



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**Instituto de Fisiología
BUAP**

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA INTEGRATIVA

**“Neuronas del asta dorsal de la médula espinal
involucradas en la generación de potenciales
espontáneos negativos que exhiben respuestas fásicas
a estímulos táctiles”**

TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Fisiológicas

PRESENTA:

LFT. Patricia Mayeli Quechol Tecuatl

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Elías Manjarrez López

Abril , 2016

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca en el periodo 2013 - 2015.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia por su apoyo incondicional.

Al Dr. Elías Manjarrez López por su apoyo en la dirección de esta tesis. Gracias por sus enseñanzas que han permitido mi crecimiento personal, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de su excelente grupo de trabajo.

A Pablo, Nayeli y a todos los compañeros de laboratorio por sus enseñanzas y consejos.

Agradezco infinitamente al DC. Julián Torres Jácome, DC. José Ramón Eguíbar Cuenca y al DC. Enrique Soto Eguíbar, por toda su paciencia, enseñanza, disponibilidad, apoyo y confianza. Gracias por guiarme en mi formación como investigador.

¡¡ A todos por ser parte de esta aventura que aún se sigue escribiendo...!!

No puedo dejar de agradecer a mi alma máter Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) quien también apoyo el proyecto del cual derivo mi tesis, por todo esto muchas gracias.

Viejo proverbio:

“Peleando, juzgando antes de tiempo y alterándose no se consigue jamás lo suficiente, pero siendo justo, cediendo y observando a los demás con una simple cuota de serenidad, se consigue más de lo que se espera.”

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ANTECEDENTES	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 ANATOMÍA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	9
1.2 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA MÉDULA ESPINAL	12
1.2.1 CITOARQUITECTURA DE LA MÉDULA ESPINAL	17
1.2.2 LÁMINAS DE REXED	20
1.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN SENSORIAL EN LA MÉDULA ESPINAL	26
1.3.1 FIBRAS AFERENTES PRIMARIAS	26
1.3.2 RECEPTORES SENSORIALES.....	28
1.3.3 CAMPO RECEPTIVO.....	32
1.3.4 ADAPTACIÓN SENSORIAL.....	33
1.4 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL	35
1.4.1 POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL (PNDMs).....	36
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
3. HIPÓTESIS	43
4. OBJETIVOS	44
5. METODOLOGÍA.....	45
5.1 DE LA EXPERIMENTACIÓN.....	45
5.2 DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS EMPLEADOS PARA REGISTRO.....	45
5.3 MÉTODO DE REGISTRO	48
5.4 DEL MÉTODO DE EUTANASIA.....	51
5.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.....	52
6. RESULTADOS	57
6.1 POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS DEL DORSO DE LA MÉDULA ESPINAL QUE PRESENTAN RESPUESTA FÁSICA	65

6.2 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA DE NEURONAS CON RESPUESTA FÁSICA DURANTE LA APARICIÓN DE PNDMS ESPONTÁNEOS EN GATO DESCEREBRADO.	68
6.3 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA DE INTERNEURONAS CON RESPUESTA FÁSICA DURANTE LA APARICIÓN DE PNDMS EN GATOS NO DESCEREBRADOS Y ANESTESIADOS CON PENTOBARBITAL SÓDICO.	79
6.4 INTERNEURONAS QUE NO PRESENTARON RESPUESTA ANTE ESTÍMULOS DE ALTA FRECUENCIA (10- 400 Hz).....	86
7. DISCUSIÓN	91
8. CONCLUSIÓN.....	99
9. BIBLIOGRAFÍA.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AL	Adaptación lenta
ALI	Adaptación lenta tipo I
AL II	Adaptación lenta tipo II
AR	Adaptación Rápida
CR	Campo receptivo
CP	Corpúsculo de Pacini
SEG	Electroespinograma
FAP	Fibras aferentes primarias
FA	Fibras aferentes
L3	Segmento espinal lumbar tres
L6	Segmento espinal lumbar seis
L7	Segmento espinal lumbar siete
LR	Láminas de Rexed
ME	Médula Espinal
N	Ondas negativas
PCEs	Potenciales de campo extracelulares
PNDM	Potencial Espontáneo Negativo del Dorso de la Médula Espinal.
PDM	Potencial del Dorso de la Médula Espinal
PA	Potencial de acción
SNC	Sistema Nervioso Central
S1	Segmento espinal sacro 1
RS	Receptor Sensorial

UNIDADES DE MEDIDA

ms	milisegundos
mv	milivolts

RESUMEN

Los Potenciales Espontáneos Negativos del Dorso de la Médula Espinal (**PNDMs**) se originan de la actividad no inducida de conjuntos neuronales distribuidos a lo largo de las láminas III a VI de Rexed del asta dorsal de la médula espinal a nivel lumbar en el gato. Estos conjuntos neuronales modulan la transmisión sináptica de las fibras aferentes musculares a nivel de los segmentos espinales lumbares seis y siete (L6-L7). A su vez, reciben entradas monosinápticas de fibras aferentes cutáneas de bajo umbral.

Las fibras aferentes son axones que transmiten estímulos codificados hacia el SNC. Estas fibras pueden ser mielínicas o amielínicas, y se encuentran clasificadas con base en su localización. Por un lado, las fibras aferentes procedentes de receptores musculares se encargan de transmitir información cinestésica. Ejemplo de ello son los husos musculares encargados de transmitir información sobre la percepción del movimiento (estiramiento), y los órganos tendinosos de Golgi, que transmiten información sobre la posición del cuerpo (fuerza).

Por otro lado, se encuentran las fibras aferentes procedentes de receptores táctiles, principalmente fibras mielínicas primarias de los grupos **A α** y **A β** , encargadas de transmitir información sensitiva. Ejemplo de este tipo de receptores son: los receptores Meissner y los receptores Pacini, esenciales en la percepción vibrotáctil superficial y profunda, respectivamente.

Los hallazgos mencionados previamente sugieren que la actividad espontánea de dichos conjuntos neuronales tienen un papel funcional durante la transmisión de información sensorial. Dicho papel depende del tipo de fibras aferentes y del receptor activado.

Sin embargo, el tipo de respuesta que exhiben estos grupos neuronales a estímulos táctiles aplicados a diferentes frecuencias, nos permiten sugerir que están involucrados en la modulación de la velocidad de la transmisión de la información sensorial en su paso por la vía de la columna dorsal-lemnisco medial a nivel de la médula espinal.

En esta tesis proponemos que los conjuntos neuronales involucrados en la generación de los potenciales espontáneos negativos del asta dorsal de la médula espinal, exhiben **respuestas fásicas** a estímulos táctiles, en un rango de frecuencia de 10 a 400 Hz. Es decir, presentan respuestas de adaptación rápida. Dichas respuestas reciben entradas sinápticas de mecanorreceptores tipo **Pacini y Meissner**. Dicha respuesta está presente en las preparaciones de gato descerebrado y no descerebrado. Sin embargo, se observó que algunos conjuntos neuronales responden a estímulos táctiles de baja frecuencia (1 a 9 Hz). Estos ya presentaban una respuesta de tipo tónica y PNDMs con alteración en sus características.

Estos hallazgos son consistentes con trabajos previos, los cuales han propuesto que la actividad espontánea negativa generada por las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, están involucradas en la codificación y modulación de los estímulos sensoriales.

PALABRAS CLAVE: PNDMs, láminas de Rexed, fibras amielínicas A α y A β , respuestas fásicas, mecanorreceptores Pacini y Meissner.

ANTECEDENTES

El sistema nervioso central (SNC) realiza operaciones neuronales implicadas en el procesamiento de la información (Fetz, 1997). En vertebrados, dicho procesamiento de información somatosensorial involucra lo siguiente: 1) la actividad eléctrica de la médula espinal (Gasser y Graham, 1933), 2) la transmisión de actividad neuronal desde los órganos sensoriales de la periferia del cuerpo hasta la corteza cerebral, y 3) vías aferentes, que de manera jerárquica, ascienden a través de varias estructuras del SNC (Mariño, 2001; Mouncastle, 1984).

En 1891, Gotch y Horsley demostraron la ocurrencia de potenciales registrados en la médula espinal producidos por la estimulación de fibras aferentes primarias, fibras motoras o vías descendentes del cerebro. Estos autores sugirieron que dichos potenciales son generados por un flujo de corrientes a través del espacio extracelular como resultado de la despolarización de terminales de fibras aferentes primarias. Estos potenciales de la médula espinal son comparables a los potenciales provocados de la corteza cerebral (Purpura, 1959).

En 1933, Gasser y Graham describieron los potenciales intermediarios de la médula espinal. Estos, son una serie de eventos eléctricos registrados en la superficie de la médula espinal tras la llegada de una descarga en fibras nerviosas aferentes primaria y que son precedidos por una despolarización de fibras aferentes primarias. Dichos potenciales incluyen una serie de ondas negativas (N) seguidas de una onda positiva larga (P).

Las ondas N, están generalmente asociadas con eventos excitatorios de las interneuronas en el asta dorsal (Bernhard, 1953; Gasser y Graham, 1933), mientras que las ondas P, están relacionadas a la actividad inhibitoria (Hughes and Gasser, 1934a,b). Sin embargo, probablemente la actividad eléctrica registrada en la raíz dorsal es en parte, resultado de los potenciales sinápticos (Burke and Rudomin, 1977; Eccles, 1964a; Schmidt, 1971).

1. INTRODUCCIÓN

En los vertebrados, la médula espinal (ME) es la primera estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) en desarrollarse durante la embriogénesis, esto resulta de la necesidad de integrar la información del medio ambiente.

La médula espinal tiene la capacidad de transmitir actividad sensorial que es generada como respuesta a un estímulo, así como la consecuente activación de las fibras aferentes primarias (FAP), y posteriormente, la transmisión del mensaje a centros superiores. A su vez, la médula espinal recibe información supraespinal con fines motores y reguladores (analgesia), contando así con una vasta capacidad de integración y modulación de señales (Willis y Coggeshall, 1991).

1.1 ANATOMÍA DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal es parte del SNC y está localizada en el canal espinal de la columna vertebral, presenta una forma cilíndrica y una extensión en dirección caudal; además, está cubierta por tres meninges: duramadre, aracnoides y piamadre (Figura 1).

La *duramadre* es una membrana fuerte, densa, fibrosa y la más externa. Se encarga de recubrir el encéfalo y la médula espinal y formar una envoltura alrededor de la cauda equina denominada saco dural, que se extiende hasta la segunda vértebra sacra (S2). Bajo esta vértebra sacra, la duramadre se continúa rodeando al *filum terminal* y su unión forma el ligamento coccígeo que se inserta en el cóccix.

La *aracnoides* es una membrana delgada e impermeable que recubre totalmente la médula espinal. Es la membrana media, y se encuentra ubicada entre la duramadre y la piamadre. Envía prolongaciones en forma de tela de araña hacia la siguiente capa, la piamadre, constituyendo el espacio subaracnoideo, el cual contiene líquido cefalorraquídeo que rodea a la médula espinal en toda su extensión,

y favorece la fusión de la duramadre y la aracnoides con el *filum terminale*. (Bustamante, 1987)

La *piamadre* es una capa delgada de tejido conectivo, transparente, de carácter vascular que se adosa íntimamente a la médula espinal por lo que es la membrana más profunda. Se divide en dos capas: La más externa que está en contacto con el líquido cefalorraquídeo y la más interna que está adosada a la ME. Envía prolongaciones hacia la duramadre en forma de dientes de sierra llamadas ligamentos dentados (Bustamante, 1987).

En vertebrados la médula espinal presenta una extensión de alrededor de 45 cm, desde el arco anterior del atlas (C1) hasta la segunda vértebra lumbar (L2).

Desde la región de la segunda vértebra lumbar (L2) donde termina la médula espinal hasta el cóccix desciende un filamento delgado llamado *filum terminale* y las raíces de los nervios sacros y lumbares forman un manojo de fibras que reciben el nombre de cauda equina. No obstante, la longitud de la ME con respecto a la columna vertebral varía según la especie aunque en general es más corta que esta última. En el hombre la médula espinal finaliza a nivel de la segunda vértebra lumbar, mientras que en reptiles y aves ocupa toda la longitud del canal raquídeo y a diferencia de los mamíferos carece de *filum terminale* (Armengol, 1998; Bustamante, 1987).

La médula espinal de los vertebrados se divide longitudinalmente en cuatro regiones: cervical, torácica, lumbar y sacrococcígea. Su ancho va cambiando según la cantidad de fibras que lleven a sus tractos, presentando así dos ensanchamientos importantes: cervical y lumbar (Figura 1.1).

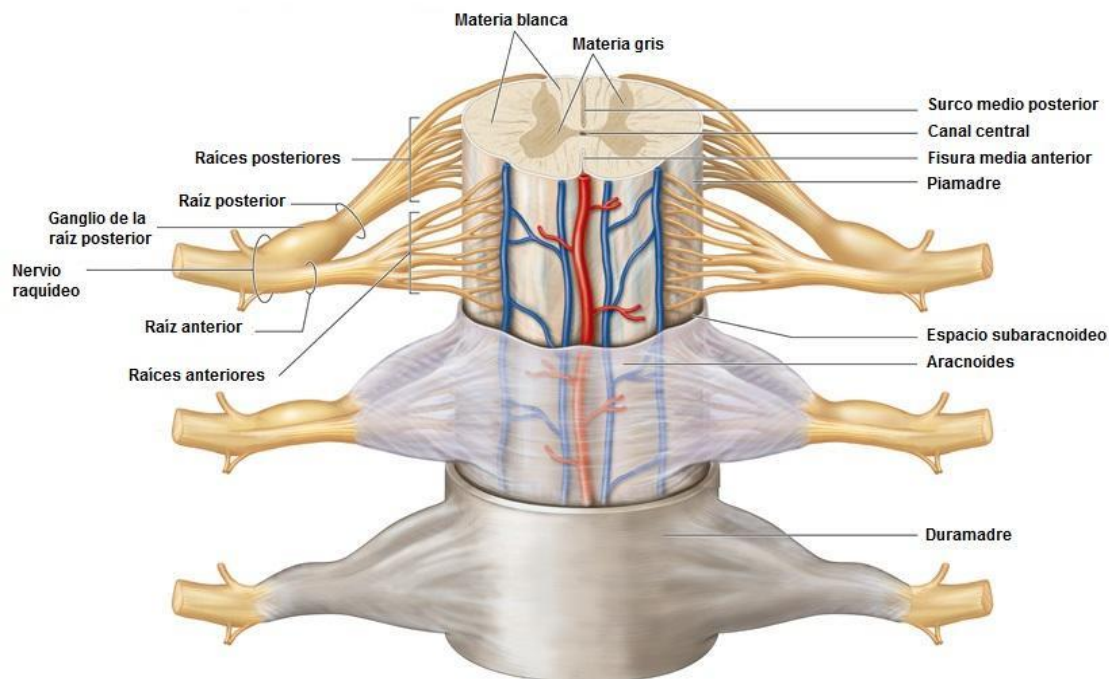


Figura 1. Vista anteroposterior de la médula espinal. En esta imagen están representadas las tres meninges de la médula espinal: duramadre, aracnoides y piamadre (William D.2004).

A nivel cervical, la médula espinal de los vertebrados presenta un ensanchamiento cervical que comprende desde la vértebra cervical número tres (C3) hasta la torácica número dos (T2), y presenta un diámetro de 13 mm. De este engrosamiento emergen los nervios raquídeos que constituyen el plexo braquial y participan en procesos sensoriales y funciones motoras de la parte posterior de la cabeza, el cuello, diafragma y cadena escapular superior (Figura 1.1).

Asimismo, a nivel lumbar, la médula espinal de los vertebrados presenta un ensanchamiento lumbosacro que comprende desde la vértebra lumbar número uno (L1) hasta la sacra número tres (S3) y presenta un diámetro de 11mm. De este engrosamiento emergen los nervios raquídeos lumbares y sacros que conforman el plexo lumbosacro. Recordemos que los nervios lumbares inervan la parte inferior de tronco, espalda y extremidades inferiores. Los nervios sacros inervan la pelvis y el esfínter anal y vesical (Figura 1.1).

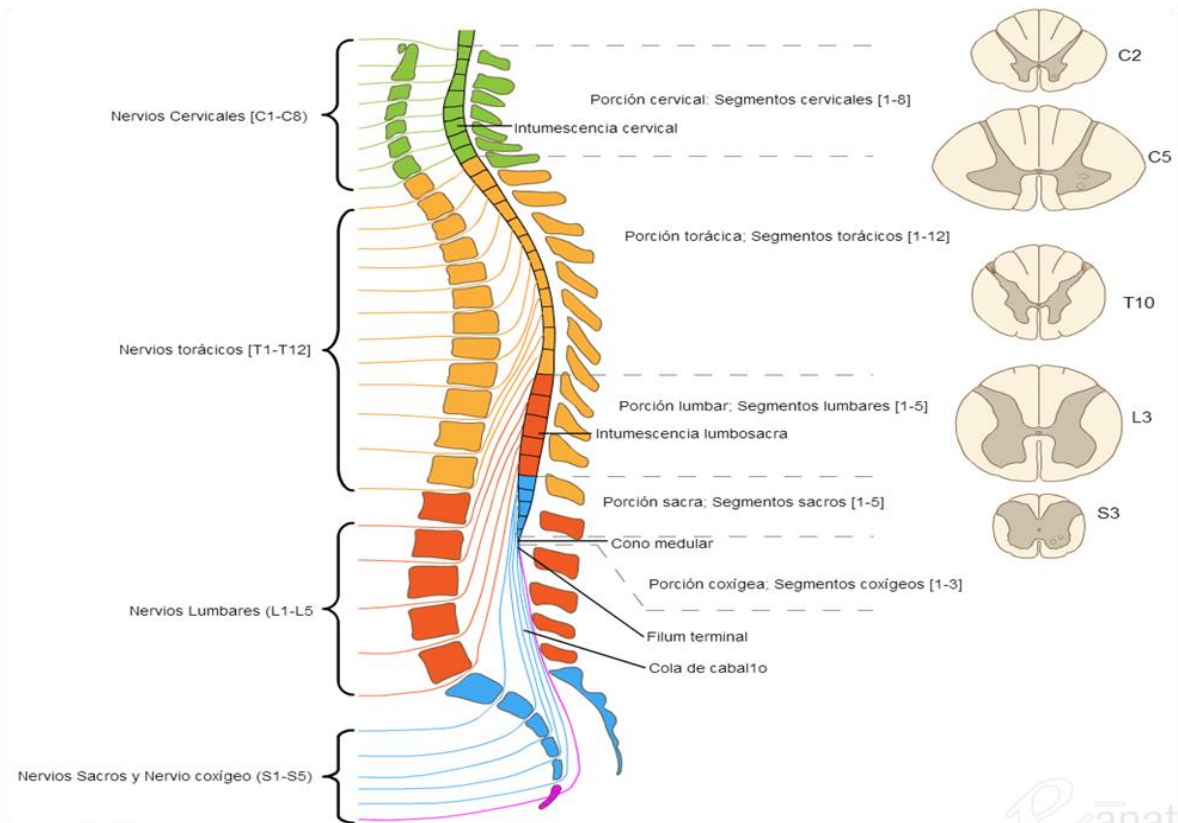


Figura 1.1 Vista longitudinal de la médula espinal. En esta vista están representadas sus cuatro regiones y la forma de la sustancia gris a nivel de C2, C5, T10, L3 y S3 (C2= segmento cervical 2, C5= segmento cervical 5, T10= segmento torácico 10, L3= segmento lumbar 3 y S3= segmento sacro 3), (Tomada de A. Micheau).

1.2 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal está conformada por dos tipos de tejidos neuronales denominados *sustancia gris* y *sustancia blanca*, esta última recubre a la primera tal como se representa en la figura 2 (Willis y Coggeshall, 1980; Nogradi, 2006).

La *sustancia blanca* está compuesta de una gran cantidad de fibras nerviosas, neuroglia y vasos sanguíneos, en cada hemimédula¹ son identificables tres cordones o funículos: el anterior, el lateral y el posterior (Figura 2).

1) El cordón Anterior aparece situado entre el surco anterolateral y el surco anteromedial, posee tractos motores que también controlan movimientos asociados a los voluntarios.

2) El cordón lateral aparece situado entre los surcos posterolateral y antero lateral, está formado por vías ascendentes y descendentes que forman fascículos relacionados con los movimientos voluntarios, el fascículo corticoespinal lateral así como fascículos relacionados con la sensibilidad.

3) El cordón posterior aparece situado entre el surco medio posterior y, el borde medial del asta dorsal. En este cordón encontramos el fascículo grácil y cuneiforme, los cuales contienen fibras ascendentes pertenecientes al tacto epicrítico, propiocepción consciente y sensibilidad vibratoria. Los cordones posteriores están totalmente separados por el tabique medio posterior, que va desde el surco mediano posterior hasta la comisura gris posterior.

Las proporciones de la *sustancia blanca* son diferentes para cada segmento de la médula espinal, por lo que a nivel de los segmentos cervicales está presente en mayor proporción debido a la presencia de cilindros² tanto ascendentes como descendentes de todos los segmentos medulares por el contrario, a nivel de segmentos sacros esta proporción está disminuida (Ojeda y Ricardo, 2004).

1) Hemimédula: Es la mitad derecha o izquierda de la médula espinal, obtenida en un corte sagital.

2) Cilindroejes: Prolongación de una célula nerviosa que constituye la parte esencial para la transmisión del impulso nervioso

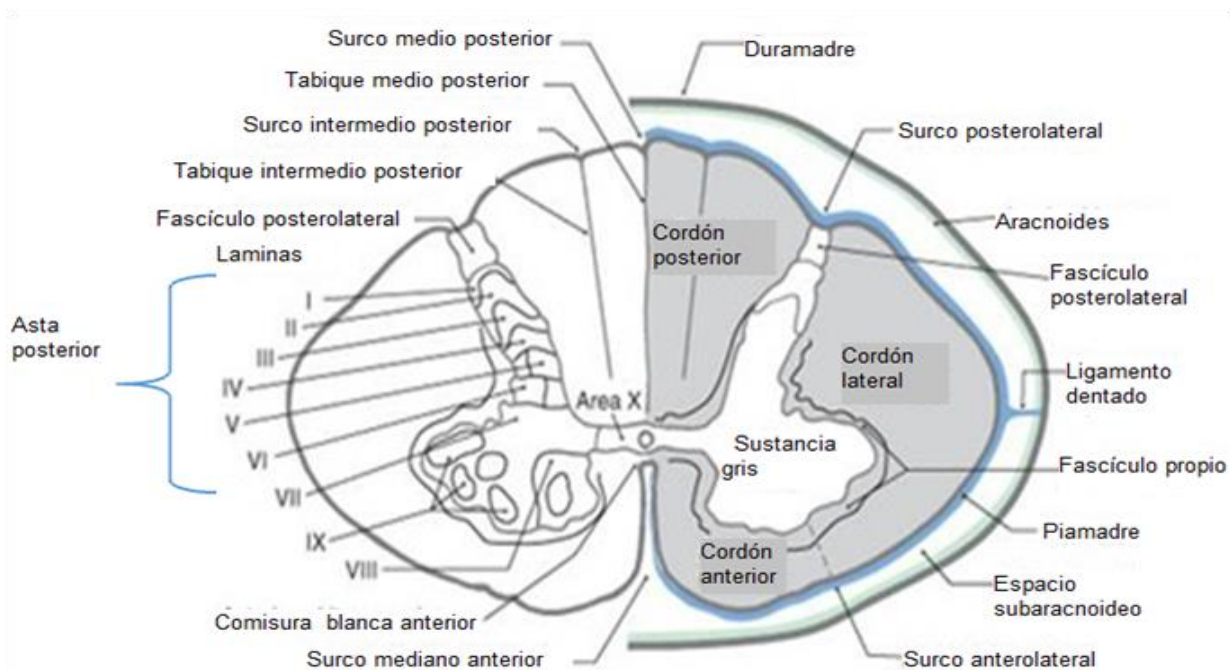


Figura 2. Esquema del segmento espinal C7. Muestra la organización básica de la sustancia gris y blanca y de las meninges (estas últimas ilustradas sólo en el lado derecho). En el lado izquierdo está representada la distribución de las láminas de la sustancia gris (Láminas de Rexed), (C7= segmento cervical 7) (Modificado de Heines, 2006).

La *sustancia gris* está conformada por dos elementos principales: las células nerviosas y una red formada por fibrillas nerviosas. En la *sustancia gris*, los tipos celulares nerviosos son variados y abundantes; la dimensión de su diámetro oscila entre los 18 mm a los 135 mm. Presenta una distribución en forma de “H” o “mariposa”, lo cual permite dividirla en: la comisura gris y ramas laterales (Figura 2).

1) La comisura gris es la rama horizontal de la “H”, que presenta en su zona central el conducto central del epéndimo

2) Las ramas laterales de la “H” están subdivididas, en dirección rostro-caudal, en un *asta anterior* (más corta y gruesa), *asta lateral* (región intermedia más desarrollada en los segmentos torácicos) y un *asta posterior* (más larga y delgada respecto a la otra). (Figura 2 y 2.1).

Los cuerpos de las células nerviosas están dispuestos en diferentes zonas de las astas de la médula espinal, por las cuales la información asciende por conexiones intersegmentales.

En el asta anterior se encuentran núcleos de motoneuronas, la disposición de estos núcleos sigue un patrón somatotópico de manera que: los núcleos dispuestos medialmente inervan la musculatura axial (cuello y espalda) y los dispuestos lateralmente se encargan de los músculos distales de las extremidades; además aquellos dispuestos dorsalmente se encargan de los músculos flexores y los dispuestos ventralmente de los músculos extensores (Noback, 2005a).

En la región intermedia están ubicados tres núcleos, que no están distribuidos a lo largo de la médula espinal: la columna intermediolateral, el núcleo parasimpático y la columna torácica (Figura 2.1).

- 1) *Columna intermediolateral*: está localizada entre la vértebra torácica número uno y la lumbar uno (T1-L1) y forma el asta lateral. Está formada por neuronas preganglionares pertenecientes al sistema nervioso vegetativo simpático.
- 2) *Núcleo parasimpático sacro*: comprende el espacio encontrado entre las vértebras sacras dos y cuatro (S2 - S4). Está formado por neuronas preganglionares pertenecientes al sistema nervioso vegetativo parasimpático.
- 3) *Columna torácica o núcleo torácico de Stilling Clarke* localizado en la superficie medial de la sustancia gris, próxima a la base del asta posterior, comprende el espacio encontrado entre la vértebra cervical siete y la lumbar dos (C7 - L2), y está relacionada funcionalmente con el cerebelo. (Figura 2.1)

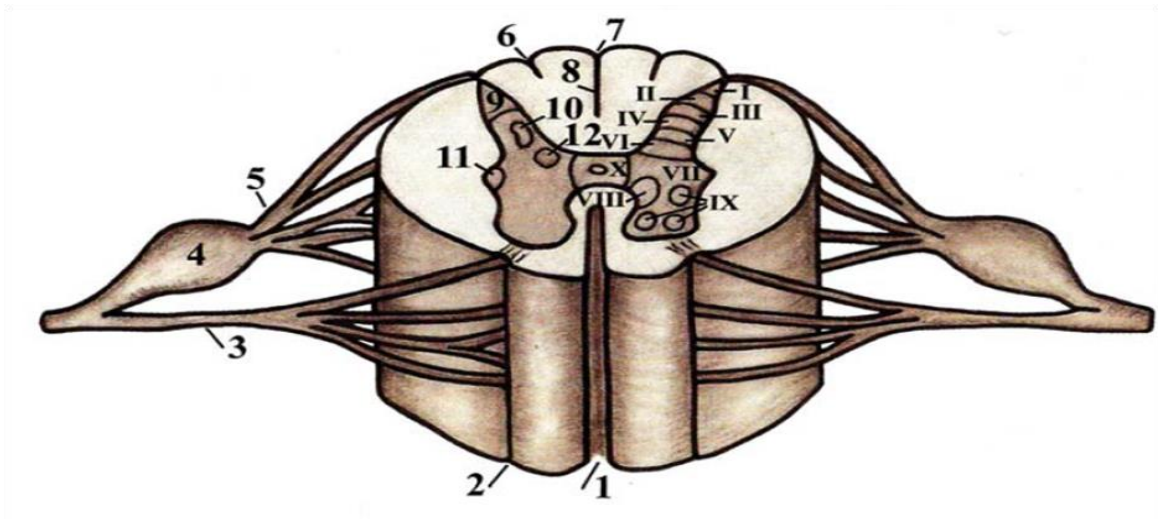


Figura 2.1 Visión anterior de un segmento medular. En la mitad izquierda de sustancia gris están representadas las láminas de Rexed, mientras que en la mitad derecha están representados los núcleos. 1. Fisura media anterior, 2. Surco anterolateral, 3. Raíz Anterior, 4. Ganglio espinal, 5. Raíz posterior, 6. Surco posterolateral, 7. Surco medio posterior, 8. Tabique medio posterior, 9. Sustancia gelatinosa, 10. Núcleo sensitivo propio, 11. Columna intermedio lateral, 12. Columna Torácica (C8-L3 (Modificado de Heines, 2006).

Finalmente, el asta posterior es la región que se encarga principalmente del procesamiento de información somatosensorial que se produce en la médula espinal. En esta región existen numerosos tipos neuronales que se pueden caracterizar basándose en su morfología (ver Willis y Coggeshall, 2004) y en sus propiedades electrofisiológicas (Russo y Hounsgaard, 1999).

A continuación su clasificación con base en el rango de intensidad de estímulos a los que responden: neuronas de bajo umbral, neuronas de amplio rango dinámico y neuronas nociceptivas específicas.

1) *Neuronas de bajo umbral*: tipo de neuronas que se excitan sólo por estímulos de baja intensidad conducidos por fibras gruesas mielinizadas. Los órganos receptores para estas son los propioceptores (Handwerker y cols, 1975).

2) *Neuronas de amplio rango dinámico*: Son las neuronas que se excitan por estímulos de baja intensidad conducidos por fibras gruesas mielinizadas y de alta intensidad conducidos por fibras amielínicas. Los órganos receptores para estas son mecánicos y nociceptores (Handwerker y cols, 1975).

3) *Neuronas nociceptivas específicas*: Esta clase de neuronas dorsales fue incluida por Cervero y colaboradores (1976) ampliando la terminología utilizada por Handwerker y colaboradores (1975). Este tipo de neuronas solo se excita por estímulos de alta intensidad (nocivos) conducidos por fibras aferentes finas. Las neuronas de esta clase a su vez se subdividen en 3a y 3b.

Las 3a reciben información de nociceptores mecánicos $A\delta$ y no responden a estímulos térmicos nocivos. Las 3b son excitadas por fibras $A\delta$ y C respondiendo a estímulos térmicos y mecánicos nocivos.

1.2.1 CITOARQUITECTURA DE LA MÉDULA ESPINAL

Al inicio de la segunda mitad del siglo XX, Bror Rexed utilizando la técnica de Nissl, descubrió un patrón citoarquitectónico basado en forma y organización de las neuronas de la médula espinal del gato, lo cual le permitió dividir la sustancia gris en una serie de 10 láminas (I - X) que enumeró en sentido dorso-ventral, denominadas láminas de Rexed (Rexed, 1952 y 1954; Armengol 1998) (Figura 3).

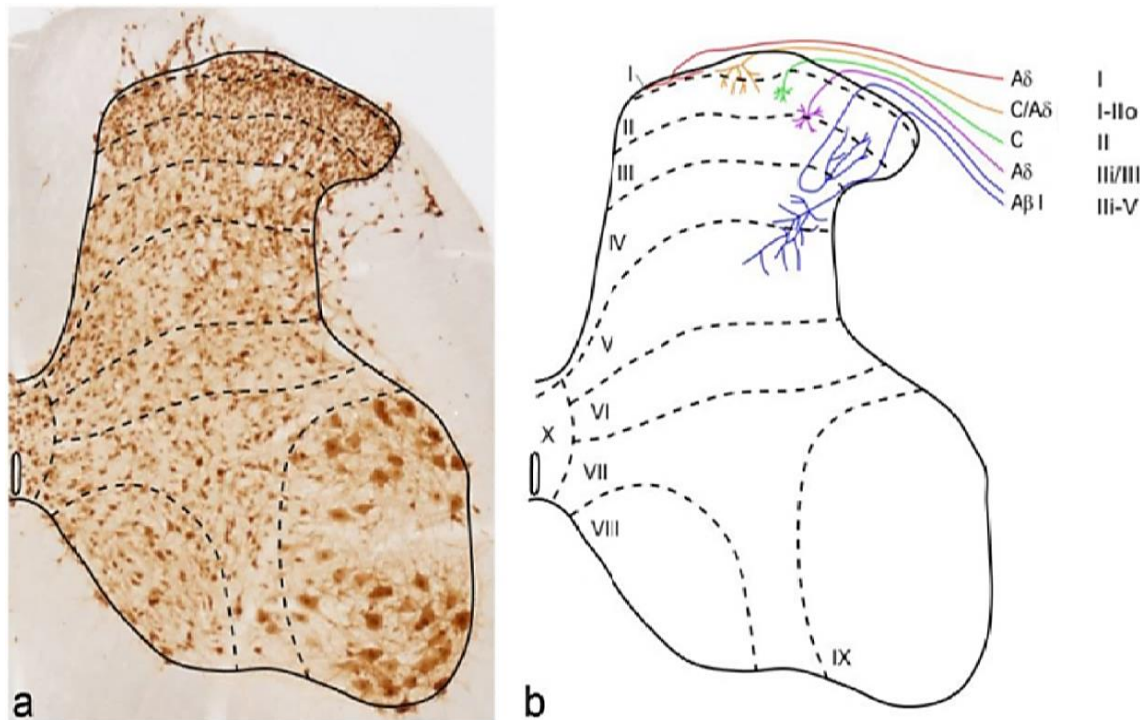


Figura 3. Organización laminar del asta dorsal y entrada de aferentes primarias. Rexed divide la materia gris del asta dorsal gato en una serie de láminas paralelas basado en variaciones en el tamaño y la densidad de embalaje de las neuronas, y este esquema ya se ha aplicado a otras especies. **A** Es una sección transversal de zona lumbar de la médula espinal en rata. Los límites Laminares se indican mediante las líneas de trazos. **B** Presenta la entrada de aferentes primarias en el asta dorsal de forma ordenada: un patrón de terminación laminar basado en el diámetro y la función de la fibra se superpone a una distribución somatotópica que determina la ubicación mediolateral y rostro caudal. Se muestran las terminaciones centrales de los principales tipos de aferentes primarios (excluyendo propioceptores). (Tomada de Andrew J. Todd, 2010).

De acuerdo a su disposición:

El asta posterior está compuesta por las láminas I a VI, siendo la estructura más evidente la lámina II (*sustancia gelatinosa de Rolando*), situándose detrás de ésta y, a modo de capuchón, la lámina I (*núcleo marginal o capa zonal de Waldeyer*) ambas reciben estimulación nociceptiva. No obstante, se denomina lámina marginal a las láminas I, II, III y IV. Las cuales reciben información exteroceptiva (dolor, temperatura, tacto y presión). (Figura 3 y3.1).

Las láminas III a VI están dispuestas por dentro de la sustancia gelatinosa, una a continuación de la otra. Las láminas III y IV se denominan: *núcleo propio del asta posterior*, y están conformadas por células que tienen dendritas complejas y recibe estímulos de tipo propioceptivo y de tacto ligero (Figura 2.1 y 3).

La base del asta posterior está formada por las láminas V y VI. Éstas reciben información propioceptiva de estructuras derivadas del mesodermo (huesos, músculos, articulaciones, ligamentos); así como, información relacionada con la posición, movimiento y equilibrio del cuerpo. Es importante recordar que la lámina V detecta estímulos mecánicos muy fuertes y que la lámina VI es más evidente en engrosamientos medulares.

La zona intermedia con funciones principalmente vegetativa está formada por la lámina VII y X (zona que rodea el canal central), está se extiende desde la región del conducto espinal hasta el borde lateral de la sustancia gris. Posee conexiones con el cerebelo y con el mesencéfalo.

El asta anterior está relacionada con las láminas VIII y IX y conformada por células pequeñas que son tanto interneuronas como células de proyección. Y en conjunto con la lámina VIII detecta estímulos musculares dolorosos y estímulos mecánicos inocuos. Además, la lámina IX y una porción de la VIII están conformadas por motoneuronas, cuyos axones inervan directamente a los músculos esqueléticos, lo cual está íntimamente relacionado con la actividad motora.

1.2.2 LÁMINAS DE REXED

1.2.2.1 LÁMINA I (ZONA MARGINAL)

Se encuentra localizada en la punta del asta dorsal, presenta células de distribución y tamaño variable. Gobel (1978a) identificó cuatro tipos de células caracterizadas por su forma, árbol dendrítico y densidad espinal. Estas células son fusiformes, multipolares y piramidales, y para algunos autores también habría células aplanadas. La célula Waldeyer es más típica, larga, fusiforme, con forma de disco y de dominio dendrítico (Waldeyer H. y cols 1888; Schoenen J.1982a).

Además, enfatizó sobre la orientación tangencial de esas neuronas con sus dendritas confinadas a la misma lámina. (Ramón y Cajal, 1909; Scheibel y Scheibel, 1968; Waldeyer, 1888) Según Han y colaboradores (1998) las células fusiformes serían nociceptivas específicas, las piramidales (de mediano tamaño) termorreceptoras específicas y las multipolares serían polimodales o bien nociceptivas específicas.

Esta recibe axones aferentes de los nociceptores periféricos, sobre todo fibras C y A δ (Cervero e Iggo, 1980; Lynn y Hunt, 1984). Siendo nociceptores cutáneos (fibras de tipo A δ y C, relacionadas con la sensación del dolor y la temperatura) y musculares (fibras A δ llamadas fibras del grupo III en nervios musculares y de fibras C llamadas fibras del grupo IV en nervios musculares)(Figura 3). Las fibras del grupo III responden a iones potasio, bradicinina, serotonina y a contracciones sostenidas del músculo. Las fibras del grupo IV responden a estímulos como presión, calor e isquemia muscular. Sus neuronas proyectan principalmente al tálamo y al tronco del encéfalo.

1.2.2.2 LÁMINA II (SUSTANCIA GELATINOSA)

Esta lámina contiene pequeñas células fusiformes y de alta densidad (Rolando, 1824), que son fundamentales en el procesamiento de la nocicepción. Además de presentar mayor cantidad de fibras no mielinizadas (Figura 3.1).

Gobel subdivide esta lámina en una porción interna (Ili) que recibe aferencias no nociceptivas y otra externa (Ile) a la que llegan aferencias nociceptivas A δ y C.

Entre sus poblaciones celulares destacan dos tipos de células: células de tallo y células islote (Gobel ,1978). Las células de tallo son neuronas de mediano tamaño, de carácter excitatorio y de tipo nociceptivo específico. Se caracteriza por presentar ramificaciones dendríticas en forma de cono que va desde el cuerpo celular y pasa ventralmente a través de la lámina II-IV. Células islote contienen *GABA* y son consideradas neuronas inhibitorias, localizadas en la unión entre la lámina I y II. El árbol dendrítico de las células islote se extiende desde el grosor de la lámina II y son orientadas en el plano rostro caudal.

Esta lámina fue definida por Szentágothai en 1964 como un sistema cerrado que influye en las neuronas de proyección de otras láminas.

1.2.2.3 LÁMINA III

Esta lámina junto con la lámina IV reciben el nombre de *núcleo propio del asta posterior* y se distingue de la lámina anterior por una baja densidad neuronal, la presencia de células de tamaño intermedio: células antena, células radiales y una cantidad moderada de fibras mielinizadas (mieloarquitectura) lo que la distingue de las láminas más superficiales. Las células de esta lámina poseen campos dendríticos complejos y muchas de estas contienen neurotransmisores inhibitorios: *GABA* o *glicina* (Todd, 1990) (Figura 3.2 y 4).

Sobre esta lámina, finalizan aferentes primarias (mielinizadas) de: 1) *Corpúsculos de Pacini* (sus axones se bifurcan entrando a la médula espinal, viajando en dirección cráneo-caudal a la materia gris espinal), 2) *Mecanorreceptores rápidamente adaptables* (sus axones se bifurcan entrando a la médula espinal y sus colaterales se distribuyen en la parte medial del asta dorsal (Brown, 1980)), 3) *Mecanorreceptores lentamente adaptables tipo I* (sus fibras se bifurcan entrando a la médula espinal, sus colaterales forman terminaciones globulares en regiones que se extienden a través de las láminas III-V) y 4) *Mecanorreceptores lentamente adaptables tipo II* (sus fibras se bifurcan y sus colaterales terminan en las láminas III-VI).

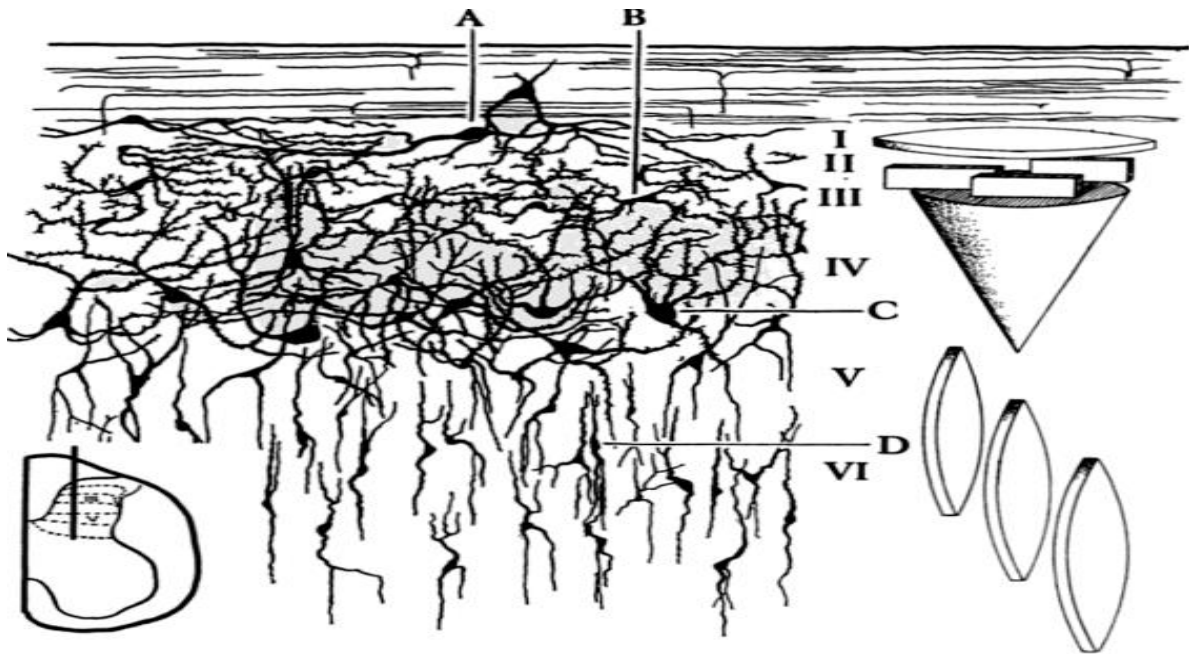


Figura 4. Representación de los árboles dendríticos de células del asta dorsal de la ME. A células marginales B células tallo y células islote, C interneuronas y células del tracto espinocervical, D células postsinápticas de las columnas dorsales. Los números I –VI corresponden a las láminas de Rexed del asta dorsal de la médula espinal. (Tomado de Mecanismos sensoriales de la médula espinal. Willis y Coggeshall, 1991).

1.2.2.4 LÁMINA IV

Esta lámina es caracterizada por una alta concentración de fibras mielinizadas. Por lo que presenta entradas directas de gran cantidad de axones de aferentes primarias, estos axones forman un plexo longitudinal y proyectan: al tálamo, al núcleo cervical lateral y a los núcleos de las columnas dorsales.

Recibe fibras $A\alpha$, $A\beta$ y sus neuronas responden a estímulos mecánicos ligeros como el tacto. Algunas de ellas responden a estímulos nociceptivos transmitidos por fibras $A\delta$ y C.

Además, contiene una variedad de células antena y las llamadas células transversas tanto en hombres como en gatos (Brown, 1981; Schoenen J. ,1982^a). Las células antena se caracterizan por la presencia de árboles dendríticos que llegan a las láminas I y II. Los contactos sinápticos son hechos sobre los cuerpos celulares de las neuronas del asta dorsal, muchas de estas fibras pueden ser ramificaciones terminales de grandes fibras aferentes (gruesas) primarias mielinizadas. Los axones

de estas neuronas forman parte de las columnas dorsales y del tracto espinotalámico.

Una vez descritas las láminas I-III de Rexed, cabe resaltar la marcada diferencia en la concentración de fibras mielinizadas previendo así una base para definir el límite preciso entre estas láminas de la médula espinal. Un claro ejemplo es la clara diferencia entre lámina II y III (Molander y cols., 1984; Ralston, 1979; Rexed, 1964; Snyder, 1982). (Figura 3.1)

1.2.2.5 LÁMINA V

Es fácilmente diferenciable de la lámina IV, por su menor contenido de fibras mielinizadas. Presenta neuronas aún más heterogéneas que las presentes en la lámina anterior mismas que responden a estímulos cutáneos tanto nocivos como no nocivos. En su porción medial contienen células fusiformes y células triangulares así como fibras fuertemente mielinizadas.

Se han descrito las siguientes células: 1) *Neuronas multireceptivas o clase 2*, son más grandes y con las dendritas extendiéndose en todas direcciones, 2) *Neuronas que responden sólo a estimulación nociva*, son más pequeñas y con dendritas en todas direcciones, 3) *Neuronas que responden sólo a estímulos inocuos*, son aún más pequeñas y con campos dendríticos menos extensos.

Además, reciben fibras tipo III y IV de músculo esquelético, articulaciones y vísceras. Estas neuronas proyectan al tálamo, núcleos de las columnas dorsales, núcleo cervical lateral y otros destinos dentro de la médula espinal. Su porción lateral no está claramente separada del funículo dorsolateral. Esta parte corresponde a la formación reticular en el tronco encefálico y consiste de neuronas multipolares de tamaño medio (Figura 3.2).

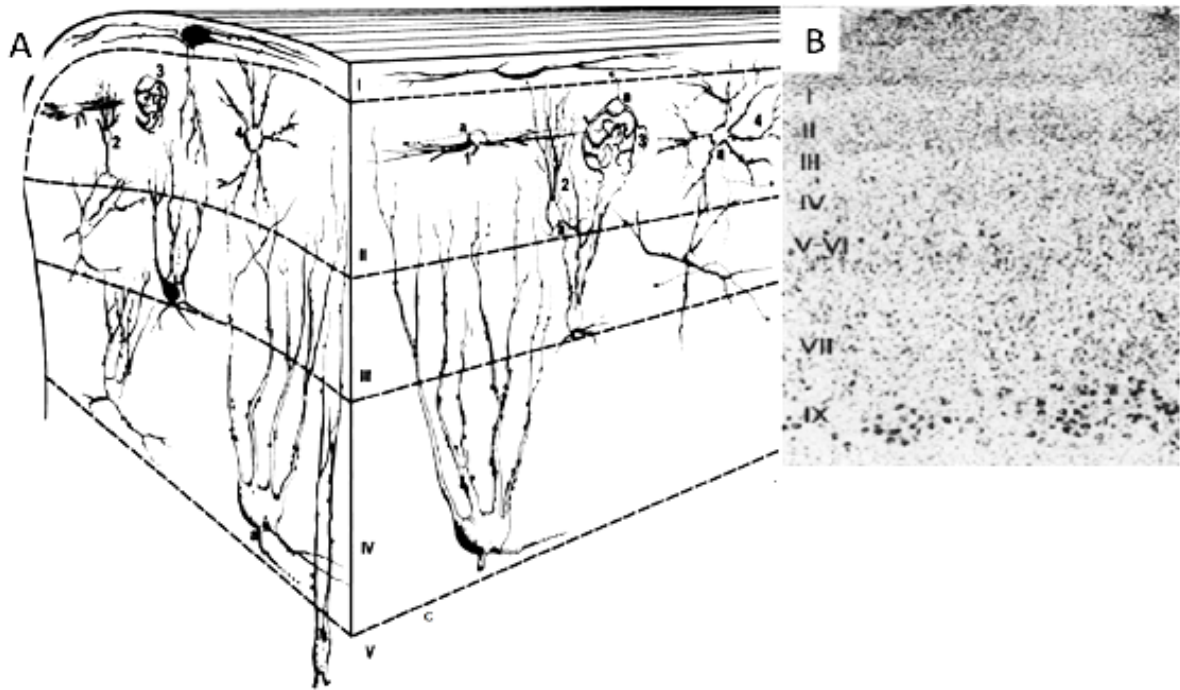


Figura 3.2 Representación de la citoarquitectura de la ME. A) Ubicación de las células que conforman a las láminas de Rexed, B) localización de las neuronas identificadas en sección transversal y sagital del asta dorsal de la médula espinal de humano con tinción de golgi. 1, células islote; 2, células filamentosas; 3, células rizadas; 4, células estrella; a, axón. (Modificado de Mecanismos sensoriales de la médula espinal. Willis y Coggeshall, 1991)

1.2.2.6 LÁMINA VI

Esta lámina es más evidente en los engrosamientos cervical y lumbar. Las células de esta capa se organizan de un modo similar a las de lámina V por lo que presentan una citoarquitectura muy similar. Estas neuronas tienen prolongaciones dendríticas muy extensas orientadas dorso ventralmente.

Estas células reciben información de diversas zonas del asta dorsal, pero no de láminas superficiales y de fibras aferentes finas. En esta capa terminan muchas colaterales de axones de aferentes primarias que van hacia el asta ventral, sobre

todo fibras de tipo *1a*. Las proyecciones de las neuronas de esta lámina probablemente llegan al tálamo o al núcleo cervical lateral. Contiene la misma cantidad de fibras mielinizadas que la lámina V, por lo que son poco diferenciables.

1.2.2.7 LÁMINA VII

Esta lámina está formada por una población homogénea de neuronas multipolares de mediano tamaño. Contiene algunos núcleos bien definidos como: núcleo intermedio lateral (T1-L1, medialmente) y el núcleo dorsal de Clarke (T1-L2, lateralmente) del cual surge el tracto espinocerebeloso posterior y núcleo intermedio lateral además de enviar información de la actividad motora al cerebelo.

1.2.2.8 LÁMINA VIII

Esta contiene una variedad de neuronas con árboles dendríticos polarizados orientados dorso ventralmente. No presentan dendritas longitudinales y tiene una mieloarquitectura similar a la lámina VII.

1.2.2.9 LÁMINA IX

Presenta una baja concentración de fibras mielinizadas en comparación con las láminas VII y VIII. Se encarga de las eferencias motoras y en ella se encuentran las neuronas motoras alpha que inervan las fibras musculares extrafusales encargadas del acto motor y las neuronas motoras gamma que inervan las fibras musculares intrafusales importantes en el mantenimiento del tono y la postura.

1.2.3.0 LÁMINA X

Se dispone alrededor del canal espinal central y corresponde a la sustancia gris que lo rodea, presenta dos tipos de células de acuerdo a su localización sobre esta. En la porción más dorsal presenta células bipolares con árbol dendrítico en forma de abanico y en la porción más ventral presenta células bipolares con dendritas longitudinales poco ramificadas.

1.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN SENSORIAL EN LA MÉDULA ESPINAL

El origen de la información sensorial se asocia con la activación de los receptores periféricos, los cuales generan información que es transmitida a la médula espinal por las fibras aferentes primarias y a centros superiores por vías ascendentes espinales. Dicha información llega a centros superiores y circuitos propioespinales, desde los cuales será transmitida a los músculos a través de las fibras eferentes, a este proceso se le denominó *mecanismo de transmisión segmental*. Esto es importante ya que en los segmentos lumbares se integra información procedente de las extremidades posteriores de los animales, generando reflejos monosinápticos o polisinápticos.

1.3.1 FIBRAS AFERENTES PRIMARIAS

Las fibras aferentes son axones mielínicos o amielínicos de neuronas sensoriales (neuronas del ganglio de raíz dorsal) y forman parte de los nervios periféricos (Willis y Coggeshall, 1991). Estas comienzan en los receptores periféricos y presentan diferentes diámetros, lo cual les confiere velocidades de conducción distintas (Figura 4.1). Son fibras encargadas de la transmisión del estímulo codificado hacia el SNC (Figura 4).

Además, se clasifican por su localización, según se encuentren en piel, músculos o articulaciones (Willis y Coggeshall, 1991; Cervero, 1994). Las fibras aferentes viscerales, de articulaciones y de músculo, proyectan sólo a la lámina I, mientras que las fibras aferentes cutáneas no mielinizadas de nociceptores, termorreceptores, y mecanorreceptores sensitivos proyectan a la lámina II.

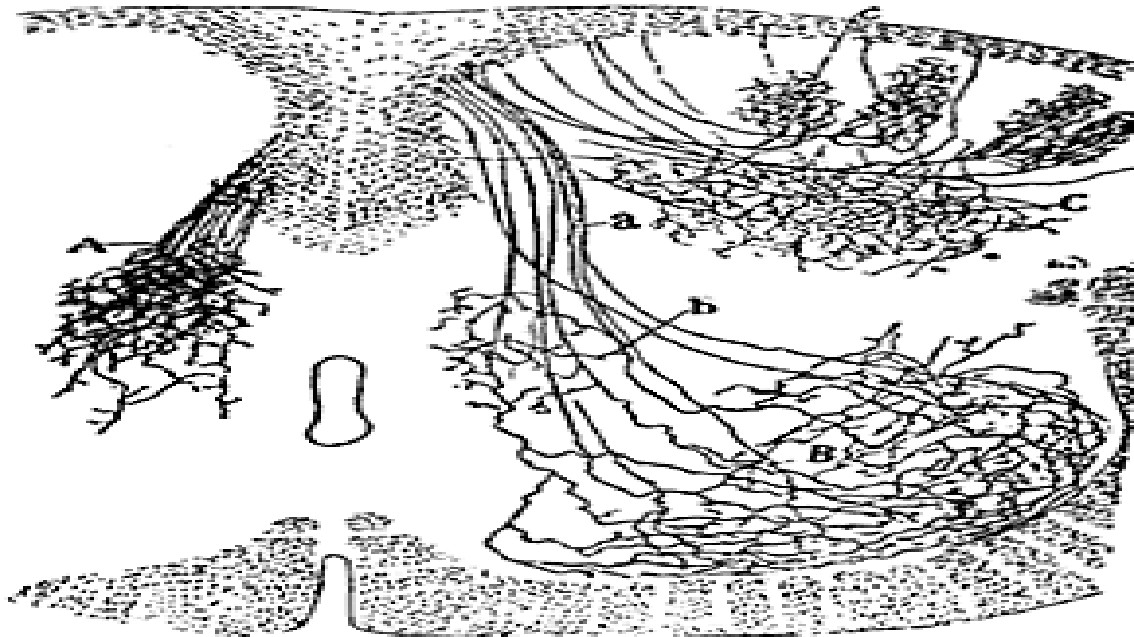


Figura 4. Sección de la médula espinal que presenta la distribución intramedular de las aferentes primarias: Derecha a) fibras aferentes de la sustancia gris, b) distribución hacia el asta dorsal y a la sustancia gelatinosa de Rolando. c) colaterales al núcleo intermedio de Cajal. Izquierda A) densidad de colaterales a núcleo intermedio (Cajal, histología del sistema nervioso, Paris, Maloine 1909) (Tomada de Ruch 1965).

A continuación una breve descripción (ver figura 4.1):

Las fibras aferentes de mayor calibre y más mielinizadas son fibras $A\alpha$ y $A\beta$ con un diámetro de 10-20 μm y 5-15 μm respectivamente (Erlangen y Gasser, 1937); Ambas fibras transmiten PA con una velocidad de 30-100 m/s (Boivie y Perl, 1975).

Las fibras aferentes de menor calibre y menos mielinizadas son fibras $A\delta$ con un diámetro de 2-5 μm , las cuales transmiten PA a velocidades de 4-30 m/s (Boivie y Perl, 1975).

Finalmente, las fibras aferentes de menor calibre y constituidas por axones amielínicos denominadas fibras C con un diámetro de 0.5 a 2 μm , estas transmiten PA a velocidades de entre 0.5 y 2.5 m/s (Gasser, 1950). Por otro lado, tenemos a las fibras aferentes procedentes de músculos y articulaciones, denominadas fibras tipo I con velocidad de 72- 120 m/s, fibras tipo II con velocidad 24- 71 m/s y fibras tipo III con velocidad de 6-23 m/s (Rexed y Therman, 1948; Lloyd y Chang, 1948; Hunt, 1954) y fibras tipo IV con velocidad de 2.5m/s (Stacy, 1969).

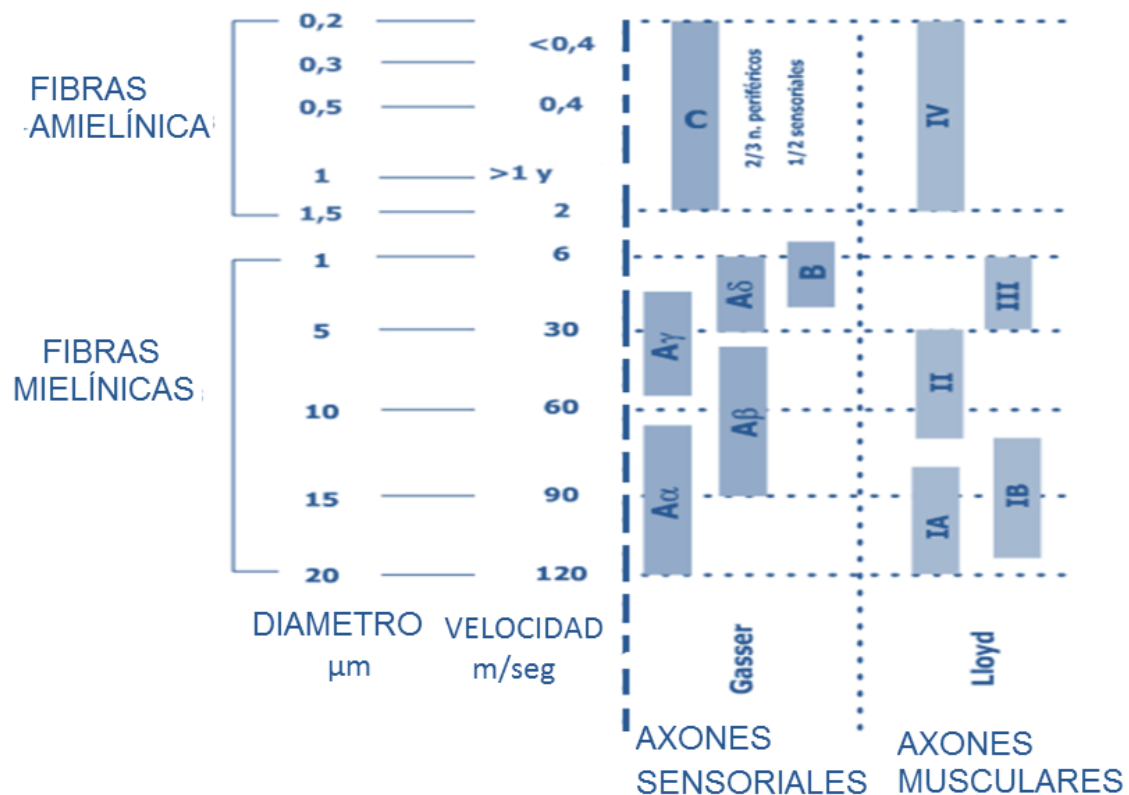


Figura 4.1 Esquema sobre características de las fibras aferentes primarias, clasificación sensorial y muscular. (Los valores han sido adaptados de Willis y Coggeshall, 2004; Rexed y Therman, 1948; Lloyd y Chang, 1948; Gasser, 1950; Hunt, 1954)

1.3.2 RECEPTORES SENSORIALES

Los sistemas sensoriales se encargan de transmitir y procesar información sobre los cambios que tienen lugar en el medio que nos rodea y en nuestro propio organismo, seguida ésta, de una respuesta adecuada al estímulo inducido. Dicho contacto con el medio externo ocurre sobre zonas específicas denominadas *campos receptivos (CR)* y a través de estructuras neuronales especializadas llamadas *receptores sensoriales (RS)*.

Los receptores sensoriales son estructuras que detectan y transforman la energía del estímulo en energía eléctrica mediante un mecanismo denominado “*transducción del estímulo*”. Mecanismo por el cual la energía de un estímulo

específico se transforma en una señal eléctrica que será transmitida por fibras aferentes primarias (FAP) del sistema nervioso central.

Se han identificado cuatro tipos principales de mecanorreceptores y con base en su ubicación se dividen en dos grupos uno de mecanorreceptores superficiales y otro de mecanorreceptores profundos. Los mecanorreceptores más superficiales son corpúsculos de Meissner y discos de Merkel localizados en la capa papilar de la dermis. Y los mecanorreceptores más profundos son los corpúsculos de Pacini y las terminales de Ruffini localizados más profundamente en la dermis y tejidos circundantes en la piel glabra del primate (Darian-Smith 1984) (Figura 5 y 7) (ver tabla 1).

Los mecanorreceptores envían fibras colaterales aferentes a la sustancia gris de la médula espinal, estas colaterales presentan distintas distribuciones de terminación y de arborización. Dichas fibras terminan en el asta dorsal abarcando las láminas I - VI de Rexed (Fyffe, 1984).

Además, se han distinguido cuatro grupos de fibras mecanoreceptivas. Estas fibras son mielinizadas, de bajo umbral y responden a los estímulos cutáneos. Cada grupo está relacionado con las terminales receptoras anteriormente descritas tal que los grupos funcionales son: 1) Aferentes mecanoreceptivas rápidamente adaptables que inervan los corpúsculos de Meissner (AR) y a los corpúsculos de Pacini, 2) Aferentes mecanoreceptivas lentamente adaptables tipo II que inervan las terminales de Merkel y 3) Aferentes mecanoreceptivas lentamente adaptables tipo I que inervan terminales de Ruffini (Darian-Smith y Kenins, 1980).

1.3.2.1 CORPÚSCULOS DE MEISSNER

Es un receptor encapsulado que se adapta rápidamente, está acoplado mecánicamente al borde de las rugosidades de la piel glabra lo cual le confiere la sensibilidad mecánica fina. Su cápsula es incompleta y ocupa la porción basal del receptor, en su núcleo interno posee células de Schwann y terminales nerviosas. La terminal nerviosa sensorial se encuentra entrelazada entre las capas del corpúsculo (Darian-Smith, 1984). Es esencial en la percepción vibrotáctil y presenta respuesta de tipo fásica (Figura 5)(Tabla 1).

1.3.2.2 DISCO DE MERKEL

Es un receptor en forma de “disco” que se adapta lentamente. Cada disco es una célula epitelial que rodea una estructura parcialmente rígida que transmite la tensión de compresión desde la piel a la terminal sensorial, provocando respuestas de tipo tónico. Estos discos se encuentran en grupo y localizados en los centros de las rugosidades de la piel (Gardner y cols., 2000) (Figura 5) (Tabla 1).

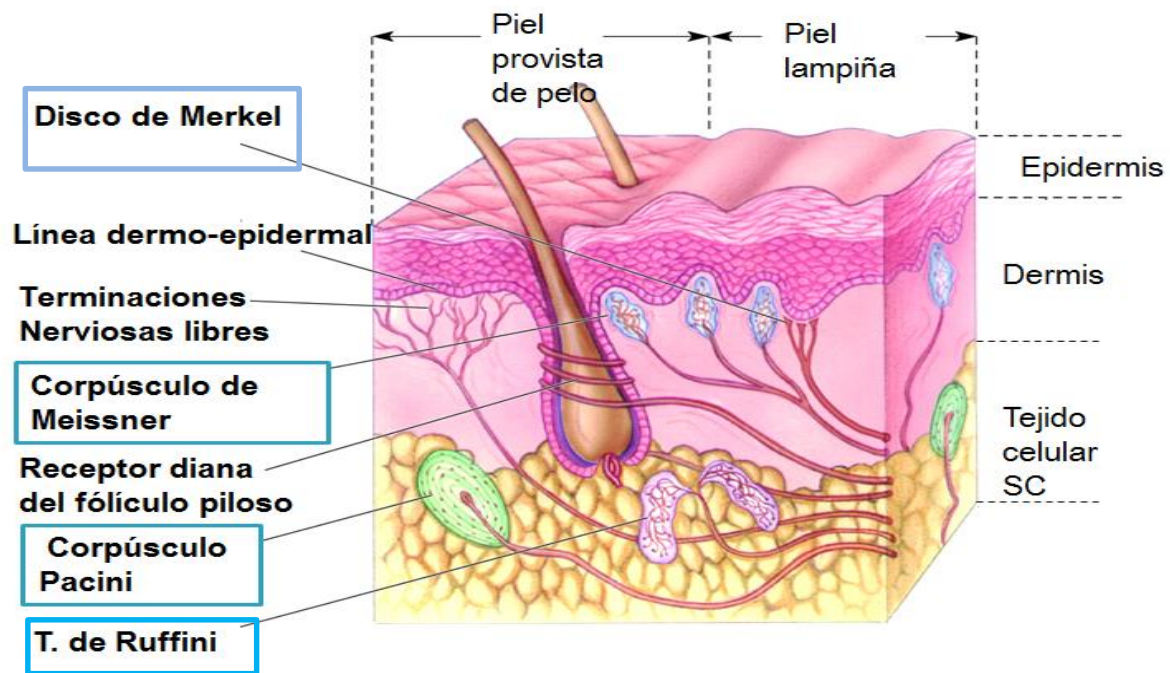


Figura 5. Localización de varios tipos de mecanorreceptores de la piel con pelo y la piel glabra. Los receptores son localizados en la superficie de la piel, dermis y epidermis. Los receptores de la piel glabra son los corpúsculos de Meissner localizados en la papila dérmica. Los discos de Merkel están localizados entre las papilas dérmicas y las terminales nerviosas desnudas. Los corpúsculos de Pacini y terminaciones de Ruffini se encuentran localizados en tejido celular subcutáneo (Tomado de Cervero, 1994).

1.3.2.3 CORPÚSCULO DE PACINI

Mecanorreceptor más grandes y encapsulado, su cápsula es gruesa multilaminada (20 a 70 capas) lo cual le permite detectar vibraciones que ocurren incluso a varios centímetros de distancia. Presenta un espacio intracapsular y células de Schwann con una terminal central amielínica.

Localizado en la profundidad del tejido subcutáneo. Funcionalmente es un mecanorreceptor de adaptación rápida capaz de percibir frecuencias altas de estímulo sinusoidal. (Diamond , 1958; Mouncastle y cols., 1972) (Figura 5) (Tabla 1).

Las terminaciones arborizadas de las fibras que inervan los corpúsculos de Pacini terminan en dos zonas distintas del asta dorsal .De esta manera algunas de las colaterales pasan a través de las láminas I y II o bien, ingresan directamente al borde medial de la lámina III, para ramificarse ampliamente en las láminas III y IV (Brown y Fuchs, 1975) donde se ha observado que se encuentran sus botones sinápticos (Egger y Cols., 1981).

1.3.2.4 TERMINALES RUFFINI

Son receptores lentamente adaptables que unen el tejido subcutáneo con pliegues en la piel. Estos receptores detectan el estiramiento de la piel y brindan información de la forma de los objetos (Gardner y cols., 2000)(Figura 5) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales mecanorreceptores involucrados en la percepción vibrotáctil y sus propiedades (Modificada de Malamud, 2014).

Canales	Área de contacto (0.008 cm ²)	Área de contacto (2.9 cm ²)	Fibras y Mecanorreceptor	Malamud 2014
Canales pacini (P)	-	>64 Hz** > 40*	PC→ corpúsculos de Pacini	60-400 Hz
Canales no pacini tipo I (NPI)	2-100 Hz *	2- 64 Hz *** 2-40 Hz*	RA→ corpúsculos de Meissner	10-50 Hz
Canales no pacini tipo II (NPII)	>100 Hz *	-	SA II →discos de Merkel	5-10 Hz
Canales no pacini tipo III (NPIII)	0,4 – 2 Hz * 0,4 – 8 Hz **	0,4 – 2 Hz * 0,4 – 8 Hz **	SAI →terminación Ruffini	< 5 Hz

RA: Adaptación rápida
SA II: Adaptación lenta tipo II
SA I: Adaptación lenta tipo I

(Gescheider, Bolanowski & Verrillo ,2003*;
Johansson, Landstrom & Lundstrom, 1981**; Iggo-Ogawa, 1976 ***)

1.3.3 CAMPO RECEPTIVO

El campo receptivo (CR) es la región cutánea desde la cual una neurona sensorial puede ser activada, su tamaño está determinado por la ubicación de sus ramas axonales provenientes de neuronas sensoriales.

Hillman y Wall (1969) determinaron que los campos receptivos (CR) de las células localizadas en la lámina V del asta dorsal de la médula espinal en gato están conformados por tres zonas concéntricas. La zona uno es la región central, la zona dos es la región media y la zona tres es la región más periférica. La zona uno es el campo receptivo excitatorio. Por el contrario, las zonas dos y tres, son la región inhibitoria. Otros hallazgos sugieren que neuronas del asta dorsal de la médula espinal (*láminas III-VI*) con actividad espontánea poseen campos receptivos mayores y una gran sensibilidad a la estimulación selectiva de receptores de la piel (Brown y cols., 1973; Brown y Fyffe, 1981). Además cada receptor sensorial presenta un CR específico. (Figura 6 y 7).

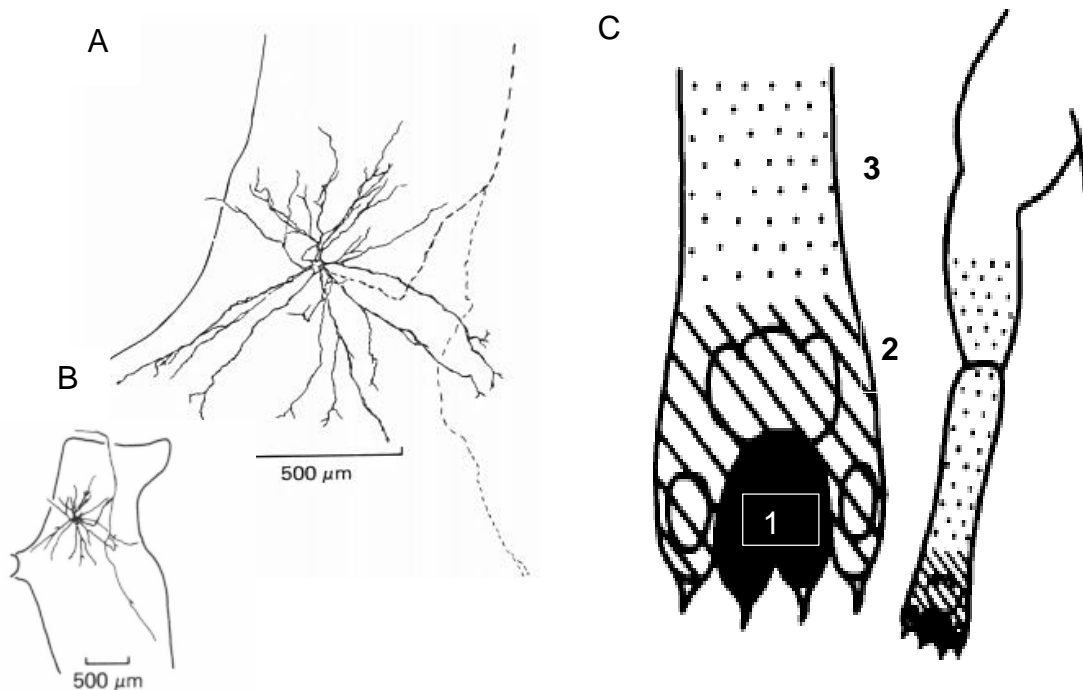


Figura 6. Representación del campo receptivo sobre la piel glabra del gato. A Neurona del asta dorsal localizada en la parte medial de la lámina V, presenta un árbol dendrítico radiado que delimita el tamaño del CR en la piel glabra del gato. B Sus dendritas van hacia el borde medial del canal central del asta dorsal. C Es la localización del CR sobre la piel glabra del gato. Incluye las zonas del CR, en zona 1 las células responden a estímulos nocivos e inoivos y produce una excitación. En zona 2 las células solamente responden a un estímulo nocivo. El estímulo inoivo en zona 2 y 3 produce una inhibición. (Modificada de Brown y Fyffe, 1981).

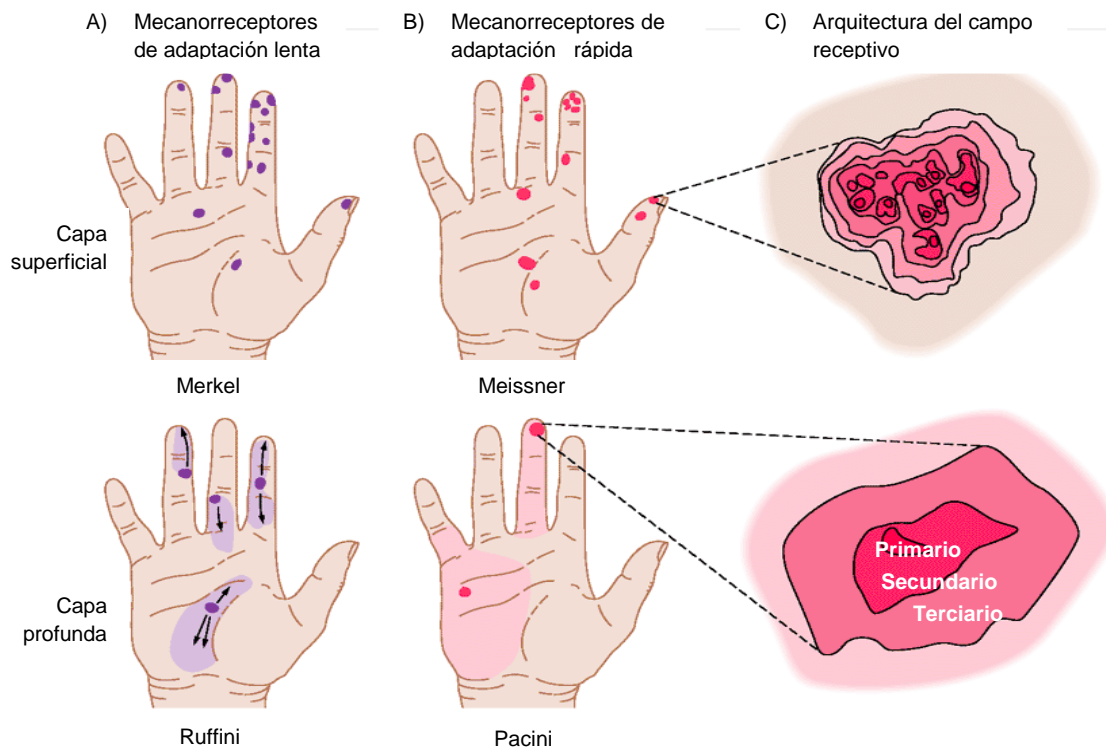


Figura 7. Representación de campos receptivos en piel glabra de la mano. Estos varían tamaño y estructura de acuerdo al mecanorreceptor. Cada área de color en las manos indica que el campo receptivo de una fibra nerviosa sensorial es diferente en el nervio mediano humano. (Modificado de Johansson y Vallbo 1983).

1.3.4 ADAPTACIÓN SENSORIAL

Adaptación es una disminución en la frecuencia de descarga de un receptor mientras el estímulo es inmutable (Adrian y Zotterman 1926). Esta puede ser de dos tipos: adaptación rápida (AR) y lenta (AL). Dicho proceso depende de las propiedades estructurales de la célula receptor y de las propiedades eléctricas del receptor. Demostrable mediante el registro de impulsos nerviosos en fibras provenientes de receptores específicos.

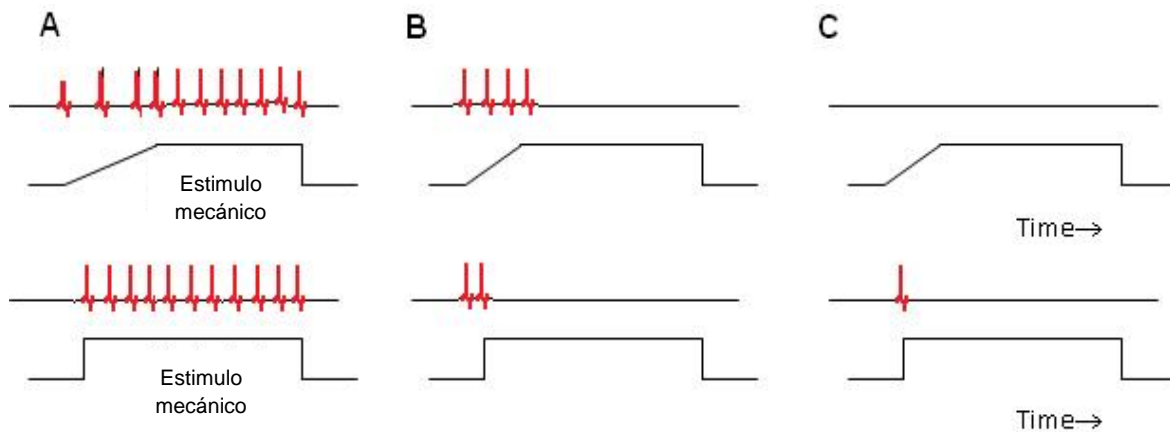


Figura 8. Tipos de adaptación. A) Representa la respuesta tónica (AL) la información se está enviando al SNC, mientras que el receptor se deforma. **B)** Respuesta fásica (AR) detecta cambios en la fuerza del estímulo y **C)** cambios muy rápidos en movimiento.

Adaptación es el término empleado para describir la respuesta de los diferentes receptores a la aplicación de un estímulo. Los receptores fueron clasificados en: receptores con respuesta tónica (adaptación lenta (AL)) y receptores con respuesta fásica (adaptación rápida (AR)).

El receptor tónico es un receptor sensorial que se adapta lentamente a un estímulo y continúa para producir potenciales de acción mientras dure el estímulo. De esta manera se transmite información durante periodos largos de tiempo.

Algunos receptores tónicos están permanentemente activos e indican un nivel de fondo. Ejemplos de tales receptores tónicos son los receptores del dolor, cápsula articular y los husos musculares, estos mantienen informado al sistema nervioso central acerca del estado del cuerpo y de su relación con medio que lo rodea.

Un receptor fásico es un receptor sensorial que se adapta rápidamente a un estímulo. La respuesta de la célula disminuye muy rápidamente y luego se detiene. No proporciona información sobre la duración de los estímulos; en cambio algunos de ellos transmiten información sobre los cambios rápidos en la intensidad del estímulo y la velocidad. En consecuencia, estos receptores se denominan de velocidad, de movimiento o receptores fásicos y tienen gran importancia en el control del movimiento de las articulaciones. Un ejemplo de un receptor fásico es el corpúsculo de Pacini.

1.4 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL

Las neuronas espinales no sólo están activas durante la locomoción o el rascado, ya que en condiciones de reposo, estas exhiben actividad eléctrica espontánea en el asta dorsal de la médula espinal. Esta actividad fue reportada por Bremer en 1941 y posteriormente Ten Cate en 1947. Ellos describieron que la actividad espontánea registrada en el electroespínograma (SEG)³ la constituían potenciales de amplitud promedio de 30 μ v. Sin embargo, fueron Gasteiger e Ichikawa (1963) y Manjarrez y colaboradores (2000) quienes caracterizaron en detalle esta actividad de grupos neuronales en el gato.

La actividad espontánea o de fondo registrada en médula espinal la constituyen los denominados potenciales espontáneos negativos (PNDMs) y ocurren en una banda de frecuencia de 2.4 a 6.5 HZ. Se ha registrado mayor actividad en la sustancia gris del asta dorsal de la médula espinal (Gasteiger e Ichikawa, 1963).

Por otro lado, la actividad eléctrica espontánea se ve influenciada en su amplitud y frecuencia por parámetros relacionados con la geometría de la población neuronal y de las vías subyacentes. Algunos parámetros son: propiedades intrínsecas neuronales, neuromoduladores y la activación sincrónica neuronal. Además, a nivel de los segmentos espinales L6-L7, la actividad de las neuronas que generan los PNDMs comparten las mismas vías funcionales que las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral. De tal manera que este grupo de neuronas son responsables de generar la variabilidad de las respuestas monosinápticas, producidas en las motoneuronas por la activación de aferentes del grupo I.

3. Electroespínograma (SEG): Registro empleado para analizar la actividad eléctrica de la médula espinal. Con este tipo de registro se han caracterizado potenciales provocados por la estimulación de entradas sensoriales a la médula espinal. El SEG se puede registrar mediante electrodos finos de plata clorurada que se insertan en la ME.

Otros tipos de registros de la actividad eléctrica intraespinal se puede obtener mediante microelectrodos que se insertan en la médula espinal. Con este método, ha sido posible obtener registros de potenciales de campo extracelulares (PCE) producidos por la estimulación de fibras aferentes cutáneas o musculares (Willis y cols., 1973);

Aunque al principio no se otorgó una significancia fisiológica a la actividad eléctrica espontánea que se registró en el asta dorsal de la médula espinal, se ha propuesto que esta podría participar en la modulación de respuestas espinales ante la aplicación de ciertos estímulos. Como la variabilidad de los reflejos espinales producto de neuronas involucradas en la generación de los PNDMs (Gasteiger y Brust-Carmona, 1968). Así como un papel funcional en el procesamiento y control de las señales sensoriales (Manjarrez y cols., 2000).

1.4.1 POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL (PNDMs).

Manjarrez y cols. (2000), propusieron que la actividad eléctrica espontánea de la médula espinal la constituían potenciales eléctricos variables de baja frecuencia y baja amplitud, que se han denominado *potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal (PNDMs)*.

Las neuronas que generan los PNDMs se localizan en el asta dorsal de la médula espinal. Se han reportado dos tipos de PNDMs: Uno con potenciales de amplitud promedio mayor a los $125 \pm 50 \mu\text{v}$ y duración de $40 \pm 10 \text{ ms}$. Y otro con potenciales de amplitud promedio menor de $25 \pm 10 \mu\text{v}$ y duración de $10 \pm 5 \text{ ms}$ (Mark y Gasteiger, 1953). Sin embargo trabajos recientes han reportado PNDMs con amplitud promedio de 50 a $150 \mu\text{v}$ y duración de 25 a 50 ms (Manjarrez y cols., 2000) (Figura 9A). Posteriormente, Gasteiger e Ichikawa (1963) calcularon los espectros de potencia de estas señales espontáneas, describiendo que los potenciales de mayor amplitud eran negativos y ocurrían en un rango de frecuencia de 2.4 a 6.5 Hz (ver Manjarrez y cols., 2000) (Figura 9B).

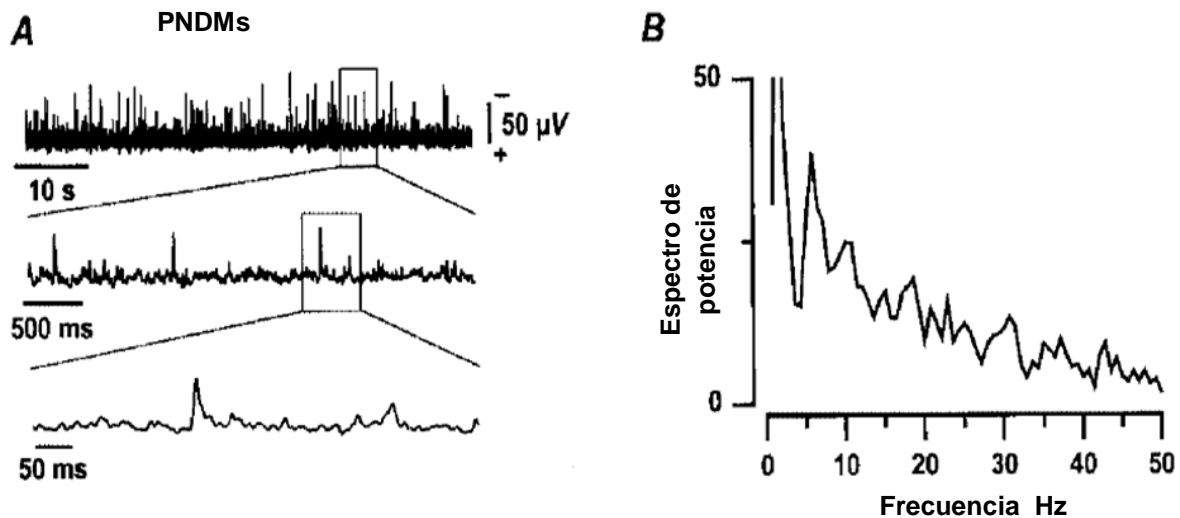


Figura 9. Actividad eléctrica espontánea registrada en el dorso de la médula espinal del gato. **A)** Registro de potenciales negativos del dorso de la ME (PNDMs) en zona lumbar (L6) con variaciones en el tiempo. **B)** Espectro de potencia promedio de señales espontáneas de 8 experimentos (Tomada de Manjarrez y cols., 2000).

Además, Levitan y cols. (1968) reportaron que los decrementos en amplitud y frecuencia presentes en la actividad espontánea del dorso de la médula espinal aparecen por estimulación de la formación reticular bulbar. Esto sugiere que las neuronas encargadas de generar los *PNDMs* estaban moduladas por vías supraespinales. Sin embargo, este decremento estaba acompañado de un incremento en la excitabilidad de las motoneuronas lumbares.

Posteriormente, un hallazgo importante fue que los *PNDMs* presentaban cambios en su amplitud cuando se realizaban espinalizaciones en el gato anestesiado (Manjarrez y cols., 1998), lo que indica claramente que las neuronas que generan los *PNDM* se encuentran sometidas a la influencia sináptica de estructuras del tallo cerebral. Estos cambios también se presentan en gatos anestesiados al estimular táctilmente la piel.

1.4.2 LOCALIZACIÓN INTRAESPINAL DE GRUPOS NEURONALES INVOLUCRADOS EN LA GENERACIÓN DE LOS POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS DEL DORSO DE LA MÉDULA ESPINAL (PNDMs)

Gasteiger e Ichikawa (1963) estudiaron la actividad espontánea de la médula espinal. Ellos realizaron experimentos en la médula espinal de gato, en la cual insertaron electrodos de plata clorurada en diferentes profundidades para explorar el comportamiento de la actividad espontánea y su ubicación. Sus resultados indicaron que el foco de máxima actividad (negatividad), ocurre entre 1000 y 1400 μm de profundidad; es decir, en la región del *nucleus proprius*, que se ubica justo por debajo de la sustancia gelatinosa de Rolando (Figura 10). En la región del núcleo propio hacen sinapsis las fibras que transmiten la sensibilidad táctil (Gasteiger e Ichikawa, 1963).

Manjarrez y colaboradores (2000) describieron la localización de neuronas involucradas en la generación de PNDMs. Ellos reportaron que los grupos neuronales responsables de generar los PNDMs se localizan en las láminas de la III a la VI de Rexed del asta dorsal, entre los segmentos lumbares L5 a L7, justo en el engrosamiento lumbar de la médula espinal. Estas neuronas modulan la transmisión sináptica de fibras aferentes a nivel segmental. Dichos resultados coinciden con los hallazgos previos.

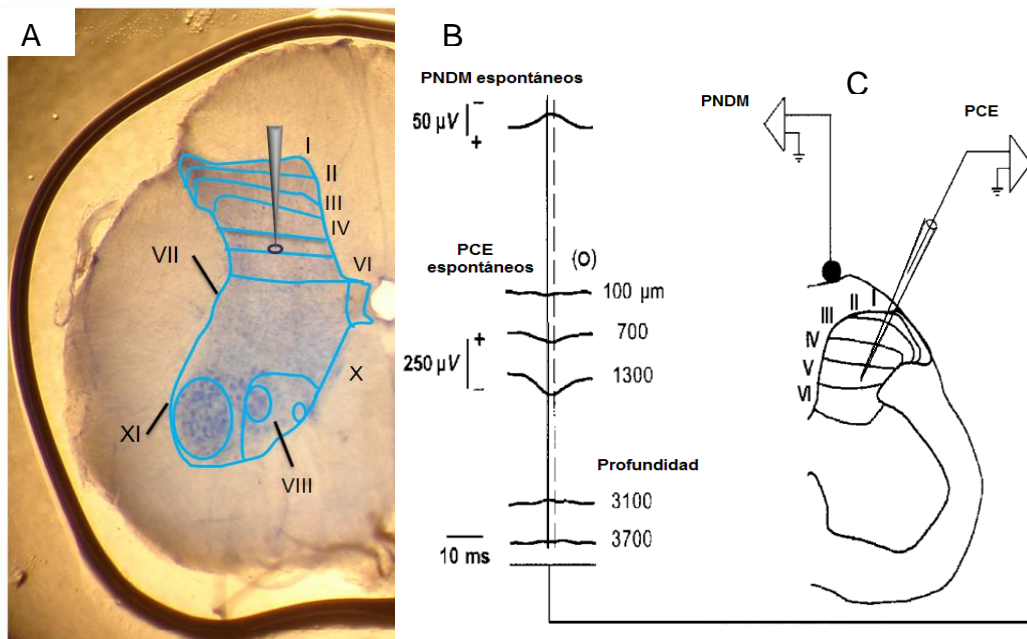


Figura 10. Distribución intraespinal PNDMs y potenciales de campo monosinápticos producidos por estimulación de aferentes cutáneos. **A)** Histología de la sexta vértebra lumbar (L6) en ME de gato, muestra la zona de registro de potenciales de máxima amplitud. **B)** PNDMs registrados en la superficie de la médula espinal a nivel L6 (izquierda). Además potenciales promedio de campo extracelulares (PCEs) espontáneos y provocados por la estimulación al nervio peroneo superficial registrados a diferentes profundidades como lo indican la flechas. **C)** PNDM registrados en el dorso de la médula provocados por estimulación al nervio cutáneo peroneo superficial (pulsos únicos, 1.2xT) (Modificado de Manjarrez y cols., 2000).

Manjarrez y colaboradores (2000) reportaron que en las láminas de Rexed de la III a VI del asta dorsal de la médula espinal, no sólo se encuentran neuronas que generan PNDMs, sino que también se localizan interneuronas que reciben entradas mono y polisinápticas de fibras aferentes cutáneas de bajo umbral (Figura 3). Estos resultados sugieren que las neuronas responsables de generar PNDMs presentan los mismos efectos obtenidos al estimular fibras aferentes cutáneas de bajo umbral. Debido a que tanto las neuronas que responden a la estimulación mecanorreceptiva, como las neuronas con actividad espontánea se encuentran en la misma zona (Willis y Coggeshall, 1991; Brown, 1981; Manjarrez y cols., 2000).

Posteriormente, en la tesis de doctorado de Rojas-Piloni (2003), se analizó la respuesta de grupos neuronales asociados a la actividad espontánea de la médula espinal ante estímulos externos. Los resultados de dicha tesis doctoral sugieren que las neuronas asociadas a los PNDMs, y sometidas a estímulos táctiles de larga duración, pueden presentar respuestas fásicas o tónicas (Figura 11).

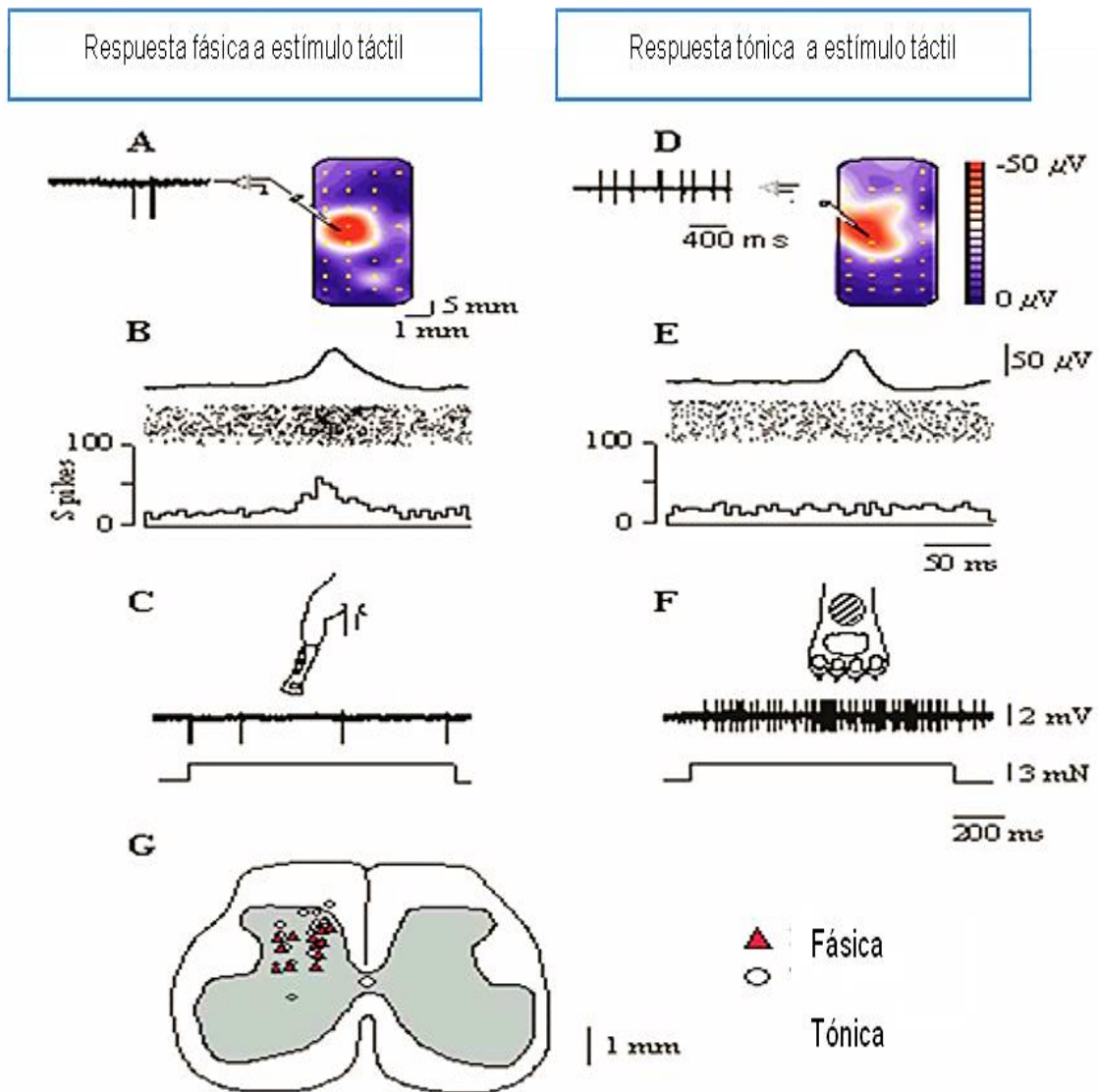


Figura 11. Respuesta de dos interneuronas con actividad fásica y tónica en el gato anestesiado con pentobarbital sódico, respectivamente: A) Se observa una respuesta fásica. **B)** Trazo superior: potencial espontáneo promediado, la gráfica de en medio indica la actividad de la misma interneurona (cada punto representa la ocurrencia de un potencial de acción). **C)** Campo receptivos de la extremidad posterior del gato. **D)** Respuesta tónica a estímulos táctiles. **E)** y **F)** lo mismo que **B)** y **C)** para una respuesta tónica. **G)** Reconstrucción de un corte transversal de la médula espinal que muestra la región de registro de neuronas que exhibieron respuestas fásicas y tónicas en gatos

anestesiados con pentobarbital sódico (Tomada de la tesis de doctorado de Gerardo Rojas-Piloni, 2003. Datos aún no publicados).

Otro aporte de Manjarrez y colaboradores en el 2000 y Rojas-Piloni en el 2003, es que los PNDMs están asociados con los reflejos espinales (RE). Durante la ejecución de un acto motor existe una interacción de sistemas segmentales con sistemas aferentes y descendentes, por lo cual, los reflejos dependen del estado de muchas neuronas espinales que reciben gran cantidad de influencias (Skinner y Willis, 1970; Fu y cols, 1974; Skinner y Remmel, 1978; Edgley y Jankowska, 1987; Wall y Lidierth, 1997). Es posible pensar entonces en grupos neuronales que son los responsables de la fluctuación en los reflejos espinales. Entre los grupos de neuronas candidatos se encuentran: las neuronas que median la inhibición presináptica (Rudomin y Dutton, 1969a), las neuronas de la sustancia gelatinosa (Wall y Lidierth, 1997), o bien, las neuronas que generan los PNDMs.

Sin embargo Molt y Gasteiger (1976) aseguraban que la variabilidad presente en los reflejos espinales se originaba por la actividad espontánea de las neuronas espinales. La demostración directa de dicha suposición fue dada por Manjarrez y colaboradores (2000), quienes reportaron una relación positiva entre las fluctuaciones en la amplitud de los PNDMs y las fluctuaciones de los reflejos monosinápticos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Manjarrez y colaboradores (2000) demostraron que el grupo neuronal que genera los PNDMs en el gato anestesiado, se localiza en las láminas III-VI del asta dorsal. Este conjunto de células modula la transmisión sináptica de aferentes segmentales, y comparte las vías funcionales de las neuronas que responden monosinápticamente a la estimulación de aferentes cutáneas de bajo umbral. Además, se sabe que dicha población de neuronas puede influenciar la actividad basal de las neuronas corticales. Dicha influencia se lleva a cabo a través de las vías de las columnas dorsales, como del tracto espino-cervical (Manjarrez y cols., 2002).

Se sabe que una gran cantidad de fibras aferentes de mecanorreceptores se bifurcan en la médula espinal, esto para originar ramas ascendentes y descendentes que favorezcan la transmisión de la información sensorial (Davidoff 1984). No obstante, la transmisión de la información requiere de la respuesta de grupos neuronales asociados a la actividad espontánea de la médula espinal ante estímulos externos. Dicha respuesta, fue analizada por Rojas-Piloni (2003) en su tesis de doctorado, en la cual, sugiere que las neuronas asociadas a PNDMs en gatos anestesiados y sometidas a estímulos táctiles de larga duración pueden presentar respuesta fásica o tónica.

Con estos datos y con los reportados por López- García y King (1994), donde se describe que las neuronas de las láminas III-VI del asta dorsal de la médula espinal se pueden clasificar de acuerdo a su patrón de disparo, la pregunta sería: ¿Cuáles son los mecanorreceptores involucrados en las respuestas fásicas o tónicas de las neuronas que generan los PNDMs en gatos no anestesiados?

Por tal razón, la propuesta del presente trabajo, fue clasificar el tipo de mecanorreceptor activado (Meissner o Pacini), con base en la frecuencia de estimulación aplicada y su relación con el tipo de respuesta, fásica o tónica, de las neuronas asociadas a los PNDM en gatos descerebrados y compararla con las respuestas obtenidas en gatos anestesiados con pentobarbital sódico.

3. HIPÓTESIS

Si las neuronas del asta dorsal que generan los potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal (PNDMs) del gato reciben entradas sinápticas de fibras aferentes que inervan a receptores cutáneos, entonces, presentan respuestas fásicas a estímulos táctiles de alta frecuencia.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el tipo de entradas aferentes primarias (Meissner y Pacini) que activan a las neuronas asociadas a los potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

En gatos descerebrados y en gatos no-descerebrados (anestesiados con pentobarbital sódico):

1. Analizar el tipo de respuesta (fásica o tónica) de las neuronas que generan los potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal, durante la estimulación táctil de la piel de las extremidades posteriores en el gato.
2. Para cada neurona registrada, determinar el tipo de mecanorreceptor activado (Meissner y Pacini) con base en la frecuencia de estimulación táctil.
3. Caracterizar el grado de sincronía entre neuronas asociadas a los potenciales espontáneos negativos que responden a la estimulación de mecanorreceptores Pacini vs Meissner.
4. Aplicar estímulos sostenidos de un segundo de duración para identificar si las neuronas registradas (Meissner y Pacini) asociadas a potenciales espontáneos del dorso de la médula espinal tienen adaptación rápida.

5. METODOLOGÍA

5.1 DE LA EXPERIMENTACIÓN

El protocolo de experimentación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Neurofisiología Integrativa del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El espacio empleado para la experimentación es un cubículo aislado de aproximadamente 4m por 4m. Conformado por una mesa anti vibratoria (Technical Manufacturing Corporation, TMC) y un aparato estereotáxico (de la compañía Narishige). La mesa anti vibratoria evita la interferencia causada por vibraciones o estímulos externos durante la obtención de los registros. El aparato estereotáxico se encuentra colocado sobre la mesa anti vibratoria, favoreciendo el posicionamiento y manipulación de la preparación quirúrgica en el gato.

5.2 DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS EMPLEADOS PARA REGISTRO

Para el desarrollo del protocolo experimental empleamos gatos adultos sin distinción de sexo de 2.5 a 3 kg de peso, proporcionados por el bioterio central “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Cabe señalar que todos nuestros experimentos cumplieron con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio estipulados en el NIH (85-23, revisada en 1985) y en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.2.1 ANESTESIA Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Los gatos fueron colocados en una cámara de inducción de anestesia gaseosa (mezcla gaseosa de oxígeno al 5% e isoflurano al 95%) durante 20-25 min. La cámara tiene una dimensión de 38 cm x 24 cm x 23 cm y cuenta con un orificio de inducción y otro de extracción. A la salida, el gas fue recolectado por un filtro de carbón activado manteniendo una atmósfera gaseosa circulante en el interior. Una vez que el gato estaba anestesiado, se le retiró de la cámara de inducción.

La continuación de la anestesia durante el experimento fue mediante vías distintas para cada grupo experimental. En la técnica de gato descerebrado, una vez que el gato fue retirado de la cámara se le colocó una mascarilla que suministró el mismo anestésico. En cambio para la técnica de gato no descerebrado, una vez que el gato fue retirado de la cámara, este fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis anestésica para felinos de 35 mg / kg vía intravenosa y durante el experimento se le aplicó una dosis suplementaria de pentobarbital sódico al 10 % por vía intravenosa para mantener al animal anestesiado. Para ambas técnicas se verificó el estado de anestesia mediante la auscultación de dilatación pupilar, reflejo palpebral y estado de relajación del animal.

Enseguida se le realizó la traqueostomía para facilitar administración del anestésico. Este procedimiento consistió en realizar una incisión en el cuello, y mediante disección roma, separar los músculos de la garganta para hacer un corte transversal en la tráquea e introducir una cánula traqueal donde se conectó el gas anestésico. Enseguida la arteria carótida se canuló para el monitoreo de la presión arterial, a través de un transductor especial conectado a una bomba de perfusión (mini bomba de flujo variable, Mini-PUMP 7892 K05, Thomas Scientific), por la cual se aplicó una solución amortiguadora del pH (glucosa 5%, NaCOH3 0.84%) a razón de 5 ml/hora. Luego se canuló la vena radial para la administración de fármacos y fluidos.

Después realizamos una laminectomía del nivel lumbar (L3) al sacro (S1), para exponer el dorso de la médula espinal, para el registro eléctrico neuronal. Dicho procedimiento consistió en realizar una incisión en la región lumbosacra (L4-S1); enseguida, se realizó disección "roma" para separar los músculos. Las apófisis transversas fueron cortadas, y posteriormente, se retiraron.

Una vez terminada la laminectomía y expuesta la médula espinal, se colocó el gato en un aparato estereotáxico (Narishige, Scientist Instrument Lab. SN-2N), usando para soporte y fijación unas abrazaderas espinales y pélvicas.

Posteriormente, se retiraron las meninges y se fijaron sobre los músculos. Primero se pinzó la duramadre con pinzas finas, y se realizó un corte sobre el eje longitudinal de la médula espinal en dirección craneal, esta fue separada y fijada. Las dos meninges consecutivas por ser más delgadas sólo fueron desgarradas con el uso de pinzas finas. Utilizando la piel del dorso y de las extremidades posteriores se formaron fosetas y se les agregó aceite mineral (petrolato líquido, MEDINA Natural) a una temperatura de 37°C para proteger los tejidos expuestos.

Se realizó una craneotomía para exponer la superficie de la corteza cerebral. Esta consistió en un corte longitudinal sobre la línea media de la piel que recubre la cabeza del gato. El corte se realizó desde el punto intermedio de los procesos supra-orbitales hasta la apófisis espinosa de la primera vértebra cervical. Seguido al corte, fueron retirados los músculos temporal y esplenio de la cabeza que cubren al cráneo. Inmediatamente fue retraída la arteria carótida derecha con hilo de algodón mercerizado y se retiró la parte superior de la bóveda craneana, dejando expuesto el tejido cerebral.

Una vez expuesto el tejido cerebral, se procedió a retirar la duramadre y, se realizó una descerebración. Para esta se empleó una espátula plana de 230 mm (espátula para descerebración, elaborada en Canadá), se localizaron los colículos superiores y se realizó un corte precolicular - premamilar (Figura 12). Todos los tejidos rostrales a esa sección fueron retirados bilateralmente, cubriendo la cavidad craneana con surgicel (malla hemostática de celulosa oxidada, que se usó para controlar sangrado, marca Johnson & Johnson) y solución agar (solución consistente en 1gr. de agar en 100 ml de sol. salina o glucosada).

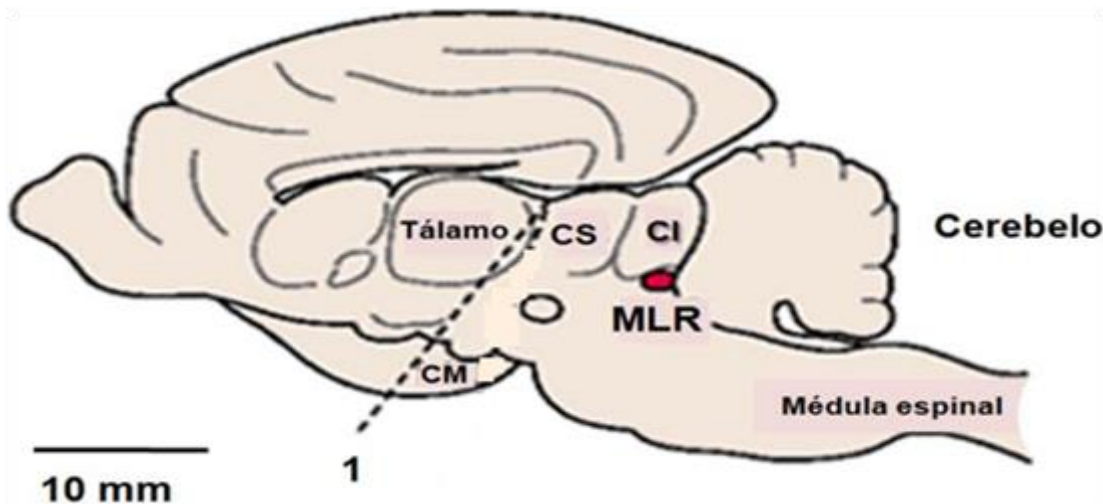


Figura 12. Esquema de descerebración. Ilustración que muestra en 1 el corte para una descerebración precolícolar - premamilar), CI, colículo inferior; CS, colículo superior; CM, cuerpo mamilar (Modificado de Kandel, 2000).

El paso a seguir fue discontinuar la anestesia gaseosa, y los animales fueron ventilados artificialmente a una frecuencia de 18/ min con un ventilador artificial (ventilador para gato y conejo 6025 Ugo Basile). Simultáneamente, los animales fueron paralizados con bromuro de pancuronio (0.8 mg/hora) aforado a 10 ml de solución salina. La presión arterial se monitoreó mediante un transductor de presión (CIDES tecnología) y la temperatura se mantuvo a 37 °C irradiando con luz infrarroja, constantemente.

5.3 MÉTODO DE REGISTRO

5.3.1 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO:

Se registró la actividad eléctrica de superficie de la médula espinal, al nivel del engrosamiento de la región lumbar. Para identificar las regiones espinales de máxima actividad eléctrica a estímulos táctiles se empleó una matriz de 32 electrodos de plata clorurada (AgCl) de 200 μ m, colocada en la superficie de la médula espinal a nivel lumbar en los segmentos L5-L7. Con un electrodo de referencia insertado en los músculos paravertebrales. Cabe destacar que esta matriz de multielectrodos consiste en un arreglo de 32 electrodos de plata de 200 μ m de diámetro con un arreglo lineal de cuatro filas de ocho electrodos cada una, con una distancia entre ellos de 5 mm en dirección rostro- caudal, y de 1 mm en dirección

medio-lateral (Figura 8), fue construido en el laboratorio de neurofisiología integrativa y se adaptó a la superficie de la médula espinal (Manjarrez y cols., 2005).

El multielectrodo se conectó a un amplificador SynAmps electroencefalográfico. Los registros se obtuvieron con una frecuencia de muestreo de 10 kHz con un filtro pasa bandas de 0.05 a 500 Hz en AC o de DC a 200 Hz. Los mapas topográficos se realizaron empleando el software Scan 4.2 de NeuroScan (Inc. Steling, VA). Posteriormente, una vez que se encontraron los mapas topográficos de las neuronas con actividad espontánea en la médula espinal (Figura 12.1) se retiró el arreglo de los 32 electrodos no sin antes marcar la zona con un colorante (azul de metileno), para poder realizar los registros de estas neuronas con mayor facilidad.

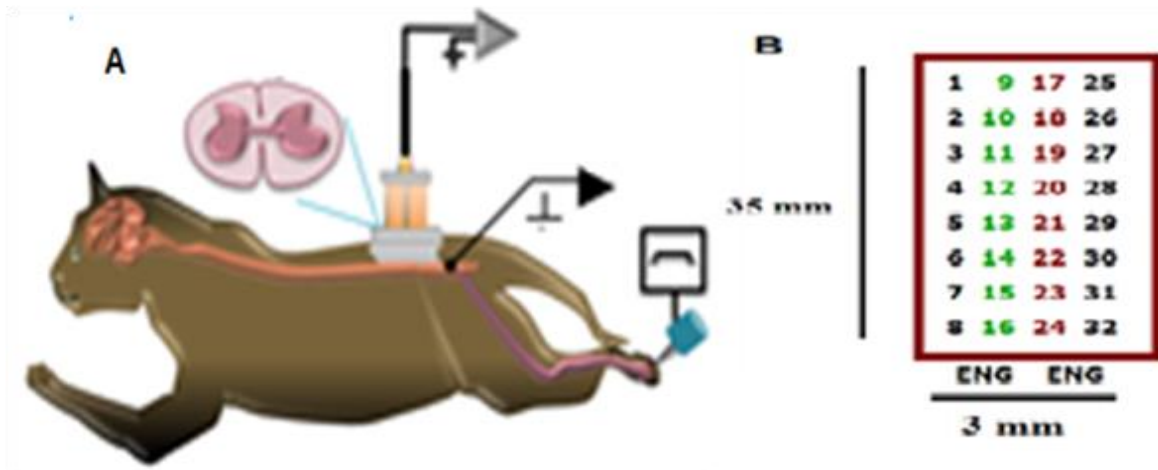


Figura 12.1 Arreglo experimental para el registro electrofisiológico. A) Multielectrodo sobre la médula espinal lumbosacra **B)** Electrodos de registro.

Una vez determinada la zona de potenciales espontáneos de máxima amplitud, se registró la actividad eléctrica del dorso de la médula espinal, colocando un electrodo monopolar de plata clorurada al nivel del engrosamiento espinal de la región lumbar. Las señales obtenidas se enviaron a un amplificador Grass (Astro-Med, Inc.) y se envió a una tarjeta de conversión digital. La adquisición de los datos fue a través del programa Axoscope 10.2. Se empleó una frecuencia de muestreo de 250 kHz.

Para obtener registros simultáneos de actividad unitaria de neuronas del asta dorsal de la médula espinal, se utilizó un multielectrodo Thomas Recording de 5 electrodos de cuarzo-platino-tungsteno (Thomas recording Minimatrix microelectrodes manipulation system - TRec®) en un arreglo longitudinal transversal en la región lumbar. Cabe mencionar que este sistema favorece la manipulación y desplazamiento independiente de cada uno de los 5 micro electrodos que lo componen. El registro de actividad extracelular unitaria se realizó con el software de captura Axoscope 8.0 (Axon Instruments®), dejando un tiempo previo y posterior en relación a la actividad neuronal procurando mantener una ventana temporal amplia.

Se aplicaron estímulos táctiles ligeros en los campos receptivos de la piel de las extremidades posteriores del animal y sobre la piel glabra (la almohadilla central de la extremidad posterior del gato) con un estimulador transductor-mecánico (Chubbuck, 1969).

El protocolo de registro fue el siguiente:

1.- Se registró la actividad basal durante un minuto, por lo que no se aplicó estímulo y fue empleado como registro control, del cual se obtuvieron datos de la actividad espontánea de la médula espinal.

2.- Se registró la actividad eléctrica de las neuronas espinales durante la aplicación de estímulos mecánico-táctiles periódicos a la piel glabra de la extremidad posterior (1s de duración a 1Hz de frecuencia) mediante un estimulador-transductor mecánico (Chubbuck). El estimulador fue colocado sobre la piel glabra (localizada en la almohadilla central de la extremidad posterior del gato). El estímulo mecánico se ilustra en la Figura 13, 10 segundos sin estímulo, 10 segundos con estímulo y 10 segundos sin estímulo.

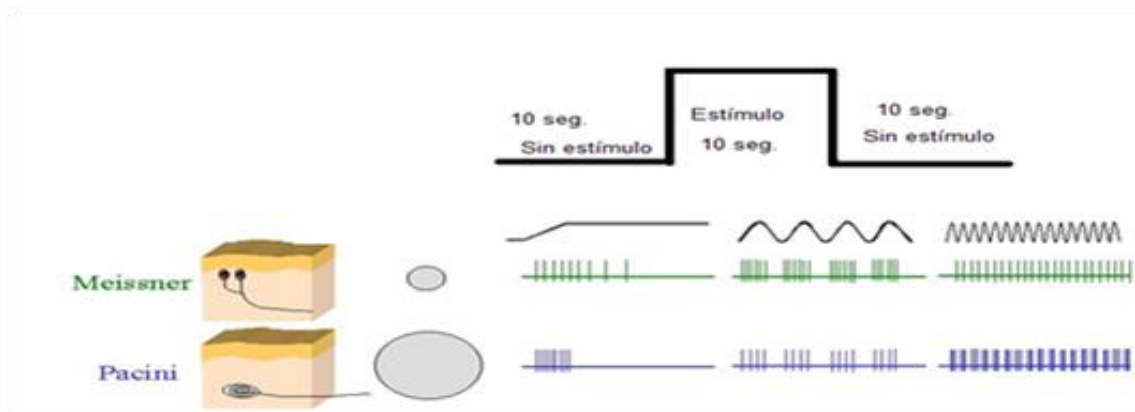


Figura 13. Protocolo de estimulación. Esquema que muestra la actividad eléctrica de neuronas durante la aplicación de estímulos táctiles periódicos

3.- Se registró la actividad eléctrica de neuronas en distintos campos receptivos sobre las extremidades posteriores, a diferentes frecuencias y profundidad.

Una vez concluido el experimento, se extrajo la médula espinal para su análisis histológico. Esta, se colocó en formol al 10% durante cinco días. Posteriormente, el tejido se deshidrató en alcohol al 70%, al 90% y 100%. Después la médula espinal se preparó para obtener cortes por deslizamiento de 10 a 15 μm de grosor y se dejan en alcohol 96% otra vez para llevarlos a una solución saturada de azul de toluidina, luego pasarlos por alcohol absoluto para aclararlos y realizar el montaje. Los cortes de la médula espinal fueron fotografiados y a partir de estos cortes se hizo la localización de la zona de registro.

5.4 DEL MÉTODO DE EUTANASIA

Posterior a los registros, una vez terminados los procesos experimentales, se realizó un proceso de eutanasia a los animales mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (3 ml ³) y se verificó la ausencia de pulso cardíaco de acuerdo con las normas de eutanasia vigentes de la norma oficial mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

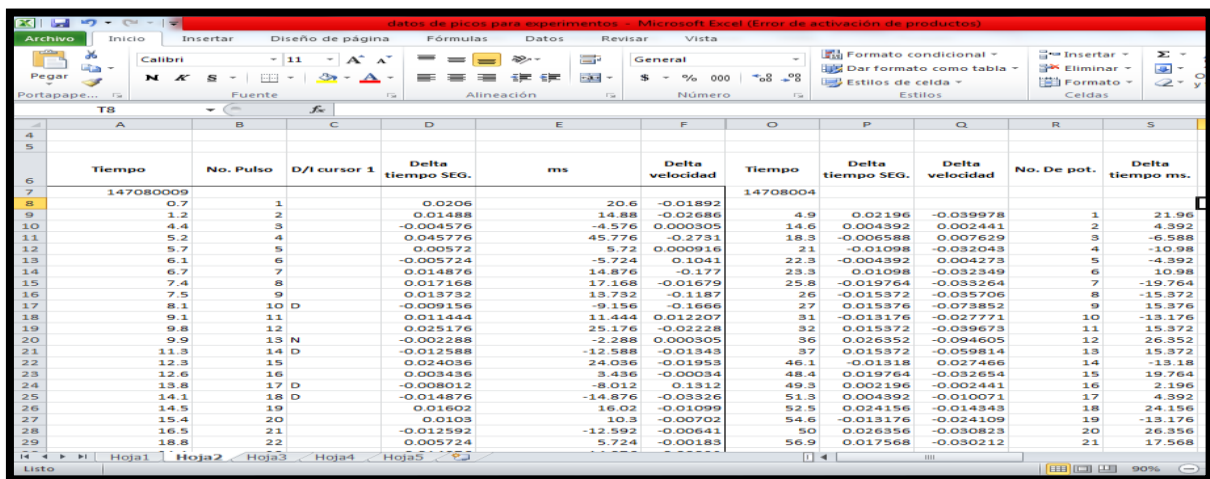
5.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Después de la obtención de los registros de actividad extracelular multiunitaria, éstos fueron incluidos en una carpeta digital para después ser evaluados individualmente.

Se realizaron los siguientes tipos de análisis:

5.5.1 ANÁLISIS DE LOS PNDMs

- En cada registró se contabilizó el número de espigas de característica negativa (espiga extendida de polaridad negativa, PNDMs) con duración (50 ms) y amplitud (100 μ V) considerada normal.
- Se contabilizó el número de PNDMs para cada registro de forma manual así como el parámetro de tiempo en que se presentó cada PNDM. Se empleó el programa Microsoft Excel para almacenar la información (Figura 14).



Tiempo	No. Pulso	D/I cursor	Delta tiempo SEG.	ms	Delta velocidad	Tiempo	Delta tiempo SEG.	Delta velocidad	No. De pot.	Delta tiempo ms.
147080009	0.7	1	0.0206	20.6	-0.01892	14708004				
1.2	2		0.01488	14.88	-0.02686	4.9	0.02196	-0.039978	1	21.96
4.4	3		-0.004576	-4.576	0.000305	14.6	0.004392	0.002441	2	4.392
5.2	4		0.045776	45.776	-0.2731	18.3	-0.006588	0.007629	3	-6.588
5.7	5		0.00572	5.72	0.000916	21	-0.01098	-0.032043	4	-10.98
6.1	6		-0.005724	-5.724	0.1041	22.3	-0.004392	0.004273	5	-4.392
6.7	7		0.014876	14.876	-0.177	23.3	0.01098	-0.032349	6	10.98
7.4	8		0.037168	37.168	-0.01679	25.8	-0.019764	-0.03264	7	-19.764
7.5	9		0.013732	13.732	-0.1187	26	-0.015372	-0.035706	8	-15.372
8.1	10	D	-0.009156	-9.156	0.1666	27	0.015376	-0.073852	9	15.376
9.1	11		0.011444	11.444	0.012207	31	-0.013176	-0.027771	10	-13.176
9.8	12		0.025176	25.176	-0.02228	32	0.015372	-0.039673	11	15.372
9.9	13	N	-0.002288	-2.288	0.000305	36	0.026352	-0.094605	12	26.352
11.3	14	D	-0.012888	-12.888	-0.01343	37	0.015372	-0.059814	13	15.372
12.3	15		0.024036	24.036	-0.01953	46.1	-0.01318	0.027466	14	-13.18
12.6	16		0.003436	3.436	-0.00034	48.4	0.019764	-0.032654	15	19.764
13.8	17	D	-0.008012	-8.012	0.1312	49.3	0.002196	-0.002441	16	2.196
14.1	18	D	-0.014876	-14.876	-0.03526	51.3	0.004392	-0.010071	17	4.392
14.5	19		0.01602	16.02	-0.01099	52.5	0.024156	-0.014343	18	24.156
15.4	20		0.0103	10.3	-0.00702	54.6	-0.013176	-0.024109	19	-13.176
16.3	21		-0.012592	-12.592	-0.00644	50	0.026356	-0.030823	20	26.356
18.8	22		0.005724	5.724	-0.00183	56.9	0.017568	-0.030212	21	17.568

Figura 14. Interfaz de Microsoft Excel. Se muestra todos los parámetros registrados de cada PNDM con base en las características mencionadas.

- Se empleó el programa AxoScope para obtener el valor del delta de tiempo de la relación de CDP – PNDM, que indica la diferencia de tiempo (ms) entre la ocurrencia de uno y otro evento. La magnitud fue obtenida mediante la medición del pico de la

espiga negativa (PNDM) al pico de una espiga positiva, previa o posterior al PNDM, como se muestra en la figura 14.1. Los datos obtenidos fueron graficados junto con el PNDM promedio al cual se le invirtió la escala para mejor visualización, se empleó el programa SigmaPlot 12.0 ®.

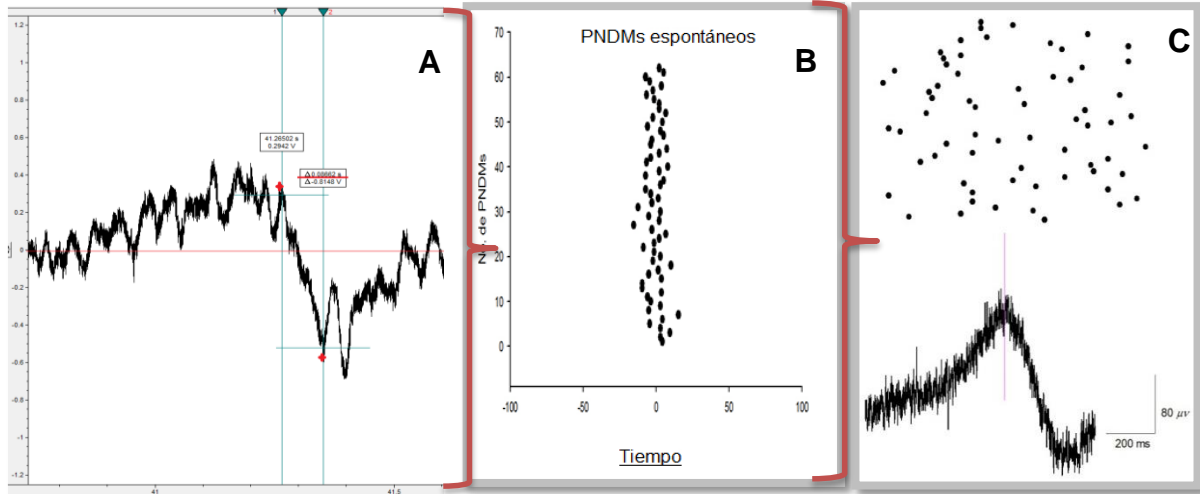


Figura 14.1 Elaboración del gráfico de ocurrencia de PNDMs. En **A** se determinó la magnitud del delta de tiempo de un PNDM. Se realizó la medición con los cursores del pico de un potencial espontáneo positivo al pico de un potencial espontáneo negativo. La magnitud la proporcionó el programa AxoScope una vez que se ubicaron los cursores en el lugar adecuado. El delta de tiempo y el tiempo al cual ocurrió el PNDM fueron registrados en el programa de Microsoft Excel. En **B** la gráfica indica la relación entre el número de PNDMs y el delta de tiempo, esta dio información sobre la presencia de PNDMs previos y posteriores a un potencial positivo. En **C** se muestra el gráfico sobre la relación entre el PNDM promedio y la ocurrencia de estos a lo largo del registro.

5.5.2 REGISTROS DE ACTIVIDAD MULTIUNITARIA

En cada registro, se analizó la relación entre actividad eléctrica extracelular y estímulo táctil. Mediante el análisis de 3 parámetros: primero, si la actividad neuronal estaba afectada por el estímulo táctil aplicado; segundo, qué tipo de influencia presentaba, es decir, si esta respondía al estímulo (siguiendo además el desplazamiento), o bien, estaba inhibiendo su actividad; tercero, qué sucedió ante un cambio de frecuencia. Al final se obtuvo una clasificación: registros que presentaban respuesta y registros sin respuesta.

Del grupo con respuesta, para cada registro se seleccionó el canal de actividad eléctrica extracelular así como el canal del estímulo; ambos fueron guardados como archivos Abf junto con su número de registro.

Debido a que los registros de actividad eléctrica extracelular generalmente son multiunitarios se necesitó de un programa para obtener los rastros de actividad de neuronas individuales. Se utilizó un programa llamado Wave Clus (Algoritmo diseñado en MatLab, software libre y diseñado por Quiroga y colaboradores en 2004).

5.5.2.1 SPIKE SORTING USANDO WAVE CLUS

Mediante el uso del programa MatLab y el algoritmo Wave Clus se obtuvieron los rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal.

Se empleó el programa MatLab para importar y convertir los archivos abf. , del grupo de registros con respuesta, en archivo data.mat (figura 14.2).

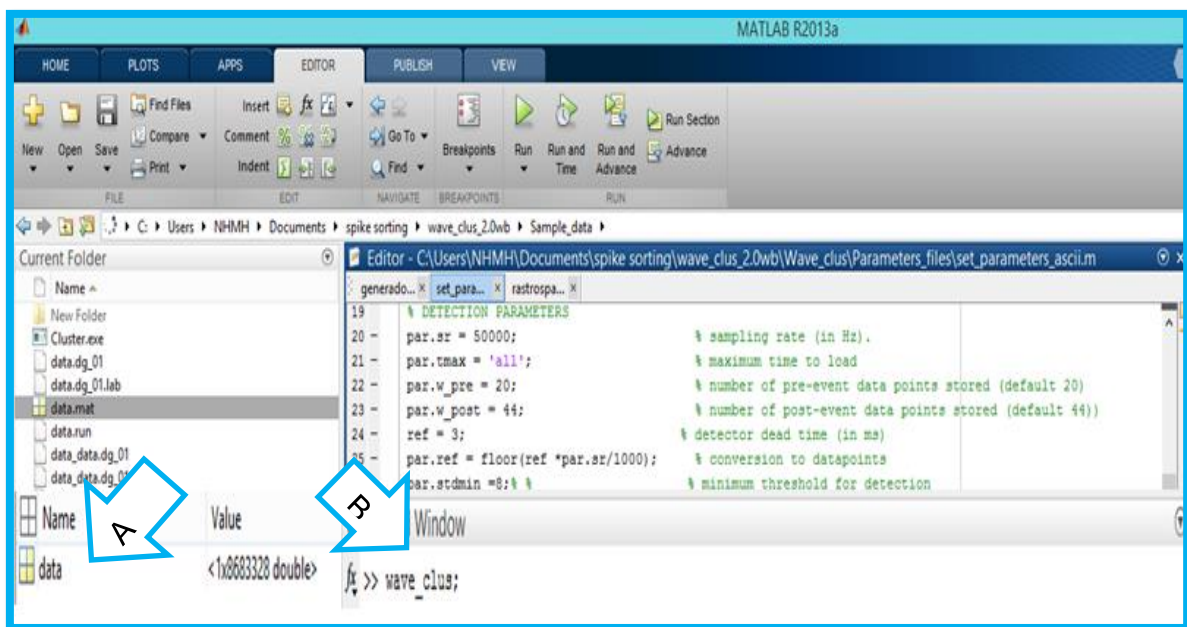


Figura 14.2 Interfaz de MATLAB R2013a. En A se observa el archivo generado con el nombre data. En B se muestra la activación del algoritmo wave_clus, el cual para su activación requiere el archivo data, el cual contiene los datos de la actividad extracelular unitaria.

La herramienta de “spike sorting” (clasificación de espigas) permitió que la actividad de cada neurona pudiera ser considerada por separado en cada uno de los análisis posteriores.

En general, Wave Clus examina cada espiga que cumpla con parámetros establecidos previamente (umbral y amplitud máxima) mediante el uso de *wavelets* y después los clasifica en *clusters* que almacenan el momento en que ocurrió cada espiga (figura 14.3).

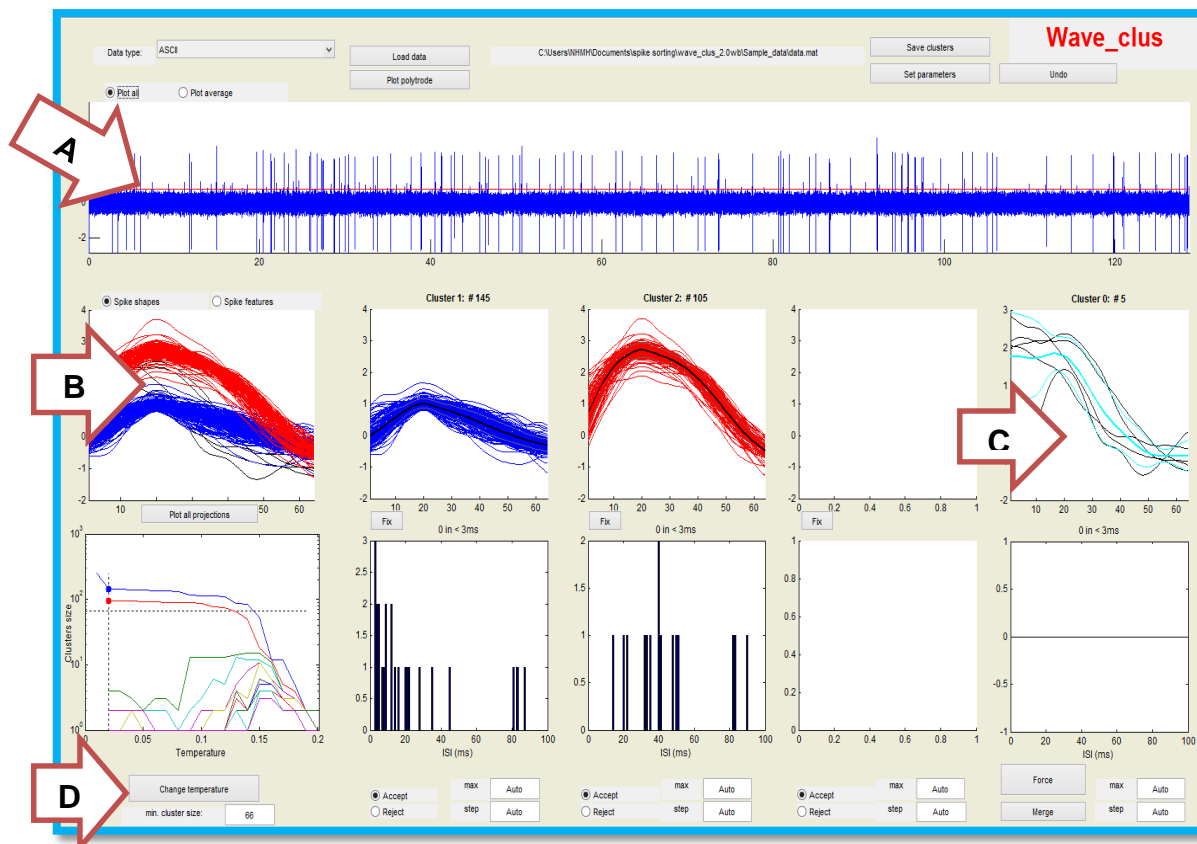


Figura 14.3 Interfaz de Wave Clus. En **A** se observa el registro original, la línea roja es el umbral elegido (5). En **B** se muestran todas las espigas encontradas y de acuerdo con el color que tienen es el *cluster* al que pertenecen. En **C** se encuentran las espigas que no fueron incluidas en ningún *cluster*. En **D** se grafica el parámetro ‘temperatura’ y puede ser modificado directamente desde esa ventana.

Al tener separados los rastros de actividad de cada neurona fueron graficados junto con el estímulo. Además, se analizó el tipo de respuesta, la frecuencia de estimulación y se obtuvo una clasificación para el tipo de respuesta y de receptor. Para la clasificación de receptores se empleó una tabla elaborada con información

de diversas fuentes bibliográficas (figura 14.4). Dichas respuestas fueron graficadas por medio del programa SigmaPlot 12.0®.

Canales	Menor contacto (0.008 cm 2)	Mayor contacto (2.9 cm2)	Fibras y Mecanorreceptor	Malamud 2014
P	-	>64 Hz** > 40*	PC→ corpúsculos de pacini	60-400 Hz
NPI	2-100 Hz *	2- 64 Hz *** 2-40 Hz*	RA→ corpúsculos de meissner	10-50 Hz
NPII	>100 Hz *	-	SA II →discos de Merkel	5-10 Hz
NPIII	0,4 – 2 Hz * 0,4 – 8 Hz **	0,4 – 2 Hz * 0,4 – 8 Hz **	SAI →terminación Ruffini	< 5 Hz

Figura 14.4 Clasificación de receptores con base en su frecuencia. Los datos fueron obtenidos de diversas fuentes bibliográficas (Gescheider, Bolanowski & Verrillo ,2003*; Johansson ,Landstrom & Lundstrom,1981**; Iggo-Ogawa, 1976 ***).

Finalmente, se caracterizó ausencia de respuesta ante un cambio de frecuencia en el estímulo aplicado. Se comprobó que la actividad neuronal sólo respondió a una frecuencia específica.

5.5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existen diferencias significativas en el número de potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal y sus amplitudes se consideraron los diferentes rangos de frecuencia de estimulación táctil entre las condiciones de descerebración. Para ello, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk ($p < 0.05$), para determinar si los datos recolectados se distribuyen normalmente. De manera conjunta se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene ($p < 0.05$). Si los datos pasaron la prueba de normalidad y de homogeneidad de varianzas se realizaron pruebas ANOVA de medias repetidas y posteriormente prueba t de Student. Por otra parte, si los datos no se distribuyeron

normalmente, y no mostraron homogeneidad en sus varianzas, se aplicaron pruebas no paramétricas. La prueba que se empleó fue la prueba U de Mann-Whitney para comparar la condición del número de potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal y sus amplitudes.

6. RESULTADOS

Realizamos experimentos en 6 gatos adultos, sin distinción de sexo, con un rango de peso de 2.5- 3 Kg. Se emplearon dos tipos de preparaciones: una de descerebración precolicular- premamilar (3 sujetos) y otra de no descerebración empleando pentobarbital sódico como anestésico (3 sujetos).

Debido a que los conjuntos neuronales que generan los PNDMs reciben entradas monosinápticas de aferentes cutáneos de bajo umbral (Manjarrez y cols., 2000) analizamos si estos grupos presentaban respuestas fásicas a estímulos táctiles aplicados a diferentes frecuencias. Para ello, realizamos registros de la actividad eléctrica de superficie del dorso de la médula espinal mediante una matriz de 32 electrodos (Ver métodos), determinando la zona donde se exhibieron los potenciales espontáneos de máxima amplitud. Posteriormente se realizó registro de actividad extracelular multiunitaria del asta dorsal de la médula espinal, mediante un sistema de multielectrodos de 5 canales (Thomas Recording), (Figura 15).

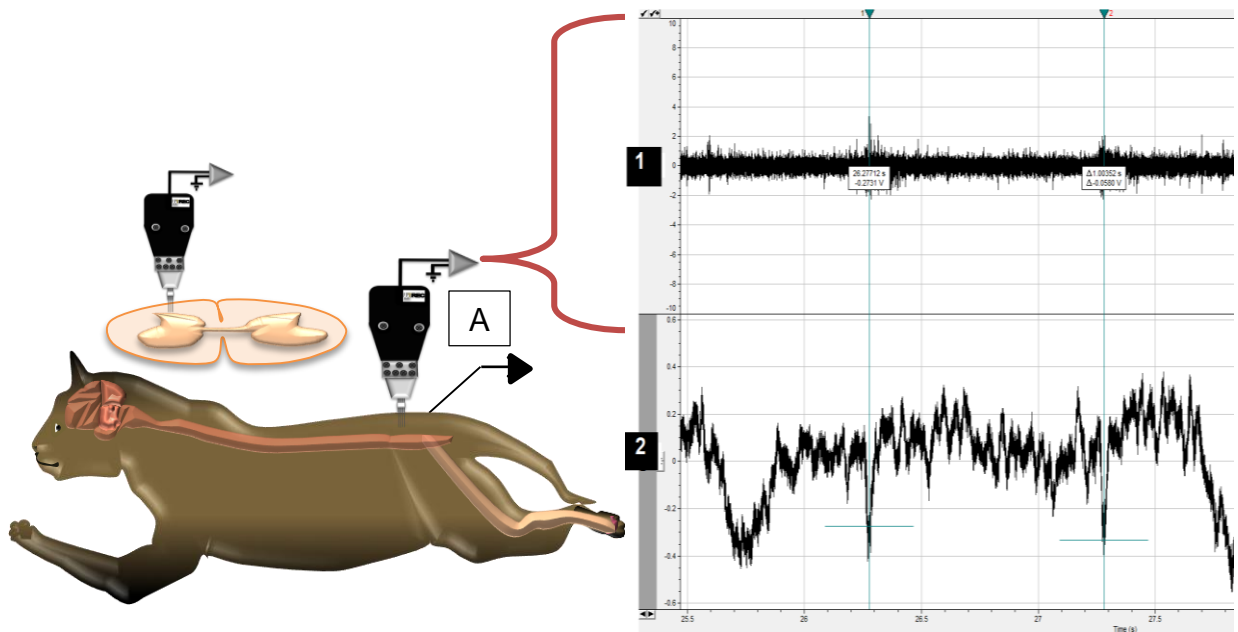


Figura 15. Registro de actividad extracelular multiunitaria del asta dorsal de la médula espinal en el gato. En **A** se muestra la inserción del multielectrodo (Thomas recording Minimatrix microelectrodes manipulation system - TRec®) a nivel del engrosamiento lumbar. En **1** se muestra el registro de la actividad extracelular involucrada en la generación de los PNDMs. En **2** se presenta el registro de los PNDMs mediante el electrodo monopolar de plata clorurada al nivel del engrosamiento espinal de la región lumbar.

Posteriormente, se aplicaron estímulos táctiles en la piel glabra de cada una de las extremidades posteriores. De esta manera, se relacionó la frecuencia del estímulo táctil (entrada) con la respuesta de la actividad espinal y de las neuronas que generan los PNDMs (salida) registradas durante los diferentes periodos de estimulación (Figura 16).

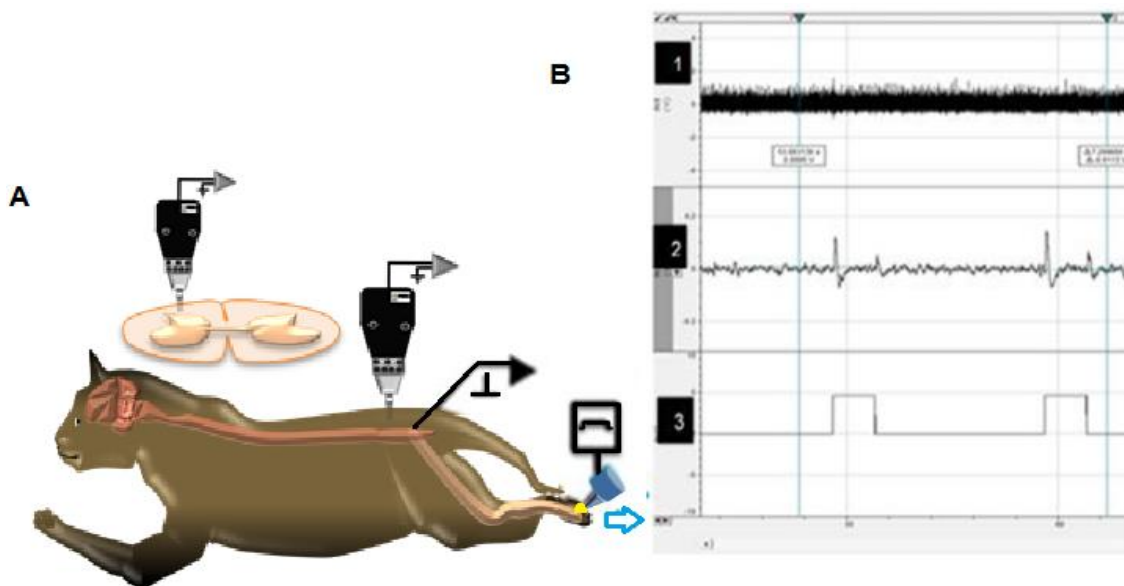


Figura 16. Registro de la respuesta de conjuntos neuronales del asta dorsal de la médula espinal, involucradas en la generación de PNDM ante estimulación táctil. **A)** Muestra los sitios de estimulación táctil en la piel glabra de la extremidad posterior mediante un estimulador transductor-mecánico con una punta de 1mm de diámetro (Chubbuck). La extremidad fue colocada en una posición fija para permitir que los estímulos fueran sobre la misma región. **B)** Muestra la ventana de registro de la respuesta de la neurona, que se analiza en el programa AxoScope: 1. Es la actividad extracelular multiunitaria, 2. Son los PNDMs, 3. Es el estímulo mecánico aplicado sobre el campo receptivo (zona amarilla).

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

A continuación, se muestra evidencia de la actividad eléctrica extracelular de conjuntos neuronales involucrados en la generación de los PNDMs y su respuesta durante la aplicación de un estímulo (figura 17 y 17.1).

Debido a que los registros de actividad eléctrica extracelular generalmente fueron multiunitarios, se obtuvieron los rastros de actividad unitaria de las distintas neuronas registradas por un mismo canal mediante un análisis de wavelets (para ello empleamos el programa waveclus, ver sección de métodos). Este permitió clasificar las espigas en diferentes grupos con base en criterios de forma, umbral y amplitud. La actividad de la neurona que respondió está representada mediante clusters. El cluster es el conjunto de potenciales de acción que indican el momento en que ocurrió cada espiga. La línea en negro indica el promedio de la amplitud.

En la figura 17 se muestra la actividad extracelular en estado basal, así como la respuesta a un estímulo aplicado a una frecuencia de 10 Hz.

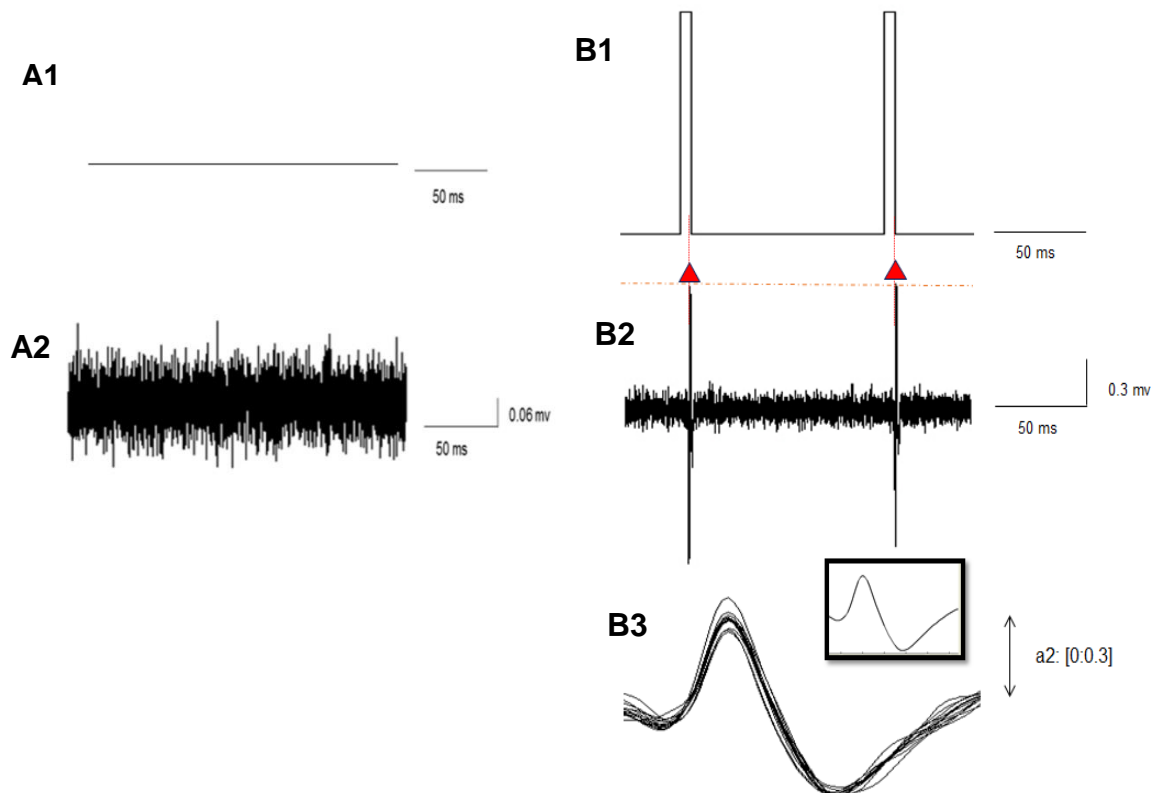


Figura 17. Actividad eléctrica extracelular involucrada en la generación de los PNDMs con y sin estimulación táctil. En **A1** se muestra la ausencia del estímulo. En **A2** se muestra la actividad en estado basal. En **B1** se muestra el estímulo táctil de 10 Hz de frecuencia. En **B2** se muestra el registro de actividad multiunitaria que respondió al estímulo aplicado. La línea punteada en rojo indica el límite de máxima amplitud de la respuesta. Los triángulos rojos indican las espigas de máxima amplitud. En **B3** se muestra el cluster de actividad unitaria, que indica la actividad de la neurona que está respondiendo al estímulo aplicado. En el recuadro superior izquierdo se muestra la forma del cluster promedio de la actividad unitaria.

En la figura 17.1 se muestra la actividad extracelular en estado basal, así como la respuesta a un estímulo aplicado a una frecuencia de 20 Hz.

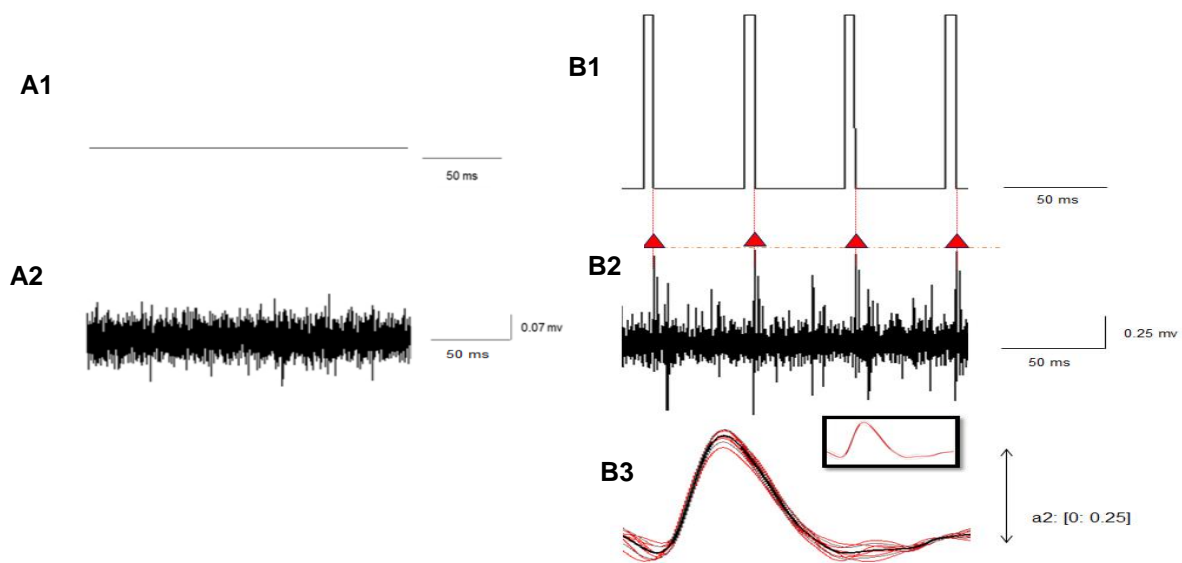


Figura 17.1. Actividad eléctrica extracelular involucrada en la generación de los PNDMs con y sin estimulación táctil. En **A1** se muestra la ausencia del estímulo. En **A2** se muestra la actividad extracelular en estado basal. En **B1** se muestra el estímulo táctil de 20 Hz de frecuencia. En **B2** se muestra el registro de actividad multiunitaria que respondió al estímulo aplicado. La línea punteada en rojo indica el límite de máxima amplitud de la respuesta. Los triángulos rojos indican las espigas de máxima amplitud. En **B3** se muestra el cluster de actividad unitaria, que indica la actividad de la neurona que está respondiendo al estímulo aplicado. En el recuadro superior izquierdo se muestra la forma del cluster promedio de la actividad unitaria.

De los experimentos realizados se obtuvo una **n = 59** de registros de actividad extracelular de conjuntos neuronales del asta dorsal de la médula espinal involucrados en la generación de PNDMs que presentaron respuesta a estímulos táctiles aplicados en la piel glabra de ambas extremidades posteriores. Los registros obtenidos fueron analizados para determinar la presencia de los PNDMs así como el tipo de respuesta con base en las frecuencias de los diferentes mecanorreceptores.

A continuación se presenta un breve resumen de los resultados para ambas preparaciones (Tabla 1 y 2):

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE DATOS OBTENIDOS PARA DESCEREBRACIÓN

No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RESPUESTA ADAPTATIVA	FRECUENCIA	RESPUESTA ADAPTATIVA	FRECUENCIA
1	Descerebración	2 Fásicos	15 Hz 80 Hz	1 Tónico	2 Hz
2	Descerebración	4 Fásicos	200 Hz 300 Hz 100 Hz 15 Hz	4 Tónicos	1 Hz 1 Hz 1 Hz 2 Hz
3	Descerebración	6 Fásicos	10 Hz 20 Hz 30 Hz 70 Hz 100 Hz 10 Hz	3 Tónicos	5 Hz 7 Hz 5 Hz
TOTAL	20		Fásicas :12		Tónicas : 8

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE DATOS OBTENIDOS

No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RESPUESTA ADAPTATIVA	FRECUENCIA	RESPUESTA ADAPTATIVA	FRECUENCIA
1	No descerebración	2 Fásicos	15 Hz 40 Hz	4 Tónicos	5 Hz 3 Hz 5 Hz 7 Hz
2	No descerebración	15 Fásicos	10 Hz 10 Hz 15 Hz 20 Hz 10 Hz 20 Hz 30 Hz 10 Hz 15 Hz 15 Hz 12 Hz 12 Hz 30 Hz 20 Hz 10 Hz	7 Tónicos	1 Hz 2 Hz 5 Hz 7 Hz 5 Hz 7 Hz 1Hz

3	No descerebración	7 Fásicos	10 Hz 15 Hz 20 Hz 20 Hz 10 Hz 30 Hz 30 Hz	4 Tónicos	2 Hz 7 Hz 1 Hz 5 Hz
TOTAL	39	Fásicas : 24		Tónicas : 15	

En las tablas uno y dos mostramos para cada experimento, los resultados obtenidos, clasificados en “gato descerebrado” y “no descerebrado”. Obteniendo un 100% de respuestas equivalente a una n= 59 de registros. El mayor porcentaje presentó respuestas de tipo fásico.

Se encontró que el 61% de las respuestas presentaron una descarga momentánea sólo al inicio del estímulo (y algunas veces al final del estímulo), a las que se les clasificó como respuesta de tipo fásica. De la misma manera, un 39 % presento respuesta sostenida durante el estímulo. A este tipo de respuesta se le clasificó como respuesta de tipo tónica.

Al analizar la descarga espontánea de ambos grupos de neuronas, encontramos que las unidades con descarga tónica mostraron actividad regular sostenida, mientras que aquellas con descarga fásica, tuvieron muy poca actividad espontánea. Además, se observó que las neuronas con descarga fásica asocian su actividad eléctrica con la ocurrencia de los PNDMs, lo cual no se observó en neuronas con descarga tónica.

En la figura 18, se puede observar que los registros que presentaron un incrementó en la ocurrencia de los PNDMs está directamente relacionado con el tipo de respuesta de los conjuntos neuronales. Tal que a un aumento en la ocurrencia de los PNDMs se observa una respuesta de tipo fásico, dicha relación es inversa en la respuesta de tipo tónico.

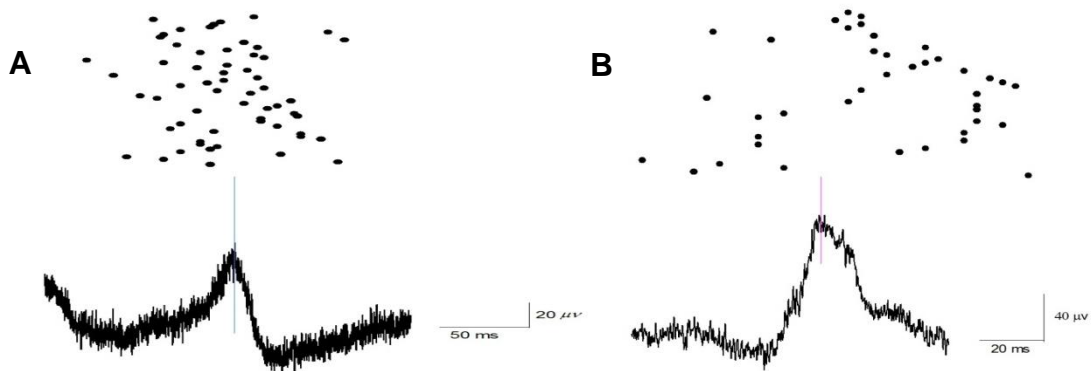


Figura 18. Presencia de PNDMs en respuesta de tipo fásica y tónica en gato descerebrado. A: Registro con respuesta fásica que corresponde a receptor tipo Pacini (frecuencia de 80 Hz), en la parte superior del gráfico cada punto indica la ocurrencia de un PNDM y en la parte inferior muestra el PNDM con las características representativas de estos. **B:** Registro con respuesta tónica, la cual corresponde a receptores tipo Merkel (frecuencia de 5 Hz), en la parte superior se indica la ocurrencia de los PNDMs y en la parte inferior se muestra el PNDM con las características representativas de estos.

6.1 POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS DEL DORSO DE LA MÉDULA ESPINAL QUE PRESENTAN RESPUESTA FÁSICA

Se clasificaron los registros neuronales que presentaron respuesta de tipo fásico ante la aplicación de un estímulo táctil de alta frecuencia para ambas preparaciones.

La preparación de descerebración se realizó en 3 sujetos, de los cuales, se obtuvo una **n=12** de registros que respondieron a estimulación táctil en un rango de frecuencia de 10 a 400 Hz. (Ver Tabla 3).

TABLA 3. CLASIFICACIÓN PARA RESPUESTA DE TIPO FASICO

No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RECEPTOR	FRECUENCIA	PROFUNDIDAD
1	Descerebración	Meissner	15 Hz	540 µm
		Pacini	80 Hz	540 µm
2	Descerebración	Pacini	200 Hz	1502 µm
		Pacini	300 Hz	1502 µm
		Pacini	100 Hz	1687 µm
		Meissner	15 Hz	1105 µm
3	Descerebración	Meissner	10 Hz	862 µm
		Meissner	20 Hz	1462 µm
		Meissner	30 Hz	1462 µm
		Pacini	70 Hz	1462 µm
		Pacini	100 Hz	1751 µm
		Meissner	10 Hz	1757 µm
Total	12			

La preparación de no descerebración fue realizada en 3 sujetos, de los cuales se obtuvo una **n=24** de registros, que respondieron a estimulación táctil, en un rango de frecuencia de 10 a 50 Hz (Ver Tabla 4).

TABLA 4. CLASIFICACIÓN PARA RESPUESTA DE TIPO FASICO				
No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RECEPTOR	FRECUENCIA	PROFUNDIDAD
1	No descerebración	2 Meissner	15 Hz	2431 μm
			40 Hz	2464 μm
2	No descerebración	15 Meissner	10 Hz	1147 μm
			10 Hz	1941 μm
			15 Hz	1941 μm
			20 Hz	1941 μm
			10 Hz	3054 μm
			20 Hz	3054 μm
			30 Hz	3054 μm
			10 Hz	3146 μm
			15 Hz	3146 μm
			15 Hz	3611 μm
			12 Hz	1449 μm
			12 Hz	1472 μm
			30 Hz	1472 μm
			20 Hz	1752 μm
10 Hz	1752 μm			
3	No descerebración	7 Meissner	10 Hz	1723 μm
			15 Hz	1723 μm
			20 Hz	1723 μm
			20 Hz	1119 μm
			10 Hz	1615 μm
			30 Hz	1682 μm
			30 Hz	1682 μm

Total	24	Rango de frecuencia de Meissner: 10 - 50 Hz		
--------------	----	---	--	--

El 61 % de los registros totales presentó respuesta de tipo fásica. El 20% corresponde a resultados obtenidos en preparación de descerebración y el 41% a resultados obtenidos empleando la preparación de no descerebración.

6.2 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA DE NEURONAS CON RESPUESTA FÁSICA DURANTE LA APARICIÓN DE PNDMS ESPONTÁNEOS EN GATO DESCEREBRADO.

A continuación se muestran los registros de la actividad eléctrica espontánea de neuronas con respuesta fásica.

Las respuestas neuronales que se obtuvieron entre los rangos de frecuencia de 10-50 Hz fueron clasificadas como receptores de tipo Meissner, mostrados en la figura 19. En los gráficos se observa la ocurrencia de los PNDMs. Dicha ocurrencia es mayor a una frecuencia de 15Hz (Figura 19 b), en comparación con la mostrada en frecuencias de 10 Hz y 100 Hz (Figura 19 a y c).

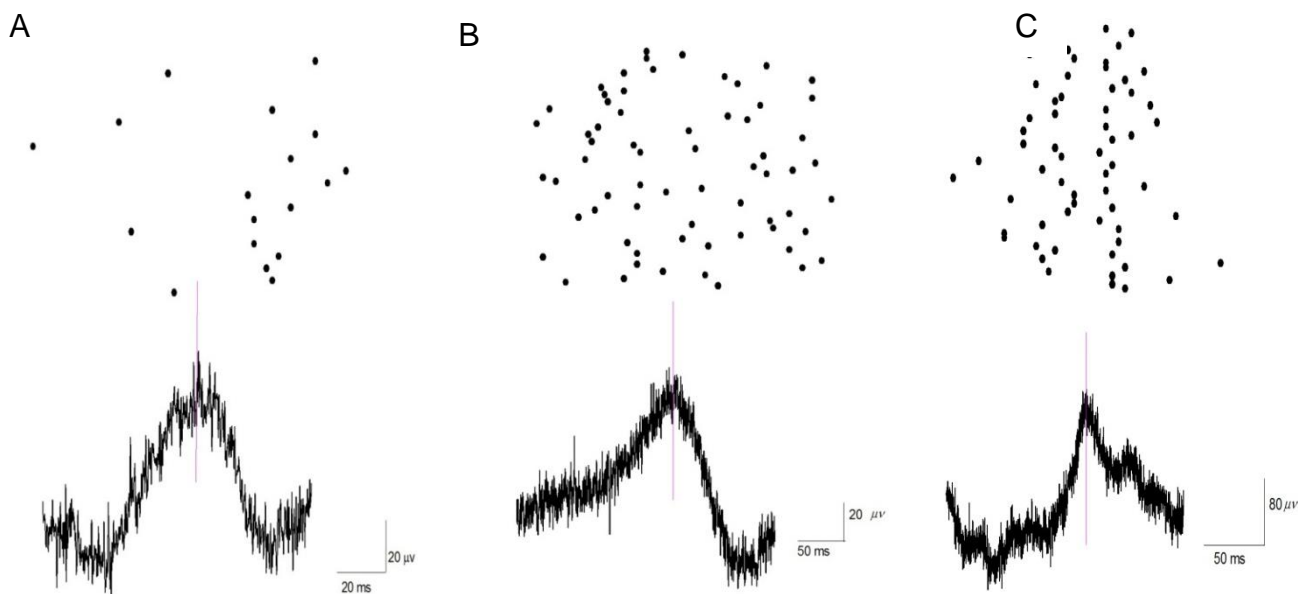


Figura 19. Presencia de PNDMs en respuesta de tipo fásica y correspondiente a receptores de tipo Meissner. En la parte superior de **A, B y C** se muestran los rastros de PNDMs. En la parte inferior, se muestran los PNDMs representativos para cada registro. Se registró actividad extracelular a diferentes frecuencias y profundidades, en **A)** a una frecuencia de 10 Hz y a una profundidad de 862 μm , y en **B)** a una frecuencia de 15 Hz y a una profundidad de 540 μm . En **C)** se muestran datos a una frecuencia de 100 Hz, a una profundidad de 1687 μm .

Los PNDMs obtenidos en registros de neuronas con respuestas relacionadas a receptores de tipo Meissner, presentaron variación en su amplitud con respecto a los diferentes tipos de frecuencia. A una menor frecuencia (10 Hz), la amplitud es de 20 μV como se observa en la figura 19A. En comparación con la amplitud de 80 μV presente a una frecuencia de 100 Hz en la figura 19C. Además se observa un aumento en la ocurrencia de PNDMs conforme aumenta la frecuencia (figura 19 A y B).

Otra de las variables que se analizó fue la profundidad de cada registro (ver tabla 3). En registros obtenidos a una mayor profundidad se presentaron PNDMs de máxima amplitud, en comparación con los registros obtenidos a menor profundidad, los cuales presentaron amplitudes por debajo del rango normal (Figura 19 A y C) (Esto es consistente con resultados de Manjarrez y cols., 2000).

Las respuestas que se obtuvieron para un rango de entre 60 y 400 Hz de frecuencia fueron clasificadas como respuestas de tipo Pacini, mostradas en la figura 20. Los resultados indicaron que el número de PNDMs es mayor ante la aplicación de un estímulo de mayor frecuencia 100 y 300 Hz (20 b y c).

En los resultados se observó una relación directa entre profundidad y presencia de los PNDMs (Figura 20 a y b), es decir a mayor profundidad hay mayor ocurrencia de PNDMs, los cuales presentan amplitudes reportadas como normales (figura 20 b).

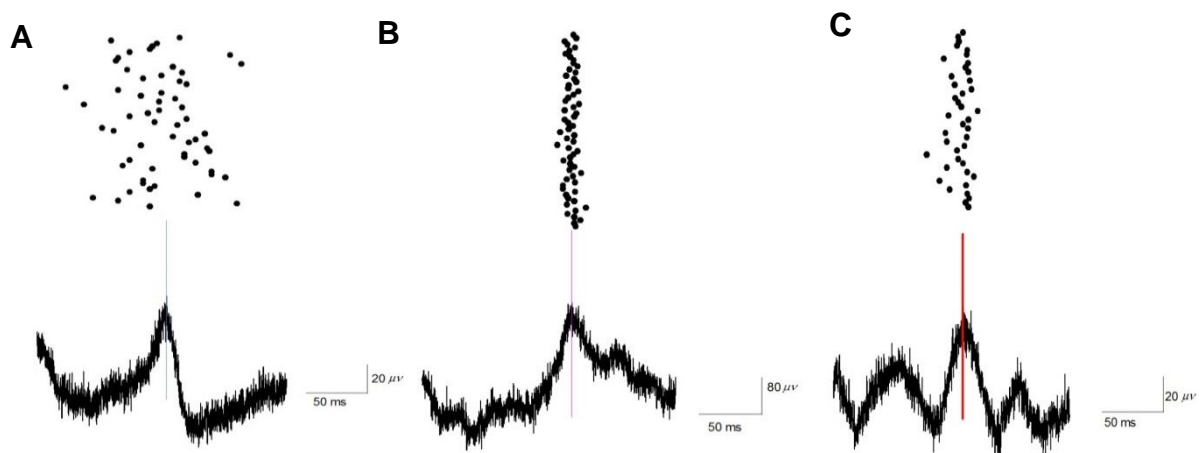


Figura 20. Presencia de PNDMs en respuesta de tipo fásica y correspondiente a receptores de tipo Pacini. A, B y C en la parte superior se presentan los rastros de PNDMs y en la parte inferior se muestran los PNDMs representativos para cada registro. Se registró actividad neuronal a diferentes frecuencias y profundidades en **A**) a una frecuencia de 80 Hz y a una profundidad de 540 μm , **B**) a una frecuencia de 100 Hz y una profundidad de 1687 μm y **C**) a una frecuencia de 300 Hz, a una profundidad de 1502 μm .

Se analizó la relación entre el desplazamiento del estímulo y la respuesta de la actividad extracelular. Los resultados mostraron una relación sincronizada de la respuesta de la actividad presente durante el periodo de tiempo en el cual fue aplicado el estímulo. Este se realizó para receptor tipo Meissner y Pacini (figuras 21 y 22 respectivamente).

Debido a que los registros de actividad eléctrica extracelular generalmente fueron multiunitarios, se obtuvieron los rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal mediante un análisis de wavelets. Este permitió

clasificar las espigas en diferentes grupos con base en criterios de forma, umbral y amplitud máxima. Esto permitió mostrar la actividad unitaria que se presentó en los resultados, mediante clusters que indican la actividad de la neurona que está respondiendo al estímulo.

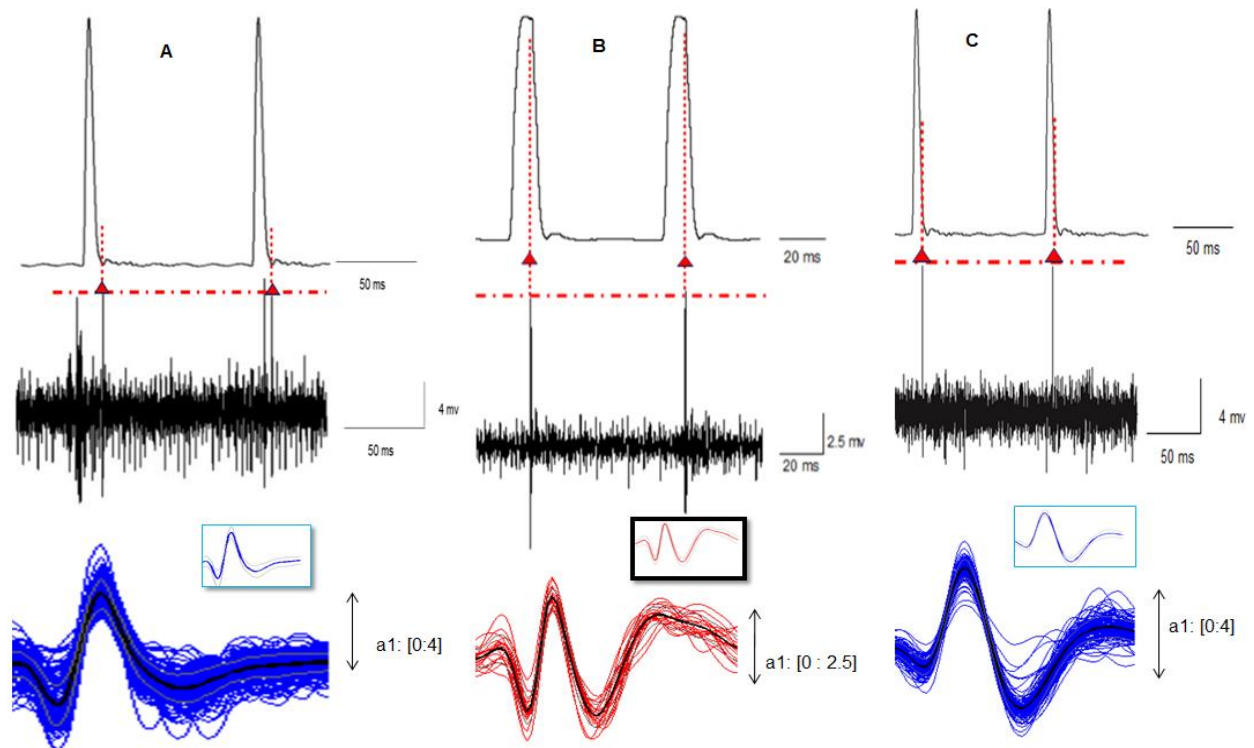


Figura 21. Relación del desplazamiento del estímulo aplicado (tipo Meissner) con la actividad extracelular. En la parte superior se muestra el desplazamiento del estímulo aplicado en: **A)** a una frecuencia de 10 Hz, en **B)** a una frecuencia de 15 Hz y en **C)** a una frecuencia de 10 Hz. En la parte intermedia de cada gráfico se muestra la respuesta de la actividad extracelular multiunitaria presente durante el desplazamiento del estímulo. Las líneas verticales en rojo indican la relación de las espigas con el desplazamiento. Las líneas horizontales en rojo indican el límite de las espigas de máxima amplitud. Los triángulos en rojo indican que espigas están siguiendo al desplazamiento. En la parte inferior de cada gráfico se muestra el cluster de la respuesta de la actividad extracelular unitaria que va en sincronía con el desplazamiento. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria. En el recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud promedio. La letra (a1) indica la amplitud de la actividad unitaria.

En la figura 21 se observó que el desplazamiento del estímulo estaba directamente relacionado con la respuesta de la actividad extracelular de máxima

amplitud. La actividad se relacionó a receptor tipo Meissner durante un período de tiempo de 50 ms.

Resultados de la relación desplazamiento del estímulo y la respuesta de actividad extracelular para receptores de tipo Pacini figuras 22.

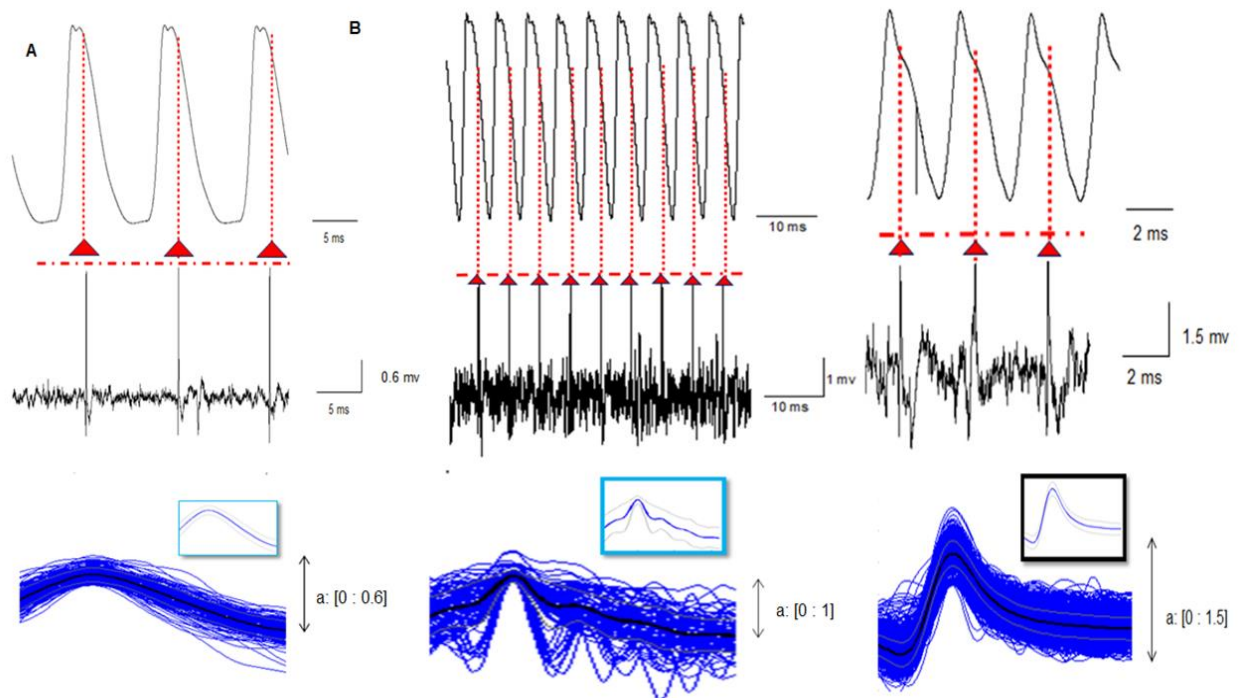


Figura 22. Relación del desplazamiento del estímulo aplicado (tipo Pacini) con la actividad extracelular. En la parte superior se muestra el desplazamiento del estímulo aplicado en: **A)** a una frecuencia de 100 Hz, en **B)** a una frecuencia de 200 Hz y en **C)** a una frecuencia de 300 Hz. En la parte intermedia de cada gráfico se muestra la respuesta de actividad extracelular multiunitaria. Las líneas verticales en rojo indican la relación de la respuesta con el desplazamiento. Las líneas horizontales en rojo indican el límite de las espigas de máxima amplitud. Los triángulos en rojo indican que espigas están siguiendo al desplazamiento. En la parte inferior de cada gráfico se muestra el cluster de la actividad extracelular unitaria que respondió y va en sincronía con el desplazamiento. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria (a). En el recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud. La letra (a) indica la amplitud de la actividad.

En la figura 22, el desplazamiento del estímulo está directamente relacionado con la respuesta de la actividad extracelular que corresponde al receptor tipo Pacini. En la imagen se muestra una relación sincronizada en periodos de hasta 10 ms.

Finalmente, habiendo determinado la relación respuesta – desplazamiento, tanto para receptores de tipo Pacini como para receptores de tipo Meissner, se analizó el tipo de respuesta que se presentó ante la aplicación de un estímulo táctil con un rango de frecuencia de 10-400 Hz.

Las respuestas obtenidas presentaron una descarga temporal sólo al final del estímulo, a estas se les clasificó como respuestas de tipo fásicas.

Las figuras 23 y 24 muestran la respuesta de la actividad extracelular relacionada al estímulo aplicado. Esta respuesta correspondió a receptores tipo Meissner y Pacini, respectivamente, con base en el estímulo aplicado sobre la piel glabra del gato. La respuesta presentó una clara descarga al final del estímulo, así como variaciones de descarga a lo largo de su aplicación (referido por A. Iggo and H. Ogawa ,1976).

Se obtuvieron los rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal mediante un análisis de wavelets. En las figuras **23 A2,B2 y C2** se muestran los *clusters* obtenidos después de una clasificación automática de espigas de máxima amplitud de los registros de la figura **23 A1,B1 y C1**.

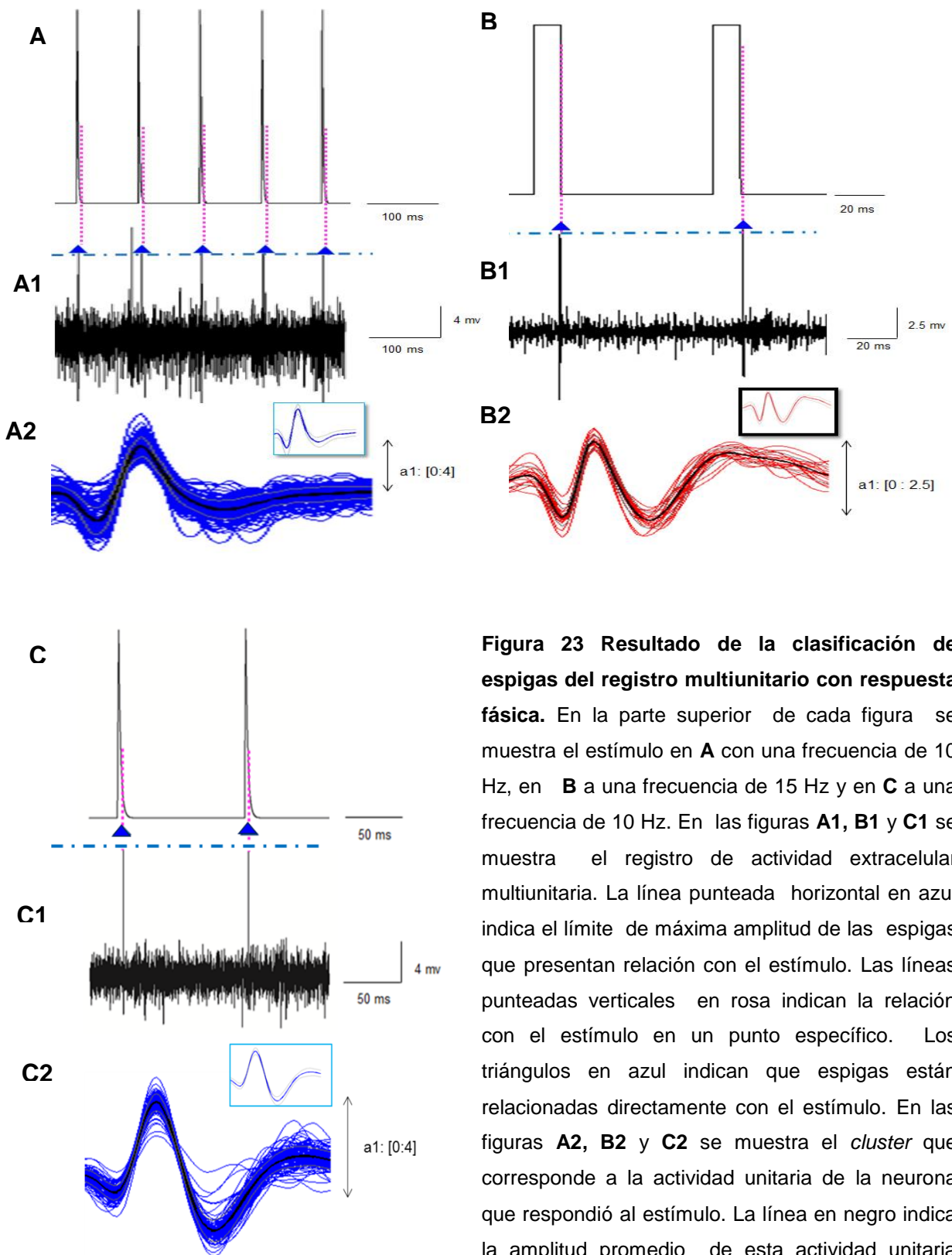


Figura 23 Resultado de la clasificación de espigas del registro multiunitario con respuesta fásica. En la parte superior de cada figura se muestra el estímulo en **A** con una frecuencia de 10 Hz, en **B** a una frecuencia de 15 Hz y en **C** a una frecuencia de 10 Hz. En las figuras **A1**, **B1** y **C1** se muestra el registro de actividad extracelular multiunitaria. La línea punteada horizontal en azul indica el límite de máxima amplitud de las espigas que presentan relación con el estímulo. Las líneas punteadas verticales en rosa indican la relación con el estímulo en un punto específico. Los triángulos en azul indican que espigas están relacionadas directamente con el estímulo. En las figuras **A2**, **B2** y **C2** se muestra el *cluster* que corresponde a la actividad unitaria de la neurona que respondió al estímulo. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria (a1). En el recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud promedio.

En la figura 24 se muestran las respuestas de tipo fásicas. Estas respuestas correspondieron a receptores tipo Pacini. Se obtuvo su actividad extracelular unitaria. En las figuras **24 A2,B2 y C2** se muestran los *clusters* obtenidos después de una clasificación automática de espigas de máxima amplitud de los registros de la figura **24 A1,B1 y C1**.

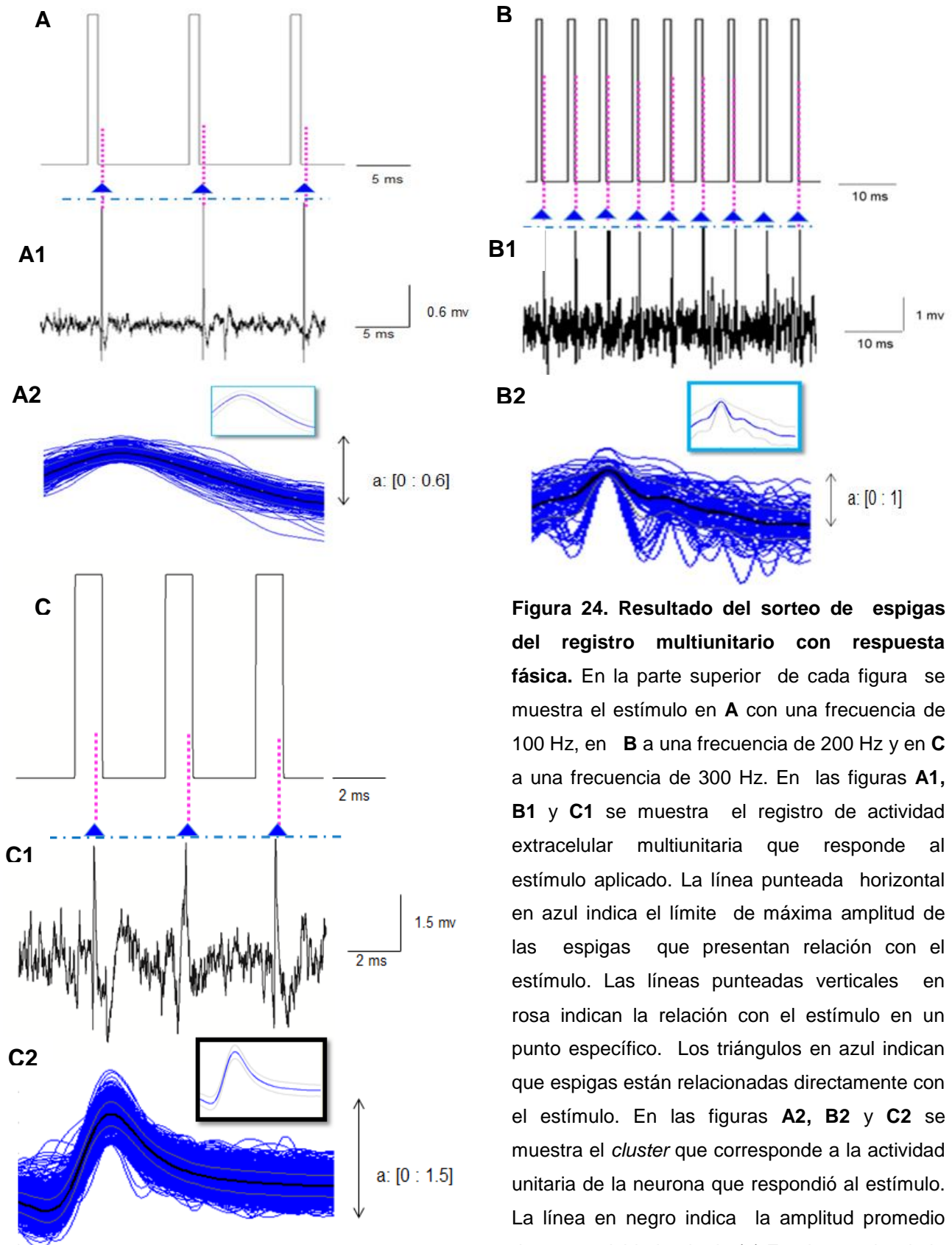


Figura 24. Resultado del sorteo de espigas del registro multiunitario con respuesta fásica. En la parte superior de cada figura se muestra el estímulo en **A** con una frecuencia de 100 Hz, en **B** a una frecuencia de 200 Hz y en **C** a una frecuencia de 300 Hz. En las figuras **A1**, **B1** y **C1** se muestra el registro de actividad extracelular multiunitaria que responde al estímulo aplicado. La línea punteada horizontal en azul indica el límite de máxima amplitud de las espigas que presentan relación con el estímulo. Las líneas punteadas verticales en rosa indican la relación con el estímulo en un punto específico. Los triángulos en azul indican que espigas están relacionadas directamente con el estímulo. En las figuras **A2**, **B2** y **C2** se muestra el *cluster* que corresponde a la actividad unitaria de la neurona que respondió al estímulo. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria (a). En el recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud.

Se verificó que la actividad extracelular sólo respondió a frecuencias altas y correspondientes a receptores de tipo Meissner y tipo Pacini. Este resultado se obtuvo mediante un cambio en la frecuencia del estímulo aplicado. Es decir de una frecuencia alta se cambió a un estímulo de menor frecuencia y correspondiente a receptores tónicos en un orden de 1 a 2 Hz. En la figura 25 y 26 se muestran los resultados asociados a receptores tipo Meissner y tipo Pacini respectivamente.

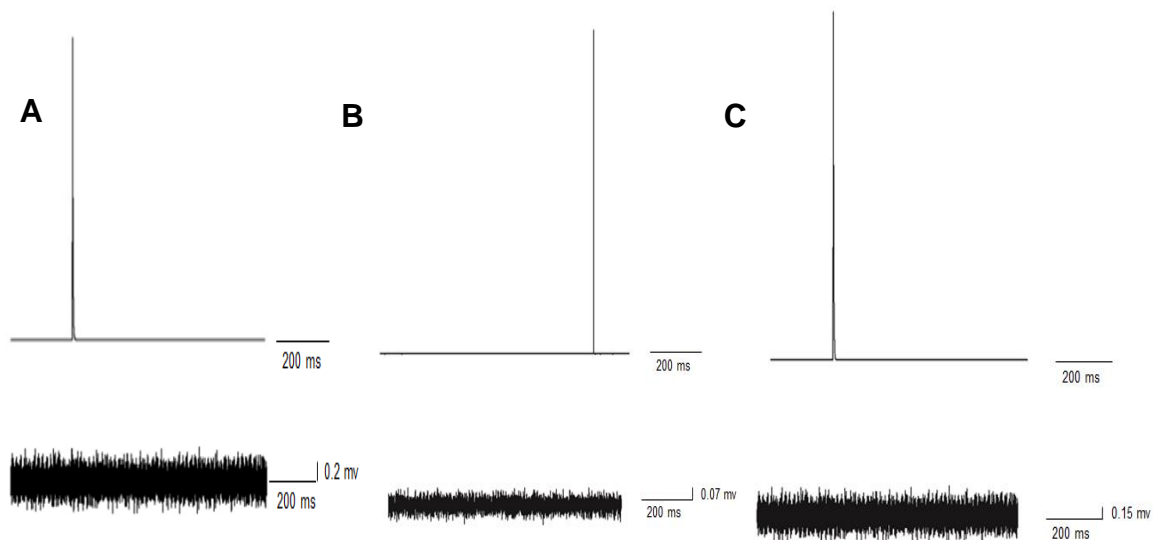


Figura 25. Ausencia de respuesta durante el cambio de frecuencia en actividad extracelular de tipo Meissner. En la imagen se muestran tres registros en experimentos en gato descerebrado. En la parte superior de las imágenes **A,B** y **C** se presenta el estímulo a 1 Hz de frecuencia y en la parte inferior se muestra la ausencia de respuesta de registros que respondieron a estimulación con frecuencias altas en **A)** fue un registro que respondió a una frecuencia de 10 Hz en **B)** a una estimulación de 15 Hz y en **C)** a una frecuencia de 30 Hz.

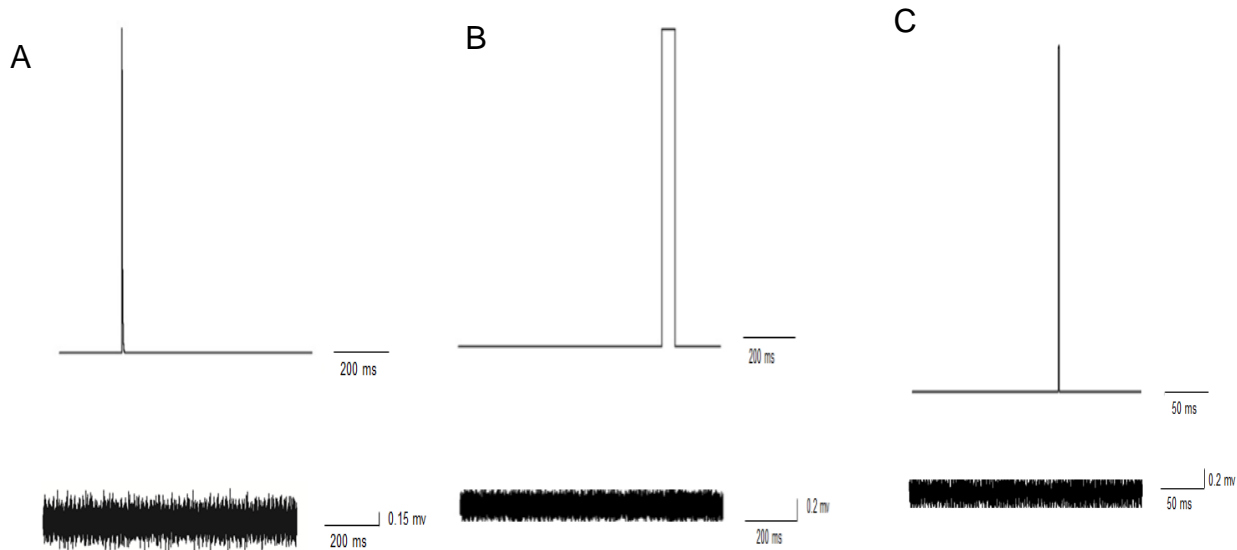


Figura 26. Ausencia de respuesta durante el cambio de frecuencia en actividad extracelular de tipo Pacini. En la imagen se muestran tres registros de experimentos en gato descerebrado. En la parte superior de las imágenes **A, B** y **C** se presenta el estímulo a 1 Hz de frecuencia y en la parte inferior se muestra la ausencia de respuesta de registros que respondieron a estimulación con frecuencias altas en **A)** fue un registro que respondió a una frecuencia de 100 Hz, en **B)** a una estimulación de 200 Hz y en **C)** a una frecuencia de 300 Hz. Este grafico confirmó que los registros sólo respondieron a estímulos de alta frecuencia.

En las figuras 25 y 26 se mostró la ausencia de respuesta ante el cambio de frecuencia del estímulo aplicado. Se comprobó que la respuesta de tipo fásica solo estuvo presente en la aplicación de estímulos de alta frecuencia y no se presentó en estímulos de baja frecuencia.

6.3 ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA DE INTERNEURONAS CON RESPUESTA FÁSICA DURANTE LA APARICIÓN DE PNDMS EN GATOS NO DESCEREBRADOS Y ANESTESIADOS CON PENTOBARBITAL SÓDICO.

Para esta preparación de no descerebración, los registros indicaron respuesta ante la aplicación de estímulos táctiles con rangos de frecuencia de entre 10 - 50 Hz, clasificados como respuesta fásica relacionada a receptores de tipo Meissner (Ver tabla 5).

TABLA 5. CLASIFICACIÓN PARA RESPUESTA DE TIPO FASICO				
No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RECEPTOR	FRECUENCIA	PROFUNDIDAD
1	No descerebración	2 Meissner	15 Hz	2431 μm
			40 Hz	2464 μm
2	No descerebración	15 Meissner	10 Hz	1147 μm
			10 Hz	1941 μm
			15 Hz	1941 μm
			20 Hz	1941 μm
			10 Hz	3054 μm
			20 Hz	3054 μm
			30 Hz	3054 μm
			10 Hz	3146 μm
			15 Hz	3146 μm
			15 Hz	3611 μm
			12 Hz	1449 μm
			12 Hz	1472 μm
			30 Hz	1472 μm
			20 Hz	1752 μm
10 Hz	1752 μm			

3	No descerebración	7 Meissner	10 Hz	1723 μm
			15 Hz	1723 μm
			20 Hz	1723 μm
			20 Hz	1119 μm
			10 Hz	1615 μm
			30 Hz	1682 μm
			30 Hz	1682 μm
			Total	24

A continuación se muestran las respuestas de la actividad eléctrica extracelular de tipo fásica. En la figura 27, se observó una clara disminución de la ocurrencia de PNDMs.

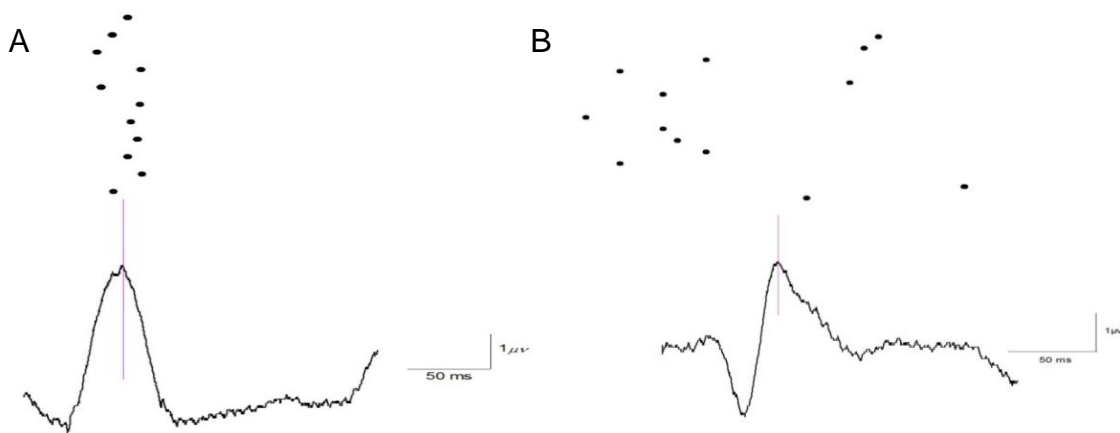


Figura 27. Presencia de PNDMs en respuesta de tipo fásica relacionadas a receptores de tipo Meissner. En la parte superior del gráfico cada punto indica la ocurrencia de un PNDM y en la parte inferior se muestra el PNDM con las características representativas para cada registro. Se registró actividad extracelular a diferentes frecuencias y profundidades en **A)** a una frecuencia de 15 Hz y a una profundidad de 2431 μm y en **B)** a una frecuencia de 40 Hz y una profundidad de 2464 μm .

Los PNDMs obtenidos en gato no descerebrado mostrados en la figura 27, mostraron una menor amplitud con respecto a los PNDMs de tipo Meissner obtenidos en gato descerebrado (ver figura 19).

En la preparación de no descerebración se obtuvieron respuestas de actividad extracelular relacionadas principalmente a receptores de tipo Meissner. Esta respuesta mostró una relación sincronizada con el desplazamiento del estímulo durante un periodo de tiempo. Además, se obtuvieron los rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal mediante un análisis de wavelets (Ver figura 28).

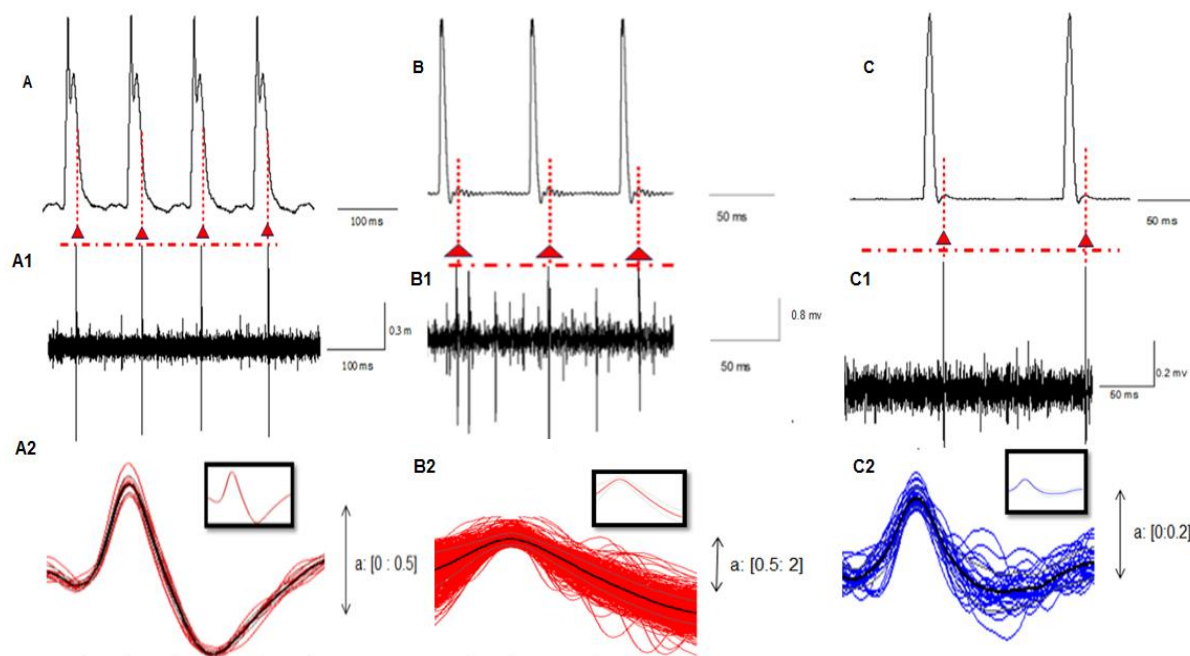


Figura 28. Relación del desplazamiento del estímulo aplicado (tipo Meissner) con la actividad extracelular. **A)** En la parte superior se muestra el desplazamiento del estímulo aplicado a una frecuencia de 10 Hz, en **B)** a una frecuencia de 15 Hz y en **C)** a una frecuencia de 10 Hz. En las figuras **A1**, **B1** y **C1** se muestra la respuesta de la actividad extracelular multiunitaria que presentó relación con el desplazamiento. Las líneas punteadas verticales en rojo indican la relación de la actividad extracelular con el desplazamiento. La línea punteada horizontal en rojo indica el límite de máxima amplitud de las espigas que van en relación con el desplazamiento del estímulo aplicado. Los triángulos indican que espigas están siguiendo al desplazamiento. En las figuras **A2**, **B2** y **C2** se muestra el cluster de la respuesta de la actividad extracelular unitaria que va en sincronía con el desplazamiento. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria. En el

recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud. La letra (a) indica la amplitud de la actividad.

Respuestas de la relación sincronizada con el estímulo durante un periodo de tiempo(ver figura 29). Se obtuvieron rastros de actividad de las distintas neuronas registradas por un mismo canal mediante un análisis de wavelets. En la figura **29 A2,B2 y C2** se mostraron los clusters resultado del análisis de los datos de los registros de las figuras **29 A1,B1y C1**. Esta respuesta está relacionada a receptores tipo Meissner.

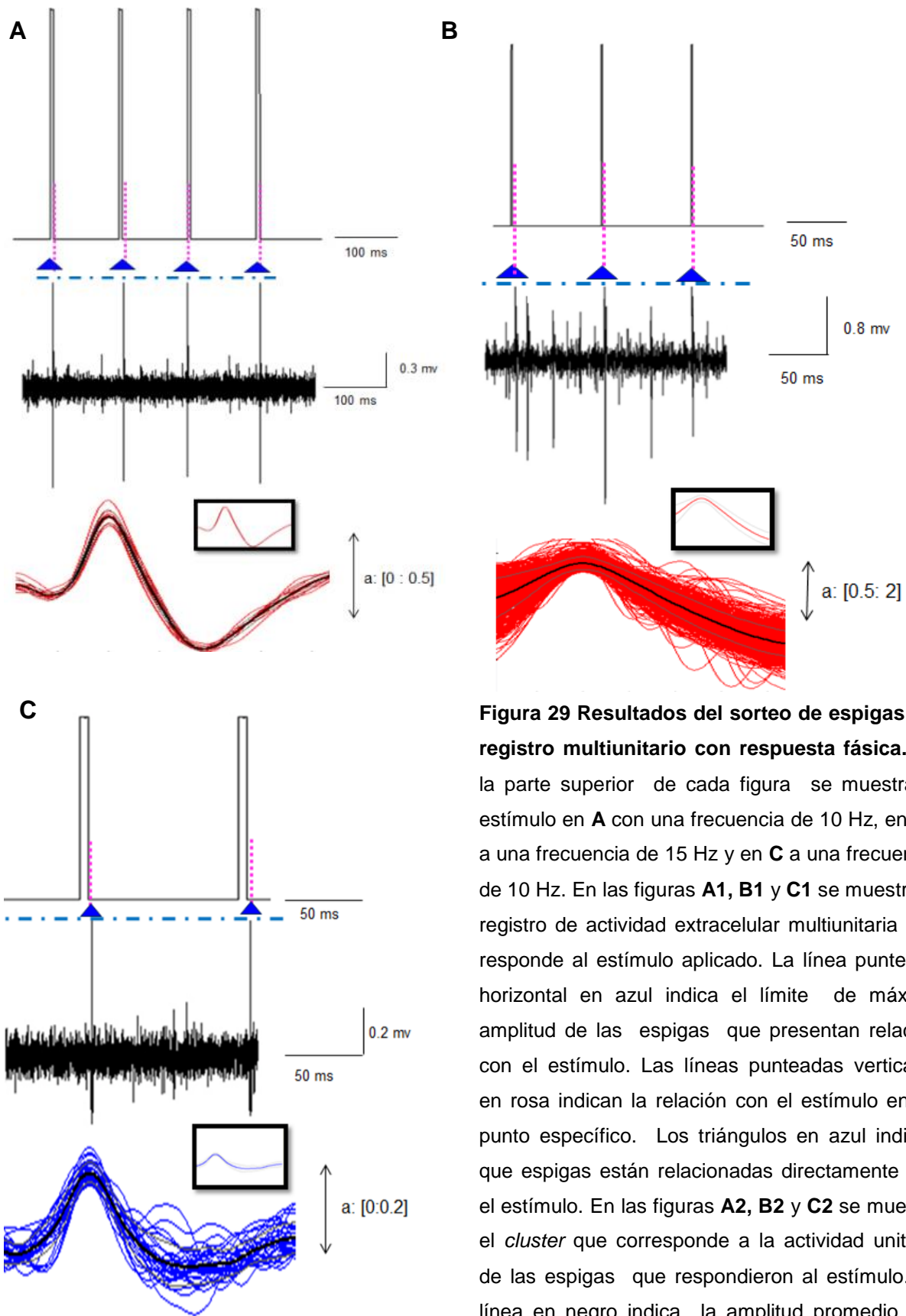


Figura 29 Resultados del sorteo de espigas del registro multiunitario con respuesta fásica. En la parte superior de cada figura se muestra el estímulo en **A** con una frecuencia de 10 Hz, en **B** a una frecuencia de 15 Hz y en **C** a una frecuencia de 10 Hz. En las figuras **A1**, **B1** y **C1** se muestra el registro de actividad extracelular multiunitaria que responde al estímulo aplicado. La línea punteada horizontal en azul indica el límite de máxima amplitud de las espigas que presentan relación con el estímulo. Las líneas punteadas verticales en rosa indican la relación con el estímulo en un punto específico. Los triángulos en azul indican que espigas están relacionadas directamente con el estímulo. En las figuras **A2**, **B2** y **C2** se muestra el *cluster* que corresponde a la actividad unitaria de las espigas que respondieron al estímulo. La línea en negro indica la amplitud promedio de esta actividad unitaria (*a*). En el recuadro de la parte superior izquierda se aprecia la forma de la amplitud.

Finalmente, en la figura 30 se mostró la ausencia de respuesta a un cambio en la frecuencia de estimulación en los registros que estaban respondiendo a frecuencias altas. El gráfico indicó la ausencia de respuesta, lo cual confirmó nuestra clasificación en respuesta de tipo fásica para el receptor de tipo Meissner.

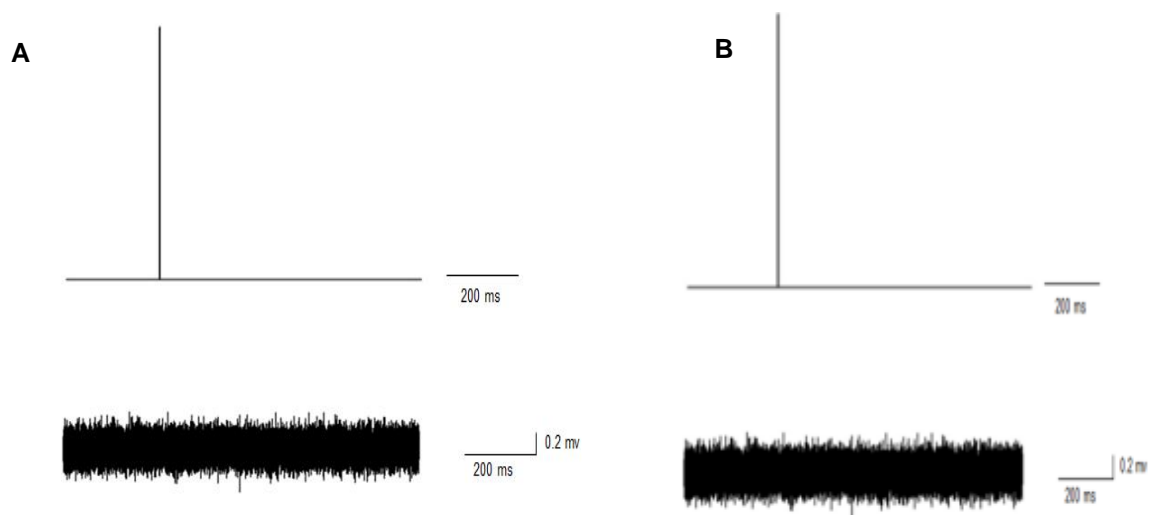


Figura 30. Ausencia de respuesta durante el cambio de frecuencia en actividad extracelular de tipo Meissner. En la imagen se muestran dos registros de experimentos con gato no descerebrado. En la parte superior de las imágenes **A** y **B** se presenta el estímulo a 1 Hz de frecuencia y en la parte inferior se muestra la ausencia de respuesta de los registros que respondieron a estimulación con frecuencias altas en **A**) fue un registro que respondió a una frecuencia de 10 Hz y **B**) fue un registro que respondió a una estimulación de 15 Hz. Este gráfico confirmó que los registros sólo respondieron a estímulos de alta frecuencia de disparo.

Se obtuvo el análisis estadístico sobre la relación entre el número de PNDMs y la frecuencia de estimulación para repuestas de tipo fásico. Se emplearon sólo los registros de gato descerebrado ya que fueron los únicos que contaban con PNDMs de características consideradas normales en la literatura.

A continuación, se muestra el arreglo de las frecuencias con base en su receptor y el intervalo al que corresponde.

Tabla 5.1		
Número	Intervalo de frecuencia	Receptor
1	< 5 Hz	Terminaciones Ruffini
2	5 - <10 Hz	Merkel
3	10 - 50 Hz	Meissner
4	60 – 400 Hz	Pacini

Ambos grupos se compararon usando una prueba estadística t-student para muestras independientes. Esta indicó valores para $F=1.585$ y $p=0.237$, lo cual refirió que existe diferencia significativa entre el número de potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal presentes en la aplicación de estímulos táctiles para los intervalos 3 y 4 (ver tabla 5.1). Por lo tanto, podemos concluir que en la preparación de gato descerebrado el número de PNDMs presentes para cada registro está relacionado de forma directa a la frecuencia del estímulo.

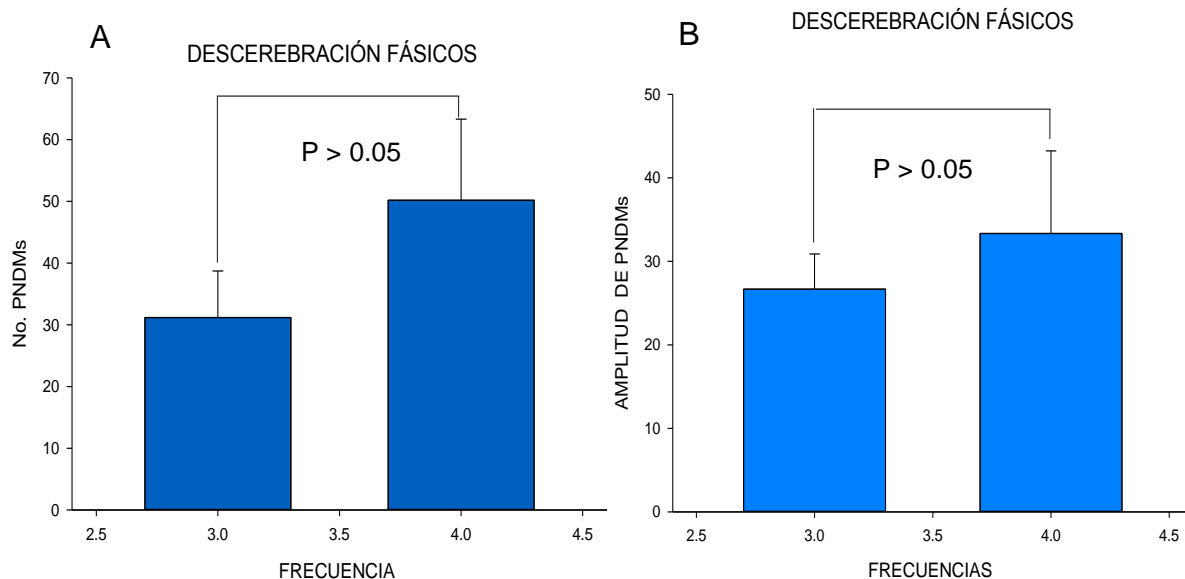


Figura 31 Gráfico de la relación del número de PNDMs y sus amplitudes con la frecuencia .

A. Indica el promedio del número de picos y su relación con la frecuencia en preparación de descerebración y para respuestas de tipo fásico. **B.** Indica el promedio las amplitudes y su relación con la frecuencia para respuestas de tipo fásico.

Además, se promediaron las amplitudes de los PNDMs de acuerdo al rango de frecuencia correspondiente. De igual manera, se organizaron en dos grupos Pacini y Meissner (ver tabla 5.1). Ambos grupos se compararon usando una prueba estadística t-student para muestras independientes. Esta indicó valores de $F=2.162$ y $P=0.172$, lo cual nos muestra que existe diferencia significativa entre las amplitudes reportadas para cada rango de frecuencia. Por lo tanto, podemos concluir que en la preparación de gato descerebrado la amplitud de los PNDMs se relaciona con la frecuencia del estímulo.

En base a los datos anteriormente mencionados se logra determinar que las neuronas asociadas a los PNDMs, mostraron un patrón de disparo fásico que se adapta rápidamente a la estimulación táctil de alta frecuencia. Dichas interneuronas presentan mayor actividad eléctrica espontánea con respuesta fásica en gato descerebrado.

6.4 INTERNEURONAS QUE NO PRESENTARON RESPUESTA ANTE ESTÍMULOS DE ALTA FRECUENCIA (10- 400 Hz)

En este apartado se analizó la actividad eléctrica extracelular que participo en la generación de PNDMs y que no presentó respuesta ante la aplicación de estímulos de alta frecuencia pero si respondió a estímulos menores a 10 Hz.

A continuación se presentan los resultados obtenidos. Estos representan el 39% del total de las respuestas obtenidas. La respuesta se presentó ante la aplicación de estímulos táctiles con frecuencias de entre 1 y 7 Hz (ver tablas).

TABLA 6 .CLASIFICACIÓN PARA RESPUESTA DE TIPO TÓNICO				
No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RECEPTOR	FRECUENCIA	PROFUNDIDAD
1	Descerebración	1 Ruffini	2 Hz	1497 μm

2	Descerebración	4 Ruffini	1 Hz	1497 μm
			1 Hz	882 μm
			1 Hz	882 μm
			2 Hz	1161 μm
3	Descerebración	3 Merkel	5 Hz	1757 μm
			7 Hz	1757 μm
			5 Hz	1915 μm
TOTAL	8			

TABLA 7. CLASIFICACIÓN PARA RESPUESTA DE TIPO TÓNICO				
No. DE SUJETO	TÉCNICA QUIRÚRGICA	RECEPTOR	FRECUENCIA	PROFUNDIDAD
1	No descerebración	3 Merkel	5 Hz	1927 μm
			3 Hz	1927 μm
		Ruffini	5 Hz	2431 μm
			7 Hz	2431 μm
2	No descerebración	3 Ruffini	1 Hz	1632 μm
			2 Hz	1147 μm
		4 Merkel	5 Hz	1632 μm
			7 Hz	1941 μm
			5 Hz	1941 μm
			7 Hz	2694 μm
		1 Hz	2694 μm	

3	No descerebración	2 Ruffini	2 Hz	2694 μm
		2 Merkel	7 Hz	1723 μm
			1 Hz	1590 μm
			5 Hz	1590 μm
TOTAL	15			

Estos registros presentaron una respuesta sostenida durante el estímulo y se clasifico como respuesta de tipo tónico. Y de acuerdo a la frecuencia empleada, correspondieron a receptores tipo Merkel y Ruffini como se muestra en la figura 32.

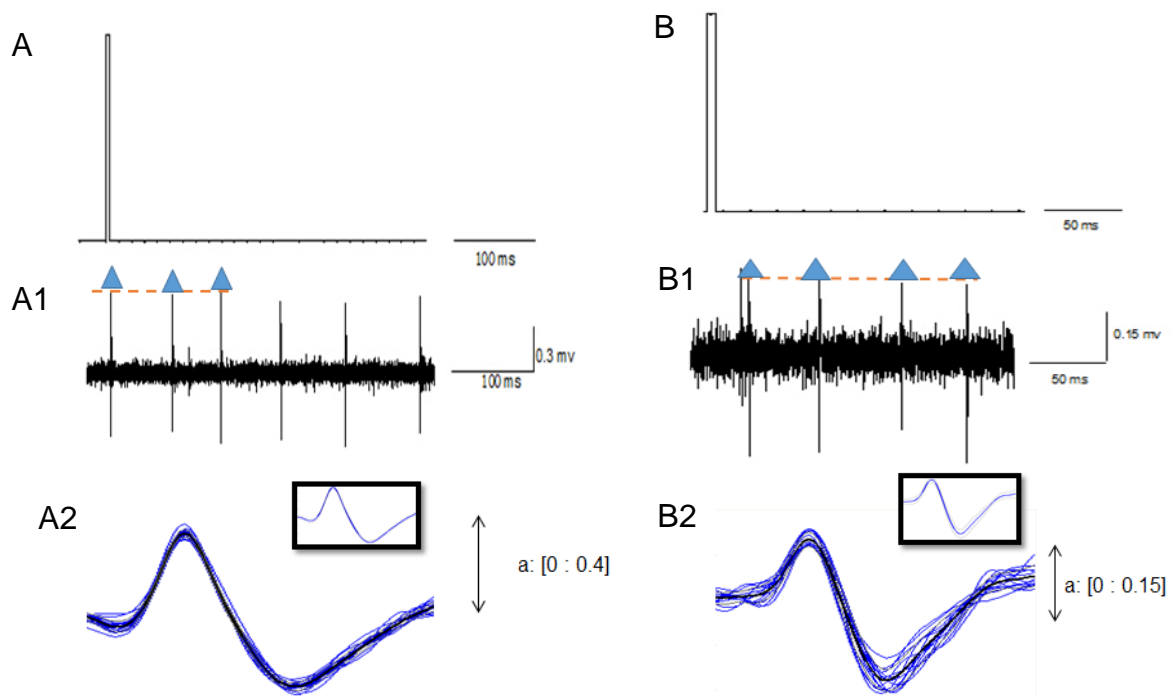


Figura 32. Relación Estímulo – respuesta de actividad extracelular (tipo Merkel y Ruffini).

Estos registros fueron obtenidos en gato no descerebrado. En la parte superior se presenta el estímulo a diferentes frecuencias. En **A)** una frecuencia de 2 Hz y en **B)** a una frecuencia 5 Hz. En **A1** y **B1** se muestra la respuesta de la actividad extracelular al estímulo aplicado. La línea punteada horizontal en naranja indica la amplitud máxima de la respuesta. En **A2** y **B2** se muestra el cluster de la actividad extracelular unitaria que responde al estímulo aplicado. La línea en negro indica la amplitud promedio de la actividad unitaria. En la imagen superior del lado izquierdo se muestra la forma promedio del potencial de dicha actividad.

Estos datos permitieron corroborar que las neuronas que intervienen en la generación de potenciales espontáneos negativos presentaron respuestas fásicas a estímulos de alta frecuencia.

Finalmente, se obtuvo histológicamente la localización de los registros de actividad extracelular involucrada en la generación de PNDMs. Al haber finalizado uno de los experimentos se extrajo la médula espinal y se realizó la histología del segmento lumbar de la médula espinal, para verificar la zona de registro de los datos obtenidos, así como la profundidad (figura 33).

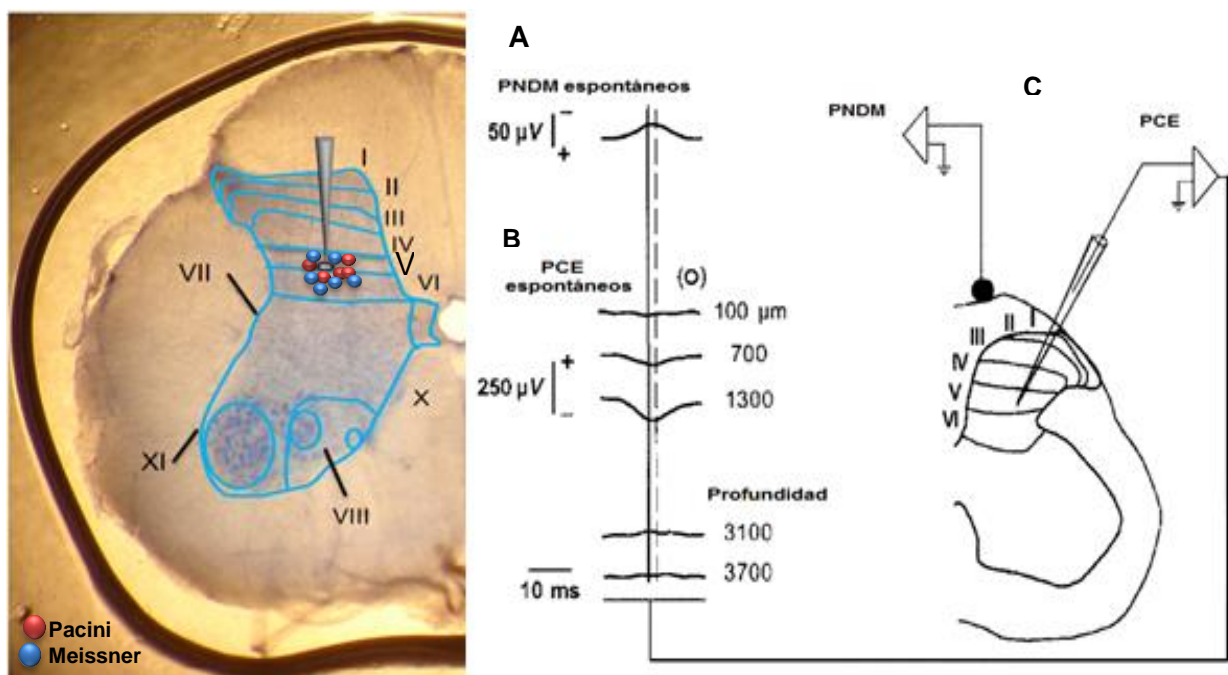


Figura 33. Localización intraespinal del grupo neuronal involucrado en la generación de los PNDMs en la médula espinal del gato. A la derecha se muestra la histología del segmento lumbar L₆ de la médula espinal con subdivisiones del asta dorsal, en la cual se indica la localización de registro intramedular. A la izquierda se muestra el esquema del mismo en **A**: se mostró un PNDM registrado de la superficie del segmento lumbar L₆. **B**: representa los PCE registrados intraespinalmente a diferentes profundidades. Las líneas discontinuas indican el tiempo de medición de la amplitud (2 ms) después del pico máximo de un PNDM espontáneo. **C**: Esquema del lugar de registro del PNDM y de los PCE, el cual corresponde al segmento lumbar L₆ localizado a una profundidad de 1500 μm. PNDM corresponde al potencial negativo del dorso de la médula espinal, PCE corresponde al potencial de campo extracelular (Modificado Manjarrez y cols., 2000).

6.5 Resumen de resultados y conclusión:

1.- Los grupos de neuronas que intervienen en la generación de potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal (PNDMs) presentaron respuestas fásicas a estímulos táctiles, en un rango de frecuencia de entre 10 y 400 Hz.

2.- En el gato descerebrado se presentaron respuestas de tipo fásico. Las respuestas obtenidas fueron para un rango de frecuencia de entre 10 y 400 Hz. Estas fueron correspondientes a receptores tipo pacini.

3.- Los PNDMs registrados en gato descerebrado no presentaron alteración en su amplitud.

4.- En el gato no descerebrado se presentaron respuestas de tipo fásico. Las respuestas obtenidas fueron para un rango de frecuencia de entre 10 y 50 Hz. Estas fueron correspondientes a receptores tipo meissner.

5.- Los PNDMs registrados en gato no descerebrado presentaron amplitudes por debajo de lo normal.

6.- Los PNDMs presentaron mayor incidencia en gato descerebrado.

7. DISCUSIÓN

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis indicaron que las neuronas del asta dorsal de la médula espinal involucradas en la generación de PNDMs exhiben respuestas fásicas a estímulos táctiles en un rango de frecuencia de 10 - 400 Hz.

A continuación se discutirá la justificación del trabajo con base en el tipo de experimentación, las respuestas de los grupos neuronales involucrados en la generación de PNDMs y los mecanorreceptores fásicos.

Utilizamos como animal de experimentación al gato, para estudiar el tipo de respuesta que exhiben los grupos neuronales involucrados en la generación de PNDMs ante la aplicación de estímulos táctiles. Hemos empleado esta especie, ya que en ella se ha descrito detalladamente la actividad eléctrica espontánea de estos grupos neuronales y su localización.

Para este estudio se emplearon dos tipos de preparación: gato descerebrado y gato no descerebrado.

En la preparación de gato descerebrado se empleó una descerebración precolicular – premamilar con la finalidad de evitar la percepción de dolor y asegurando que la vía de locomoción permanezca intacta. Los resultados obtenidos indicaron que estos grupos neuronales respondieron a frecuencias bajas y altas. Las respuestas obtenidas fueron de tipo fásico y tónico. No obstante predomina la respuesta de tipo fásico.

Sin embargo, se ha reportado en la literatura que los anestésicos deprimen la actividad espontánea de la médula espinal (Gasteiger & Ichikawa 1963). Este dato sugiere que las respuestas que exhiben estos grupos neuronales ante la aplicación de estímulos táctiles podrían modificarse. Por lo cual, se empleó la preparación de gato no descerebrado.

En la preparación de gato no descerebrado se usó un anestésico general de tipo barbitúrico, el pentobarbital sódico, con la finalidad de evitar la percepción de

dolor y observar si este presentaba influencia sobre la respuesta que exhiben los grupos neuronales involucrados en la generación de PNDMs ante la aplicación de estímulos táctiles. Los resultados indicaron que los grupos neuronales presentaban respuesta sólo a frecuencias bajas. Las respuestas obtenidas fueron de tipo fásico y tónico. Sin embargo, también se observó un predominio de respuestas de tipo fásico.

Los grupos neuronales involucrados en la generación de PNDMs se localizaron en las láminas III a la VI del asta dorsal de la médula espinal (Gasteiger e Ichikawa, 1963; Manjarrez y cols., 2000). Estos grupos pueden registrarse en la médula espinal a nivel lumbar, entre los segmentos lumbares de L5 a L7 (Manjarrez y cols., 2001). De acuerdo a Manjarrez y cols., 2000, dicho grupo de neuronas utiliza las mismas vías funcionales que aquellas neuronas que reciben entrada mono y polisinápticas de aferentes cutáneas de bajo umbral.

Estos grupos neuronales fueron considerados responsables de generar, por una influencia presináptica, la variabilidad de las respuestas monosinápticas de las vías aferentes (Manjarrez y cols., 2000). Además, estos grupos se localizaron en la misma zona de proyección de aferentes cutáneas de mecanorreceptores. Estas neuronas proyectan en una dirección rostro-caudal en las láminas III-IV de Rexed del asta dorsal de la médula espinal (Levinsson y cols., 2002; Eccles y cols., 1963a; Tapper y cols., 1973; Brown y cols., 1973).

Los hallazgos descritos anteriormente han sugerido que los grupos neuronales del asta dorsal involucrados en la generación de los PNDMs están localizadas en la misma región donde se encuentran neuronas que responden a la estimulación mecanorreceptiva, ya que reciben entradas de aferentes cutáneas de mecanorreceptores (Willis y Coggeshall, 1991; Brown, 1981; Manjarrez y cols., 2000). Lo cual nos permite sugerir que estos grupos neuronales, al estar recibiendo entradas sinápticas de mecanorreceptores, podrían estar interviniendo en la transmisión de la información sensorial.

La pregunta por responder sería: ¿De qué manera influyen estos grupos neuronales sobre la transmisión de la información sensorial? y ¿qué características de la transmisión de información estarían influenciadas?. Nosotros sugerimos que

con base en el tipo de respuesta que presentan dichos grupos neuronales se responderían estas preguntas.

“MECANORRECEPTORES FÁSICOS”

En esta tesis se exploró el papel que juega el sistema somatosensorial sobre los grupos neuronales con actividad espontánea, involucrados en la generación de PNDMs.

Los grupos neuronales se estimularon a diferentes rangos de frecuencia, mediante la aplicación de estímulos táctiles sobre la piel glabra de la extremidad posterior del gato en ambas preparaciones. Los resultados obtenidos indicaron que los grupos neuronales registrados a mayor profundidad y, que respondieron a estímulos táctiles en un rango de frecuencia de 10-400 Hz presentaron respuestas de tipo fásico. Sin embargo la presencia y característica de los PNDMs fue influenciada por el tipo de preparación. En gato descerebrado los PNDMs presentaban rangos normales en su amplitud, duración y presencia. Siendo lo contrario en gato no descerebrado. Estos resultados nos permitieron sugerir que la presencia de los PNDMs estuvo influenciada por el anestésico ya que disminuye la actividad espontánea de la médula espinal, siendo afectadas las características y presencia de los PNDMs. Sin embargo, la respuesta fue de tipo fásico, predominante en ambas preparaciones, e íntimamente relacionada con la activación de mecanorreceptores específicos.

Los mecanorreceptores corresponden a terminaciones nerviosas libres que actúan como transductores, mismos que son capaces de convertir los estímulos externos en una señal nerviosa específica, es decir, en un potencial eléctrico. Además, cuanto mayor sea el estímulo más rápido será el ritmo de descarga desde el mecanorreceptor. Por consiguiente, la suma de dichas descargas forma un código de frecuencia modulada, que el sistema nervioso central utiliza para analizar lo sucedido en el medio externo; un ejemplo de esto es la cinestesia del cuerpo.

Los mecanorreceptores de tipo Pacini y Meissner presentan una respuesta adaptativa sensorial de tipo fásica y responden a frecuencias altas. Son considerados receptores fásicos o también denominados receptores de velocidad y son importantes en el control del movimiento (Martín 2006).

Vallbo (1968) los clasificó como receptores de adaptación rápida tipo I (corpúsculos de Meissner) capaces de percibir sensación de presión y responder a estimulación de la piel glabra, pero responden al desplazamiento constante. Y los receptores de adaptación rápida tipo II (corpúsculos de Pacini) capaces de seguir a altas frecuencias de vibración, pero no frecuencias bajas. Estos receptores no son excitados por estimulación constante de la piel.

Otros autores reportaron que los corpúsculo de Pacini presentan la capacidad de seguir fielmente altas frecuencias de vibración (hasta 1000 Hz), lo cual depende de sus características morfológicas, mismas que le permiten actuar como filtros pasa altas, permitiendo la entrada sólo de componentes rápidos de un estímulo aplicado para alcanzar el núcleo del receptor (Iggo A. 1984).

Además, el factor de seguridad de retroalimentación, es una característica presente en todos los receptores, y que asegura un abundante suministro de información para el control de la función motora (receptores de estiramiento, receptores cutáneos, la retina y aparato vestibular) (Gasteiger & Brust Carmona 1964).

Los hallazgos anteriores nos permiten sugerir que la actividad de estos grupos neuronales, al estar relacionada directamente con receptores fásicos, está interviniendo en la modulación de la transmisión de la información sensitiva. Y debido a que son receptores que envían información sobre la velocidad de cambio del estímulo, la respuesta de estas neuronas estaría relacionado con la activación de la respuesta, es decir, que sea más rápida o lenta. Dicha características a modificar podría ser la velocidad del movimiento, mediante la activación de grupos musculares periféricos a la articulación que están realizando dicha actividad motora. Tal que si la presencia de la respuesta fásica es mayor, pueda favorecer la aceleración de la respuesta motora.

Sugerimos que dicha respuesta adaptativa sensorial está de cierta manera codificando la información de receptores, misma que se envía al SNC para realizar modificaciones en las funciones específicas de la vía sensitiva de la columna dorso lemnisco medial.

La vía de los cordones dorsales, o también conocida como vía dorso-lemnisco-medial, es la encargada de conducir sensibilidad táctil fina, discriminativa (epicritica), sensibilidad vibratoria y sensibilidad propioceptiva consciente. Sus receptores son, por tanto, mecanorreceptores de mayor o menor complejidad. Las fibras sensitivas, al entrar en la médula espinal, ascienden por los cordones medulares estableciendo sinapsis en el asta posterior de la médula espinal. En función del tipo de sensibilidad que baja por estas fibras, la sinapsis se realiza en distintos lugares del asta dorsal (en distintas láminas de Rexed), lo cual permite una organización topográfica de las modalidades sensitivas en el sistema nervioso central.

Además, es importante mencionar que a partir de la región torácica, el cordón posterior se organiza en dos fascículos: Fascículo grácilis, que conduce sensibilidad de la mitad inferior del cuerpo, y el Fascículo cuneatus, que conduce sensibilidad de la mitad superior de cuerpo.

POTENCIALES ESPONTÁNEOS NEGATIVOS DEL DORSO DE LA MÉDULA ESPINAL (PNDMS).

La actividad eléctrica espontánea de la médula espinal, es una característica importante del sistema nervioso central en los vertebrados. Suponemos que la actividad espontánea de las neuronas que generan los PNDMs podría estar influenciada por el tipo de preparación empleada para su registro. Esto implica que los PNDMs presenten alteración en su amplitud, el número de PNDMs y la cantidad de respuestas fásicas.

La actividad eléctrica espontánea de la médula espinal fue descrita detalladamente por Bremer en 1941, y posteriormente ten Cate, en 1947 y 1950. Estos autores reportaron que la actividad espontánea registrada en el

electroespínograma (SEG) estaba constituida por potenciales de amplitud promedio de 30 μ v.

Sin embargo, fueron Gasteiger e Ichikawa (1963) y Manjarrez y colaboradores (2000) quienes caracterizaron en detalle esta actividad poblacional en el gato. Ellos describieron que la actividad espontánea o de fondo registrada en la médula espinal la constituyen los denominados PNDMs (Gasteiger e Ichikawa, 1963). Dichos potenciales según Bremer y Ten Cate afirman, son más fácilmente determinables en áreas de materia gris que contienen neuronas con una gran tendencia a disparos espontáneos, detectados mediante microelectrodos colocados en dicha zona.

El registro de la actividad neuronal se realizó mediante electroespínograma (SEG). Este permitió determinar que la actividad eléctrica espontánea de la médula espinal se ve influenciada en su amplitud y frecuencia por tres parámetros: propiedades intrínsecas neuronales, neuromoduladores y activación sincrónica neuronal. Estos parámetros, al ser alterados, generan variaciones en el potencial eléctrico, como se observó en animales anestesiados. Algunos autores han reportado que los anestésicos deprimen la actividad espontánea de la médula espinal. Sin embargo esto no sucede en el animal espinalizado (Gasteiger & Ichikawa 1963). El SEG en gato espinalizado y descerebrado tiene los mismos componentes, pero su magnitud y frecuencia de ocurrencia son mayores en el animal espinalizado (Brust-Carmona & Gasteiger 1967). Estos hallazgos nos permitieron sugerir el uso de dos preparaciones (gato descerebrado y gato no descerebrado) para analizar la existencia de cambios en la generación y características de potenciales espontáneos negativos PNDMs.

Para gato no descerebrado empleamos como anestésico pentobarbital sódico (anestésico desde 1930), es un barbitúrico y depresor del SNC, de acción larga y cuyo término de acción es fundamentalmente por oxidación, en su cadena lateral, a nivel microsomal hepático (La Du y cols., 1971). Actúa potenciando los efectos inhibitorios del GABA. Tiene efectos sobre los receptores GABA_A. Son receptores unidos a los canales de Cl⁻. El pentobarbital disminuye considerablemente la demanda de oxígeno por parte del SNC.

En los resultados obtenidos en este trabajo indicaron:

Los PNDMs registrados en gato descerebrado presentaron potenciales de mayor amplitud, en un rango de $\pm 100 \mu\text{V}$, con espiga de polaridad negativa más precisa y mayor cantidad de respuestas de tipo fásico. Los PNDMs registrados en gatos no descerebrados y tratados con pentobarbital sódico presentaron potenciales de menor amplitud en un rango menor a $5 \mu\text{V}$ y una menor cantidad de respuestas de tipo fásico. Este resultado se atribuye a la influencia que ejerce el pentobarbital sódico sobre los **PNDMs**. Dicho anestésico aumentó el periodo de reposo entre los potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal y disminuyó la amplitud de los mismos, disminuyendo la frecuencia de activación de los conjuntos neuronales. (Ver figura 19 y 27).

Las respuestas de los grupos neuronales podrían presentar variaciones ante un aumento o disminución de la frecuencia del estímulo táctil aplicado, ya que la respuesta depende de la información aferente. Gasteiger & Ichikawa (1963) mencionaron que los potenciales grandes obtenidos en un electroespínograma dependen de los impulsos aferentes. Esto explica el por qué los PNDMS sólo presentan respuestas de tipo fásico ante la aplicación de estímulos táctiles de alta frecuencia (10-400 Hz). Sin embargo, aquellas respuestas obtenidas en frecuencias menores a 10 Hz fueron de tipo tónico.

Las neuronas que presentaron respuesta ante la aplicación de un estímulo táctil en un rango de frecuencia de entre 1 y 9 Hz corresponden a receptores de tipo Ruffini (adaptación lenta tipo I), para una frecuencia de 1- 4Hz. Por su parte, el receptor Merkel (adaptación lenta tipo II), se activó durante la aplicación de un estímulo táctil a una frecuencia de 5- 9Hz.

Además, las neuronas con descarga fásica incrementaban su descarga basal durante la ocurrencia de los PNDMs espontáneos. Algo que no sucedió con las unidades obtenidas con respuesta de tipo tónico, lo cual demostró que no tuvo relación directa con los PNDMs. Estos concuerdan con lo reportado por Manjarrez y colaboradores (2003b) sobre interneuronas que responden a la estimulación de

aferentes cutáneos y presentan un incremento de actividad durante la ocurrencia de los PNDMs.

Los hallazgos anteriores sugieren que el grupo de neuronas del asta dorsal de la médula espinal espontáneamente activas involucradas en la generación de PNDMs establecen un nivel de modulación de la transmisión de señales en la vía espinal sensitiva y motora (Manjarrez y cols., 2000; 2001). Y que además, durante la ejecución de un acto motor, existe una interacción de sistemas espinales con sistemas aferentes, propiciando que los reflejos dependan del estado de muchas interneuronas espinales que reciben gran cantidad de influencias (Skinner y Willis, 1970; Fu y cols, 1974; Skinner Remmel, 1978; Edgley y Jankowska, 1987; Wall y Lidieth, 1997). Esto apoya los resultados obtenidos, ya que las neuronas que generan los PNDMs exhibieron en mayor porcentaje respuestas de tipo fásico ante la aplicación de estímulos táctiles de alta frecuencia en un rango de entre 10 - 400 Hz. Esto nos permitió sugerir que la relación existente entre PNDMs y respuestas fásicas, podrían estar involucrada en la modulación de la velocidad de la respuesta sensitiva presente ante un estímulo externo.

8. CONCLUSIÓN

Las neuronas del asta dorsal que generan los potenciales espontáneos negativos del dorso de la médula espinal (PNDMs) del gato presentan respuestas fásicas a estímulos táctiles de alta frecuencia, y están asociadas con fibras aferentes de receptores de tipo Meissner y Pacini. La incidencia de dichas respuestas fásicas es predominante en ambas preparaciones (gato descerebrado y no descerebrado); sin embargo, la amplitud e incidencia de los PNDMs se encuentra disminuida en la preparación del gato no descerebrado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1.] Adrian E. D. and Zotterman Y (1926) The impulses produced by sensory nerve endings. Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure.
- [2.] Bolanowski S. J., Gescheider G. A., Verrillo R. T. and Checkosky C. M. (1988). Four channels mediate the mechanical aspects of touch J. Acoust. Soc. Am. 84, 1680
- [3.] Brown A. G. and Fyffe R. E. W. (1981) Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in cat J. Physiol. 321, pp. 31-47 31.
- [4.] Bustamante B.J. (1987) Neuroanatomía funcional. Addison –Wesley Iberoamericana ,pp. 53-81.
- [5.] Brust -Carmona, H., Levitan, H, H., Kasprzak, H. and Gasteiger, E.L.(1968) Spinal electrogram of the cat. I. Study of origin by degeneration and ischemia .Electroenceph.Clin.Neurophysiol. 25:101-110
- [6.] Brust Carmona, Levitan, H, Kasprzak,H. and Gasteiger, E.L (1969) Spinal electrogram: synchronizing and desynchronizing influences of the brainstem.Bol.Estud.Méd.Biol.,26:133-137.
- [7.] Chubbuck, J.G (1966) Small-motion biological stimulator. APL.Tech. Digest. 5:18-23
- [8.] Enrique Laforé Antón (2005) Evaluación de la anestesia inducida con el uso del pentobarbital sódico en caninos, Ciudad de lima.
- [9.] Fyffe.R.E. (1984) Afferents fibers. In: Davidoff, R.A(ed).Handbook of the spinal cord.vol 2&3: Anatomy and Physiology. New York. Marcel Dekker.pp79-136
- [10.] Gardner. P. and Kandel, E, R (2000) Touch. In: Kandel, E.R., Schwartz,J.H. and Jessel.T.m. Principles of neural science.McGraw-Hill,4th edition. New York.pp 430-450
- [11.] Goodman L.S.and Gilman A. (1975) The pharmacological Basis of therapeutics.5^a ed. MacMillan Publishing Co.,Inc. New York.

- [12.] Gasteiger, E.L. and Ichikawa, S. (1963) the relation of the spinal electrogram of the cat to intrinsic and extrinsic factors .Biol.Inst.Estud.Méd.Biol.Méx. 21:223-234
- [13.] Gasteiger, E.L. and Brust- Carmona H. (1964) On the relation of spinal reflex variability to internal noise. NY Acad. Sci. Ser.II 26(6):688-696.
- [14.] Gasteiger ,E.L., .and Rothmeier,J.J.,(1968) Characterization of electrical activity of the Spinal cord by pattern recognition techniques .Department of physical Biology ,N.Y.State Veterinary College, Cornell University, Ithaca ,New York.: 257-265.
- [15.] Iggo A. (1984) Cutaneous Receptors and their Sensory Functions From the Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Edinburgh, VOL. 9-B No.
- [16.] Iggo A. (1973) Handbook of Sensory Physiology. Somatosensory System. Volume 2. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- [17.] Knyihar-Csillik E., Csillik B., and Rakic P. (1982) Periterminal synaptology of dorsal root glomerular terminals in the substantia gelatinosa of the spinal cord in the Rhesus monkey The journal of comparative neurology 210:376-399
- [18.] Levitan, H., Gasteiger ,E.L., Kasprzak,H. and Brust Carmona ,H.(1968) Spinal electrogram of the cat. II. Supraspinal Influences. Electroenceph.Clin.Neurophysiol.25:111-118
- [19.] Malamud K.C., Estañol V.B., Ayala A.S., Senties-M. H. (2014) Fisiología de la vibración Laboratorio de Neurofisiología Clínica. Departamento de Neurología y Psiquiatría. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.
- [20.] Manjarrez E., Rojas –Piloni J.G., Jiménez I. and Rudomin P., (2000) Modulation of synaptic transmission from segmental afferents by spontaneous activity of dorsal horn neurones in the cat. J. Physiol. (Lond.) 529: 445-460.
- [21.] Manjarrez E., Rojas –Piloni J.G., Martínez L., Vázquez D, Vélez D, Méndez I, Flores A (2002b) Amplitude of somatosensory cortical evoked potentials is correlated with spontaneous activity of spinal neurons in the cat. Neuroscience Letters 323: 187-190.

- [22.] Manjarrez E., Jiménez I. and Rudomin P., (2003a) Intersegmental synchronization of spontaneous activity of dorsal horn neurons in the cat spinal cord. *Exp. Brain Res* 148: 401- 413.
- [23.] Mouncastle, V.B.(1984) Central nervous mechanisms in mechanoreceptive sensibility. In : Brookhart,J.M., Mouncastle, V, B., Darian-Smith, I and Greiger, S.R. *Handbook of physiology. Vol. III, Part 1. American Physiological Society. Bathesda Maryland. pp 789-878.*
- [24.] Quian Quiroga R., Nadasdy Z. y Ben Shaul Y. (2004). Unsupervised spike detection and sorting whit wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Computation*, 16: 1661-1687.
- [25.] Rodolfo R. Llinás (1934) *El cerebro y el mito del yo: el papel de las neuronas en el pensamiento y el comportamiento humanos.*
- [26.] Tapper, D.N., Brown,P.B. and Moraff. H (1973) Functional organization of the cats dorsal horn: connectivity of myelinated fiber systems of hair skin.*J.Neurolophysiol.*36:817-826.
- [27.] Vallbo, A. B. and Hagbarth, K. E. (1968). Activity from skin mechanoreceptors recorded percutaneously in awake human subjects. *Experimental Neurology*, 21: 270-289.
- [28.] Wall P. D. (1966) The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses *J. Physiol.* (1967), 188, pp. 403-423 403
- [29.] William D. Willis Jr., Richard E. Coggeshall, (2004) “Sensory mechanisms of the spinal cord” Volume 2 : *Ascending Sensory Tracts and Their Descending Control*, Chapter 8.
- [30.] Willis, W.D. and Coggeshall, R.E. (1991) *Sensory mechanisms of the spinal cord. Plenum Press, 2th Ed New York. pp 575*