta frecuencia ha demostrado dicho efecto aumentativo incluso a un nivel celular (Remedios y cols. 2019), lo cual resulta prometedor para provocar un aumento en la excitabilidad cortical.

Los trabajos arriba mencionados muestran que la EERA de alta frecuencia puede incrementar la excitabilidad en el sistema motriz, mejorar la discriminación visual, o potenciar la amplitud de las corrientes iónicas en neuronas piramidales. Sin embargo, no se conocen los efectos de dicha EERA sobre la excitabilidad en el sistema somatosensorial.

Por lo anterior, el propósito del presente estudio es caracterizar el efecto de la estimulación eléctrica ruidosa aleatoria de alta frecuencia en la actividad eléctrica de la corteza somatosensorial, y en su respuesta a estímulos mecánicos de las vibrisas en ratones C57bl/6.



CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La estimulación eléctrica ruidosa aleatoria de alta frecuencia aplicada de forma transcutánea en la médula espinal produce un aumento significativo en la excitabilidad eléctrica de la corteza somatosensorial primaria del ratón.



CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar el efecto aumentativo de la estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal en la corteza somatosensorial primaria del ratón, cuantificando la actividad eléctrica espontánea de la corteza de los barriles y la respuesta cortical provocada por la protracción mecánica de las vibrisas.

Objetivos específicos

Registrar la actividad espontánea de la corteza somatosensorial primaria de ratones C57bl/6 y obtener espectros de potencia de dicha actividad. Ejecutar el protocolo de estimulación eléctrica ruidosa transcutánea de la médula espinal y obtener el registro de la actividad espontánea posterior al protocolo de estimulación, para la obtención de datos que se someterán al análisis.

Registrar potenciales provocados de la corteza somatosensorial producidos por una retracción mecánica de las vibrisas. Ejecutar el protocolo de estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal y obtener potenciales provocados, posterior al protocolo de estimulación, para la obtención de datos que se someterán al análisis.

Examinar el posible efecto de la estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal sobre la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales. Realizar mediciones de amplitud y aplicar las pruebas estadísticas correspondientes para revelar si existen cambios significativos debido a dicha estimulación eléctrica espinal.

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

Selección de la muestra

Ratones adultos, de la cepa C57bl/6 machos de 30 a 40 gr de peso. La muestra de los ratones fue seleccionada de manera no probabilística y en función de los criterios de selección de las unidades experimentales. Los sujetos experimentales fueron proporcionados por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Aclaraciones bioéticas

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), así como los códigos bioéticos vigentes para la experimentación con animales: las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (Guide For the Care and Use of Laboratory Animals, 1985) y el Comité Directivo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), de la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (85-23, revisada en 1985). Asimismo, todos los protocolos y procedimientos fueron aceptados por el comité de bioética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICUAL-Proyecto-00214).



Técnicas y procedimientos

Cirugía estereotáxica

Realizamos experimentos en 14 ratones de la cepa C57bl/6 (35 ± 3 gramos), a los cuáles registramos la actividad espontánea de la corteza somatosensorial y los potenciales provocados somatosensoriales (PPs) producidos por la estimulación mecánica de las vibrisas del labio superior derecho de los animales anestesiados. Los animales se obtuvieron del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, dónde se mantuvieron en cuartos con luz y temperatura controlada (luz encendida a las 6a.m. y apagada a las 6 p.m.) y libre acceso a comida y agua

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina, Xilacina y Acepromacina en una dosis de 100 mg/kg, 15mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente. Esta mezcla fue administrada por medio de una inyección intraperitoneal con una jeringa ultrafina de 6mm (Figura 14). El nivel de anestesia fue mantenido por medio de inyecciones suplementarias periódicas durante la cirugía (intervalos de entre 60-90min), así como durante la ejecución del protocolo de estimulación y registro.

La temperatura de los animales se mantuvo a 37°C , por medio de una lámpara de calor radiante durante todo el experimento, asimismo se administró cloranfenicol 5mg/g en los ojos de los sujetos experimentales para evitar resequedad.

Los sujetos experimentales, una vez anestesiados fueron sometidos a una traqueotomía, previo a realizar la incisión sagital en el cuello fue aplicada lidocaína tópica y el área fue desinfectada con yodopovidona. Se diseccionó el área traqueal con un par de pinzas finas, y posteriormente, con micro-tijeras para cirugía se realizó un corte a nivel del tercer anillo traqueal, para la colocación de la sonda traqueal que se conectó a un respirador (Ugo Basile Instruments, Mouse Ventilator), el cuál proveía al ratón de un volumen tidal de aire de x y se ajustó la frecuencia respiratoria a 30rpm. (Figura 14)

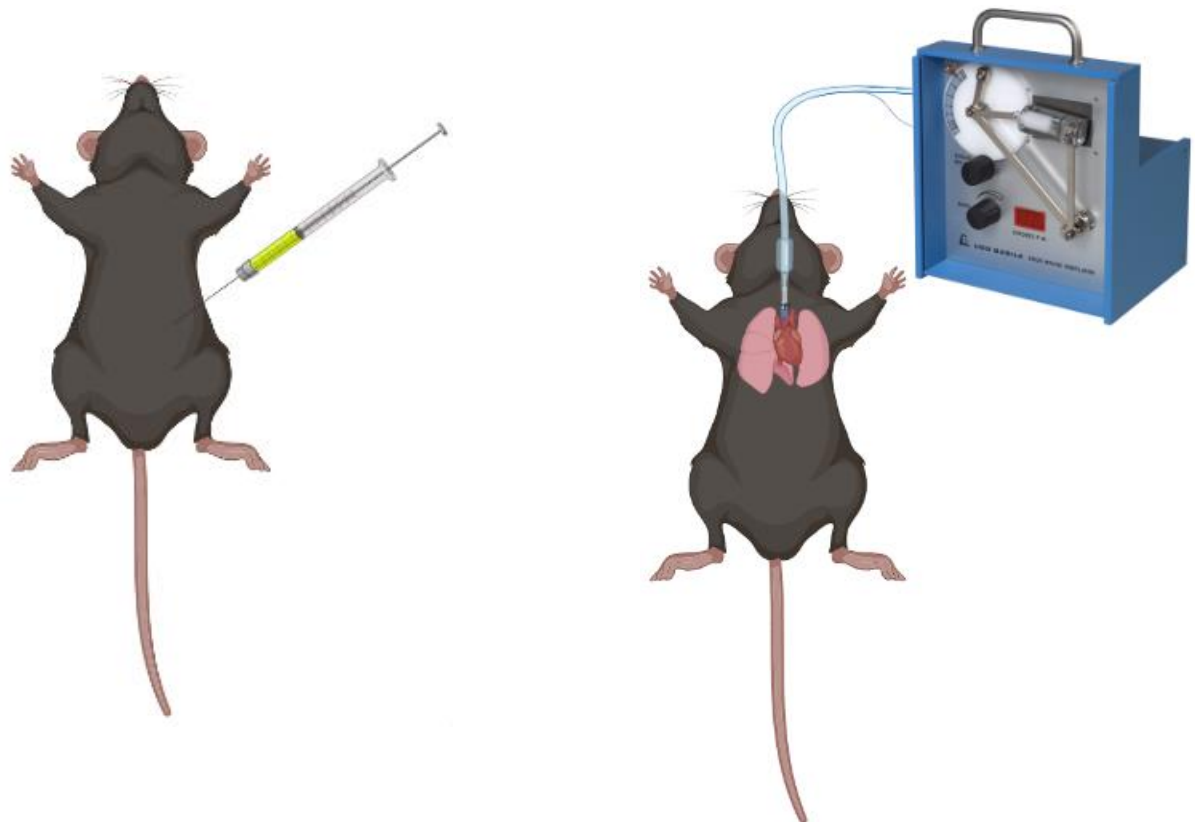


Figura 14. Anestesia y traqueotomía de los sujetos experimentales. A la izquierda observamos el sitio de inyección de la anestesia vía intraperitoneal, y a la derecha se esquematiza al sujeto experimental conectado al respirador Ugo Basile, posterior a la traqueotomía.

Una vez anestesiado y conectado al respirador, el animal fue colocado en un aparato estereotáxico, a su vez fueron colocados electrodos de registro en las extremidades anteriores y la derecha posterior, para el monitoreo constante de la actividad cardiaca. (Figura 15-A)

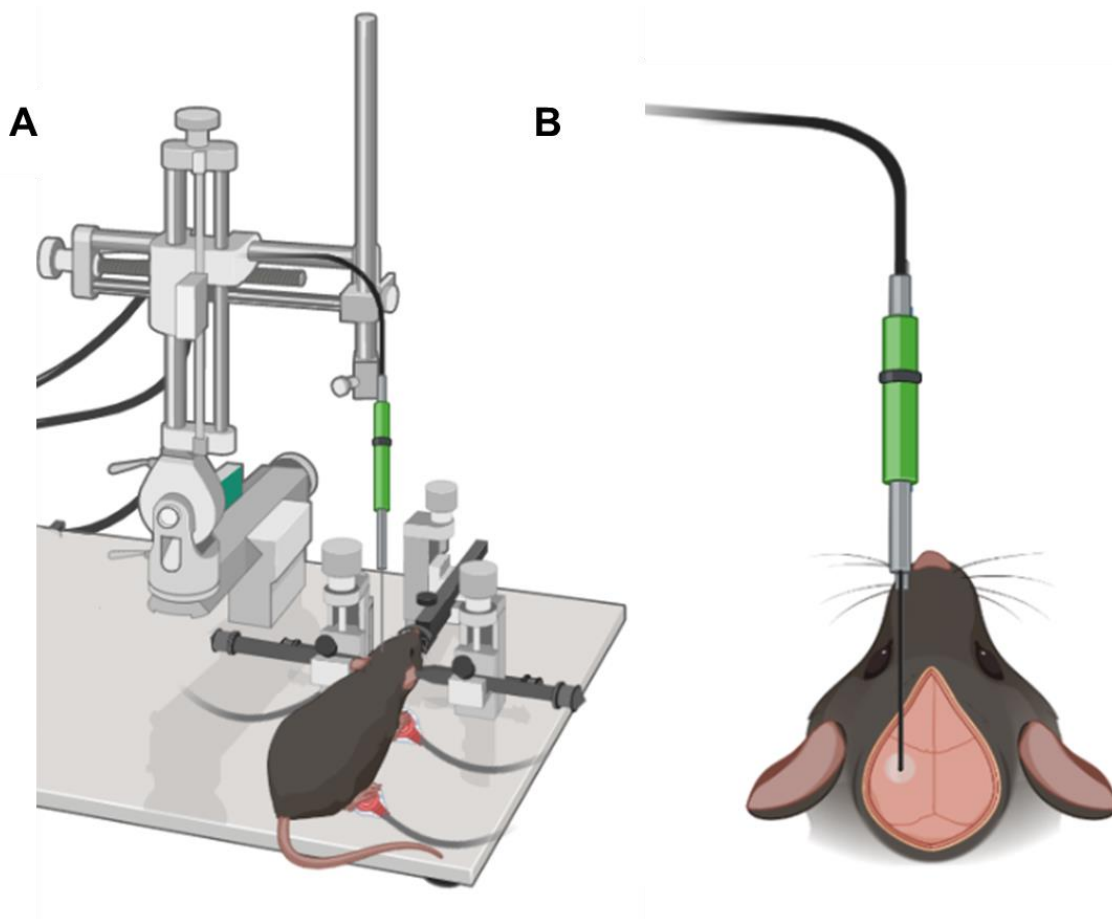


Figura 15. Montaje del sujeto experimental en el aparato estereotáxico. En A observamos el montaje del animal fijo de la cabeza con los electrodos de registro cardiacos y el electrodo de registro cortical, en B, observamos un acercamiento al corte y trépano realizados, así como la colocación del electrodo de registro cortical

Se desinfectó la zona de la cabeza del animal utilizando yodopovidona y se aplicó lidocaína tópica sobre la piel de la cabeza del animal antes de realizar la incisión sagital que tenía por objeto exponer el cráneo.

Con el cráneo expuesto, se siguieron las coordenadas de ubicación (Paxinos, 2008) y se realizó un trépano de ~3 mm de diámetro en la bóveda craneal con un micro-taladro de baja velocidad, con el fin de exponer la corteza somatosensorial de barriles (contralateral al sitio de estimulación de las vibrisas). (Figura 15-B)

El nivel de anestesia se monitoreó durante toda la cirugía, verificando la ausencia de reflejo de retirada, y observando continuamente el color de las mucosas. Al término del experimento, se realizó la eutanasia de los ratones con una sobredosis de pentobarbital sódico.

Estimulación mecánica de las vibrisas

La estimulación mecánica de todo el grupo de vibrisas del labio superior del lado derecho de cada animal permitió el registro de los potenciales provocados somatosensoriales en la corteza de barriles contralateral. La estimulación consistió en la protección de las vibrisas con un pulso de duración de 5 ms a 1 Hz de frecuencia, de 0 a 3 mN, los cuáles aplicamos mediante un estimulador-transductor mecánico tipo Chubbuck. Es importante señalar que, el estímulo de protracción se ajustó para producir un PPS, en la corteza de barriles izquierda del 30% con respecto al máximo PPS (100%) que registramos.

Método de registro

Obtuvimos todos los registros de los PPS con electrodos de plata clorurada de 200 μm de diámetro, colocados en la corteza de los barriles y sobre los músculos de la cabeza. La localización aproximada de los electrodos se muestra en la figura 16.

Obtuvimos registros de los PPS en la región de la corteza de barriles donde el promedio de los PPs, exhibió su máxima amplitud. Dichos PPs se obtuvieron con amplificadores Astromed-Grass P511 con un filtro pasa bandas de 0.05-30Hz. Posteriormente, se digitalizaron con el sistema Digitada 1440A (Molecular Devices, Axon Instruments), con una frecuencia de muestreo de 50 kHz.

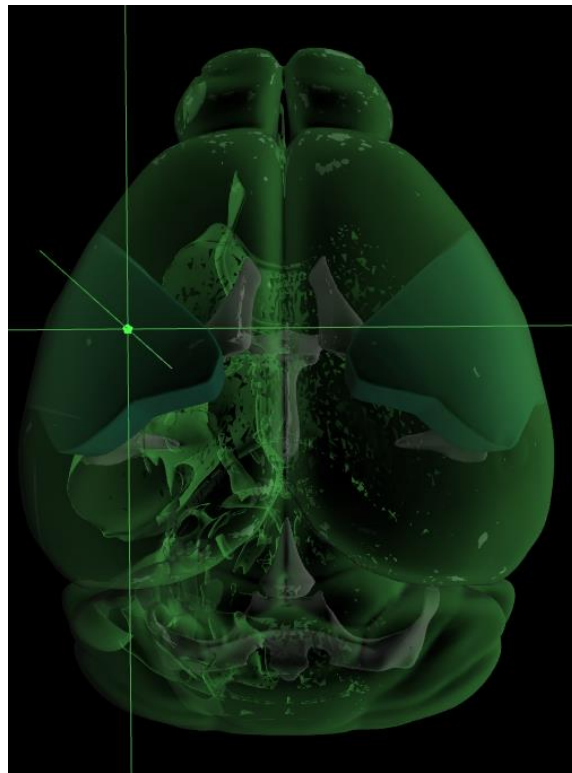


Figura 16. Representación estereotáctica de la colocación del electrodo para el registro de los potenciales provocados somatosensoriales. El punto verde indica la colocación del electrodo de registro. El área somatosensorial primaria se encuentra resaltada sin transparencia en la imagen (Allen Mouse Brain Atlas)

Estimulación eléctrica transcutánea espinal

El protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal consistió en estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia (101-640Hz), con un estimulador eléctrico (NeuroCONN DC-Stimulator plus). La corriente de estimulación fue de 1mA y los electrodos de estimulación fueron colocados sobre la piel del sujeto experimental a nivel de las vértebras T13-L1, con el cátodo colocado de manera rostral, y el ánodo en la porción caudal. La duración de la estimulación fue de 10 minutos (Figura 17)

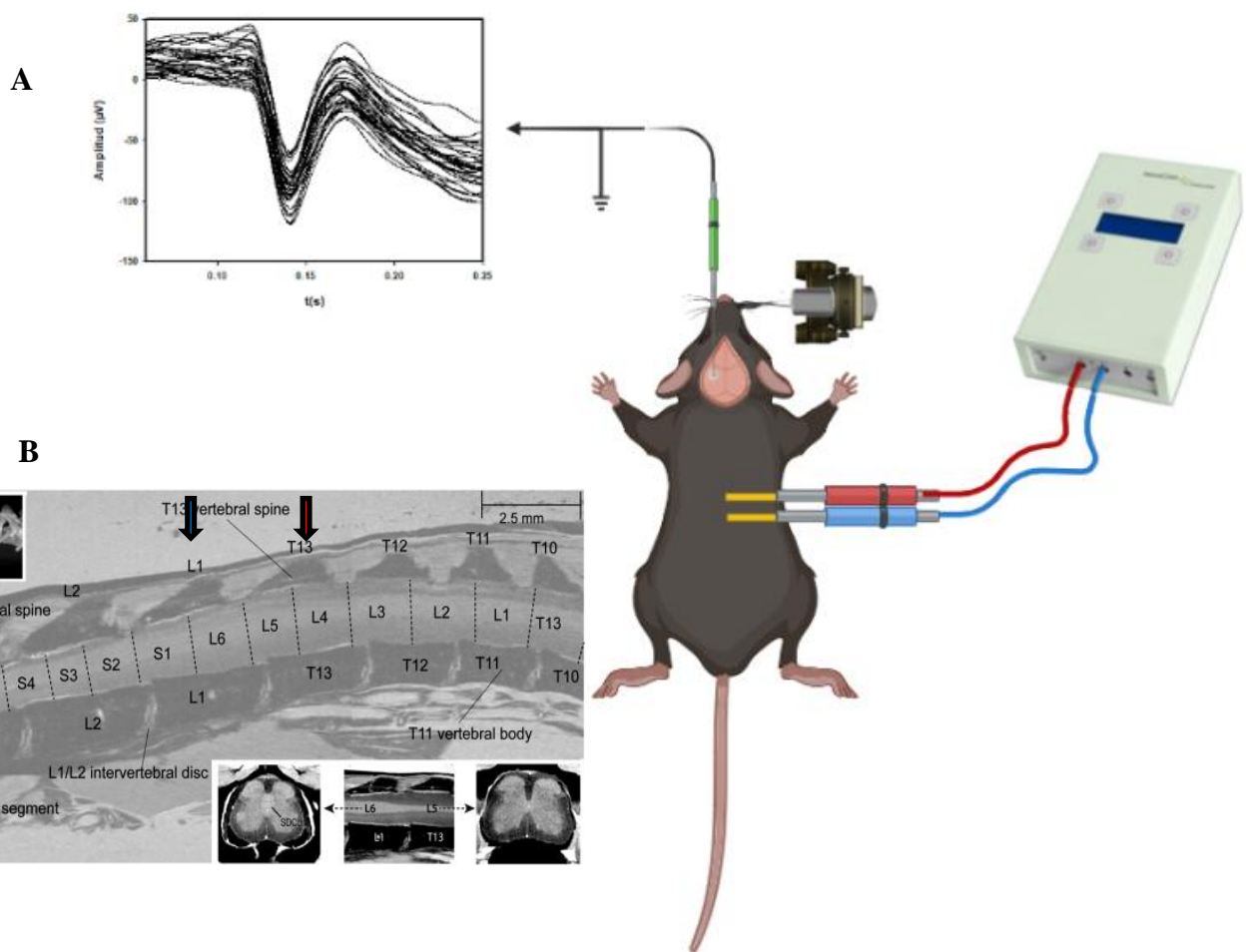


Figura 17. Montaje del protocolo experimental. Una vez montado el ratón en el aparato estereotáxico, realizamos el registro de la actividad cortical, previo y posterior a la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia. En B, se muestra la colocación de los electrodos de estimulación los cuáles se colocaron de forma transcutánea a nivel de las vértebras T13-L1.

Análisis de datos

Para el registro de la actividad espontánea de la corteza somatosensorial.

Obtuvimos la actividad espontánea de la corteza somatosensorial al registrar con un electrodo de plata clorurada, y realizamos los espectros de potencia obtenidos a partir de dicha actividad.

Posteriormente, obtuvimos 60 minutos de registro para la condición control previa al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal, y hasta 200 minutos posteriores al protocolo de estimulación

Para el registro de los potenciales provocados somatosensoriales.

Obtuvimos potenciales provocados somatosensoriales producidos por diferentes niveles de intensidad de estimulación mecánica de las vibrisas. Asimismo, obtuvimos curvas entrada-salida, con el objetivo de determinar la intensidad de estimulación que nos produjera PPSs del 30% con respecto a la máxima amplitud de dichos potenciales. La gráfica de la figura 20, muestra una curva entrada-salida para la máxima amplitud de los PPSs y señala la intensidad utilizada.

Posteriormente, obtuvimos 40 potenciales provocados somatosensoriales en la condición control, previo al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal, y hasta 200 PPSs posteriores al protocolo de estimulación a lo largo de 3 horas.

Análisis estadístico

Para el registro de la actividad somatosensorial

Para probar la existencia de alguna diferencia significativa entre el registro de la actividad espontánea producido por la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal, consideramos el área bajo la curva de los espectros de potencia, obtenidos a partir del registro de la corteza somatosensorial.

Por lo cual, definimos la condición control, como los registros obtenidos previo al protocolo de estimulación, y definimos intervalos de tiempo posteriores de 0-10 minutos, 11-30 minutos, 31-50 minutos, de 51-70 minutos, de 71-100 minutos, de 101-150 minutos, de 151-200 minutos y de más de 200 minutos según el caso. Ello nos permitió comparar las condiciones control vs cada una de las condiciones de tiempo. Para examinar dicha diferencia estadística realizamos una ANOVA1, bajo la hipótesis nula de que las medias no eran diferentes entre sí. Debido a que realizamos las comparaciones contra un grupo control, usamos la Prueba de Dunnet para analizar las diferencias. En todos los sujetos experimentales, los resultados se consideraron significativos si $P < 0.01$.

Para el registro de los potenciales provocados somatosensoriales.

Para demostrar alguna diferencia estadística en los PPSs, consideramos los 40 PPSs previos al protocolo de estimulación como la condición control y los 200 PPs distribuidos en los intervalos de tiempo de 0-10 minutos, 11-30 minutos, 31-50 minutos, de 51-70 minutos, de 71-100 minutos, de 101-150 minutos, de 151-200 minutos como la condición a comparar. Para examinar dicha diferencia estadística realizamos una ANOVA1, bajo la hipótesis nula de que las medias no eran diferentes entre sí. Debido a que realizamos las comparaciones contra un grupo control usamos la prueba de Dunnet para analizar las diferencias. En todos los sujetos experimentales se consideraron que los cambios fueron significativos si $P < 0.01$.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal en la actividad espontánea de la corteza somatosensorial primaria

Realizamos experimentos en 9 ratones C57bl/6, que cumplieron los criterios de inclusión para nuestro protocolo experimental. De los cuáles se registró la actividad espontánea de la corteza somatosensorial previo y posterior al protocolo de estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal. Se analizaron los espectros de potencia de la actividad espontánea previo y posterior al protocolo de estimulación. (Figura 18).

El valor de área obtenido se normalizó. Asimismo, se compararon los espectros de potencia previo y posterior al estímulo. Dichas comparaciones pueden observarse en la figura 19.

En cada uno de los experimentos realizados notamos un aumento evidente en la actividad espontánea cortical somatosensorial de los sujetos experimentales, sugiriendo así un aumento en la excitabilidad neuronal basal como consecuencia del protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal

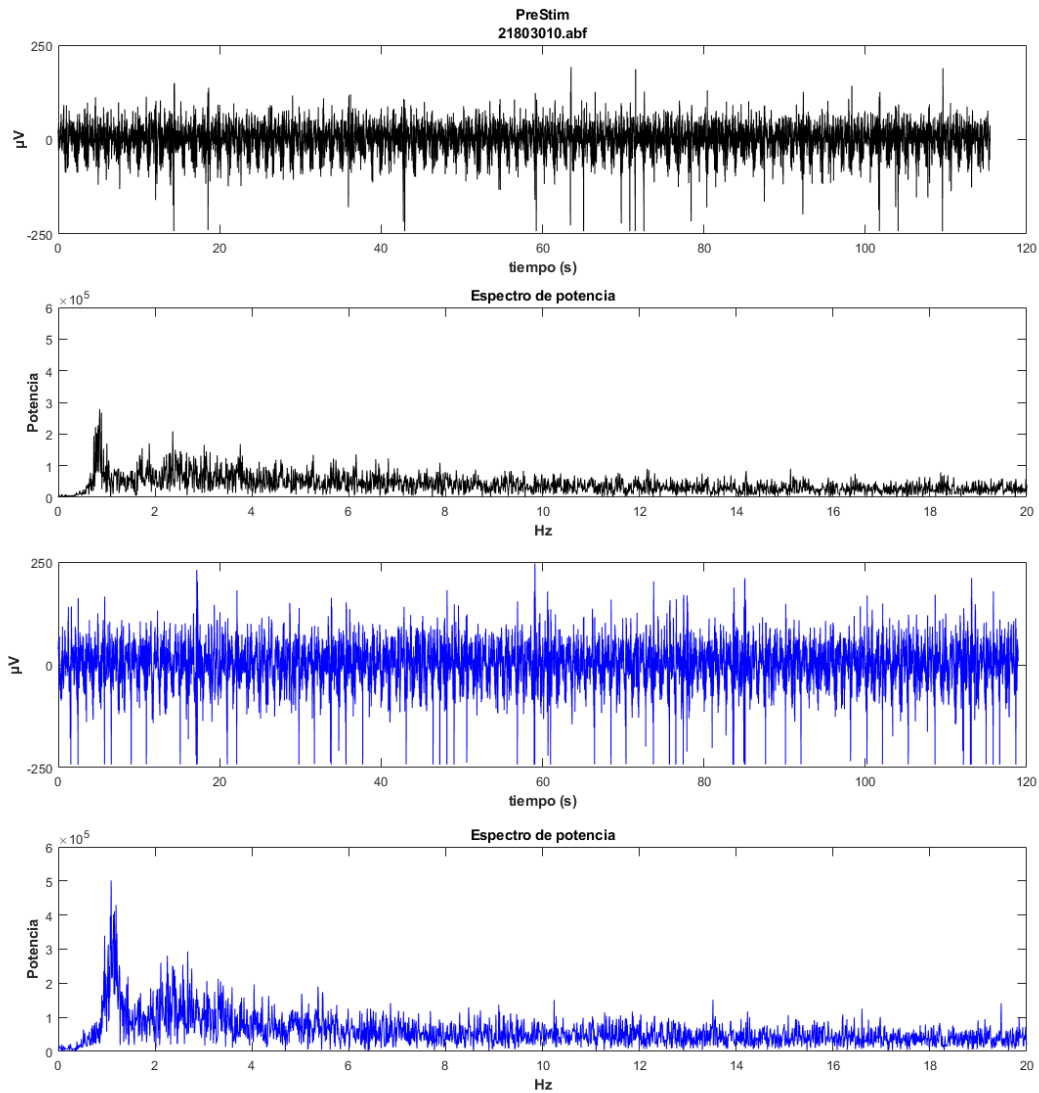
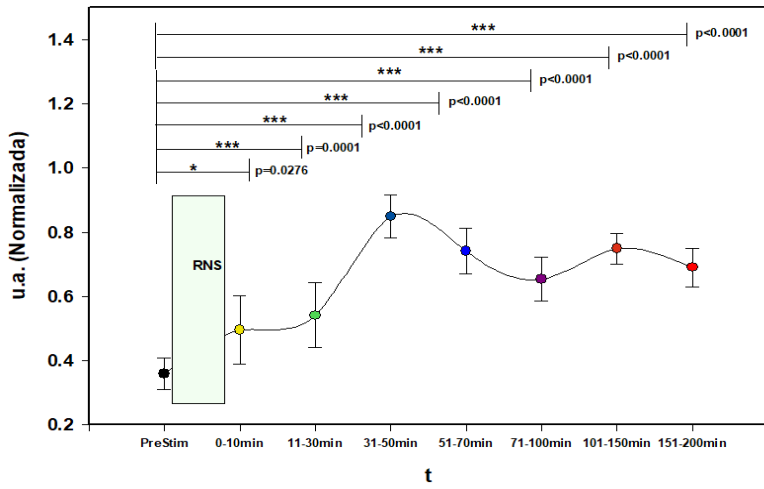
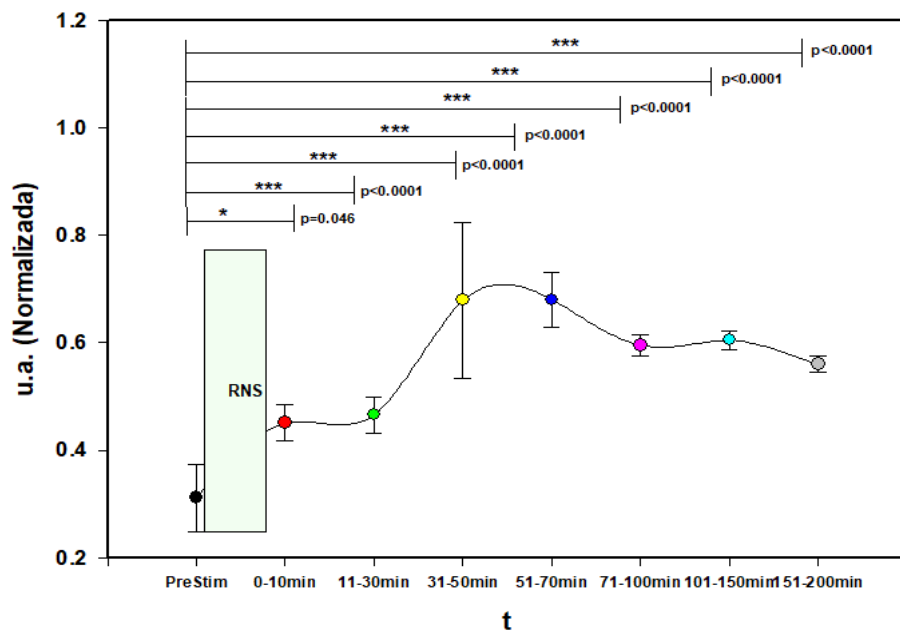
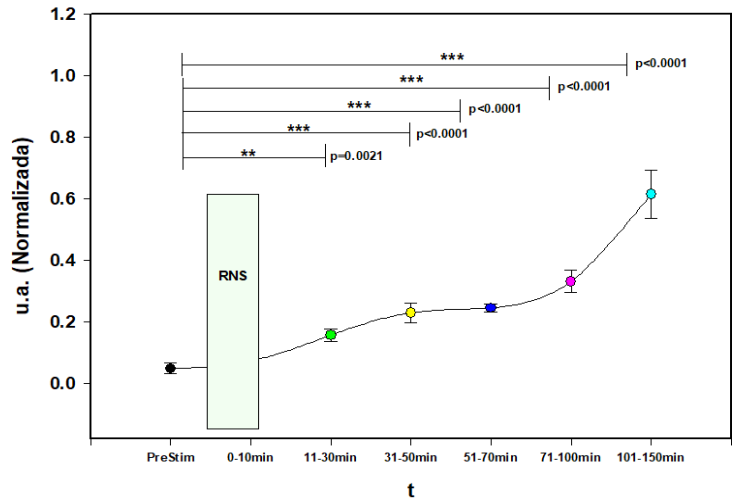
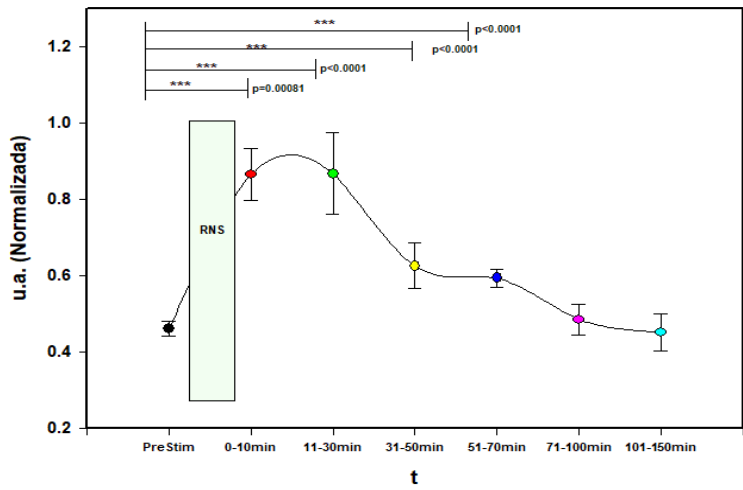
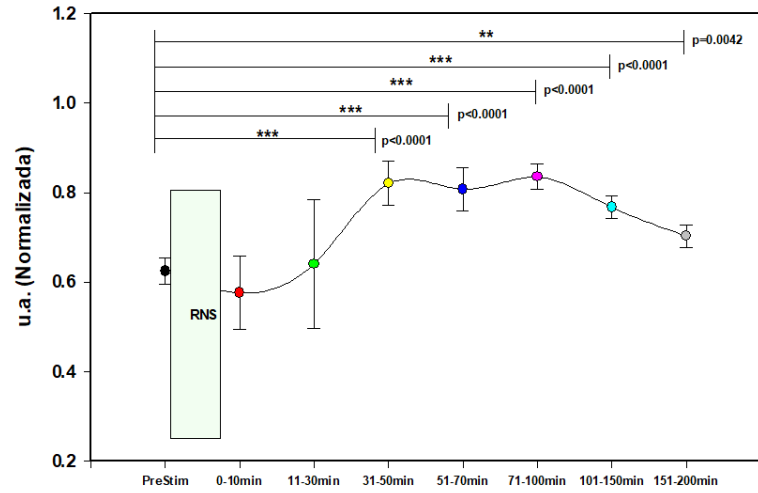


Figura 18. Registro y procesamiento de la actividad espontánea de la corteza somatosensorial. Se muestran dos registros representativos de un sujeto experimental. El registro y espectro de potencia superior corresponde a la actividad espontánea previa a la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal. Los trazos inferiores (azul), muestran la actividad y el espectro de potencia 45 min posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal. Nótese un claro aumento en la actividad espontánea.



Actividad espontánea corteza somato-sensorial



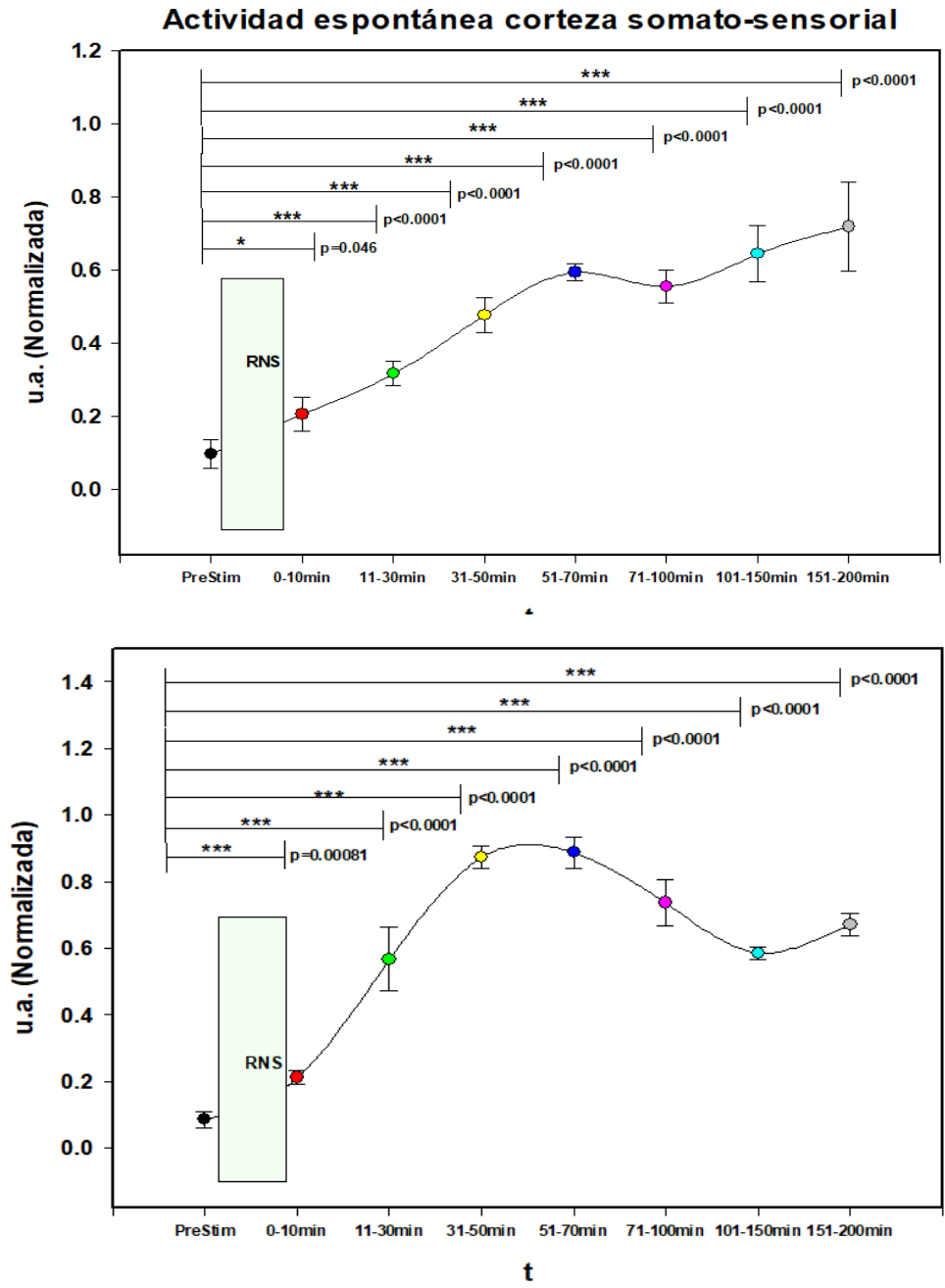


Figura 19. Actividad espontánea previa y posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal. Se muestra el conjunto de curvas representando el área bajo la curva de los espectros de potencia obtenidos del registro electrofisiológico previo y posterior a la estimulación. Nótese un gran aumento en la actividad espontánea de la corteza somatosensorial primaria. Dicho aumento se mantiene para todos los experimentos (7/7) hasta por 3 horas y media.



Una inspección de la figura 19, permite destacar que, aunque hay diferentes perfiles de respuesta en la actividad espontánea cortical somatosensorial posterior a la EERAF transcutánea de la médula espinal, en todos los casos se encontró que la EERAF produjo un incremento sistemático en la actividad espontánea. Ello es consistente con las figuras previamente mostradas.

Para la comparación de los datos de la actividad espontánea cortical somatosensorial se realizó un análisis estadístico ANOVA 1



Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal sobre los potenciales provocados de la corteza somatosensorial

Para cada experimento, previo al protocolo de registro de potenciales provocados somatosensoriales y al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal se eligió el nivel de estimulación que provocara un potencial cuya amplitud representara el 30% de la amplitud máxima lograda al retraer las vibrisas mecánicamente. Para esto, se construyeron las curvas entrada-salida a partir de dichas amplitudes (Figura 20).

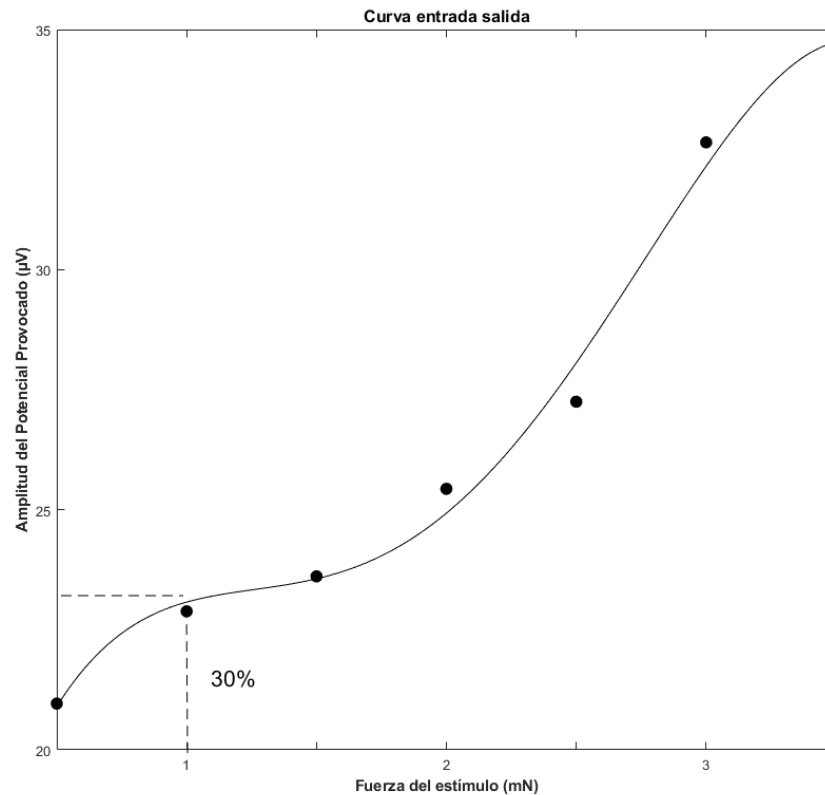


Figura 20. Curva entrada-salida de Potenciales Provocados Somatosensoriales. Gráfico de la amplitud del potencial provocado en función de la fuerza del estímulo mecánico aplicado en las vibrisas del ratón. Antes de iniciar el registro de los potenciales

provocados y el protocolo de estimulación, se seleccionó el nivel que fuera capaz de provocar el 30% de la respuesta.

La figura 21, muestra trazos típicos de los promedios de los potenciales provocados registrados en la corteza somatosensorial primaria, previo a la estimulación transcutánea de la médula espinal para un sujeto experimental. La figura 22, muestra una comparación de los potenciales provocados previo y posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal.

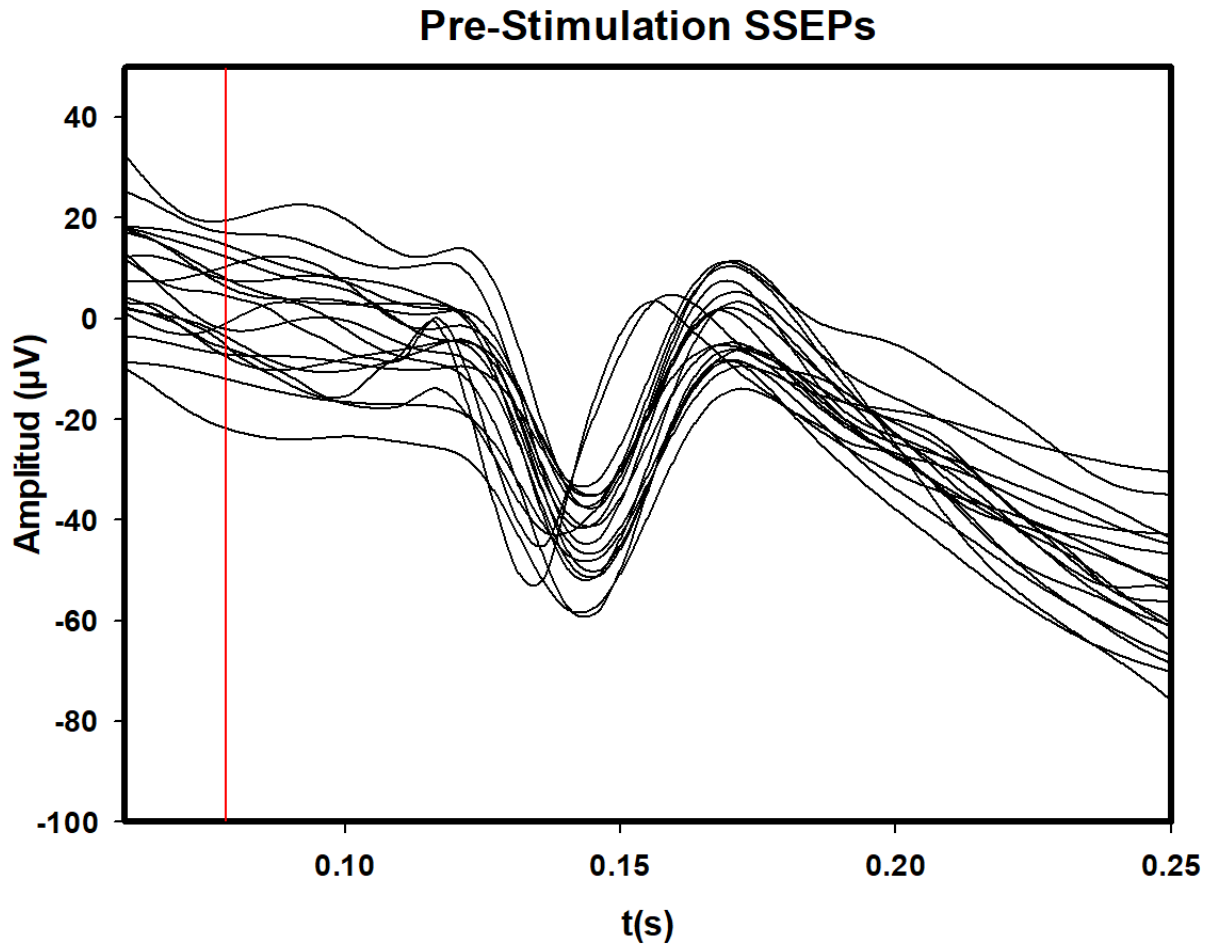


Figura 21. Potenciales provocados somatosensoriales. Trazos típicos de los potenciales provocados registrados en la corteza de los barriles del ratón C57bl/6. Cada trazo representa el promedio de los potenciales provocados después de 60 ejecuciones del protocolo de estimulación mecánica de las vibrisas

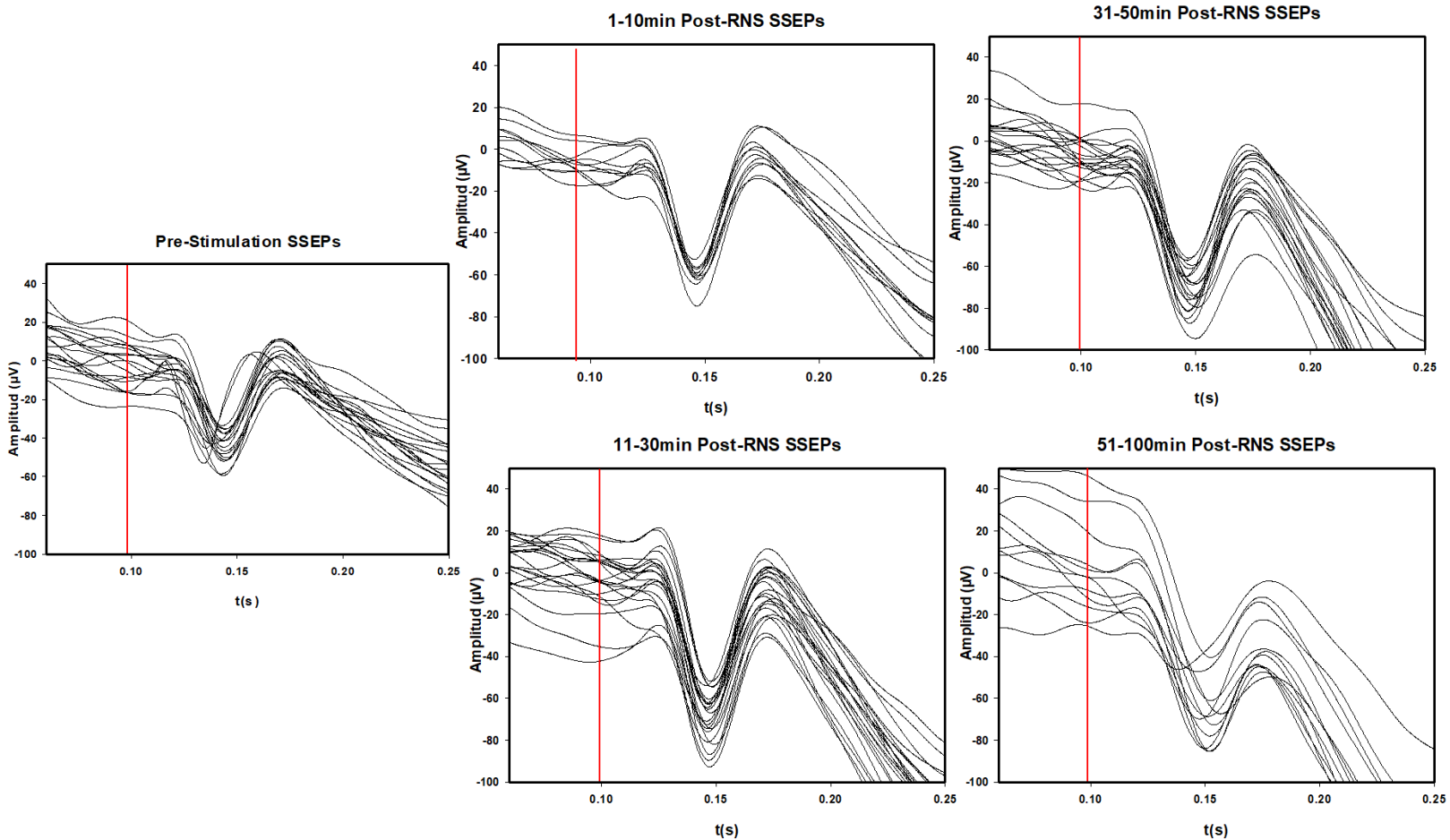
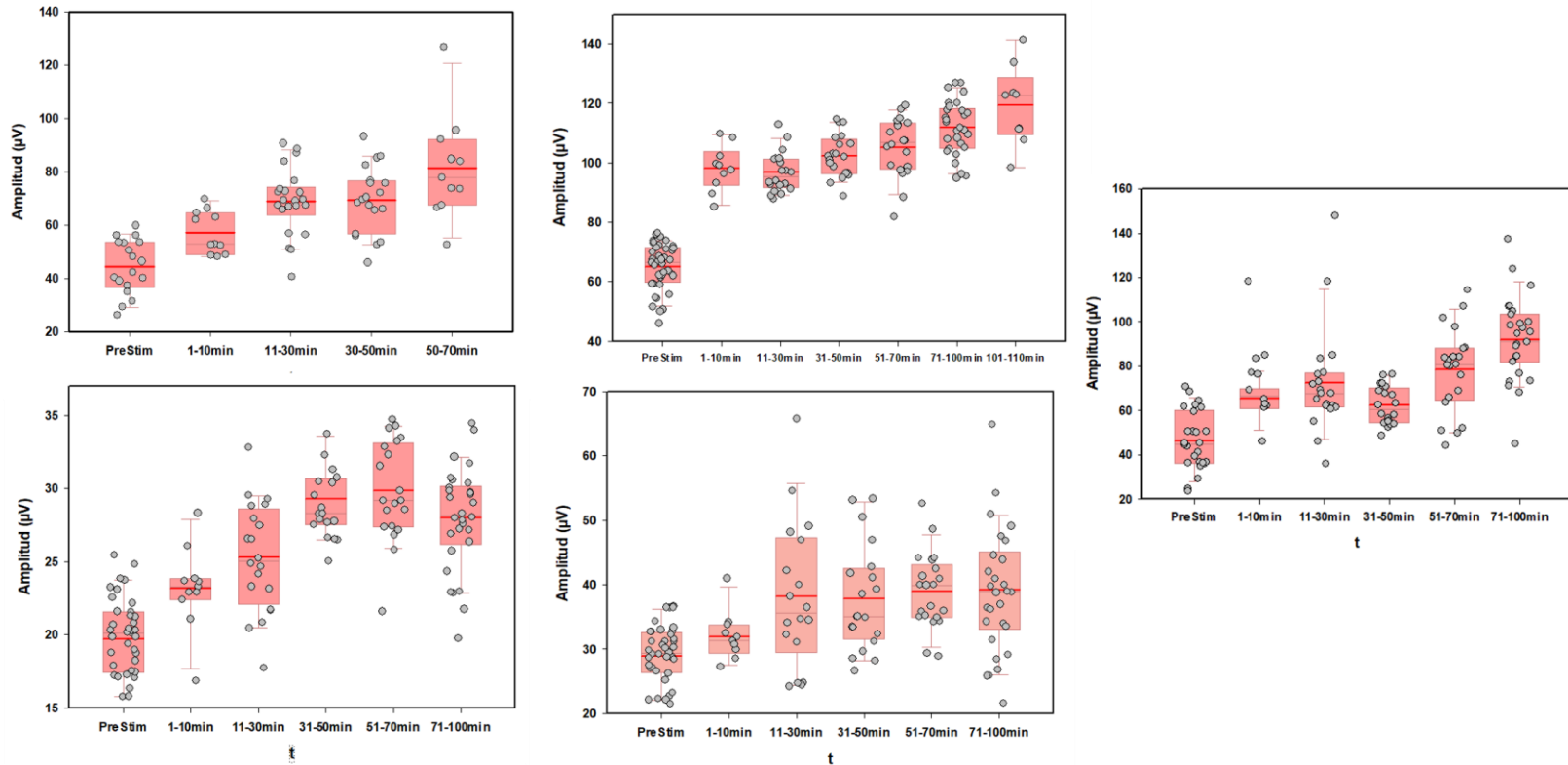


Figura 22. Comparación de los potenciales provocados somatosensoriales previo y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal. De izquierda a derecha se observan las condiciones previa y posterior al protocolo de estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia aplicada de forma transcutánea en la médula espinal del ratón C57bl/6. Nótese que la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales es más amplia posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal. Esto fue observado en los 6 animales registrados con esta técnica.

Calculamos la amplitud pico a pico de los potenciales provocados somatosensoriales para cada una de las variables, previa y posterior a la estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal. Dichos valores individuales de los promedios están representados en la figura 23. Nótese un aumento evidente posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal, y que dicho efecto se mantiene a lo largo del tiempo.

Figura 23. Representación de la amplitud promedio de los potenciales provocados somatosensoriales previo y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal. Cinco gráficos que corresponden a los cinco ratones C57bl/6, la primera caja de izquierda a derecha, de cada uno de los gráficos representa los promedios de los



potenciales provocados previo a la estimulación, cada punto color gris, representa un promedio de 60 potenciales provocados generados por la protección de las vibrisas, la línea color rojo en cada una de las cajas representa la media aritmética de los potenciales provocados. Nótese un aumento en la amplitud en cada una de las condiciones experimentales y que dicho incremento se mantiene a lo largo del tiempo.

Con el objetivo de examinar la significancia estadística de los efectos de la estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal sobre los potenciales provocados somatosensoriales, en los 5 sujetos experimentales, realizamos la prueba estadística ANOVA 1 de un solo factor. Comparamos la amplitud media de los potenciales provocados somatosensoriales, para las distintas condiciones. Los resultados se pueden observar en las tablas x. Para todos los casos a evaluar, se utilizó un $\alpha = 0.01$, así nuestra prueba estadística fue más robusta.

Medias

Media					Media				
Factor	N	(μV)	Desv.Est.	IC de 99%	Factor	N	(μV)	Desv.Est.	IC de 95%
Pre-Estim	20	44.45	10.13	(36.53, 52.38)	Pre-Estim	40	65.00	7.82	(62.32, 67.69)
1-10min	11	57.25	8.01	(47.12, 67.39)	1-10min	10	98.06	7.69	(92.69, 103.43)
11-30min	22	68.99	12.51	(61.83, 76.16)	11-30min	20	96.73	6.75	(92.93, 100.53)
31-50min	19	69.45	12.59	(61.74, 77.17)	31-50min	20	102.36	7.16	(98.56, 106.15)
51-120min	11	81.40	19.43	(71.26, 91.53)	51-70min	20	105.21	9.95	(101.42, 109.01)
					71-100min	29	111.78	9.15	(108.63, 114.94)
					101-120min	10	119.22	13.38	(113.55, 124.88)

Desv.Est. agrupada = 12.7228

Desv.Est. agrupada = 8.59252

Media					Media				
Factor	N	(μV)	Desv.Est.	IC de 95%	Factor	N	(μV)	Desv.Est.	IC de 95%
Pre-Stim	41	20.188	3.444	(19.138, 21.239)	Pre-Estim	40	28.928	4.737	(26.505, 31.351)
1-10min	11	23.180	2.847	(21.152, 25.207)	1-10min	11	31.86	3.69	(27.24, 36.48)
11-30min	20	25.285	3.744	(23.781, 26.789)	11-30min	18	38.12	11.43	(34.51, 41.73)
31-50min	20	29.287	3.023	(27.783, 30.791)	31-50min	21	37.01	8.77	(33.67, 40.36)
51-70min	20	29.843	3.418	(28.339, 31.346)	51-70min	21	38.97	5.87	(35.63, 42.32)
71-120min	30	27.968	3.501	(26.740, 29.195)	71-120min	30	39.18	9.55	(36.38, 41.98)

Desv.Est. agrupada = 3.40098

Desv.Est. agrupada = 7.74838

Media				
Factor	N	(μV)	Desv.Est.	IC de 95%
Pre-Estim	26	46.35	13.19	(39.78, 52.91)
1-10min	10	65.28	7.66	(54.69, 75.86)
11-30min	20	72.45	24.13	(64.96, 79.93)
31-50min	20	62.20	8.65	(54.71, 69.68)
51-70min	21	78.28	19.08	(70.97, 85.59)
71-120min	27	92.03	18.70	(85.58, 98.47)

Desv.Est. agrupada = 16.9063

Tabla 1. Agrupación de medias de los potenciales provocados somatosensoriales. Se muestran las medias de los potenciales provocados somatosensoriales para cada una de las condiciones previa y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal



Con los datos obtenidos de la ANOVA 1, realizamos una prueba *post-hoc*, para comparación vs una condición control (Prueba de Dunnet). Nuestra medición control fueron las amplitudes promedio de los potenciales provocados somatosensoriales registrados. Dicha prueba mostró diferencias significativas entre la condición previa a la estimulación y posterior a la estimulación transcutánea de la médula espinal. Esta significancia estadística se mantenía a lo largo del tiempo y hasta por dos horas posterior al protocolo de estimulación. Estos resultados se resumen en la tabla x.

La representación gráfica de la amplitud promedio de los potenciales provocados de la corteza somatosensorial, con su respectivo índice de confianza del 95% están representados en la figura 24. En dicha figura, se muestra también el nivel de significancia estadística de la prueba, comparando la media de los potenciales provocados previo y posterior al protocolo de estimulación transcutánea de la médula espinal.

Estos resultados demuestran que, al emplear la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal, produce un aumento significativo en la amplitud de los potenciales provocados de la corteza somatosensorial primaria. Dicho efecto aumentativo se mantiene, incluso hasta dos horas o más después de aplicar el protocolo de estimulación.



Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	1-10min - Pre-Estim	12.80	4.87	(0.61, 25.00)	2.63
11-30min - Pre-Estim	24.54	4.04	(14.41, 34.67)	6.07	0.000
31-50min - Pre-Estim	25.00	4.18	(14.52, 35.48)	5.97	0.000
51-100min - Pre-Estim	36.94	4.87	(24.75, 49.14)	7.59	0.000

Nivel de confianza individual = 98.56%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	1-10min - Pre-Estim	33.06	3.04	(25.03, 41.09)	10.88
11-30min - Pre-Estim	31.73	2.35	(25.50, 37.95)	13.48	0.000
31-50min - Pre-Estim	37.35	2.35	(31.13, 43.57)	15.87	0.000
51-70min - Pre-Estim	40.21	2.35	(33.99, 46.43)	17.09	0.000
71-100min - Pre-Estim	46.78	2.10	(41.24, 52.32)	22.32	0.000
101-120min - Pre-Estim	54.21	3.17	(45.83, 62.60)	17.10	0.000

Nivel de confianza individual = 99.09%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	1-10min - Pre-Stim	2.99	1.15	(0.01, 5.97)	2.59
11-30min - Pre-Stim	5.097	0.928	(2.703, 7.490)	5.49	0.000
31-50min - Pre-Stim	9.099	0.928	(6.705, 11.492)	9.81	0.000
51-70min - Pre-Stim	9.654	0.928	(7.261, 12.048)	10.41	0.000
71-120min - Pre-Stim	7.779	0.817	(5.671, 9.888)	9.52	0.000

Nivel de confianza individual = 98.91%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	1-10min - Pre-Estim	2.93	2.64	(-3.88, 9.73)	1.11
11-30min - Pre-Estim	9.19	2.20	(3.52, 14.87)	4.18	0.000
31-50min - Pre-Estim	8.09	2.09	(2.70, 13.47)	3.87	0.001
51-70min - Pre-Estim	10.04	2.09	(4.66, 15.43)	4.81	0.000
71-120min - Pre-Estim	10.25	1.87	(5.42, 15.08)	5.48	0.000

Nivel de confianza individual = 98.90%

Tabla 2. Pruebas *Post-Hoc* (Dunnett), comparación de medias vs media control. Se enlistan cinco tablas correspondientes a los cinco experimentos realizados. La comparación de medias se realizó respecto a la condición previa a la estimulación. Nótese que para la mayoría de los casos se muestran diferencias significativas con un $p < 0.0001$.



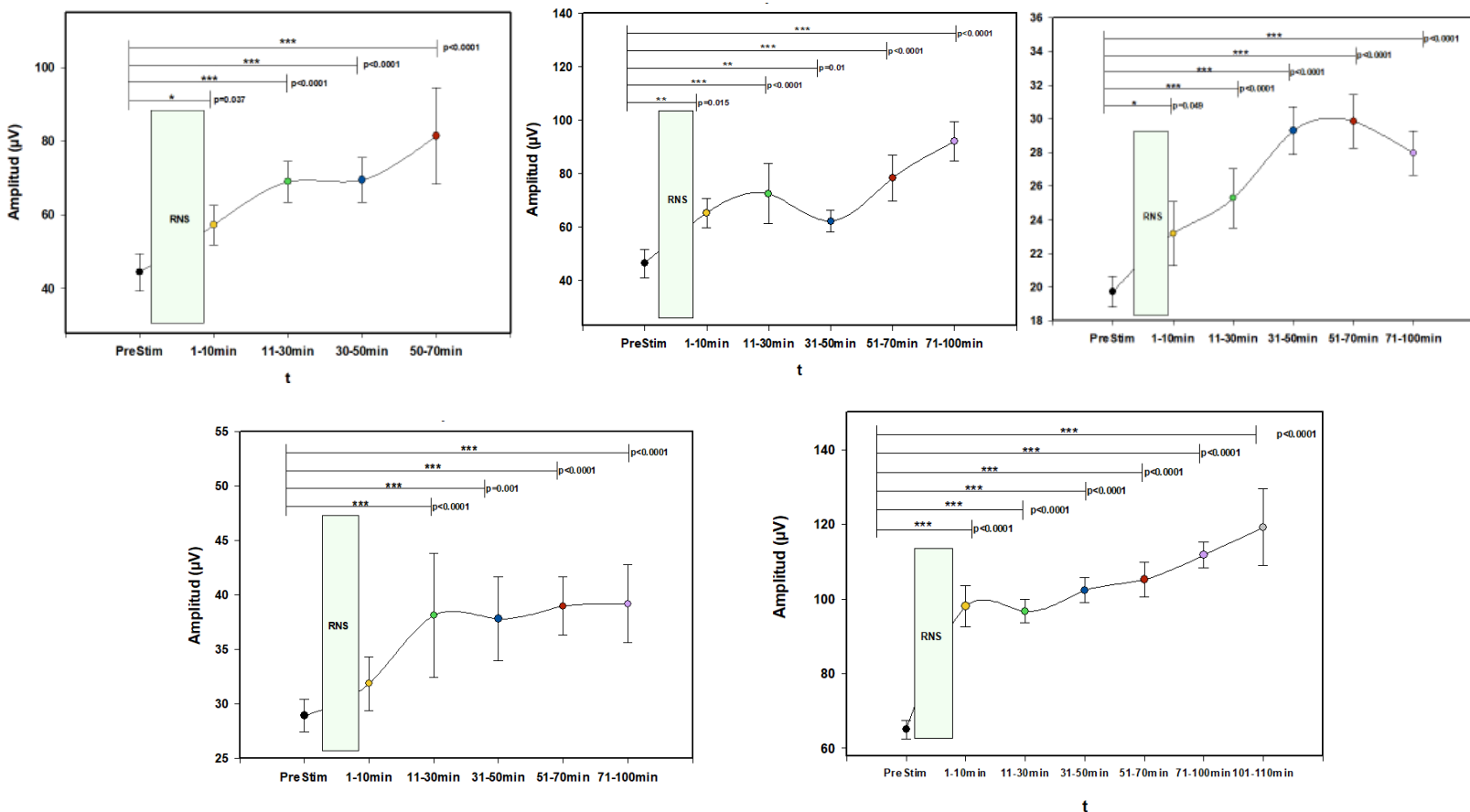


Figura 24. Efecto de la EERAF transcutánea de la médula espinal, en la amplitud de los potenciales provocados somatosensoriales Se muestran las amplitudes de los potenciales provocados en los cinco ratones C57bl/6. Las barras en cada punto representan el intervalo del 95%. Nótese también la significancia en cada uno de los puntos a comparar, existe una significancia estadística con una $p < 0.0001$ *** en la amplitud de los potenciales provocados para la mayoría de los casos. Se comparó la condición previa y posterior al protocolo de estimulación eléctrica transcutánea de la médula espinal.

En la figura 25 se muestran los potenciales provocados de los cinco ratones registrados. Nótese que hubo un aumento significativo en todos los casos en que se realizó el protocolo de estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal. Asimismo, se muestran en la tabla x, los datos resultantes tras aplicar la prueba estadística ANOVA1, para toda la población utilizada, así como la amplitud normalizada.



Cuando se realizó una prueba *post-hoc* de comparación contra un control, encontramos una alta significancia estadística de las variables previa y posterior a la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal.

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 99%
Pre-Estim	137	0.22070	0.10224	(0.18734, 0.25406)
1-10min	53	0.3534	0.1402	(0.2997, 0.4070)
11-30min	102	0.4457	0.1574	(0.4071, 0.4844)
31-50min	99	0.5273	0.1637	(0.4880, 0.5665)
51-70min	91	0.5858	0.1544	(0.5449, 0.6267)
71-120min	141	0.5964	0.1767	(0.5636, 0.6293)

Desv.Est. agrupada = 0.151106

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1-10min - Pre-Estim	0.1327	0.0244	(0.0708, 0.1946)	5.43	0.000
11-30min - Pre-Estim	0.2250	0.0198	(0.1750, 0.2751)	11.39	0.000
31-50min - Pre-Estim	0.3066	0.0199	(0.2561, 0.3571)	15.38	0.000
51-70min - Pre-Estim	0.3651	0.0204	(0.3133, 0.4168)	17.87	0.000
71-120min - Pre-Estim	0.3757	0.0181	(0.3298, 0.4217)	20.73	0.000

Nivel de confianza individual = 98.84%

Tabla 3. Agrupación de medias y prueba *post-hoc* de Dunnet para comparación de medias. La tabla superior muestra la agrupación de las medias de los potenciales provocados somatosensoriales. La N representa el número de potenciales provocados y promediados para cada variable, con un índice de confianza del 99%. La tabla inferior muestra la comparación de la media de los potenciales provocados somatosensoriales en las condiciones previa y posterior a la estimulación. Nótese la diferencia estadísticamente significativa, para todos los casos con una $p < 0.0001$.

Amplitud Potenciales Provocados Somatosensoriales

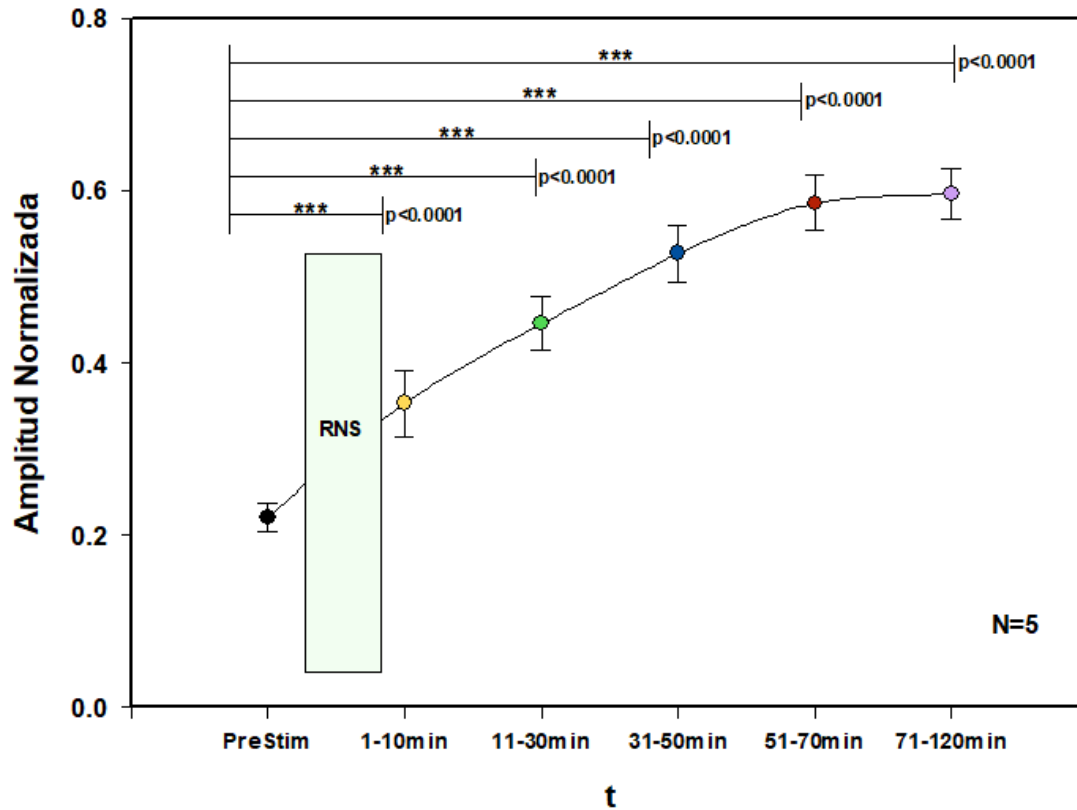


Figura 25. Efecto de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal. Se muestran las amplitudes de los PPSS de los cinco ratones C57bl/6, previos y posteriores al protocolo de estimulación. Nótese un aumento estadísticamente significativo para cada condición experimental.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

La neuromodulación de estructuras del sistema nervioso central se ha investigado durante siglos, con el objetivo primario de modificar la función neurológica. El principal método utilizado para descifrar las vías y los efectos de la neuromodulación es la estimulación eléctrica. (Gildenberg; 2009)

La estimulación eléctrica del SNC, ha sido históricamente una de las técnicas de mayor uso para la comprensión de procesos neurofisiológicos, y a su vez, ha representado una herramienta terapéutica del tratamiento de patologías de gran importancia, como son la depresión, los trastornos psiquiátricos, la esclerosis múltiple, el Parkinson, entre otras patologías. (Costain; 1964)

Por ejemplo, una de las principales problemáticas de la estimulación eléctrica profunda en el caso del tratamiento del Parkinson, es que es una técnica altamente invasiva, que requiere una cirugía para el sujeto experimental y/o paciente, que puede poner en riesgo la integridad del sujeto. En contraste, la estimulación eléctrica no invasiva ha representado así una gran alternativa tanto para la comprensión de procesos fisiológicos y el tratamiento de patologías del SNC. (Ni y cols. 2022)

En el presente trabajo, hemos demostrado por primera vez el efecto de la estimulación transcutánea eléctrica ruidosa de alta frecuencia de la médula espinal y su efecto en la corteza somatosensorial primaria del ratón. Dicha técnica de estimulación eléctrica transcutánea es no invasiva y nos ha permitido observar un aumento altamente significativo en la actividad neuronal cortical.

Dicho aumento en la excitabilidad cortical somatosensorial se mostró tanto en la actividad espontánea como en respuesta a la estimulación mecánica de las vibrisas.

Demostramos así que el efecto de la Estimulación Transcutánea Ruidosa de Alta Frecuencia (ETRAF) de la médula espinal provoca un aumento generalizado en la corteza somatosensorial, lo cual brinda a la neurofisiología una nueva aproximación del estudio de la actividad somatosensorial.

Dada la íntima relación que existe en la comunicación de la médula espinal con la corteza cerebral, la mayoría de los trabajos previos se han centrado en el uso de la estimulación eléctrica espinal en patologías como el dolor crónico y lesiones parciales o totales de la médula espinal. (Angeli y cols; 2014), (Dimitrijevic y cols; 1986), (Gildenberg; 2006). La idea detrás de dichos estudios fue el tratamiento del dolor y de las afecciones motrices, así como en describir las vías ascendentes motoras afectadas. (Gildenberg; 2006).

Asimismo, la relación que existe entre la estimulación de la médula espinal y la actividad cortical actualmente está en su mayoría centrada en mecanismos y vías nociceptivas, de igual manera hacía la terapéutica del dolor. (Huang; 2019)

Hoy en día el presente trabajo cumple un objetivo primordial en la neurofisiología moderna, el cuál es comprender el funcionamiento complejo de una modalidad del sistema nervioso, particularmente la interacción médula espinal y corteza somatosensorial. Así, buscamos dilucidar los principios fundamentales que subyacen estos procesos neuronales al estudiar los mecanismos de señalización eléctrica y la dinámica de las redes neuronales, buscando descifrar los mecanismos que generan la función de la corteza somatosensorial. Los avances en neurofisiología contribuyen a la comprensión del funcionamiento nervioso y a su vez proporcionan una herramienta para el desarrollo de nuevas terapias y tratamientos que sientan las bases en distintos campos de estudio.

El papel neuromodulador de la médula espinal tras la ETRAF en una modalidad sensorial, abriendo así la puerta a nuevos abordajes terapéuticos en patologías que no se centran en la corteza motora primaria, sino en la corteza somatosensorial. Es por ello por lo que en el presente trabajo mostramos evidencia robusta que la función somatosensorial puede ser aumentada significativamente con dicha estimulación.

Es posible inferir que el efecto que observamos en los resultados del presente trabajo, son producidos también por un aumento en la excitabilidad de las vías espinales ascendentes. En particular, resaltamos aquí el rol fundamental del tracto espino-cortical, que lleva la información a través de la médula espinal hasta proyectar a la corteza somatosensorial.

Así, las proyecciones espinales que se encuentran ampliamente distribuidas en la lámina I de la asta dorsal y en menor medida en la lámina III-VIII, X, envían sus proyecciones axonales a través del funículo anterolateral y terminan en diversas áreas cerebrales, incluyendo el prosencéfalo, protuberancia, mesencéfalo y bulbo raquídeo. (Todd; 2010) (Hylden y cols.; 1989)

El tálamo es una de las estructuras principales de las proyecciones neuronales espinales, que son originadas en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal. Específicamente, en el núcleo posterolateral ventral o en el núcleo posteromedial ventral. Ésta vía se encuentra íntimamente relacionada en funciones de codificación espacial y temporal, pero sobre todo con los principales aspectos de intensidad en los procesos somatosensoriales. Esto es de importancia, ya que estas regiones talámicas actúan como relevo para retransmitir toda la información a la corteza somatosensorial primaria. (Liu y cols.; 2009) (Lund y cols.; 1967)

En el caso de los roedores, las proyecciones de la médula espinal también tienen sus terminaciones en el puente, mesencéfalo y bulbo raquídeo. (Feil y Herbert; 1995) (Gauriau y cols. 2004) Las terminales de las neuronas de proyección superficial se encuentran bilateralmente en varios núcleos en el puente y el mesencéfalo. En el puente las terminales densas de las neuronas de proyección espinal terminan en el núcleo parabraquial (NPB) y en la parte caudal del núcleo pontino reticular. (Bernard y cols.; 1995) Así, las proyecciones a la corteza somatosensorial desde la médula espinal hasta el NPB, se encuentran organizados topográficamente. Es importante destacar que las neuronas que proyectan de la capa superficial del asta dorsal de los segmentos torácicos y lumbares de la M.E. también proyectan a la parte dorsal y central del NPB, específicamente, a su parte externa lateral. (Feil y Herbert; 1995)

Las neuronas espinales localizadas en el núcleo espinal lateral en su lámina profunda tienen distintos patrones de proyección a diferencia de las neuronas en la lámina superficial; sin embargo, en su mayoría envían proyecciones al tálamo. (Gauriau y Bernard; 2004) En menor medida, existen proyecciones espinales que envían información al globo pálido, la amígdala y el hipotálamo. (Liu y cols.; 2009) Dado que estas regiones cerebrales son importantes para el procesamiento de las emociones y conductas motoras, estas proyecciones sugieren que ésta vía se encuentra relacionada con los componentes motores y emocionales, como lo serían el dolor y la picazón. (Lund y Webster; 1967)

Si bien la vía espinotalámica es por excelencia la vía discriminativa de los componentes de la somato sensación. Se concluyó que las neuronas implicadas en esta vía responden también a estímulos nociceptivos, tanto en roedores como en resultados obtenidos en el gato. Dichas neuronas también están implicadas en procesos de discriminación térmica, tanto a estímulos térmicos y estímulos de enfriamiento inocuo.

En primates, se demostró el rol crítico en el procesamiento del dolor con la aplicación de capsaicina. Así también la hiperexcitabilidad de la vía espinotalámica provoca dolor crónico en ratas (Boadas-Vaello et al. 2016; Eaton et al. 1990). Es por ello por lo que dichos autores han concluido que la vía talámica no solo lleva información nociceptiva, si no también información de temperatura y tacto. Por lo que podemos especular que ésta vía sería la principal responsable del efecto de la Estimulación Eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal.

Como mencionamos anteriormente, existen otras vías ascendentes que podrían estar implicadas en este aumento de excitabilidad de la corteza somatosensorial. Un ejemplo sería la vía espino-parabraquial, ya que es de suma importancia para el procesamiento de información de múltiples modalidades sensoriales. (Feil y Herbert; 1995)

Particularmente, se mostró que dicha vía es crítica para procesamiento del dolor; sin embargo, estudios recientes muestran que esta vía está altamente implicada en el procesamiento de estímulos mecánicos y de temperatura. (Todd; 2005) Estudios recientes, clasifican el tipo de neurona que está asociada a los estímulos mecánicos y aquellas neuronas asociadas a estímulos nociceptivos, ambos grupos formando parte de esta vía de suma relevancia para el procesamiento somatosensorial. (Choi et. al.; 2020) (Barik et.al. 2021) Las proyecciones del NPB incluyen la corteza somatosensorial primaria y el tálamo. Por tal motivo, el NPB se ha reconocido con una región cerebral que procesa la información sensorial y las transforma en respuestas autonómicas, afectivas y motivacionales. Por ejemplo, la foto-estimulación del NPB induce respuestas conductuales tanto de reforzamiento positivo como de reforzamiento negativo, dependiendo de la intensidad el estímulo (Huang et al. 2019).



Una vía más que podría estar implicada en el aumento de la excitabilidad cortical es la vía espino-reticular, que actualmente no ha sido ampliamente estudiada, pero amerita su estudio. En dicha vía, el soma de las neuronas espino reticulares se encuentran en la lámina VII y VIII de Rexed, y se cree que esta vía es una vía alternativa para el procesamiento nociceptivo, ya que los primeros estudios realizados en gatos y monos resultaban en la activación de esta vía tras un estímulo cutáneo de pinzamiento. (Fields et.al.; 1977) (Garifoli et. al.; 2006) Adicionalmente, registros extracelulares en monos mostraron que el estímulo inocuo mecánico podía activar también la vía espino reticular. Esto sugiere que la información táctil también es transmitida por esta vía hacia la corteza cerebral. Los estudios en gatos demostraron que la estimulación táctil del pabellón auricular que provocaba conductas de rascado podría modular la actividad de las neuronas espino-reticulares (Menetrey et al. 1984), lo que sugiere que esta vía procesa parte de la sensación de picazón. Sin embargo, el papel funcional de las neuronas espino-reticulares debe investigarse más a fondo.

En este contexto, nuestro estudio es relevante, ya que permite un marco teórico para explorar el aumento en excitabilidad en vías de relevo somatosensoriales a partir de la estimulación transcutánea eléctrica ruidosa de la médula espinal.

El progreso de la caracterización de las vías ascendentes relacionadas a la somato sensación aumentó exponencialmente en los últimos años, dilucidando el papel funcional de las proyecciones neuronales ascendentes.

En particular, el descubrimiento de patrones de proyección tanto contralateral, como ipsilateral, ha expandido nuestro conocimiento de la organización funcional del sistema somatosensorial. Desde los estudios electrofisiológicos pioneros que revelaron el papel de suma importancia de la vía ascendente de la médula espinal, en el procesamiento químico, de temperatura y mecánico, hasta estudios recientes que diferencian las funciones de subgrupos de las proyecciones neuronales. (Kryklywy et.al.; 2020)

Si bien la evidencia ha mostrado que algunas neuronas de las proyecciones espinales pueden ser selectivamente activadas para cierto tipo de estímulos somatosensoriales la mayoría de las neuronas responden a más de una modalidad sensorial. (Allard; 2019) Ello indica que el proceso de somato sensación es procesado en un cierto tipo de codificación en las neuronas de la proyección espinal.

Asimismo, los principios generales en que las neuronas de las proyecciones espinales procesan la información somatosensorial necesita ser explorada con acercamientos moleculares y/u optogenéticos, y es necesario expandir las propiedades de las neuronas de la proyección espinal en animales despiertos en experimentos conductuales. Esto es importante, ya que existe una perspectiva conductual y cognitiva del procesamiento somatosensorial. Esto es debido a que las respuestas al entorno tanto de los animales como los humanos produce reacciones que modulan el almacenamiento de la información, lo cual es crítico para la supervivencia y las funciones sociales. En la somato-sensación aún se desconoce cómo los componentes sensoriales y afectivos son modulados de forma general o específica.

Cabe mencionar que la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea en la médula espinal, además de afectar las vías ascendentes, que hemos mencionado con anterioridad, podría activar vías simpáticas y autónomas, que a su vez podrían modificar la actividad cardiaca. En este contexto, podemos mencionar que, en nuestros experimentos, la actividad cardiaca se controló con la administración periódica de anestesia y se mantuvo dentro de un rango establecido. Además, ello fue posible gracias a la intubación endo-traqueal con la que controlamos la actividad respiratoria. La implementación de dicha técnica de intubación permitió el registro por mucho más tiempo de los sujetos de experimentación, aunque no descartamos que pueda existir un aumento en el flujo sanguíneo provocado por la estimulación eléctrica espinal, la cual resulte en un aumento en la excitabilidad cortical. En futuros experimentos será necesario medir el cambio en la presión arterial sistémica y local cortical en el modelo experimental implementado en esta tesis.

Nuestros resultados sugieren que la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal tiene un efecto modulador en la corteza somatosensorial del ratón.

Es posible que dicha estimulación produjo fluctuaciones en la excitabilidad de la médula espinal que permitieron un incremento en la excitabilidad de la corteza somatosensorial, y en la capacidad de respuesta de las neuronas somatosensoriales.

Podemos proponer incluso, a la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia aplicada de forma transcutánea en la médula espinal como una posible herramienta terapéutica ante patologías relacionadas a una disminución en la excitabilidad de la corteza somatosensorial. Entre ellas, se encuentran patologías como hiperalgesia, hiperestesia o parestesia.

Asimismo, proponemos que dicha estimulación proporciona un nuevo enfoque terapéutico para tratar diversas patologías que afectan el procesamiento sensorial, donde el procesamiento de las señales se encuentra disminuido. Tal es el caso de patologías del espectro autista, el síndrome de déficit de atención e hiperactividad, así como en pacientes con síntomas alterados del dolor y ciertos tipos de parálisis.

Es de suma relevancia resaltar que con nuestros resultados se abre una puerta a nuevas preguntas de investigación, ya que hemos logrado con éxito por primera vez demostrar el efecto aumentativo somatosensorial cortical como consecuencia de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal. De esta manera, proponemos que este tipo de estimulación actúa como un neuromodulador directo de las vías ascendentes de la médula espinal, y cuyo efecto, se ve reflejado en el aumento significativo de la actividad pasiva y de las respuestas activas de las neuronas de la corteza somatosensorial.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Como producto del presente trabajo, hemos generado nuevas preguntas de investigación las cuáles ayudarán a la mejor comprensión del sistema somatosensorial y las vías ascendentes de la médula espinal, los resultados aquí mostrados serán parte de un artículo científico próximo a publicar.

La primera pregunta de investigación que generamos es ¿qué vía ascendente espinal transmite la información que está que provoca que la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia aplicada transcutánea de la médula espinal aumente la excitabilidad de la corteza somatosensorial?

Para responder esta pregunta, proponemos el registro específico de segmentos espinales, así como un registro *in vivo* de la médula espinal, previo, durante y posterior a la estimulación. De esta forma construiremos un correlato de la actividad espinal y somatosensorial.

A su vez, modelos en animales con lesiones en las vías espinales nos permitirán dilucidar la vía específica por la cual dicha estimulación actúa.

Adicionalmente, el registro fotopletiomográfico de la actividad cortical y espinal, nos permitirá observar cambios en el flujo sanguíneo que correlacionen el aumento en la excitabilidad cortical con el aumento en la actividad cardíaca.



Es pertinente preguntarnos si este efecto aumentativo ocurre únicamente al estimular la médula espinal, por lo que proponemos la estimulación en distintas estructuras tanto espinales como encefálicas, incluyendo distintos segmentos espinales, así como estructuras del bulbo raquídeo, puente y cerebelo, ésta última ya se encuentra siendo explorada en el laboratorio de Neurofisiología Integrativa.

Proponemos también experimentos en humanos con deficiencias sensoriales, como pacientes con parálisis y pacientes con trastorno del espectro autista, específicamente pacientes con déficit de atención e hiperactividad, para demostrar el efecto terapéutico de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

Se demuestra por primera vez el efecto aumentativo de la estimulación eléctrica ruidosa de alta frecuencia transcutánea de la médula espinal en la excitabilidad de la corteza somatosensorial primaria del ratón.

El aumento en la excitabilidad de la corteza somatosensorial primaria del ratón se demuestra tanto en la actividad eléctrica espontánea como en la respuesta activa provocada por la protracción mecánica de las vibrisas

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

Afifi, A. K., & Bergman, R. A. (1998). *Functional neuroanatomy: text and atlas* (Vol. 10). New York: McGraw-hill.

Al'joboori, Y., Hannah, R., Lenham, F., Borgas, P., Kremers, C. J., Bunday, K. L., ... & Duffell, L. D. (2021). The immediate and short-term effects of transcutaneous Spinal Cord Stimulation and Peripheral Nerve Stimulation on Corticospinal Excitability. *Frontiers in Neuroscience*, 15.

Allard, J. (2019) Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse. *J. Physiol.* 597, 2097–2113

Angeli CA, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Harkema SJ. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain*. 2014;137(pt 5):1394-1409.

Augustinsson, L. E., Carlsson, C. A., Holm, J., & Jivegård, L. (1985). Epidural electrical stimulation in severe limb ischemia. Pain relief, increased blood flow, and a possible limb-saving effect. *Annals of surgery*, 202(1), 104.

Bartholow, R. (1874). ART. I.--Experimental Investigations into the Functions of the Human Brain. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*, (134), 305.

Barik, A. et al. (2021) A spinoparabrachial circuit defined by Tac1 expression drives pain. *Elife* 10, e61135

Birdwell, J. A., Solomon, J. H., Thajchayapong, M., Taylor, M. A., Cheely, M., Towal, R. B., ... & Hartmann, M. J. (2007). Biomechanical models for radial distance determination by the rat vibrissal system. *Journal of neurophysiology*, 98(4), 2439-2455.



Blix, M. (1884). Experimental contribution to the solution of the problem of the specific energy of skin nerves. *Ztschr. f. Biol*, 20, 141.

Boadas-Vaello, P. et al. (2016) Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord* 54, 330–340

Cerletti, U., & Bini, L. (1938). Electric shock treatment. *Bollettino ed atti della Accademia Medica di Roma*, 64, 36.

Choi, S. et al. (2020) Parallel ascending spinal pathways for affective touch and pain. *Nature* 587, 258–263

Cook, A. W. (1976). Electrical stimulation in multiple sclerosis. *Hospital practice*, 11(4), 51-58.

Cook, A. W., & Browder, E. J. (1965). Function of posterior columns in man. *Archives of Neurology*, 12(1), 72-79.

Costain, R., Redfearn, J. W. T., & Lippold, O. C. J. (1964). A controlled trial of the therapeutic effects of polarization of the brain in depressive illness. *The British Journal of Psychiatry*, 110(469), 786-799.

Danner SM, Hofstoetter US, Ladenbauer J, Rattay F, Minassian K. Can the human lumbar posterior columns be stimulated by transcutaneous spinal cord stimulation? A modeling study. *Artif Organs*. 2011;35:257-262

Dimitrijevic MM, Dimitrijevic MR, Illis LS, Nakajima K, Sharkey PC, Sherwood AM. Spinal cord stimulation for the control of spasticity in patients with chronic spinal cord injury: I. Clinical observations. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1986;3:129-144.

Dooley, D. M. (1976). Spinal cord stimulation. *AORN journal*, 23(7), 1209-1212.

Eaton, S.A. and Salt, T.E. (1990) Thalamic NMDA receptors and nociceptive sensory synaptic transmission. *Neurosci.Lett.* 110, 297–302

Ebara, S., Kumamoto, K., Matsuura, T., Mazurkiewicz, J. E., & Rice, F. L. (2002). Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle–sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, 449(2), 103-119.

Everson, S. (1999). *Aristotle on perception*. Oxford University Press on Demand.



Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L. J., Aronoff, R., Weber, B., & Petersen, C. C. (2007). Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron*, 56(5), 907-923.

Feil, K. and Herbert, H. (1995) Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* 353, 506–528

Fields, H.L. et al. (1977) Somatosensory properties of spinoreticular neurons in the cat. *Brain Res.* 120, 49–66

Fritsch, G., & Hitzig, E. (2009). Electric excitability of the cerebrum (Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns). *Epilepsy & Behavior*, 15(2), 123-130.

Galvani, L. (1791). De viribus electricitatis in motu musculari. *Commentarius. De Bonoiensis Scientiarum et Artium Intituo atque Academie Commentarii*, 7, 363-418.

Garifoli, A. et al. (2006) Organization of bilateral spinal projections to the lateral reticular nucleus of the rat. *Arch. Ital. Biol.* 144, 145–157

Gauriau, C. and Bernard, J.F. (2004) A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 468, 24–56

Gildenberg PL. Neuromodulation: a historical perspective. In: Krames ES, Peckham PH, Rezai AR, eds. *Neuromodulation*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier and Academic Press; 2009:9-20.

Gildenberg, P. L. (2006). History of electrical neuromodulation for chronic pain. *Pain Medicine*, 7(suppl_1), S7-S13.

Gildenberg, P. L., & Hassler, R. (1971). Influence of stimulation of the cerebral cortex on vestibular nuclei units in the cat. *Experimental Brain Research*, 14(1), 77-94.

Green, E. L. (1941). Genetic and non-genetic factors which influence the type of the skeleton in an inbred strain of mice. *Genetics*, 26(2), 192.

Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, et al. Effect of epi-dural stimulation of the lumbosacral spinal cord on vol-untary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet*. 2011;377:1938-1947

Hassler, R., & Dieckmann, G. (1969). Locomotor movements in opposite directions induced by stimulation of pallidum or of putamen. *Journal of the neurological sciences*, 8(1), 189-195.



Hautvast, R. W., Blanksma, P. K., DeJongste, M. J., Pruijm, J., van der Wall, E. E., Vaalburg, W., & Lie, K. I. (1996). Effect of spinal cord stimulation on myocardial blood flow assessed by positron emission tomography in patients with refractory angina pectoris. *The American journal of cardiology*, 77(7), 462-467.

Herrick, J. C. (1947). The proprioceptive nervous system. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 106(3), 355-358.

Huang, T. et al. (2019) Identifying the pathways required for coping behaviours associated with sustained pain. *Nature* 565, 86–90

Hylden, J.L. et al. (1989) Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience* 28, 27–37

Inanici, F., Brighton, L. N., Samejima, S., Hofstetter, C. P., & Moritz, C. T. (2021). Transcutaneous spinal cord stimulation restores hand and arm function after spinal cord injury. *IEEE Transactions on neural systems and rehabilitation engineering*, 29, 310-319.

Inukai, Y., Saito, K., Sasaki, R., Tsuiki, S., Miyaguchi, S., Kojima, S., ... & Onishi, H. (2016). Comparison of three non-invasive transcranial electrical stimulation methods for increasing cortical excitability. *Frontiers in human neuroscience*, 10, 668.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (6th Ed.). (2021). *Principles of neural science*. New York: McGraw-hill.

Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C., & Welker, E. (2002). Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*, 34(2), 265-273.

Kryklywy, J.H. et al. (2020) From architecture to evolution: multisensory evidence of decentralized emotion. *Trends Cogn. Sci.* 24, 916–929

Ladenbauer J, Minassian K, Hofstoetter US, Dimitrijevic MR, Rattay F. Stimulation of the human lumbar spinal cord with implanted and surface electrodes: a computer simulation study. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2010;18: 637-645

Lee, K. J., & Woolsey, T. A. (1975, January). Relationship of peripheral innervation density (vibrissae) to cortical neuron number (barrels) in mouse. In *Anatomical Record* (Vol. 181, No. 2, pp. 408-408). Div John Wiley & Sons Inc, 605 Third Ave, New York, Ny 10158-0012: Wiley-Liss.

Lifshitz, K. (1966). The averaged evoked cortical response to complex visual stimuli. *Psychophysiology*, 3(1), 55-68.



Lifshitz, K. (1969). An examination of evoked potentials as indicators of information processing in normal and schizophrenic subjects. In *National Aeronautics and Space Administration and the American Institute for Biological Sciences Conference, Sep, 1968, San Francisco, CA, US*;

Liu, Y. et al. (2009) Brainstem and thalamic projections from acraniovascular sensory nervous centre in the rostral cervical spinal dorsal horn of rats. *Cephalalgia* 29, 935–948

Lund, R.D. and Webster, K.E. (1967) Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 130, 313–328

MacKay-Lyons M. Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Phys Ther.* 2002;82:69-83

Magendie, Francois (1822). "Expériences sur les fonctions des racines des nerfs rachidiens". *Journal de Physiologie Expérimentale et de Pathologie* (in French): 276–9.

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain Mechanisms: A New Theory: A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. *Science*, 150(3699), 971-979.

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain Mechanisms: A New Theory: A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. *Science*, 150(3699), 971-979.

Menetrey, D. et al. (1984) Electrophysiological characteristics of lumbar spinal cord neurons backfired from lateral reticular nucleus in the rat. *J. Neurophysiol.* 52, 595–611

Minassian K, Hofstoetter U, Tansey K, Mayr W. Neuromodulation of lower limb motor control in restorative neurology. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012;114:489-497

Minassian K, Persy I, Rattay F, Dimitrijevic MR, Hofer C, Kern H. Posterior root-muscle reflexes elicited by transcutaneous stimulation of the human lumbosacral cord. *Muscle Nerve.* 2007;35:327-336.

Moliadze, V., Fritzsche, G., & Antal, A. (2014). Comparing the efficacy of excitatory transcranial stimulation methods measuring motor evoked potentials. *Neural plasticity*, 2014.



Mountcastle, V. B. (1957). Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of neurophysiology*, 20(4), 408-434.

Murphy, D. F., & Giles, K. E. (1987). Dorsal column stimulation for pain relief from intractable angina pectoris. *Pain*, 28(3), 365-368.

Ni, R., Yuan, Y., Yang, L., Meng, Q., Zhu, Y., Zhong, Y., ... & Bu, J. (2022). Novel Non-invasive Transcranial Electrical Stimulation for Parkinson's. *Advances and Challenges of Non-Invasive Brain Stimulation in Age-Related Neurodegenerative Diseases*.

O'Connor, D. H., Krubitzer, Bensmaia, S. (2021). Of mice and monkeys: Somatosensory processing in two prominent animal models. *Progress in Neurobiology*

Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.

Petersen, C. C. H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. In *Neuron* (Vol. 56, Issue 2, pp. 339–355). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017>

Prete, G., D'Anselmo, A., Tommasi, L., & Brancucci, A. (2018). Modulation of the dichotic right ear advantage during bilateral but not unilateral transcranial random noise stimulation. *Brain and cognition*, 123, 81-88.

Redfearn, J. W., Lippold, O. C., and Costain, R. (1964). Preliminary account of the clinical effects of polarizing the brain in certain psychiatric disorders. *Br. J. Psychiatry* 110, 773–785. doi: 10.1192/bjp.110.469.773

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

Sarkar, A., Dowker, A., & Kadosh, R. C. (2014). Cognitive enhancement or cognitive cost: trait-specific outcomes of brain stimulation in the case of mathematics anxiety. *Journal of Neuroscience*, 34(50), 16605-16610.

Shealy CN, Mortimer JT, Reswick JB. Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: preliminary clinical report. *Anesth Analg*. 1967;46:489-491

Shealy, C. N., Mortimer, J. T., & Reswick, J. B. (1967). Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: preliminary clinical report. *Anesthesia & Analgesia*, 46(4), 489-491.



Solomon, J. H., & Hartmann, M. J. (2006). Robotic whiskers used to sense features. *Nature*, 443(7111), 525-525.

Taccola G, Sayenko D, Gad P, Gerasimenko Y, Edgerton VR. And yet it moves: recovery of volitional control after spinal cord injury. *Prog Neurobiol*. 2018;160:64-81

Terney, D., Chaieb, L., Moliadze, V., Antal, A., & Paulus, W. (2008). Increasing human brain excitability by transcranial high-frequency random noise stimulation. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14147-14155.

Todd, A.J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836

Todd, A.J. et al. (2005) Fos induction in lamina I projection neurons in response to noxious thermal stimuli. *Neuroscience* 131, 209–217

Van der Groen, O., & Wenderoth, N. (2016). Transcranial random noise stimulation of visual cortex: stochastic resonance enhances central mechanisms of perception. *Journal of Neuroscience*, 36(19), 5289-5298.

Van der Groen, O., Potok, W., Wenderoth, N., Edwards, G., Mattingley, J. B., & Edwards, D. (2022). Using noise for the better: the effects of transcranial random noise stimulation on the brain and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 104702.

Vilensky, J. A., & Gilman, S. (2002). Horsley was the first to use electrical stimulation of the human cerebral cortex intraoperatively. *Surgical neurology*, 58(6), 425-426.

Wenger N, Moraud EM, Raspopovic S, et al. Closed-loop neuromodulation of spinal sensorimotor circuits controls refined locomotion after complete spinal cord injury. *Sci Transl Med*. 2014;6:255ra133.

Woolsey, T. A., & Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex: the description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain research*, 17(2), 205-242.



CAPÍTULO 11

ANEXOS

De la neuroanatomía de la corteza somatosensorial del ratón

La corteza somatosensorial del ratón es una región del cerebro que se encarga de procesar la información sensorial proveniente del cuerpo, como el tacto, la presión, el dolor y la temperatura. Esta región se encuentra ubicada en la corteza cerebral, específicamente en la corteza parietal, y está organizada en diferentes capas y columnas que reciben y procesan información de manera específica y ordenada (Woolsey, Van der Loos, & Gado, 1970).

La corteza somatosensorial del ratón se divide en dos áreas principales: la corteza somatosensorial primaria (S1) y la corteza somatosensorial secundaria (S2). La S1 es la primera estación en la que se procesa la información somatosensorial, recibiendo información de los receptores sensoriales ubicados en la piel, músculos y articulaciones (Feldmeyer, Brecht, Helmchen, Petersen, & Poulet, 2013). La S2, por su parte, recibe información de la S1 y de otras áreas sensoriales, y se encarga de procesar información más compleja, como la textura y la forma de los objetos (Mao, Yang, Su, & Hu, 2014).

La organización de la corteza somatosensorial del ratón es altamente estructurada y se basa en la representación topográfica del cuerpo. Esto significa que las diferentes partes del cuerpo se representan de manera ordenada y precisa en la corteza somatosensorial, de modo que las partes del cuerpo que están cerca entre sí se representan en áreas cercanas de la corteza (Sur & Leamey, 2001).

El estudio de la corteza somatosensorial del ratón ha sido fundamental para entender los principios generales del procesamiento sensorial en el cerebro. Además, el uso de técnicas de imagenología como la microscopía de dos fotones y la optogenética ha permitido investigar con mayor detalle la organización y el funcionamiento de esta región cerebral (Brecht, 2014).

La corteza somatosensorial del ratón es una región altamente estructurada y organizada que se encarga de procesar información sensorial proveniente del cuerpo. La comprensión de su funcionamiento es fundamental para entender los principios generales del procesamiento sensorial en el cerebro y puede tener aplicaciones clínicas en el tratamiento de trastornos sensoriales.

De la vía trigémino-talámico cortical del ratón

La vía trigémino-talámica-cortical es una de las rutas principales que transmiten información somatosensorial desde los receptores periféricos hasta la corteza somatosensorial en el cerebro de los mamíferos. Esta vía se ha estudiado principalmente en ratones, que son una especie comúnmente utilizada en investigación neurocientífica (Ji & Strichartz, 2004).

En esta vía, las fibras aferentes sensoriales que llevan información desde los receptores periféricos en la piel, músculos y articulaciones, entran en la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales. Allí, estas fibras aferentes se dividen en dos tipos: las fibras C y las fibras A δ . Las fibras C son fibras lentas y no mielinizadas que transmiten información sobre el dolor y la temperatura, mientras que las fibras A δ son fibras más rápidas y mielinizadas que transmiten información sobre el tacto y la presión.

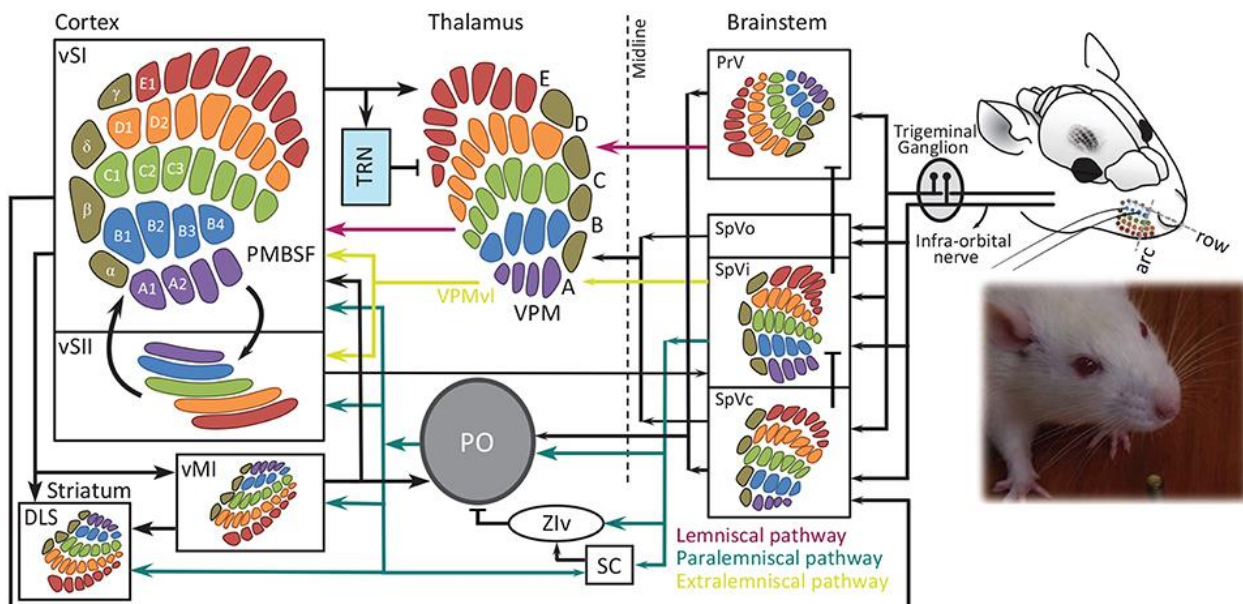
Las fibras aferentes A δ y C hacen sinapsis con las neuronas de la sustancia gelatinosa en la médula espinal y luego se proyectan a través de los tractos ascendentes de la médula espinal hacia el núcleo trigémino espinal (NTS), que es una estación de relevo importante en la vía trigémino-talámico-cortical. En el NTS, las fibras aferentes hacen sinapsis con las neuronas del núcleo ventral posterior (VP) del tálamo. El núcleo VP está organizado en subnúcleos, y cada subnúcleo recibe información específica de los diferentes tipos de receptores periféricos.

Desde el núcleo VP, las fibras aferentes se proyectan hacia la corteza somatosensorial a través de la radiación talámica. La corteza somatosensorial se divide en diferentes áreas, como la corteza somatosensorial primaria (S1), que es la primera etapa cortical de procesamiento somatosensorial. La información somatosensorial llega a la corteza S1 a través de la radiación talámica y se procesa allí antes de ser transmitida a otras áreas corticales para un procesamiento más complejo.



La vía trigémino-talámica-cortical es esencial para la percepción y la integración de la información sensorial, lo que permite a los animales responder adecuadamente a los estímulos externos y mantener el equilibrio y la postura. Además, esta vía también es importante para la plasticidad neuronal y la adaptación sensorial, lo que permite a los animales ajustarse a los cambios en su entorno sensorial.

En resumen, la vía trigémino-talámica-cortical es una ruta importante para la transmisión de información somatosensorial desde los receptores periféricos hasta la corteza somatosensorial en el cerebro de los mamíferos. Esta vía ha sido ampliamente estudiada en ratones y es esencial para la percepción y la integración de la información sensorial, así como para la plasticidad neuronal y la adaptación sensorial (Ji & Strichartz, 2004).



Representación esquemática del sistema Vibrisa-barril y la vía trigémino-talámico-cortical

Los colores indican filas. Barril, barriloide y barriletes se redibujaron de Durham y Woolsey (1984). PMBSF, subcampo de barril posterior-medial; PO, núcleo talámico posterior; PrV, núcleo principal del trigémino; SC, colículo superior; SpVi, núcleos

espinales del trigémino pars interpolaris; SpVo, pars oralis; SpVc, pars caudalis; TRN, núcleo reticular talámico; VPM, núcleo medial ventroposterior; vMI, corteza motora primaria vibrisal; vSI, corteza somatosensorial primaria vibrisal; vSII, corteza somatosensorial secundaria con el mapa somatotópico de Benison et al. (2007) ; DLS, cuerpo estriado dorsolateral; ZIv, zona ventral inserta.

Del análisis estadístico, ANOVA1 y Método de Dunnet

La prueba estadística ANOVA (Análisis de Varianza) es una técnica utilizada para comparar las medias de tres o más grupos independientes. Esta prueba se basa en la comparación de las varianzas entre los grupos y dentro de los grupos. Si la variación entre los grupos es mayor que la variación dentro de los grupos, entonces se concluye que al menos uno de los grupos difiere significativamente de los demás

La prueba ANOVA se puede realizar utilizando diferentes enfoques, como el enfoque de efectos fijos o el enfoque de efectos aleatorios. En el enfoque de efectos fijos, se asume que los grupos se han seleccionado de una población fija y se desea generalizar las conclusiones a esa población. Por otro lado, en el enfoque de efectos aleatorios, se considera que los grupos seleccionados son una muestra aleatoria de una población más grande y se desea generalizar las conclusiones a esa población.

El método de Dunnett es un enfoque *post-hoc* utilizado en la prueba ANOVA para comparar todos los grupos con un grupo de control, en lugar de comparar cada grupo con todos los demás grupos. Este método fue desarrollado por Charles W. Dunnett en 1955 y ha sido ampliamente utilizado en estudios en los que se compara un grupo experimental con un grupo de control.

El método de Dunnett se basa en la comparación de las medias de cada grupo con la media del grupo de control. Se calcula una estadística de prueba para cada comparación y se ajusta el valor de significación para tener en cuenta el número de comparaciones realizadas.



En resumen, la prueba ANOVA es una herramienta útil para comparar las medias de tres o más grupos independientes, mientras que el método de Dunnett es una técnica *post-hoc* que se utiliza para comparar todos los grupos con un grupo de control. Ambas técnicas son ampliamente utilizadas en la investigación científica y se recomienda que se utilicen en conjunto para obtener conclusiones más sólidas.

