



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurofisiología Integrativa



**Caracterización de la distribución rostrocaudal y del retraso de fase de sincronía de interneuronas ON-OFF y OFF-ON espinales durante el rascado ficticio en el gato espinalizado**

TESIS

Seminario IV

Para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta:  
LBM Jorge Gutiérrez Ojeda

Director de Tesis:  
Dr. Elías Manjarrez López

22 de Marzo de 2021, Puebla Pue. México

## ATEMPORAL

Deseo intentarlo  
Justo ahora...  
Una y otra vez,  
No importa que me rompa,  
Ahora que soy joven,  
Que me siento invencible  
Ahora que no tengo nada que perder,  
Pero mucho que ganar,  
Y esté aterrado por el futuro,  
Ahora que deseo crecer,  
Y mi cabeza está llena de proyectos,  
Que consigo mis primeros objetivos  
Ahora que soy atemporal...  
(Mayo 2018-Noviembre 2020)

A asesor, CONACYT, mi familia, Liz y amigos

## TABLA DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| 1. Antecedentes.....   | 1  |
| 1.1 Anatomía y fisiología de la médula espinal.....  | 1  |
| 1.1.1 Aspecto macroscópico de la médula espinal.....   | 1  |
| 1.1.2 Anatomía interna de la médula espinal.....   | 1  |
| 1.1.3 Citoarquitectura organizacional de la materia gris de la médula espinal.....                   | 2  |
| 1.2 Generadores centrales de patrones .....  | 3  |
| 1.2.1 Organización y fisiología del generador central de patrones .....                              | 5  |
| 1.3 Reflejos espinales.....  | 6  |
| 1.3.1 Rascado .....  | 7  |
| 1.4 Interneuronas espinales y células de Renshaw .....   | 11 |
| 1.5 Actividad de las células de Renshaw e interneuronas la durante rascado ficticio en el gato ..... | 12 |
| 1.6 Onda viajera y retraso de fase de sincronía.....   | 15 |
| 1.7 Neuronas con comportamiento ON-OFF y OFF-ON.....   | 18 |
| 1.8 Neuronas ON-OFF y OFF-ON en médula espinal relacionadas al movimiento.....                       | 20 |
| 2. Planteamiento del problema .....  | 23 |
| 3. Hipótesis.....  | 24 |
| 4. Objetivos .....   | 25 |
| 4.1 Objetivo general.....  | 25 |
| 4.2 Objetivos específicos.....   | 25 |
| 5. Material y métodos.....   | 26 |
| 5.1 Ubicación espacio-temporal .....   | 26 |
| 5.2 Estrategia de trabajo.....   | 26 |
| 5.3 Muestreo.....  | 26 |
| 5.3.1 Definición de la unidad de población.....  | 26 |
| 5.4 Procedimiento quirúrgico .....   | 26 |
| 5.5 Producción del rascado.....  | 29 |
| 5.6 Registros electrofisiológicos .....  | 30 |
| 5.7 Análisis de registros .....  | 31 |
| 5.7.1 Segmentación.....  | 31 |
| 5.7.2 Agrupación .....   | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 5.7.3.1 Generación de Registros de actividad (Rasters) .....                 | 34 |
| 5.7.3.2 Envoltente .....   | 35 |
| 5.7.4.1 Análisis de Retraso de fase de sincronía .....                       | 38 |
| 5.7.5 Mapas topográficos de incidencia.....                                  | 39 |
| 5.7.6 Conectoma .....  | 39 |
| 1.2.1 Conectoma en la médula espinal.....                                    | 40 |
| 6. Resultados.....   | 42 |
| 7. Discusión .....   | 52 |
| 7.1 Descripción de patrones de descarga en las clases neuronales ON-OFF..... | 52 |
| 7.2 Distribución de las clases de neuronas en la médula espinal.....         | 53 |
| 7.3 Generación de patrones de descarga de interneuronas .....                | 54 |
| 7.4 Análisis de correlaciones cruzadas.....                                  | 56 |
| 7.5 Propuesta de conectoma y generador central de patrones GCP .....         | 58 |
| 8. Conclusiones y perspectivas .....   | 64 |
| 9. Participaciones en congresos.....   | 65 |
| 10. Bibliografía .....   | 66 |
| 11. Cronograma de actividades .....  | 73 |

# 1. Antecedentes

## 1.1 Anatomía y fisiología de la médula espinal

### 1.1.1 Aspecto macroscópico de la médula espinal

La médula espinal (ME) es un componente importante para la transmisión de información nerviosa hacia y proveniente del cerebro, así como para la regulación de funciones autonómicas y motoras. La ME se divide en cinco porciones cervicales (C1-C8), torácicas (T1-T13), lumbares (L1-L7), sacras (S1-S3) y coccígeas (Co1). Se encuentra dentro del canal vertebral y recubierta por meninges, extendiéndose desde el foramen Magnum hasta la región Sacra. Asimismo, presenta en la línea media, la cisura mediana anterior y el surco mediano posterior, además de dos engrosamientos, uno en la porción cervical y el otro en la región Sacra (Snell, 2003). Estos engrosamientos son el resultado del aumento de inervación sensitiva y motora de la musculatura de las extremidades (Shünke, 2007). En toda la longitud de la ME hay 31 pares de nervios espinales fijados a las raíces anteriores (motoras) y las raíces posteriores (sensitivas).

Por otra parte, la ME no se extiende completamente en el canal vertebral, ya que la porción terminal de la ME (cauda equina) se ubica en la vértebra L7, por lo que el nombramiento de los segmentos espinales y vertebrales no se refiere a la misma porción. La cauda equina, es un arreglo de raíces que forman una red llamada plexo lumbosacro, la cual inerva a las extremidades pélvicas y la región perianal (Mc Clure, 1973).

### 1.1.2 Anatomía interna de la médula espinal

La ME está compuesta por dos porciones, un centro interior y una cobertura exterior. La primera porción (centro interior) consta de sustancia gris no mielinizada en forma de H, con las astas anteriores y posteriores unidas por una delgada comisura gris, la cual contiene el pequeño orificio central. Esta porción contiene a los somas de las neuronas integradoras. La segunda porción (cobertura exterior), envuelve a la primera porción con sustancia blanca,

que contiene haces descendentes y ascendentes de axones mielinizados y no mielinizados llamados tractos o fascículos (Mc Clure, 1973).

En cada mitad de la ME hay tres funículos (conjunto de tractos): 1) funículo dorsal (posterior), el cual está localizado entre la asta dorsal y el septum medial dorsal, 2) funículo lateral, localizado entre los lugares donde las raíces dorsales ingresan a la ME, y 3) funículo anterior, localizado entre la fisura medial anterior. El tamaño de las astas y funículos no es igual en todos los segmentos. A nivel cervical y lumbar, las astas ventrales son más anchas (engrosamiento cervical y lumbar, respectivamente), debido a que contienen los somas de las motoneuronas que controlan las extremidades (Young, 1997).

### 1.1.3 Citoarquitectura organizacional de la materia gris de la médula espinal

La citoarquitectura de la ME fue descrita por Rexed en 1952, dividiendo a la región gris en diez porciones. En la Tabla 1 se enlistan las láminas y sus componentes. Cabe mencionar que las láminas I a la IV, están localizadas dentro del asta dorsal de la ME (Siegel, 2015).

| Lámina              | Función clave  |
|---------------------|--|
| <b>I</b>            | Las fibras dorsales median el dolor, la temperatura, y sensaciones táctiles; núcleo postero marginal.  |
| <b>II</b>           | La sustancia gelatinosa, la cual recibe fibras aferentes mielinizadas (A $\delta$ ) y amielínicas (Tipo C) que modulan la transmisión de dolor.  |
| <b>III &amp; IV</b> | Los núcleos propio sensitivos, los cuales reciben entradas provenientes de la sustancia gelatinosa y contribuye al tracto espino talámico mediante dolor, temperatura y sensaciones táctiles.                  |
| <b>V</b>            | Las neuronas reciben fibras descendentes provenientes de los tractos cortico espinales y rubro espinales. Las neuronas de estos núcleos contribuyen al tracto ascendente espino talámico.                      |
| <b>VI</b>           | Sólo se presenta en los segmentos cervical y lumbar; los segmentos laterales reciben fibras cortico espinales y rubro espinales; segmentos mediales reciben aferencias de husos musculares y uniones aferentes |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>VII</b>           | Núcleo dorsal de Clarke se extiende de C8 a L2 y recibe aferentes musculares y tendinosas. Los axones de este núcleo, forman el tracto espino cerebeloso. La columna celular intermedio lateral, contiene neuronas pre ganglionares simpáticas provenientes de T1 a L3. Las neuronas parasimpáticas localizadas en segmentos S2-S4; corresponden a Células de Renshaw. |
| <b>VIII &amp; IX</b> | Localizada en el asta ventral; motoneuronas alfa y gama inervan músculos esqueléticos. Las neuronas mediales reciben entrada de tractos vestíbulo espinal y retículo espinal, e inervan músculos axiales para postura y balance. Las neuronas laterales reciben entradas de tractos cortico espinales y rubro espinales e inervan musculatura distal.                  |
| <b>X</b>             | Materia gris que rodea el canal central, y contiene dos grupos de neuronas bipolares, región dorsal, neuronas con árbol dendrítico en forma de abanico, y de la región ventral, poseen dendritas pobremente ramificadas  |

Tabla 1. Resumen de láminas de Rexed y sus funciones. Siegel 2015

Como podemos observar en la Tabla 1, existe un cierto arreglo de funciones de la médula espinal respecto a estas laminas. En la porción dorsal, la médula espinal se asocia con funciones sensoriales, mientras que a nivel ventral las funciones son de tipo motor. Asimismo, la porción intermedia, es un puente integrador entre la parte sensoria y motora. En la actualidad, se desconocen las estructuras funcionales involucradas en la integración. Sin embargo, se ha reportado que están involucradas laminas VI, VII y VIII (Berkinblit, 1978).

## 1.2 Generadores centrales de patrones

Los generadores centrales de patrones son circuitos neuronales capaces de producir actividad rítmica sin recibir información fásica temporalizada extrínseca, esto implica la ausencia de entradas sensoriales o vías corticales descendentes. Algunos ejemplos de estas actividades rítmicas son caminar, respirar, volar, nadar o rascar.

Así mismo, la ausencia de actividad motora rítmica de un miembro aislado del sistema nervioso no implica la inexistencia de un generador central de patrones, siempre y cuando

la vía nerviosa se encuentra intacta. Por lo que este tipo de preparaciones son llamadas patrones motores ficticios (figura 1) (Marder et Bucher, 2001).

Hay dos mecanismos generales para la producción de ritmo: algunas redes son impulsadas por neuronas marcapasos y algunos ritmos emergen como consecuencia de conexiones sinápticas entre neuronas que no son intrínsecamente rítmicas.

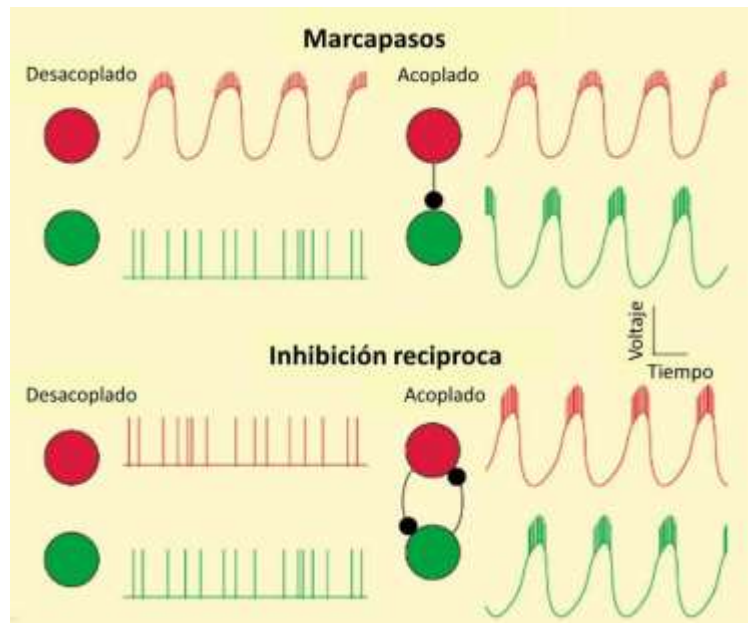


Figura 1. Los ritmos pueden generarse mediante ráfagas endógenas, o pueden ser una propiedad emergente del acoplamiento sináptico entre las neuronas. En las redes impulsadas por marcapasos, una neurona marcapasos (roja) puede conducir sinápticamente a un antagonista (verde) para que se dispare alternativamente. El ejemplo más simple de un oscilador de red es uno formado entre dos neuronas que disparan de forma no rítmica de forma aislada, pero se disparan en ráfagas alternas como consecuencia de la inhibición recíproca (Marder y Bucher, 2001)

En esta red dos neuronas se inhiben recíprocamente. Aunque cuando están aisladas, estas neuronas no se disparan en ráfagas, cuando se juntan, producen patrones alternos de actividad. Estas redes se sugirieron por primera vez por Brown en 1914, para explicar la alternancia de las fases de extensión y flexión en la locomoción del gato al que él denominó “*half-center*” (en inglés).

### 1.2.1 Organización y fisiología del generador central de patrones

En 1977, Miller y Scott introdujeron al modelo de “half-center” tres tipos de neuronas que median y organizan los patrones motores: Las motoneuronas, células de Ranshaw e interneuronas inhibitorias Ia. A partir de este esquema, propusieron un modelo de periodos de alternancia inhibitoria entre las motoneuronas de los flexores y extensores.

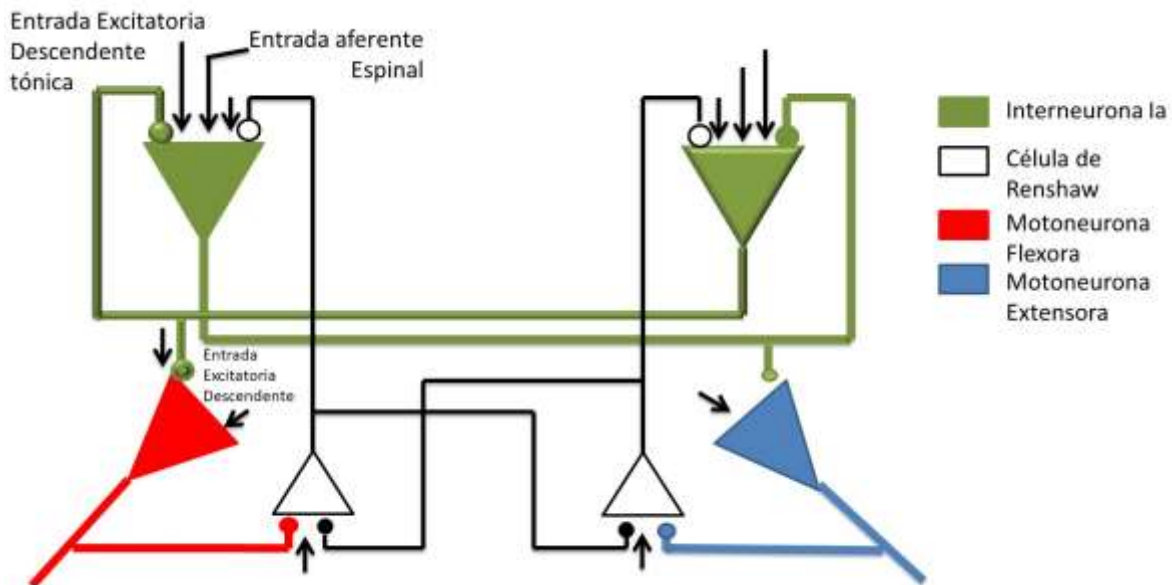


Figura 2. Modelo propuesto por Miller y Scott del generador central de patrones, donde se incluyen tres tipos de neuronas: interneuronas Ia, células de Renshaw y motoneuronas.

Se han realizado diferentes modelos de generadores centrales de patrones para el rascado, en los que se incorporan diferentes elementos que modulan la actividad de las neuronas y su frecuencia de descarga. El último modelo propuesto ha sido el de McCrea y Rybak (2008), en el que se propone un generador de patrones de tres niveles, figura 3. Las redes del generador del ritmo (GR) y la formación de patrones (FP) representan dos niveles del generador central de patrones. Las poblaciones excitadoras del GR se inhiben recíprocamente entre sí a través de las poblaciones inhibitorias de interneuronas generadoras de ritmo. Las poblaciones de FP se inhiben recíprocamente entre sí a través de las poblaciones de GR-E y GR-F tienen conexiones excitadoras recurrentes. La locomoción se inicia por un impulso excitador tónico (Región Locomotora Mesencefálica) en las poblaciones GR y FP. El ritmo locomotor y la duración de las fase flexora y extensora están determinados por la red GR que controla la actividad de la red FP mediante una

combinación de excitación directa e inhibición mediada por las poblaciones de interneuronas ritmo génicas.

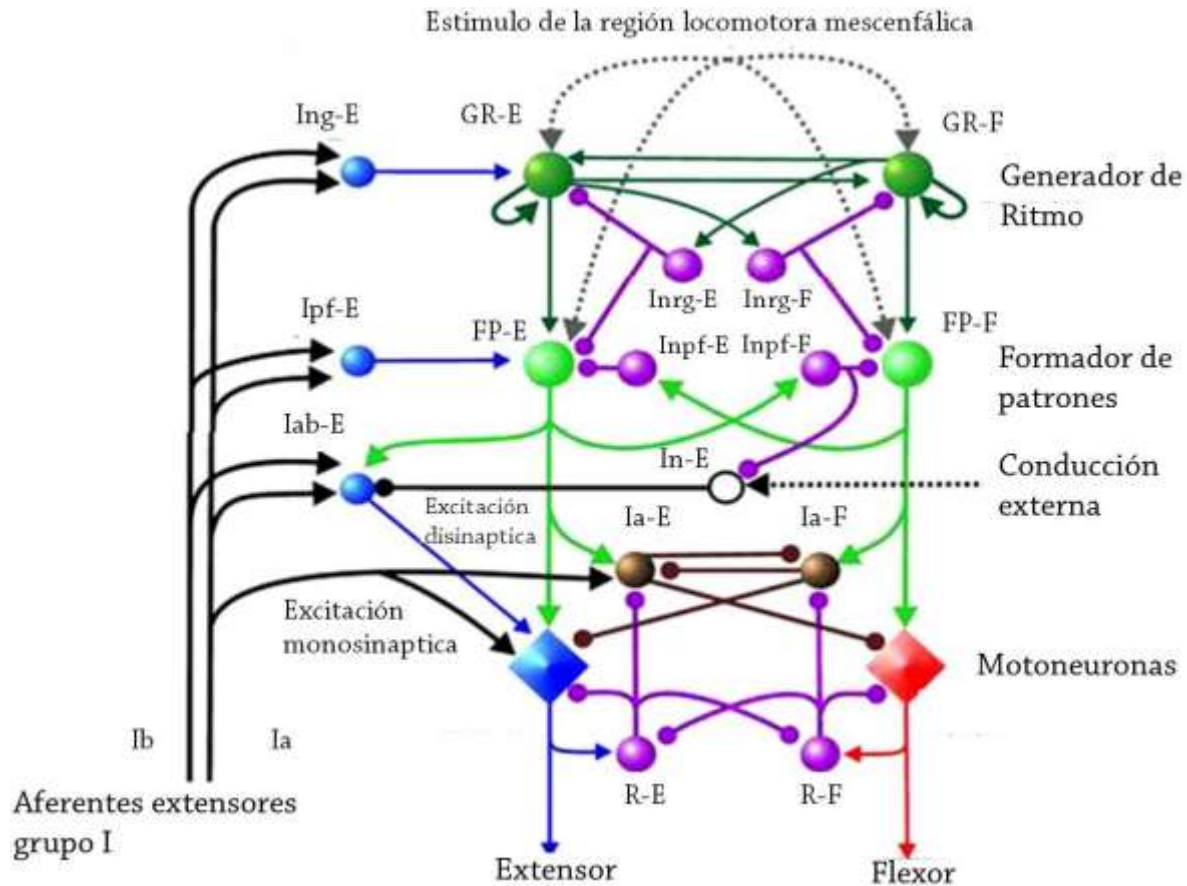


Figura 3. Este modelo incluye la influencia de interneuronas inhibidoras, como es el caso de las interneuronas Ia y las células de Renshaw, y la intervención de vías aferentes provenientes de las extremidades. Tomada de McCrea & Rybak 2008.

### 1.3 Reflejos espinales

El reflejo es una respuesta automática e involuntaria que realiza un ser vivo ante la presencia de un determinado estímulo. Algunas de estas respuestas pueden ser un movimiento o una secuencia de movimientos, que pueden ser generados en la ME (reflejos espinales). Ello ocurre a través de circuitos neurales, formados por conexiones monosinápticas o polisinápticas entre interneuronas y motoneuronas, que son adaptables y tienen un propósito funcional (Kandel, 2013). Sherrington en 1910, estudió el reflejo miotático en

gatos descerebrados, el cual consiste en flexionar pasivamente una extremidad posterior del gato, provocando que los músculos estirados se contraigan con la finalidad de contrarrestar el alargamiento de un músculo de dicha extremidad. Actualmente se sabe que este reflejo es de tipo monosináptico.

Otro tipo de reflejo es el reflejo de retirada, el cual consiste en un movimiento de flexión con la finalidad retirar la extremidad de un estímulo doloroso. Un caso particular sería cuando un humano pisa un objeto punzo-cortante, y este retira su extremidad inferior que fue estimulada y estira la otra extremidad para mantenerse en pie (Boron, 2017).

### 1.3.1 Rascado

El rascado es una tarea motora controlada por el generador central de patrones lumbosacro. En esta tarea, una extremidad trasera desarrolla un movimiento rítmico para retirar la sensación irritante proveniente de la piel del cuello y la pinna (Sherrington, 1910)

Diversos autores han descrito los componentes cinéticos de esta tarea motora. Tal es el caso de Kuhta y Smith 2009. Quienes describen que el rascado puede ser dividido en periodos cinéticos. El primero de ellos es la aproximación, seguido de un periodo cíclico o alternante, y concluyendo con el de retiro. El periodo de aproximación, se inicia por movimientos de la cabeza que posiciona la pinna estimulada hacia la extremidad ipsilateral trasera para el rascado. Posteriormente, la extremidad trasera ipsilateral inicia su trayectoria generada por la combinación de movimientos de articulaciones de cadera (flexión), rodilla (extensión) y tobillo (flexión). Posteriormente, el periodo cíclico se caracteriza por movimiento periódico alternante, en el cual, la extremidad trasera contacta con la cabeza o la pinna, con un promedio de ciclos por respuesta es de  $13 \pm 9$ , con un rango de 1 a 60 ciclos. Finalmente, en el periodo de retorno, la cabeza y la extremidad trasera regresa a la posición pre-rascado, figura 4.



1. Fase tónica (acercamiento)
2. Fase alternante (cíclica)
3. Fase de retirada

Figura 4. Fases del rascado, la primera de ellas es la fase de acercamiento, después la alternante, y finalmente la fase de retirada, estas fases fueron observadas por Kuhta y Smith en 2009.

Por otra parte, en condiciones experimentales, el rascado puede llevarse a cabo de forma ficticia. Esto quiere decir que las interneuronas y motoneuronas siguen generando potenciales de acción con el mismo patrón rítmico que en el rascado normal; sin embargo, los músculos no desarrollan una tarea motora ya que se encuentran denervados y paralizados (Berkinblit, Deliagina, Feldman, Gelfand, & Orlovsky, 1978a).

Así mismo, la actividad electrofisiológica del rascado se obtiene de la actividad de los nervios de músculos flexor (tibial anterior, TA) y extensor (gastrocnemio medial, GM), figura 5. La fase tónica inicia con la descarga en ráfaga del nervio del TA. La duración de esta fase es aproximadamente de 1000 ms. Posteriormente, la fase cíclica se puede observar en la actividad alternante de los nervios flexor y extensor. De igual manera, se puede observar un periodo intermedio entre la flexión y la extensión, de manera que la duración total de esta fase es de 3 a 10 s. Finalmente, en la fase de retirada se puede observar cómo la actividad electroneurográfica concluye con una ráfaga de descarga del nervio flexor, mientras que, el nervio extensor se encuentra silente (Deliagina TG, 1975)

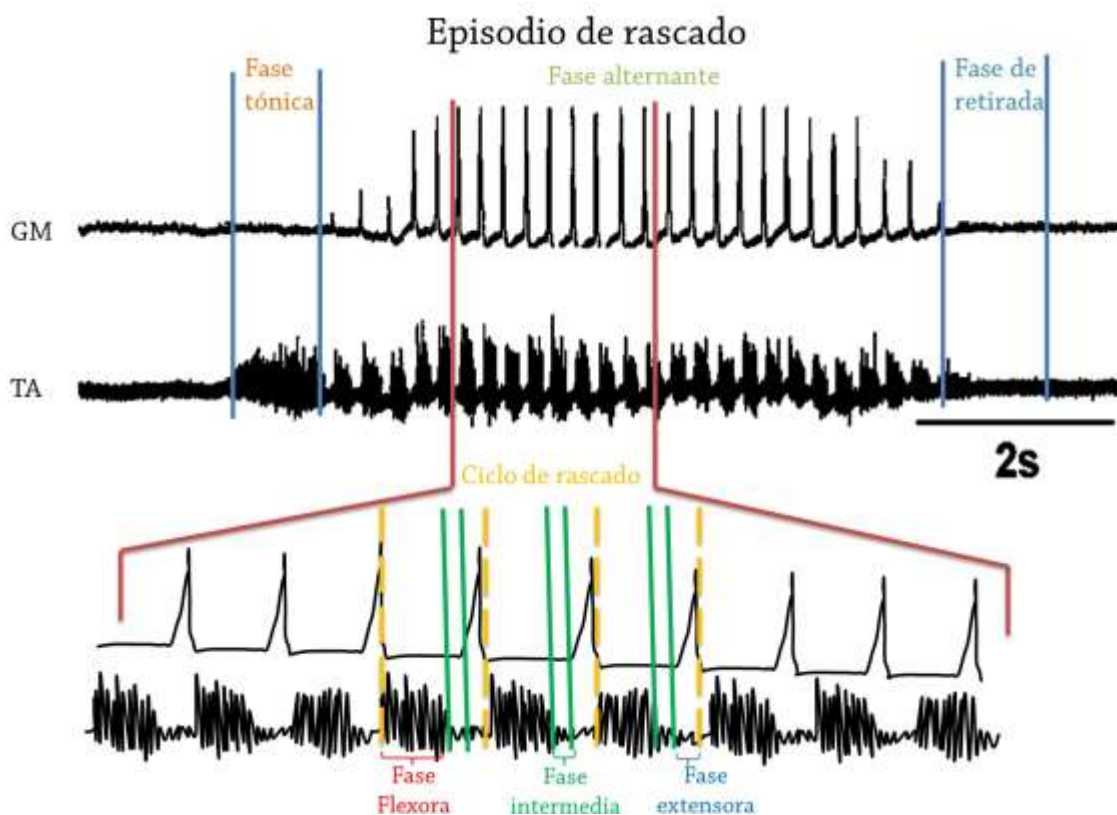


Figura 5. Electroneurogramas de un nervio flexor (Tibial Anterior, TA) y un nervio extensor (Gastrogmenio Medial, GM) durante un episodio de rascado ficticio de un gato descerebrado. Los registros muestran las tres fases de un episodio de rascado ficticio. Entre líneas amarillas se muestra un ciclo de rascado de la fase cíclica compuesto por una ráfaga de potenciales del nervio flexor seguida de una del nervio extensor. En la parte inferior de la imagen se presenta una ampliación del electroneurograma. Con una llave roja se muestra la fase flexora. Entre líneas verdes punteadas la fase intermedia y con una llave azul la fase extensora.

Profundizando en el estudio de la actividad electrofisiológica de la médula espinal lumbar en el gato, Berkinblint y cols., no solo describieron en 1978 que las neuronas de los segmentos L4 a S1 son rítmicamente moduladas durante el rascado, sino que, en segmentos más rostrales, (como L1) el porcentaje de estas neuronas disminuía bruscamente (figura 6a). Estos autores, también mostraron que las neuronas despolarizadas se encuentran ubicadas principalmente en la parte intermedia de la materia gris, que corresponde aproximadamente a la lámina VII de Rexed. Más tarde, Dai y cols. en 2005 realizaron experimentos de inmunorreactividad con c-fos en locomoción ficticia en gatos, y comprobaron las observaciones hechas por Berkinblint y cols.

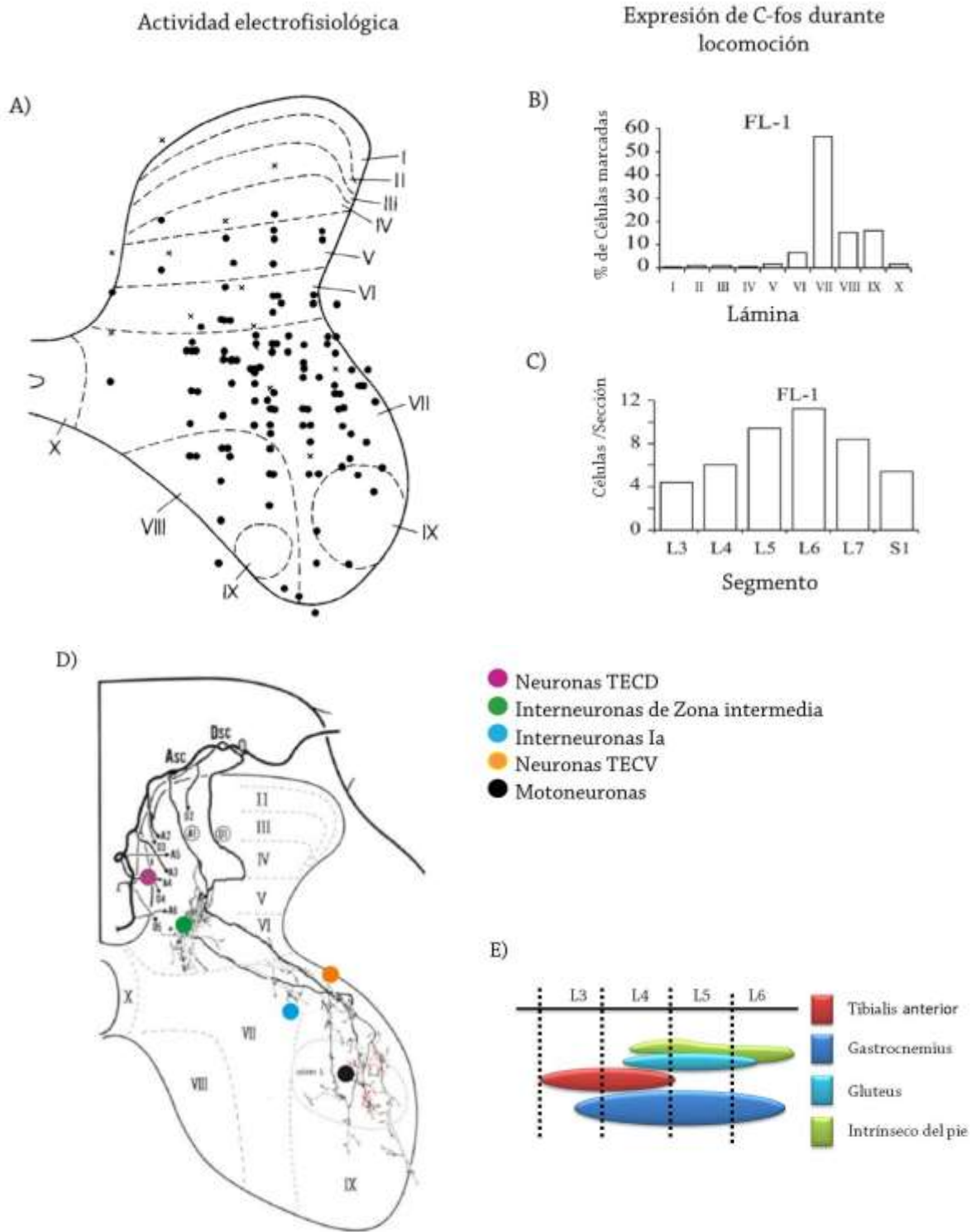


Figura 6. A) Marcaje por C-fos de neuronas activadas durante locomoción, B) Distribución de láminas de Rexed, C) Ubicación en láminas de Rexed de células mayormente activadas durante locomoción, D) Ubicación en segmentos de la médula espinal mayormente activadas durante locomoción, E) distribución de motoneuronas que inervan a diferentes

músculos de la extremidad. (A-C) Tomada y modificada de Dai et al 2005. (D y E) tomada de Jankowska y cols. 2015.

Por otra parte, Bannatyne et al 2009, emplearon técnicas de inmunocitoquímica, con lo cual, pudieron describir que existen tres tipos de neuronas. Un tipo que corresponde a neuronas excitadoras (Glutamatérgicas), y dos tipos de neuronas inhibitoras (GABAérgicas y Glicinérgicas), las cuales se extienden de forma ipsilateral a lo largo de los segmentos L3 a L7. Así mismo, Jankowska y cols. 2015 realizaron un mapa topográfico de motoneuronas de la médula espinal (figura 6d) mediante el transporte retrógrado de la toxina B del cólera. Con ello, se pudo observar que se ubican en la lámina IX, en zonas específicas delimitadas para cada músculo de la extremidad a lo largo de los segmentos L3 a L6.

## **1.4 Interneuronas espinales y células de Renshaw**

Las interneuronas espinales son células que se encuentran en la médula espinal se localizan en su mayoría en las láminas VII y VIII de Rexed; las cuales transmiten, modulan e integran las señales entre las neuronas sensoriales y motoneuronas (Rose PK, 2003).

Este grupo de neuronas son los componentes de los circuitos neuronales que regulan y estructuran las tareas motoras (Jankowska, 2008). Los tipos de neuronas que los componen son los siguientes:

Interneuronas Ia (IN-Ia): son neuronas gabaérgicas localizadas en la lámina VII, las cuales son responsables del reflejo de la inhibición recíproca. Reciben vías aferentes Ia y vías descendentes de los centros supra espinales e inhiben a las motoneuronas que inervan a los músculos antagonistas (Kandel, 2013)

Interneuronas Ib (IN-Ib): son neuronas inhibitoras localizadas en la lámina VII. Reciben fibras aferentes del órgano tendinoso de Golgi, ubicado en los tendones. Cuando se acorta un músculo, se genera tensión en el tendón, por lo que activa a las IN-Ibs y estas inhiben a las motoneuronas que inervan a las fibras musculares.

Interneuronas comisurales: son neuronas gabaérgicas (inhibidoras) y glutamatérgicas (excitadoras) que intervienen en movimientos reflejos y voluntarios, así como en tareas rítmicas. Se encuentran en la lámina VIII y se proyectan contra lateralmente pasando por la comisura gris.

Interneuronas HB9: son neuronas excitadoras que expresan el factor HB9 y se localizan en la parte medial de la asta ventral, alrededor de la comisura ventral en la lámina VIII. (Brownstone, R. M. 2008)

Células de Renshaw: neuronas glicinérgicas e inhibitoras involucradas en el reflejo de inhibición recíproca que reciben colaterales excitadoras de axones de motoneuronas sinérgicas y envían conexiones inhibitoras a interneuronas Ia. Thomas y Wilson en 1965 identificaron mediante marcaje después de haber realizado registro electrofisiológico con microelectrodos que estas neuronas se localizan en la lámina VII de la médula espinal del gato. Carr y col. en 1998 mediante uso de inmunocitoquímica cuantificaron 750 células de Renshaw en el segmento L6 y la mayoría ubicadas en la lámina VII.

Aunque las células de Renshaw participan en un circuito inhibitorio recurrente local relativamente "simple", y se sabe mucho acerca de su fisiología y morfología, aún no existe una hipótesis funcional definitiva con respecto a sus contribuciones al control y comportamiento motor. Sin embargo, este tipo de células son capaces de disparar una descarga de ráfaga de alta frecuencia, en respuesta a la activación de colaterales del axón de motoneuronas. Esta característica clave ha sido fundamental para su identificación y análisis fisiológicos mediante enfoques electrofisiológicos tradicionales in vivo (Alvarez y Fyffe, 2007).

En gatos descerebrados, y en modelos recientes de circuitos locomotores de la columna vertebral, las células de Renshaw exhiben actividad rítmica durante la locomoción ficticia en ausencia de retroalimentación sensorial ( Rybak et al. 2006, b)

## **1.5 Actividad de las células de Renshaw e interneuronas Ia durante rascado ficticio en el gato**

La actividad electrofisiológica de estas células se ha estudiado inicialmente en la locomoción. En este sentido, se pueden describir dos fases de esta actividad. Una que se denomina flexión, llevada por músculos como el tibial anterior, y la otra denominada extensión, llevada por músculos como el gastrocnemio medial y lateral, y el cuádriceps, entre otros (Pratt y Jordan 1987).

Para poder explicar el funcionamiento de las interneuronas durante la locomoción ficticia, Pratt y Jordan en 1987, registraron en el segmento L6 de la médula espinal la actividad de alpha-motoneuronas, células de Renshaw (CR) e interneuronas inhibitorias Ia (IaIN) mediante microelectrodos durante la locomoción ficticia en el gato (Figura 7).

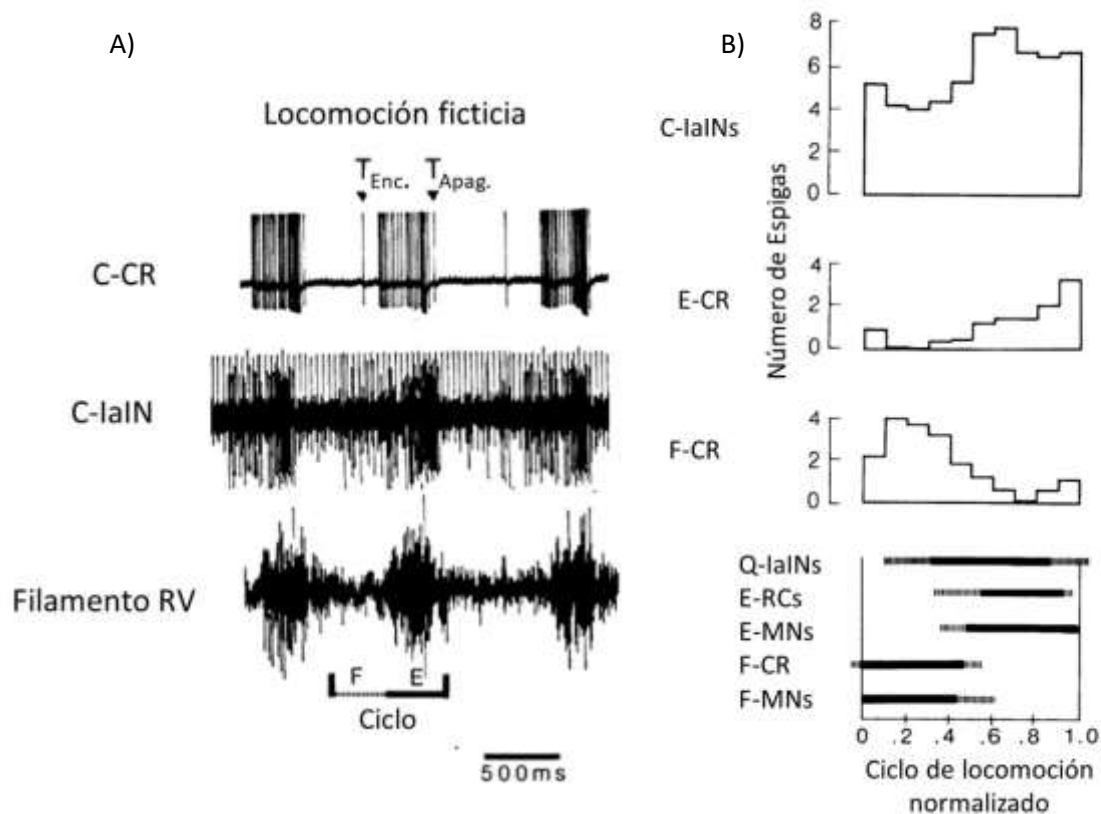


Figura 7. A) Actividad durante la locomoción ficticia de un cuádriceps RC (C-RC) y IaIN (CIaIN) registrados durante el mismo experimento. Son datos sin procesar que muestran la actividad de un C-RC y un C-IaIN junto con la actividad del extensor de rodilla registrada en un filamento de raíz ventral L6 (RV) durante 3 ciclos de pasos ficticios. El artefacto de estímulo asociado con la estimulación de la región locomotora mesencefálica puede verse en el fondo como una desviación tónica hacia arriba en medio de la actividad fásica del Q-IaIN. B) Histogramas de disparo desencadenados por ciclos y diagramas de pasos ficticios (panel inferior) para 6 IAIn cuádriceps (Q-IaIN), 7 células Renshaw extensoras (E-RC) y 3 células Renshaw flexoras (F-RC). Los datos para cada tipo de célula representan un promedio normalizado agrupado sobre las células a través de los experimentos. Pratt y Jordan en 1987

Pratt y Jordan en 1987, observaron cómo se puede diferenciar cada tipo de neurona por la frecuencia de descarga durante la locomoción ficticia. La descarga de las CR durante la locomoción ficticia fue caracterizada por una ráfaga de actividad que estuvo estrechamente relacionada con la actividad periódica de motoneuronas, tanto por extensoras como flexoras.

En este sentido, se puede observar que las CR presentan una actividad por fases claramente delimitada y correlacionada con las ráfagas de actividad de las motoneuronas.

Así mismo, las interneuronas Ia presentaron también actividad de descarga durante las fases de extensión y flexión, sin embargo los histogramas muestran una disminución de actividad en la fase de flexión, mientras que en la fase de extensión su actividad fue máxima. (Pratt, A. et Jordan, M., 1987).

Se ha observado que las C-IaIN tienden a estar activas espontáneamente en ausencia de estimulación del tronco encefálico a una tasa media de 34Hz, con frecuencias mínima de 7Hz y máxima de 156Hz. El hecho de que la tasa mínima media registrada durante la locomoción ficticia fuera menor que la tasa de reposo espontáneo promedio podría interpretarse como evidencia de una inhibición periódica de las IaIN durante la locomoción ficticia. Pratt y Jordan proponen que esta inhibición periódica es importante para producir actividad rítmica de las IaIN durante la locomoción ficticia, como lo proponen Miller y Scott en su modelo. Por lo que los potenciales post sinápticos inhibitorios (IPSPs) en motoneuronas deben modularse durante el ciclo de pasos.

Por otra parte, Deliagina y Feldman en 1981 registraron la actividad de las CR y de los nervios del extensor gastrocnemio-soleus (GS), y de los flexores Tibial anterior (TA) y vasto-crureus (VCr) durante el rascado ficticio en el gato descerebrado (figura 10). Ellos encontraron tres tipos de actividad de las CR. La primera de ellas corresponde a CR con entrada proveniente del GS durante la fase rítmica del rascado, donde se presenta una sincronía de actividad de la motoneurona con la CR. La segunda, corresponde a CR con entrada proveniente del VCr, donde la actividad de la CR es silente cuando el VCr presenta actividad. Este comportamiento de actividad fue de entrada indefinida, ya que la estimulación fue ipsilateral y contralateral al registro del GS, lo que generó que se silenciara la CR durante la actividad de la motoneurona.

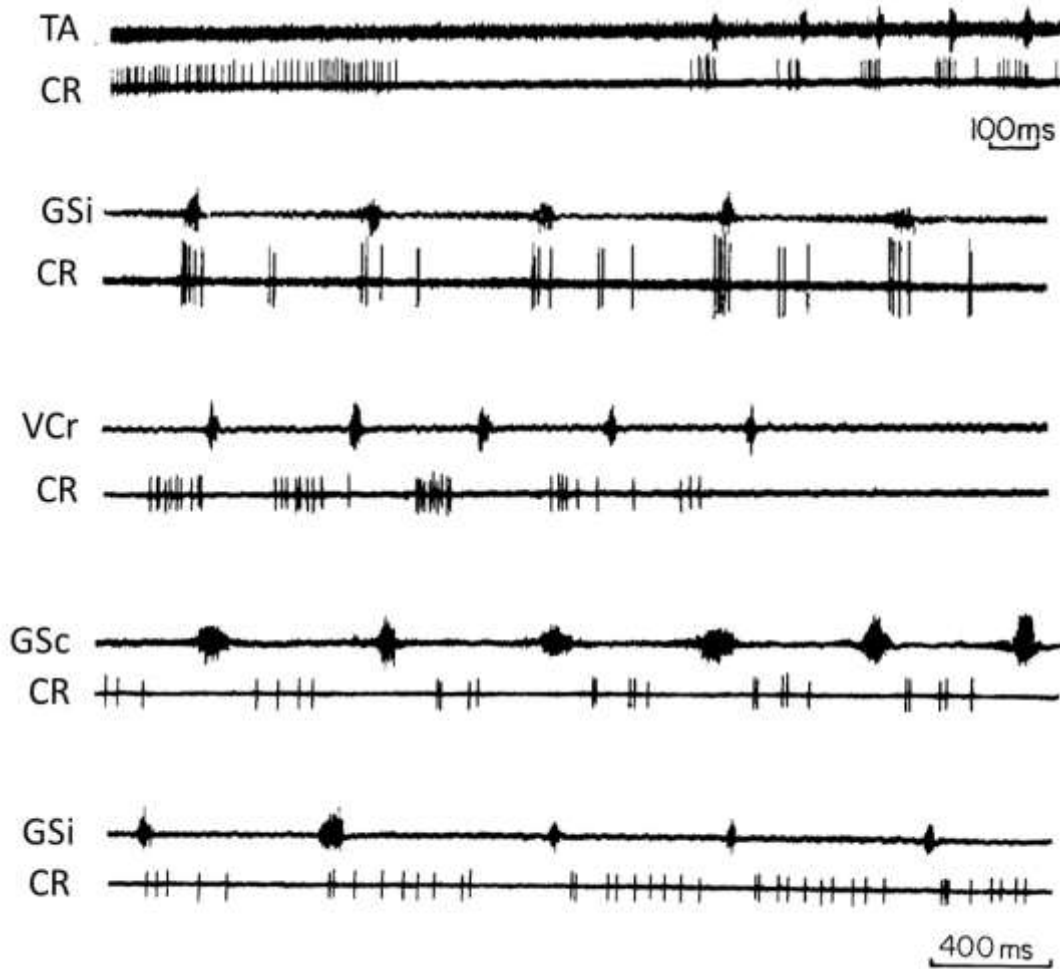


Figura 8. CR son las Células de Renshaw registradas en el segmento L6 a S1. Registro de Tibial Anterior (TA), gastrocnemius Soleus ipsilateral (GSi) y contralateral (GSc), Vasto crureus (VCr). Se puede observar como la actividad de las CR esta modulada por la actividad de las motoneuronas durante la fase rítmica. Es importante resaltar la actividad de las CR durante la actividad del GSi y CGc presenta una actividad opuesta a la que mayoritariamente habían descrito por lo que proponen que se desconoce las conexiones que pueda tener.

## 1.6 Onda viajera y retraso de fase de sincronía

Al periodo en el cual dos fenómenos o acciones son simultáneas, nos referimos a una fase de sincronía. La sincronización de osciladores no lineales acoplados es un fenómeno generalizado que ocurre en las ciencias físicas y biológicas (Pikovsky y cols. 2001). En esta última área, la sincronización es importante para procesar la información proveniente de diferentes sistemas sensoriales y formar una percepción coherente y unificada del mundo

externo (Ward 2010). Sin embargo, la conducción a través de fibras axonales es en el orden de 1 m/s resultando en retrasos de 80 ms para la propagación a través de la red cortical (Kandel y cols. 1991).

Diversos estudios teóricos sobre redes de osciladores neuronales (Kuramoto, 1984, Kopell 1986), muestran que una forma de oscilaciones conocidas como ondas oscilatorias viajeras es una propiedad emergente de los sistemas con conectividad espacialmente restringida. Los ejemplos que confirman estas predicciones se observan en mediciones multi-sitio en órganos olfativos centrales de diversas especies (Freeman,1978, Delaney cols., 1994, Lam y cols., 2000), sistema visual de la tortuga (Prechtl, y col. 1997, 2000), en la corteza humana (Ribary,y cols. 1991, Roelfsema, y col. 1997) y sobre médula espinal en el gato (Cuellar y cols. 2009).

En el trabajo de Cuellar y cols. de 2009 se describe la secuencia de activación spatiotemporal de interneuronas espinales durante el rascado ficticio, mediante la distribución de Potenciales Sinusoidales del Dorso de la Médula Espinal (CDP, por sus siglas en inglés). Ellos reportaron que los componentes de dicho potencial se correlacionaban con la actividad rítmica del rascado. Se pudo correlacionar la actividad flexora (Tibial anterior) con el pico negativo del CDP, mientras que el pico positivo con la actividad extensora (Gastrocnemio Medial). Así mismo, la distribución de estos picos se encuentra regionalizada, la mayor cantidad de picos negativos se ubican sobre L6, mientras que los picos positivos se encuentran mayoritariamente entre L7 y S1. Cuellar y cols. reportaron en el mismo trabajo, la propagación con dirección rostro caudal del CDP, basándose en la latencia y correlación entre pico negativos.

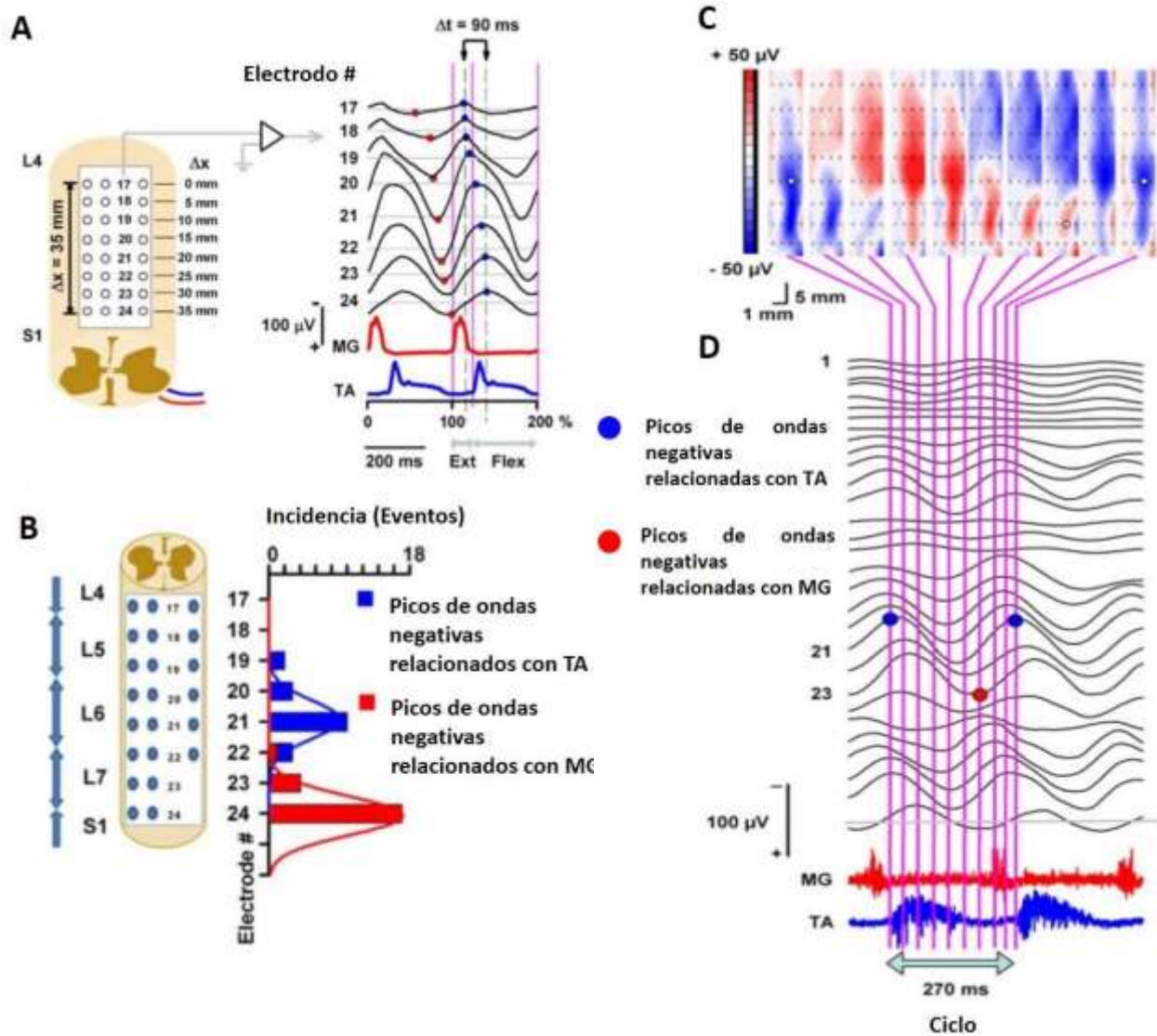


Figura 9. A) Grabaciones promedio de las ondas sinusoidales positivas y negativas durante el raspado de los electrodos 17–24. El círculo rojo y azul indica el tiempo utilizado para obtener los gráficos en el panel derecho. Los primeros puntos rojos y azules en la grabación del electrodo 17 se tomaron como cero. Después de eso, se utilizaron los siguientes puntos para obtener un intervalo de tiempo. Este intervalo de tiempo (en milisegundos) se trazó frente a la posición x (en milímetros) de los electrodos correspondientes B) Incidencia de las ondas negativas o positivas que inmediatamente precede a la activación de las motoneuronas flexoras o extensoras, indican los círculos azules (Tibial Anterior) y rojo (Gastrocnemio Medial Este gráfico se obtuvo de 18 gatos para el raspado derecho. C) Mapas topográficos calculados para 10 tiempos sucesivos como lo indican las líneas verticales en D. D) Grabaciones obtenidas con la matriz multielectrodo durante dos ciclos de extensión-flexión. Los círculos rojo y azul indican que hay ondas positivas y negativas que preceden al comienzo de las explosiones de extensor (MG) y flexor (TA).

## 1.7 Neuronas con comportamiento ON-OFF y OFF-ON

El primero en describir los tipos de neuronas ON-OFF y OFF-ON fue Hartline en 1938, cuando registró la actividad eléctrica del nervio óptico de la Rana (*Rana catesbina*) bajo estimulación lumínica directa a la retina. Hartline, observó tres tipos de neuronas, las cuales clasificó por su tipo de descarga. 1) OFF-ON-OFF, un estallido inicial de impulsos, seguido de una descarga sostenida que dura toda la iluminación y se silencia terminada la estimulación, 2) ON-OFF-ON, actividad de descarga en periodos de oscuridad que se silencian en iluminación, 3) ON solo al inicio y cese del estímulo lumínico Figura 10.

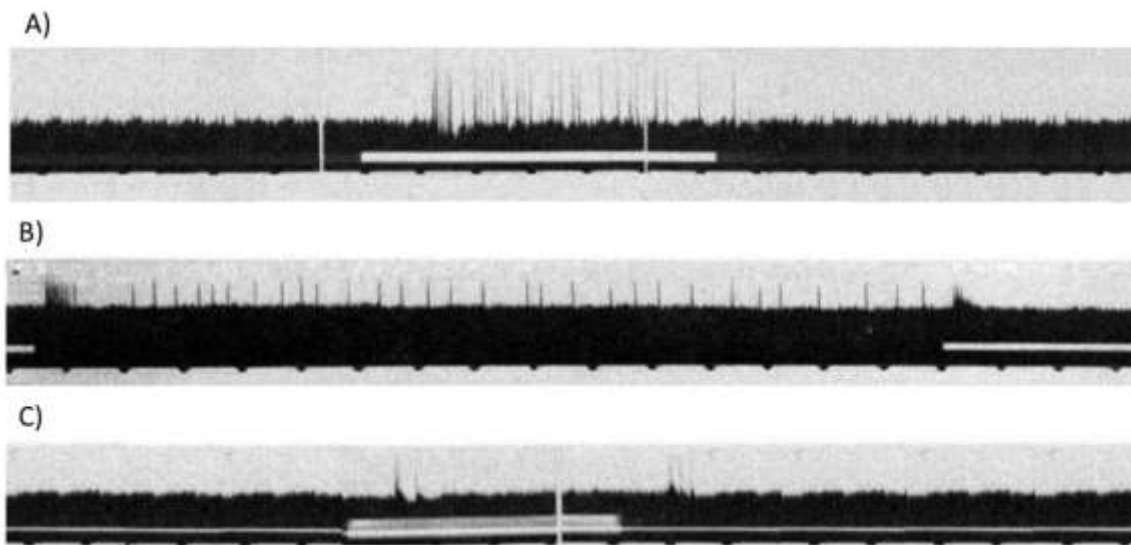


Figura 10. Registros de neuronas de la retina de la rana con estimulación lumínica con diferentes protocolos de estimulación. Las líneas blancas inferiores representan el periodo de iluminación. A) Neuronas con descarga OFF-ON-OFF, B) ON-OFF-ON, C) ON-OFF-ON solo al inicio y cese del estímulo lumínico. Tomada y modificada de (Hartline, 1938)

Más tarde, un comportamiento semejante al reportado por Hartline en 1938 fue descrito en 1953 por Kuffler, quien descubrió que las células ganglionares de la retina del gato daban respuestas activadas o desactivadas a los puntos que parpadean en sus centros de campo receptivo. Con la peculiaridad de que estas respuestas centrales eran antagonizadas por la estimulación de sus alrededores del campo receptivo. Posteriormente, Wisel en 1959 y Hubel en 1960, registraron la actividad eléctrica de neuronas en la corteza cerebral del gato, a nivel de la materia blanca subcortical, durante la estimulación lumínica puntal en una pantalla negra. Ellos observaron dos tipos de comportamientos en la descarga de las

neuronas, unas que aumentaba su frecuencia de descarga durante la estimulación lumínica, a las que denominaron como “respuesta on” y otras que disminuía su frecuencia de descarga, “respuesta off”.

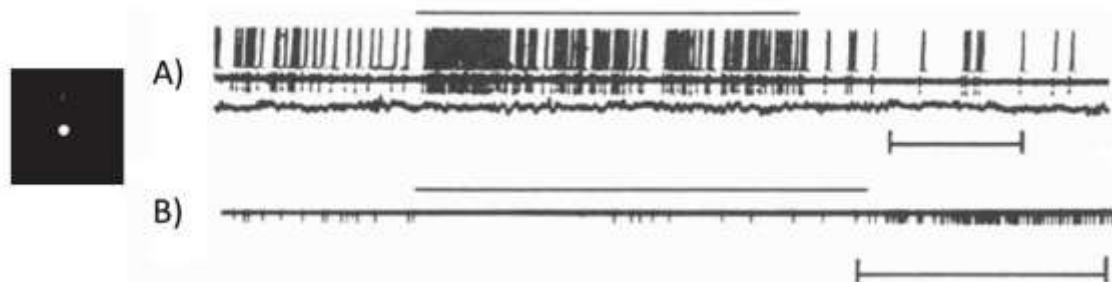


Figura 11. Respuesta a luz difusa de dos fibras registradas de la corteza, posiblemente de materia blanca subcortical. A) Respuesta de tipo “on” B) Respuestas de tipo “off”, ambas en gato anestesiado. La línea de arriba indica el periodo cuando la luz esta prendida. El diagrama de la izquierda indica el tipo de estímulo. La barra de escala indica 1s. Hubel, 1960

Así mismo, este tipo de neuronas también fueron descritas por Dubin y Cleland en 1977 en el núcleo geniculado lateral del gato, donde las interneuronas perigeniculadas generalmente están inervadas de forma binocular y dan respuestas de ON-OFF a estímulos puntuales pequeños en todo su campo receptivo. Ellas responden a estimulación eléctrica de la retina con una latencia de espiga que disminuye entre estímulos transitorios o sostenidos. Estas vías de interneuronas descritas fueron consistentes con circuitos propuestos que ayudan a la generación de IPSPs que alcanzan en respuesta al nervio óptico y la estimulación visual, lo que sugiere que estas interneuronas modulan la excitabilidad del núcleo geniculado lateral.

En el sistema motor, Buchanan J. y Grillner, S. en 1987 observaron un mecanismo de ONOFF en la locomoción de la lamprea donde interneuronas excitan a interneuronas inhibitorias como las interneuronas laterales (InL) e interneuronas que tienen un axón contralateral y proyección caudal (CCIN). InL darán un mecanismo de apagado donde las interneuronas se despolarizan en fase con las motoneuronas, por lo tanto, su actividad tenderá a desactivar a las CCIN ipsilaterales. Así que las interneuronas laterales asumirán entonces el importante papel de desactivar indirectamente toda actividad ipsilateral.

## 1.8 Neuronas ON-OFF y OFF-ON en médula espinal relacionadas al movimiento

Más tarde, Tapia y col. en 2013 describieron por primera vez en el tallo cerebral la existencia de tres tipos de actividad interneuronal (OFF-ON, ON-OFF y Tónicas) cuando registraron el potencial lento del Óbex durante el rascado ficticio, un comportamiento muy similar al descrito por Hartline durante la foto estimulación. En este caso, las interneuronas de la formación reticular que se clasificaron como OFF-ON, fueron aquellas que mostraron una descarga de fondo antes y después del rascado (1 Hz), pero durante el rascado aumenta su tasa de disparo alrededor de 80 Hz. Por otra parte, las interneuronas ON-OFF son aquellas que presentaban una frecuencia de descarga de 27 Hz antes y después del episodio de rascado, cesando su actividad durante el episodio de rascado. Finalmente, las de tipo tónico no mostraron una activación ni modulación antes, durante y después del rascado.

La distribución de estas neuronas ON-OFF y OFF-ON fueron registradas a una profundidad de 2222 a 4118  $\mu\text{m}$  sin obviar una distribución en núcleos específicos.

Posteriormente, Cuellar y col. en 2018 realizaron registros electrofisiológicos de interneuronas en un solo segmento (L6) de la médula espinal por medio de microelectrodos de tungsteno, describiendo el mismo comportamiento de neuronas relacionadas al rascado como, las descritas en el óbex.

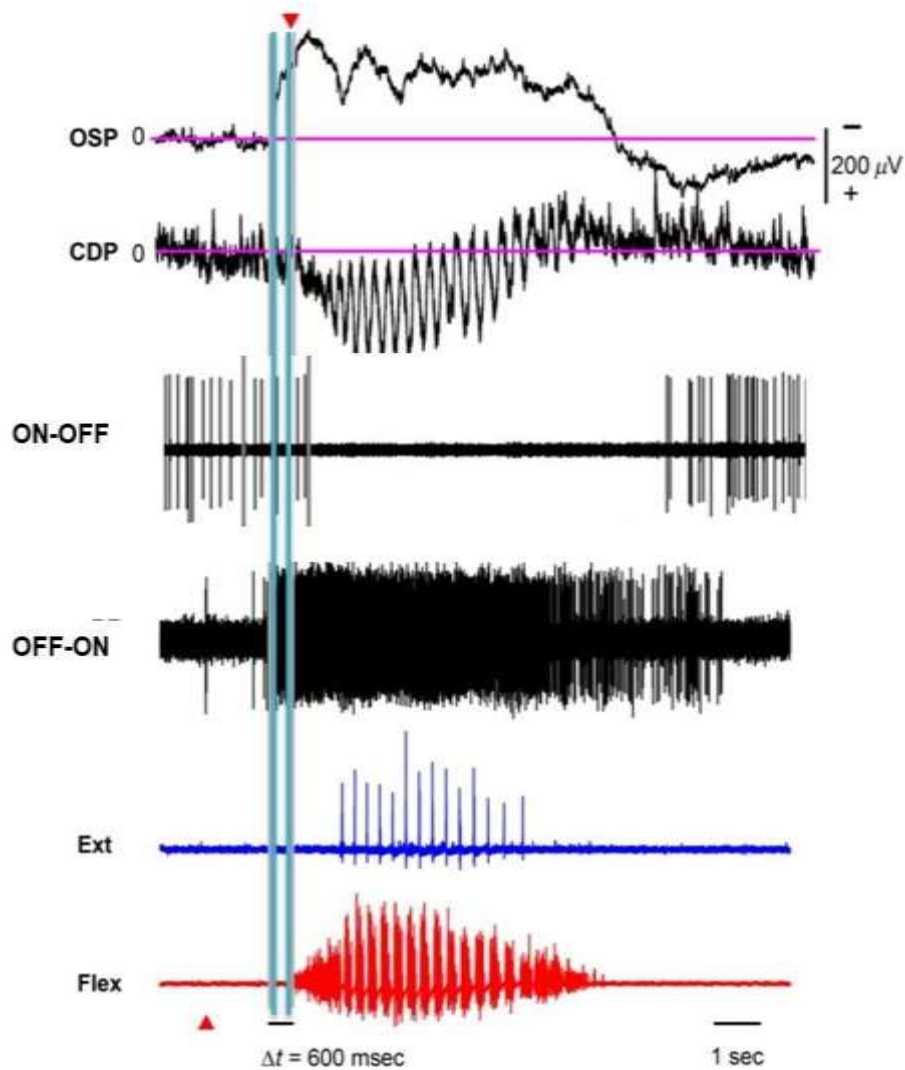


Figura 12. Se puede observar dos tipos de neurona con diferente patrón de descarga, las ON-OFF presentan una alta frecuencia de descarga antes del episodio de rascado, mientras que las OFF-ON, permanecen silentes hasta el episodio de rascado

En este caso, se pudo observar que existen neuronas ON-OFF que se correlacionan con la descarga del Nervio Gastrocnemio Medial, por lo que nombraron como ON-OFF Extensoras. Asimismo, se observó la correlación de las neuronas OFF-ON con la descarga del nervio Tibial Anterior, por lo que se nombraron como OFF-ON Flexoras. Sin embargo, Cuellar y col. describen en su trabajo otro subgrupo como ON-OFF, que se correlacionan con la fase intermedia del periodo de rascado, por lo que se nombraron como ON-OFF intermedias. Donde las descargas de estas neuronas ON-OFF extensoras son consistentes con los hallazgos realizados por Berkinblit et al en 1978.

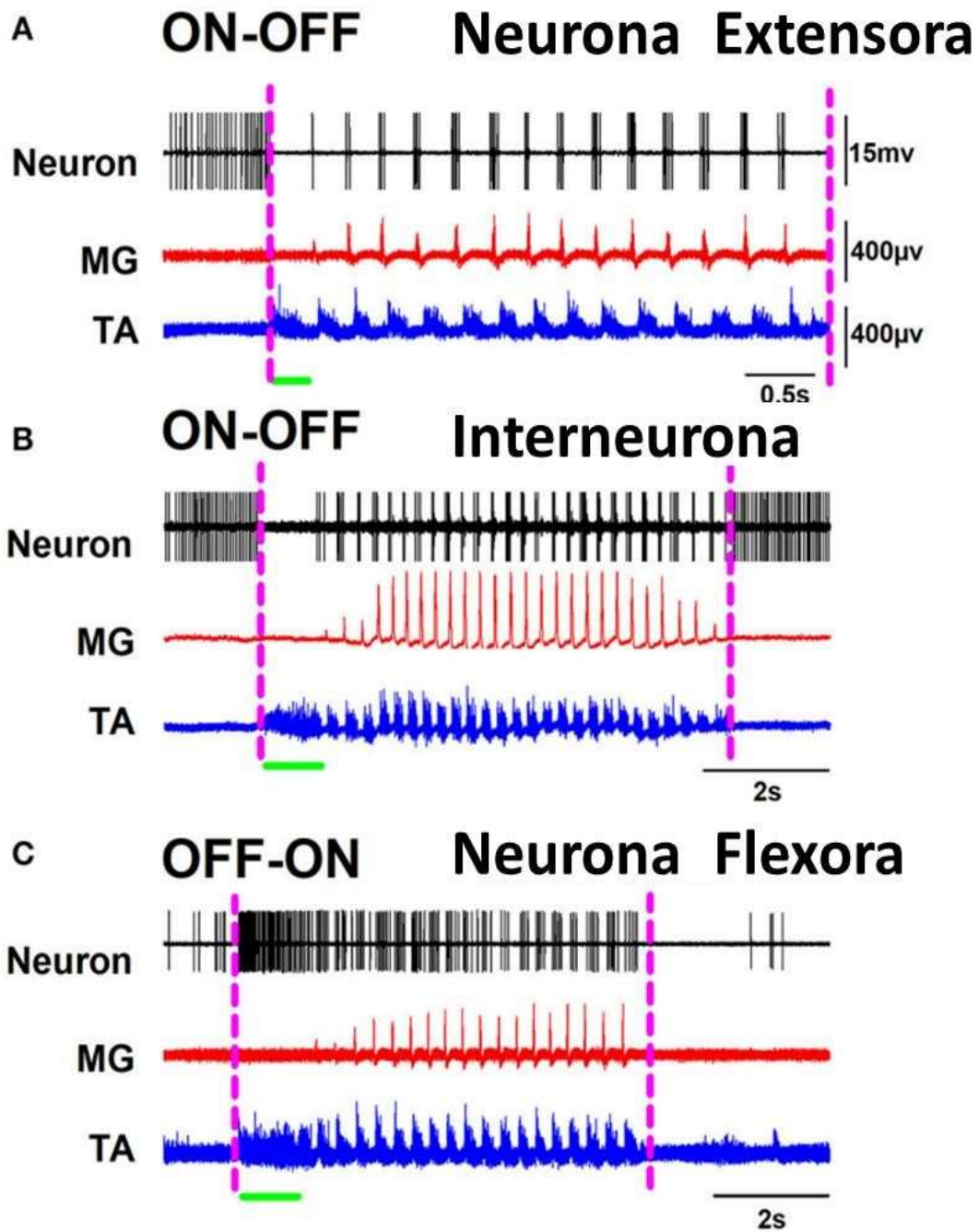


Figura 13. Se muestra los tres tipos de neuronas que se correlacionan a cada fase del rascado, neurona ON- OFF extensora, se correlaciona con la descarga del Nervio Gastrocnemio Medial, neurona ON-OFF intermedias, y neuronas OFF- ON flexoras que se correlación con la descarga del nervio Tibial nterior (Cuellar y col., 2018)

## 2. Planteamiento del problema

En los trabajos previos en el laboratorio se ha clasificado a las neuronas de la médula espinal como ON-OFF y OFF-ON asociadas al episodio de rascado ficticio tanto en el óbex (Tapia, 2013) como en la región lumbar (Cuellar, 2018). Sin embargo, aún se desconoce cómo están distribuidas estas neuronas a lo largo de los segmentos de la médula espinal, específicamente en la región lumbar. Esto es importante, ya que en esta región lumbar se encuentran los núcleos motores que inervan a las extremidades posteriores para el rascado (Dai X., 2005). Es por ello, que se propone estudiar la distribución de estos tipos de neuronas con base a su actividad eléctrica a lo largo de la región lumbar, por medio de registros de actividad multiunitaria. Se pretende examinar si existe una propagación de la actividad eléctrica con una dirección definida, mediante un análisis del retraso de fase de sincronía entre pares de interneuronas.

### **3. Hipótesis**

Las neuronas de las clases ON-OFF y OFF-ON espinales se encuentran homogéneamente distribuidas rostro-caudalmente en los segmentos L4 a S1, y exhiben un retraso de fase de sincronía similar entre pares de neuronas de la misma clase, pero diferencial entre neuronas de cada clase.

# 4. Objetivos

## 4.1 Objetivo general

Caracterizar la distribución rostrocaudal y el retraso de fase de sincronía de neuronas de las clases ON-OFF y OFF-ON en la médula espinal durante el rascado ficticio

## 4.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar la distribución rostrocaudal y retraso de fase de sincronía de pares de neuronas espinales de las clases ON-OFF antes y después de los episodios del rascado ficticio.
- II. Caracterizar la distribución rostrocaudal y retraso de fase de sincronía de las neuronas de las clases OFF-ON durante los episodios del rascado ficticio.
- III. Realizar un análisis comparativo de la fase de sincronía entre pares de neuronas de las clases ON-OFF, entre pares de neuronas OFF-ON y entre ambos grupos ON-OFF versus OFF-ON.
- IV. Construir mapas topográficos de la incidencia y de la fase para cada tipo neuronal de las clases ON-OFF y OFF-ON.

# 5. Material y métodos

## 5.1 Ubicación espacio-temporal

El estudio se realizará en laboratorio de Neurofisiología Integrativa del Instituto de Fisiología en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## 5.2 Estrategia de trabajo

A los gatos se les producirá el reflejo de rascado ficticio, al mismo tiempo, se registrará la actividad eléctrica de la médula espinal en los segmentos de L4 a L7 mediante una matriz de electrodos

## 5.3 Muestreo

### 5.3.1 Definición de la unidad de población

Animales de sexo indistinto comprendido en un rango de peso entre 2.25 kg a-5.2 kg, sin ningún registro previo de enfermedades neurológicas provistos por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Cabe señalar que todos nuestros experimentos cumplirán 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. Ejecutaremos cada protocolo sobre cada sujeto de forma particular y especializada para procurar en todo momento un margen mínimo de error a través de una planeación previa y ejecución meticulosa del paradigma experimental. Nuestros procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) BUAP.

## 5.4 Procedimiento quirúrgico

Se emplearon 2 gatos sin distinción de género (2.25 kg -5.2 kg) provistos por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Durante el desarrollo de los experimentos se seguirán estrictamente las pautas sobre el cuidado y experimentación

en animales de laboratorio, contenidas en la Norma Oficial Mexicana 062. Al iniciar el experimento, el gato se colocará en una caja para inducir anestesia, la cual consistirá en una mezcla de gases con isoflurano (Dorin, Rimsa) (2%) y O<sub>2</sub> (98%), posteriormente, la salida de los gases será capturado por un sistema de filtración para isoflurano (Scavenger, Enviropure V-7203)

Una vez que el gato mostró signos de anestesia, se procederá a retirarlo de la caja y a colocarlo sobre una mesa de cirugía. En el transcurso del traslado de la caja de inducción a la mesa de procedimientos quirúrgicos se colocará al gato una mascarilla conectada al mismo sistema de gases para continuar con la anestasia. El estado de anestesia se verificó mediante el estado de dilatación de las pupilas, respuesta al reflejo palpebral, reflejos a estímulos dolorosos (comprensión del cojinete de alguna extremidad) y estado de relajación (tono muscular). Los valores de administración de isoflurano se ajustaron de acuerdo a las necesidades del procedimiento quirúrgico que se describen a continuación.

Se introducirá un catéter en la arteria carótida (izquierda o derecha) para monitorear la presión sanguínea constantemente (valor optimo entre 80-120 mmHg) además de introducir otro catéter en la vena Radial para administrar fármacos (Ver tabla 2) restablecer líquidos

| Indicación   | Fármaco                | Concentración   | Volumen   |
|--|------------------------|---|-----------|
| Inicio de la cirugía                                       | Isoflorano             | 1.50%   |           |
|  | Atropina               | 0.2 mg/ml   | 1 ml      |
|  | Dexametasona           | 4 mg/ml   | 1 ml      |
|  | Bicarbonato            | 100 ml (1 ampolleta en 89 ml de Glucosa 5%)           | 5 ml      |
| Disminución de la presión arterial (por debajo de 80 mmHg) | Dextran                | 4   | 3 - 20 ml |
| Cada hora  | Solución amortiguadora | Glucosa 5%<br>NaHCO <sub>3</sub> .84%                 | 5 ml      |
| Antes de la descerebración                                 | Dexametasona           | 4 mg/ml   | 1 ml      |
| Después de la descerebración                               | Bromuro de pancuronio  | 0.4 mg/ml (1 ampolleta en 10 ml de sol. Salina al 9%) | 1 ml      |

perdidos en el proceso quirúrgico.

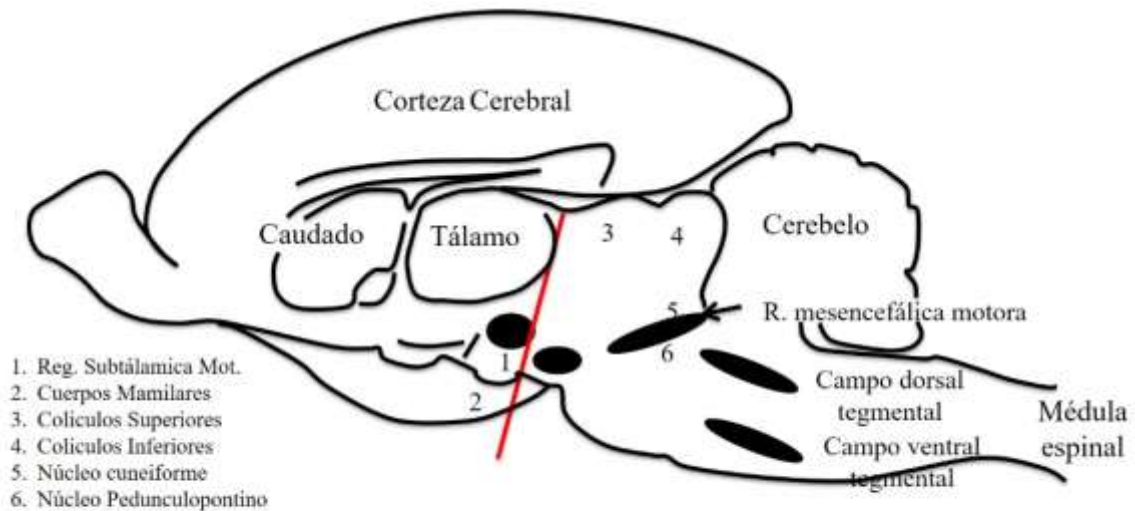
Tabla 2. Fármacos aplicados durante el experimento.

La obtención de orina será mediante la introducción de una sonda uretral hasta la vejiga. Una vez realizados los procedimientos anteriores, la anestesia se suministrará mediante una cánula endotraqueal (el flujo de isoflurano se reajustará a menos de 1.5%).

Para los registros electroneurográficos (ENG) se disecaron los nervios de las extremidades posteriores: sartorio (Sar), cuádriceps (Q), bíceps posterior (BP) y bíceps anterior (BA), semimembranoso (Sm), Semitendinoso (St), gastrocnemio medial (GM) y lateral (GLS), Tibial Anterior (TA), extensor Digitorum Longus (EDB) y Peroneo Superficial (SP). Los nervios disecados fueron cubiertos con algodón y solución fisiológica, para evitar su desecación previa al montaje de los nervios para su registro electrofisiológico. Posteriormente se realizó una laminectomía amplia en los segmentos de la médula espinal lumbar (L4-S1). La meninge duramadre de la médula espinal será seccionada medialmente en su porción dorsal, posteriormente se retrajo a los costados. Lo anterior se realizará con el propósito de permitir un adecuado contacto del tejido nervioso con la matriz de electrodos de registro. Después de los procesos quirúrgicos anteriores se procederá a colocar al gato en un aparato estereotáxico (Narishige, Japón). Una vez montado en el estereotáxico se llevará a cabo una laminectomía sobre los segmentos cervicales C1 y C2. Tanto la médula espinal como los nervios disecados de las extremidades inferiores se cubrirán con aceite mineral para evitar su desecación.

El siguiente paso consiste en la descerebración o decorticación (preparación precolícular-postmamilar o gato mesencefálico) (figura 14). Con el fin de ocluir temporalmente el flujo sanguíneo durante la descerebración, se realizó una ligadura parcial sobre la arteria carótida contra lateral que se emplea para el monitoreo de la presión sanguínea. Una vez retirados prosencéfalo y telencéfalo, se cubre la cavidad craneana con material hemostático para favorecer la hemostasia (Surgicel, Ethicon Inc.) y solución de agar (37°C). Una vez realizado el procedimiento anterior, se elimina la administración de anestesia.

Posteriormente, el animal se paraliza, para lo cual se administró bromuro de pancuronio (ver tabla para la dosis empleada) y se ventiló artificialmente (15-17 ciclos por minuto, Vol. 35 ml).



### Descerebración Precolicular- Postmamilar

Figura 14. Descerebración precolicular postmamilar. Se muestra el tipo de descerebración que se realizó en los modelos experimentales (línea roja). Se mantienen los colículos superiores e inferiores, pero se eliminan los cuerpos mamilares, con el fin de poder producir el rascado ficticio. Tomado de Whelan 1996 y Aoki, 1981

## 5.5 Producción del rascado

El reflejo del rascado se produjo mediante la aplicación de D-tubocurarina (PM 981.65 g/mol, Sigma Aldrich) al 1% (10 mg en 1 ml de solución salina) sobre la superficie de la médula espinal en los segmentos cervicales C1-C2, mediante una pequeña torunda de algodón, previamente inmersa en la solución. Posteriormente, es necesario esperar entre 5 a 20 minutos hasta obtener los episodios de rascado. Para producir este reflejo, se estimula la región del pabellón auricular o sobre la región pericefálica del gato (alrededor del cuello y en la zona mandibular). El estímulo se realizará de manera manual, frotando ligeramente con ayuda de algún objeto romo. En algunos casos, el reflejo de rascado se produce de manera espontánea; es decir, posterior a la aplicación de la D-tubocurarina y sin realizar ninguna maniobra de estimulación (figura 15).

## 5.6 Registros electrofisiológicos

Los potenciales de campo eléctrico de la médula espinal se registraron en modo DC (amplificador EEG de Synamps, NeuroScan) utilizando una matriz multielectrodo compuesta por 32 electrodos de Ag-AgCl (punta redondeada de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro). La matriz se colocó en la superficie dorsal de L4-L7 (Cuellar, January 21, 2009) y se identificó el segmento de la médula espinal con las amplitudes más altas tanto en el desplazamiento positivo de DC como en los CDP sinusoidales. Las amplitudes máximas ocurrieron alrededor del segmento de la médula espinal L6 (datos no mostrados); por lo tanto, se realizaron inserciones de microelectrodos de fibra de cuarzo / platino-tungsteno para la registrar la actividad neuronal de múltiples unidades (impedancia de 5–7 MOhms y frecuencia de muestreo fue de 50 KHz) con el sistema Minimatrix (Thomas Recording). Así mismo, también se registró la actividad electroneurográfica (ENG) (0,05 Hz a 30 kHz de paso de banda) se registraron utilizando amplificadores de CA (Grass P511) y el sistema Digidata (Molecular Devices) (figura 15).

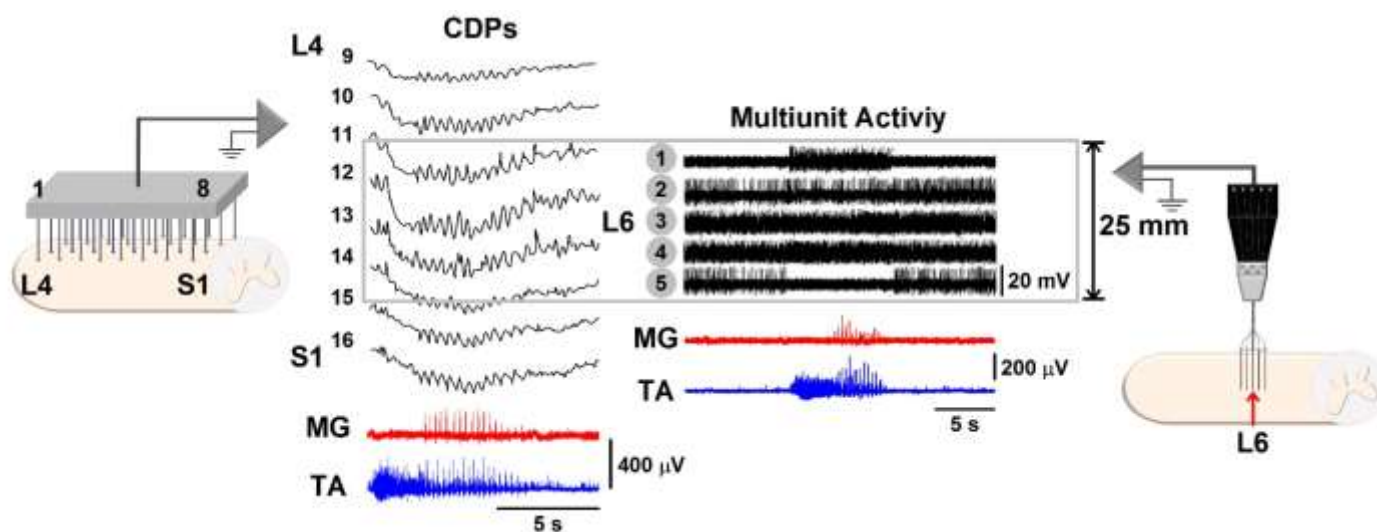


Figura 15. Esquema de colocación de electrodos a lo largo de la médula espinal. Se coloca DTubocurarina en los segmentos C1-C2. Izquierda. Colocación de una matriz de electrodos de AgCl para registrar el potencial lento de la médula espinal a lo largo de los segmentos L4-S1. Derecha. Colocación de microelectrodos para el registro del potencial lento de la médula espinal. Los microelectrodos para registro multiunitario se insertaron en L6, en la región de máxima actividad eléctrica.

## 5.7 Análisis de registros

El análisis consta de cuatro pasos como se muestra en la siguiente tabla:



Tabla 3. Procesamiento de registros. El análisis completo consta de cuatro fases, el primero de ellos es la segmentación, posteriormente la agrupación. Posteriormente, la obtención de envolvertes y generación de “rasters” de actividad, y finalmente, la generación del circuito o mapas topográficos de incidencias.

### 5.7.1 Segmentación

Dado a que se pretende analizar el comportamiento de frecuencias de descarga de las neuronas de las clases ON-OFF antes, durante y después del rascado, se procedió a obtener los tiempos de inicio del rascado (TI), tiempo del final del rascado (TF), duración del rascado ( $\Delta t = TF - TI$ ). Este último, se consideró como el tiempo de segmentación. Se obtuvo un tiempo de segmentación antes del inicio del rascado, justo antes de que la actividad del nervio tibial anterior (Flexor) presentara actividad tónica. También se incluyó el intervalo de tiempo donde estuvo presente el rascado, y al término del mismo, se tomó otro tiempo de segmentación. De esta manera, los registros duran tres veces lo que dura el rascado, figura

16.

La ventaja de hacer este tipo de segmentación, es que nos permite normalizar la duración del rascado (intervalo 0 a 100), esto implica que, en el primer tercio siempre hay actividad previa al rascado, el segundo tercio corresponde al rascado, y el tercer tercio a la actividad posterior al rascado. Ello nos permitió hacer la comparación entre registros en los pasos siguientes.

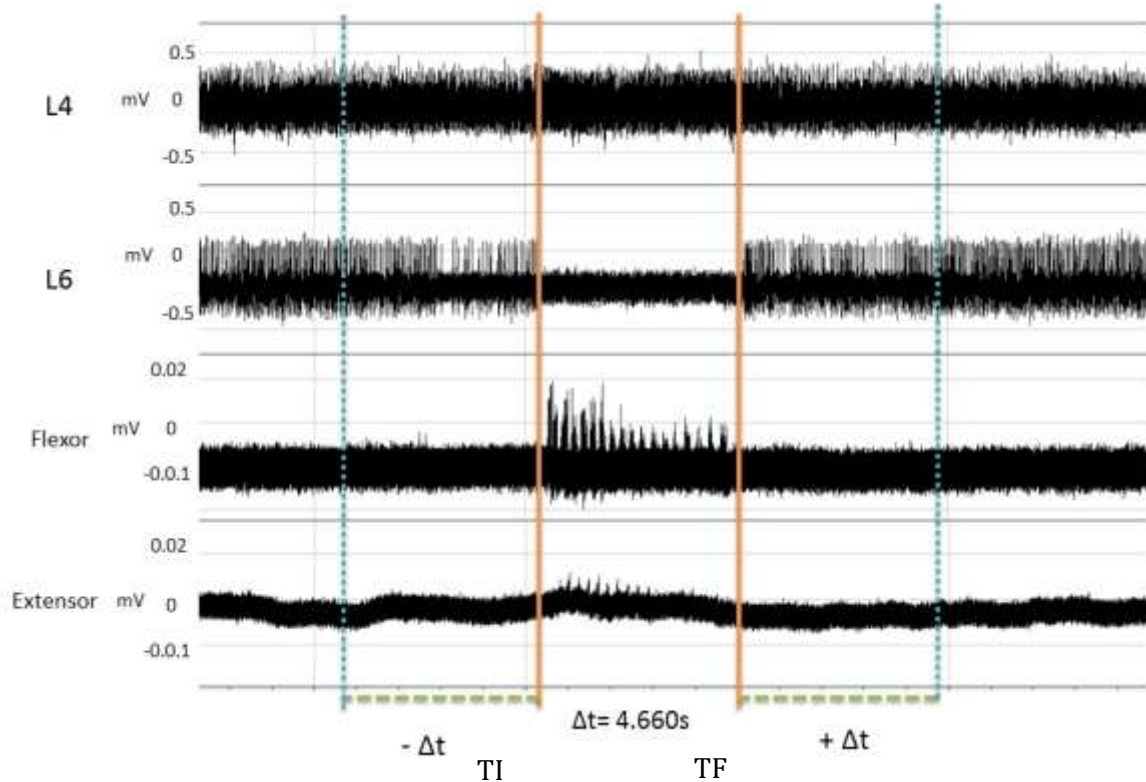


Figura 16. Se observa la presencia de neuronas del tipo ON- OFF y OFF- ON. Asimismo, se representa con líneas verticales naranjas la duración del rascado, y con líneas azules, los segmentos tomados antes y después del rascado con la misma duración del rascado. Esta segmentación se realizó mediante un algoritmo desarrollado en Matlab por De la Torre Valdovinos

### 5.7.2 Agrupación

Posterior a la segmentación, se realizó el agrupamiento de neuronas mediante el software Waveclus en Matlab, el cual consiste en juntar neuronas en grupos basándose en la similitud de sus formas (amplitud, longitud, pendiente). Dado que, en principio, cada neurona tiende a generar potenciales de acción (espigas) de forma particular, los grupos resultantes corresponden a la actividad de diferentes neuronas putativas. Este tipo de análisis de señales se basa en la descomposición de cuatro niveles usando wavelets de Haar, que son funciones cuadradas re escaladas. Ello permite que las características discriminatorias de las espigas se expresen con unos pocos coeficientes wavelet y sin suposiciones a priori sobre la forma de espiga. El resultado final de la clasificación de espigas es la determinación de qué espiga corresponde a cada una de estas neuronas (Quiroga y cols. 2004, Martínez y cols. 2009)

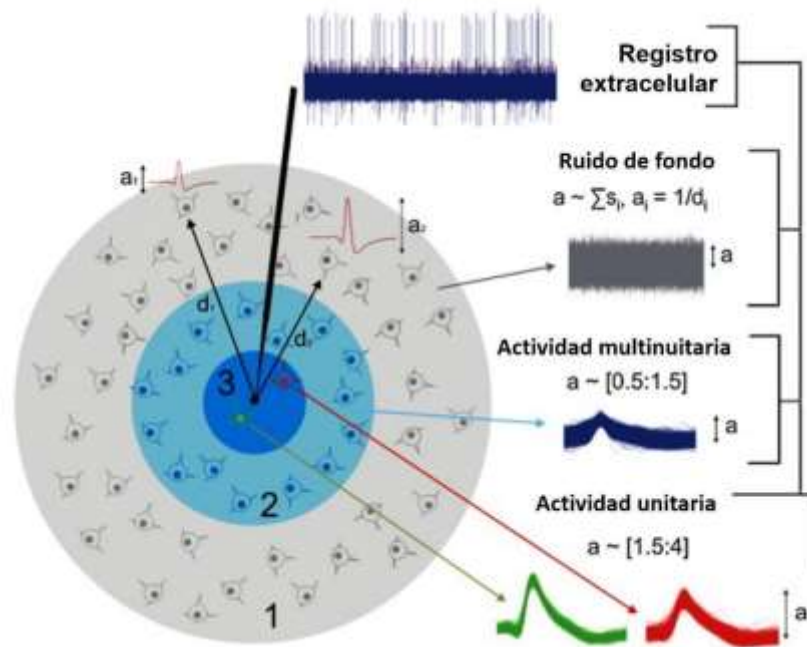


Figura 17. Descripción general del enfoque de simulación. Las neuronas en el área 1 generan la actividad de ruido, que está dada por la superposición de sus picos. Cada amplitud máxima está modulada por su distancia  $d_i$  al electrodo de grabación (en el centro de la esfera). La actividad de las neuronas en las áreas 2 y 3 (actividad de unidades múltiples y unidades individuales, respectivamente) se crea agregando picos en la parte superior del ruido de fondo, siguiendo las distribuciones de amplitud típicas medidas para picos de unidades múltiples y unidades únicas. Quiroga y cols. 2004, Martínez y cols. 2009

El principio de cómo funciona este software radica en la naturaleza del registro, dado que es extracelular multiunitario, implica que un solo electrodo puede registrar en el tejido una alta cantidad de neuronas que se encuentran alrededor de él (figura 17). Y mediante desviaciones estándar de la distribución generada, se segregan la morfología de las ondas. Esto se puede modular mediante dos parámetros principalmente, el umbral de detección y la temperatura de agrupación. El primero de ellos, se muestra como la línea roja de la figura 18, el cual determina el radio de detección del electrodo. Mientras que el segundo, modula el ajuste que tiene cada grupo de neuronas figura 18. Si nos desplazamos a la izquierda, se realiza un mal modelo de ajuste que agrupa a todas las neuronas en un solo grupo. Mientras que si nos desplazamos a la derecha, se realiza un sobreajuste de las formas de los potenciales unitarios excitatorios, lo que provoca una alta generación de grupos neuronales.

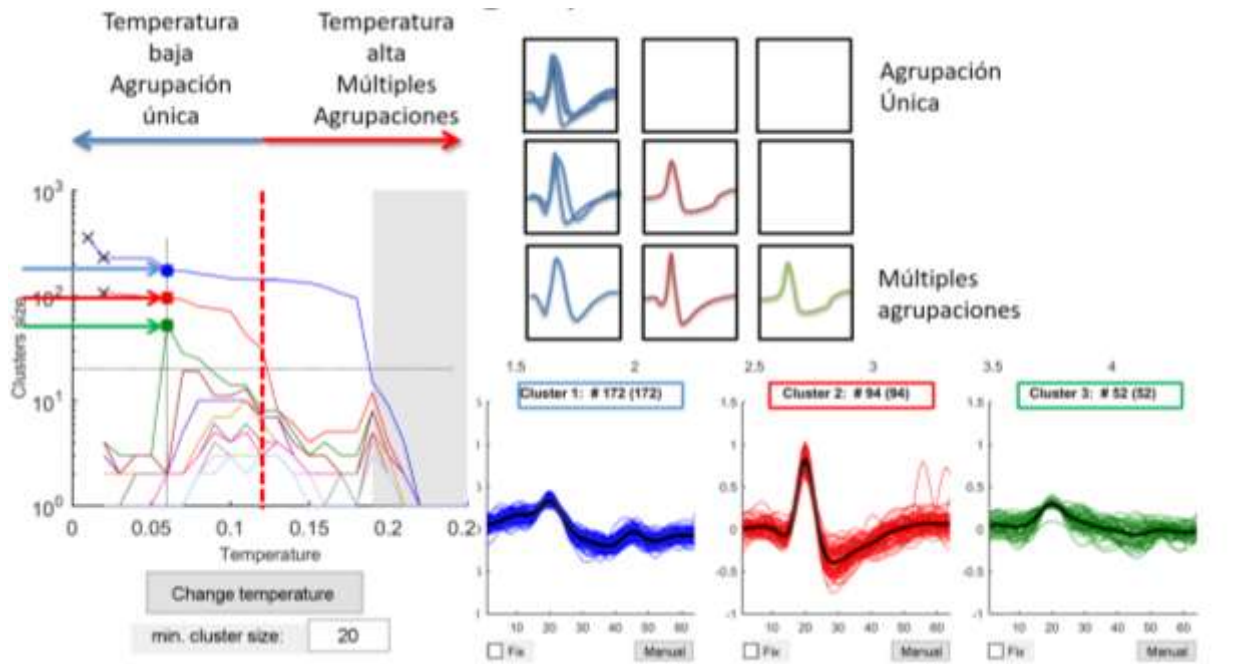


Figura 18. Agrupación de neuronas, Se muestra como se hace el ajuste para cada grupo de neuronas, si uno se desplaza para temperaturas más frías, se genera un solo grupo de neuronas, lo que implica que no exista una diferenciación entre los potenciales extracelulares, mientras que, si nos desplazamos a temperaturas más cálidas, se realiza un sobreajuste. El eje de las y muestra la cantidad de neuronas que existe en cada grupo. Tomado y modificado de Quiroga y cols. 2004, Martínez y cols. 2009

### 5.7.3.1 Generación de Registros de actividad (Rasters)

#### Separación en grupos ON-OFF y OFF-ON

Una vez realizado la segregación de neuronas, Waveclus nos devuelve archivos que contiene tiempos de aparición del potencial extracelular unitario, con el cual se realizaron los rasters de actividad (registro de actividad), y valores para reconstruir cada potencial. Se tomó en cuenta solo el vector del tiempo, y con base a su comportamiento de descarga se clasificaron en varios grupos. Originalmente se clasificaron en dos grupos, tomando en cuenta los criterios de Cuellar y cols. 2018.

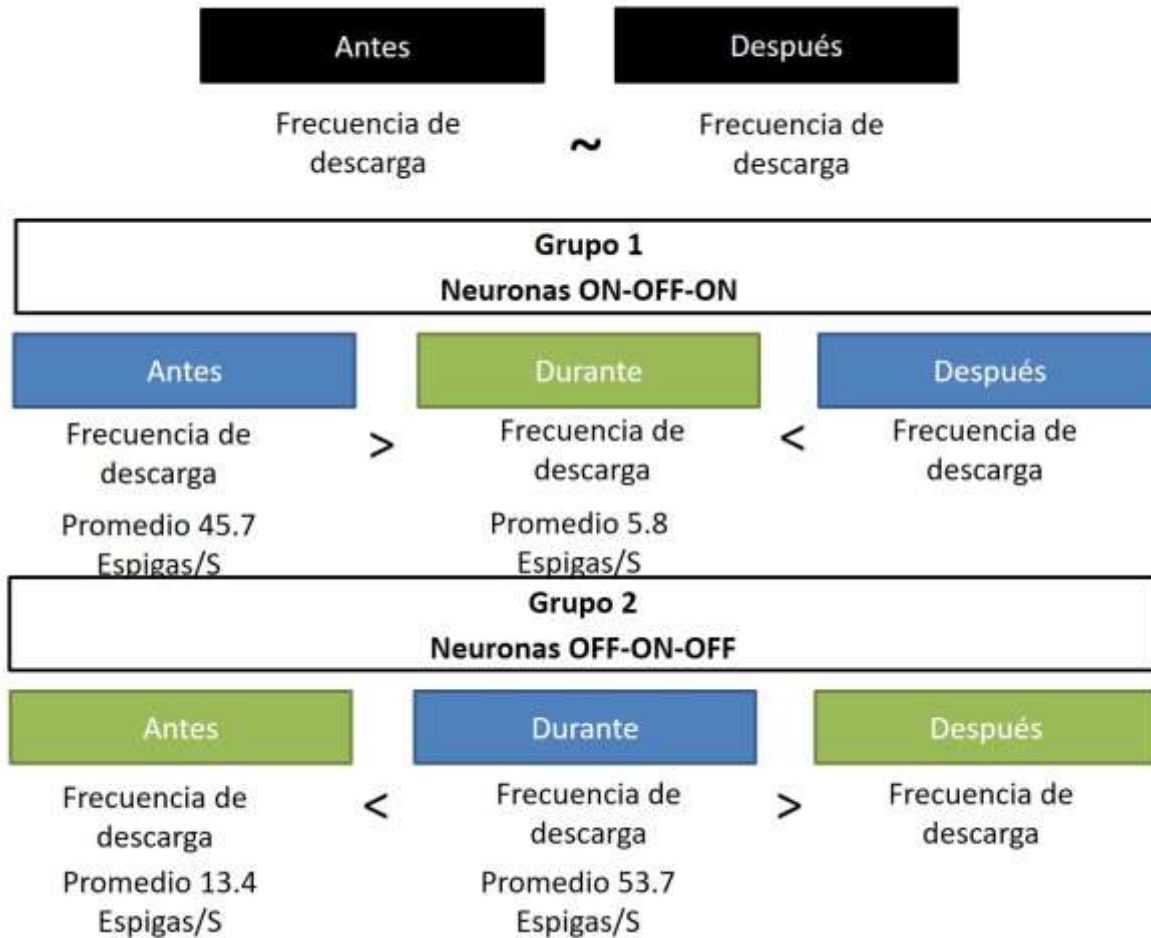


Figura 19. Con base a esta clasificación se realizaron histogramas de actividad que se observan en la de parte resultados

### 5.7.3.2 Envolvente

Seguido al agrupamiento, realizamos el cálculo de envolvente, por un algoritmo de Matlab diseñado por De la Torre Valdovinos de la Universidad de Guadalajara. Este algoritmo consiste en integrar trapezoidalmente, filtrar y rectificar las señales obtenidas por Waveclus cuya finalidad es purificar la señal registrada.

### 5.7.4 Correlación cruzada de neuronas

Posteriormente, se realizó correlación cruzada entre registros de neuronas. La correlación cruzada es una medida de similitud de dos vectores de valores aleatorios en función del desplazamiento (rezago) de una en relación con la otra. Cada vector tiene la característica de ser independiente entre sí. De tal manera que las envolventes nos sirvan para poder

calcular la correlación entre electrodos de la minimatrix y el tiempo de latencia que presentan las neuronas entre ellas, así como con el rascado.

La correlación cruzada de dos procesos aleatorios conjuntos,  $x_n$  y  $y_n$  está dada por

$$\frac{\sum_{t=1}^{n-k} (X_t - \bar{X})(Y_{t+k} - \bar{Y})}{S_x S_y}$$

Donde:

**n** es el número de observaciones

**t** es el número de fila

**k** es el retraso

**X** es la media de X

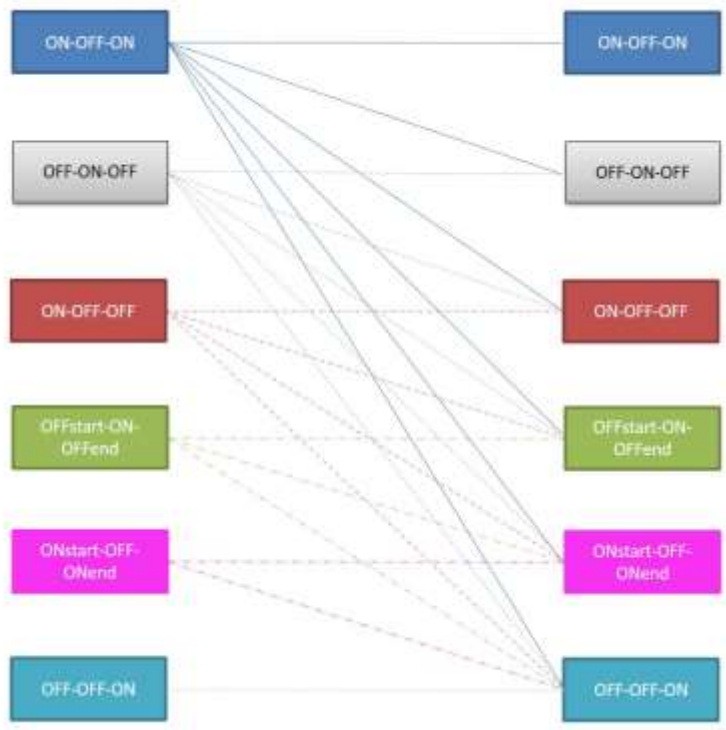
**Y** es la media de Y

**S<sub>x</sub>** es  $\sqrt{\sum_{t=1}^n (X_t - \bar{X})^2}$

**S<sub>y</sub>** es  $\sqrt{\sum_{t=1}^n (Y_t - \bar{Y})^2}$

Para nuestro análisis, la correlación cruzada se realizó entre una neurona y el registro de rascado. Esto con la finalidad de entender si la actividad neuronal tiene una relación recíproca con las motoneuronas en el rascado. Por otra parte, se realizó también correlación cruzada entre pares de neuronas, con la finalidad de encontrar una correspondencia entre ellas y el retraso promedio de neuronas. El arreglo de comparación entre neurona y rascado, así como entre neuronas, se muestra en la figura 20.

A)



B)

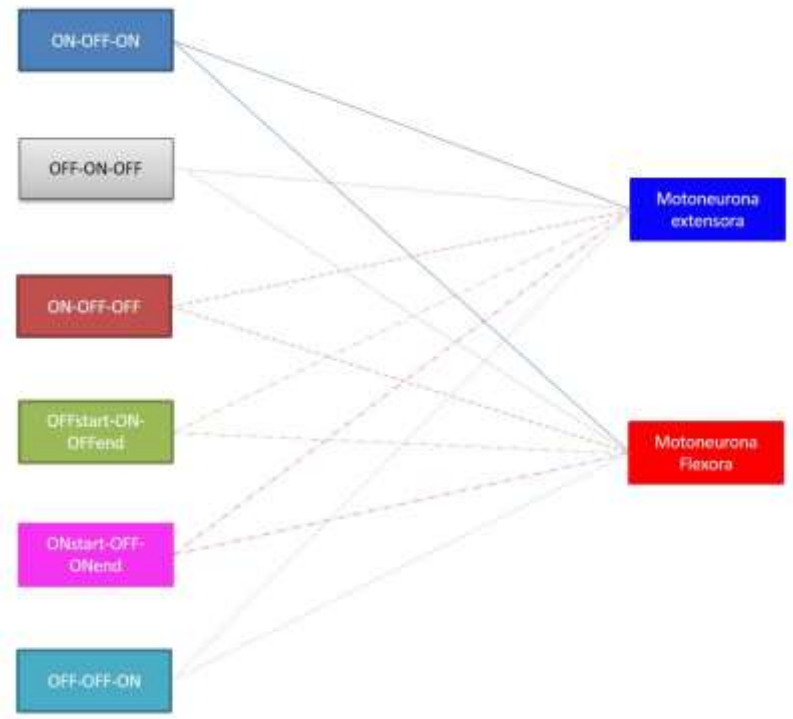
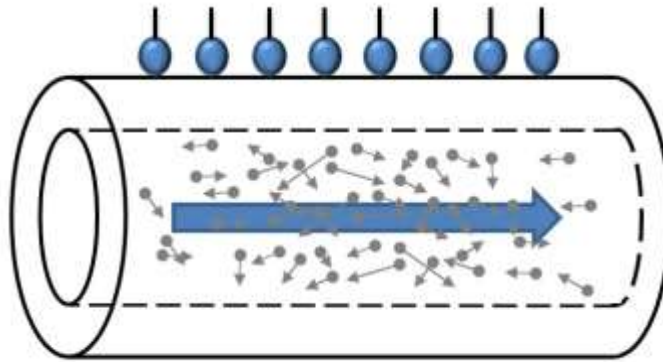


Figura 20. Correlación Cruzada. A) Tipo de comparación entre señales, se puede observar la comparación entre neuronas del mismo tipo, así como entre los diferentes tipos. Cabe mencionar que dada la naturaleza del registro, en una misma ubicación del electrodo se

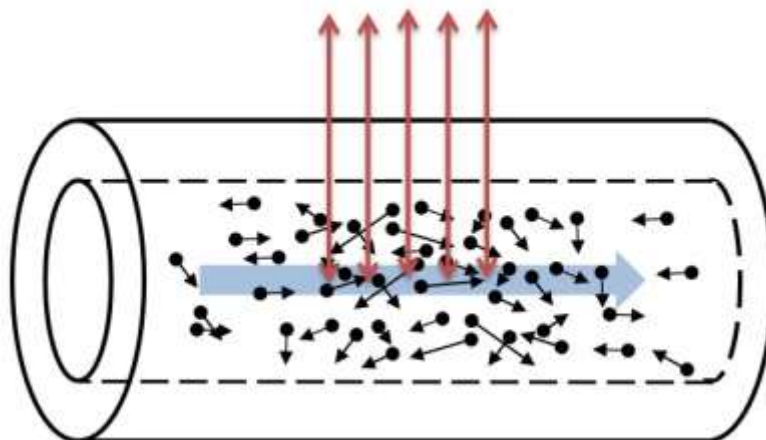
podieron encontrar diferentes tipos de neurona, también se comparará así como entre neuronas de los electrodos. B) comparación de interneuronas contra motoneuronas

#### 5.7.4.1 Análisis de Retraso de fase de sincronía

Cuellar y colaboradores, mostraron en 2009 la propagación rostro-caudal de una onda sinusoidal eléctrica (registros de campo) a lo largo de la médula espinal en la región lumbar durante el rascado ficticio, con una velocidad promedio en los picos negativos de 0.29 m/s y de 0.32 m/s para los picos positivos. De acuerdo a este reporte, se sugirió que esta onda se genera por interneuronas de la lámina VII de Rexed, donde el vector resultante de la propagación eléctrica individual de interneuronas sería la onda viajera.



Dada la naturaleza de la médula espinal, se podría encontrar un vector con la misma dirección que la onda viajera, a partir de los registros puntuales y medir el retraso entre los registros mediante la correlación cruzada. Dicha correlación cruzada ha sido empleada para estudiar la fortaleza y dirección de la relación entre dos procesos estocásticos conjuntamente estacionarios (Rosales, 2004).



Para medir la relación de la correlación con el rascado, se normalizó la duración del rascado, así como también la correlación (Coeficiente de correlación). Posteriormente, se analizó la

secuencia de picos de correlación por cada segmento y entre neuronas. En este sentido, la dirección de la propagación del impulso nervioso estaría determinado en cada segmento por la sumatoria de las áreas de las correlaciones (integración trapezoidal), obteniendo la correlación resultante (fuerza resultante) sumando segmentos equivalentes positivos y negativos.

### 5.7.5 Mapas topográficos de incidencia

Para poder realizar los mapas topográficos, nos basamos en la cuantificación de cada clase de interneuronas encontradas y sus profundidades de registro. Los ejes del mapa son los siguientes. En x, los electrodos de registro, y en y, la profundidad, mientras que, en la escala de color, en z, se muestra la intensidad de la correlación.

### 5.7.6 Conectoma

Para la creación de los circuitos, nos basamos en los datos arrojados por la correlación cruzada y la latencia entre señales, es decir el retraso que existe entre la actividad de una neurona y otra.

El conectoma humano es una descripción estructural integral de la red de elementos y conexiones que forman el cerebro humano (Hangman, 2005, Spons y col., 2005) Tres aspectos son fundamentales para esta definición. El primero de ellos, es acerca de la estructura, que toma en cuenta la conexión entre elementos neuronales. En este sentido, la unión puede describirse tanto física como funcional. En este caso, la estructural, describe conexiones anatómicas, mientras que la funcional, se define como una dependencia estadística entre elementos neuronales o regiones remotas, y se puede medir con varios métodos bastante dispares que ofrecen diferentes perspectivas sobre la dinámica del cerebro (Horwitz et al, 2003).

La segunda, el conectoma es una descripción de la conectividad cerebral, en este sentido el término de descripción implica la compresión de datos sin procesar con el objetivo de extraer la máxima información. Por lo que el conectoma no es una réplica exacta de las conexiones anatómicas. Para usar una analogía, una descripción arquitectónica de una estructura física resume las principales características del diseño, pero no ofrece una lista de dimensiones y posiciones de todos los bloques de construcción. Esto implica que se puede estudiar la

conectividad a múltiples niveles de organización, reflejando la naturaleza a multi escala de la conectividad cerebral (Ito et al, 2010).

El tercer punto, la idea principal idea detrás del concepto de conectoma es que es una descripción de una red. Por lo que no solo es una gran colección de datos, si no también proveer modelos matemáticos que vincula a las neurociencias con los desarrollos modernos en la ciencia de redes y sistemas complejos (Sporns, 2011).

### 1.2.1 Conectoma en la médula espinal

En los vertebrados, los circuitos motores en la médula espinal generan el ritmo y la coordinación de la actividad muscular durante la locomoción. Debido a que esta funcionalidad se puede preservar en ausencia de entradas sensoriales, estos circuitos generalmente se denominan generadores centrales de patrones (GCP). En animales que nadan, el GCP puede distribuirse a lo largo de la médula espinal (Grillner S., 2006). En el roedor, cada región de extremidades contiene una red de GPC con el agrandamiento cervical que contiene la red locomotora involucrada en los movimientos de las extremidades anteriores, y la parte inferior torácica y la médula espinal lumbar contienen la red locomotora de las extremidades posteriores (Kiehn 2006).

En 2011 Borisyuk y colaboradores modelaron el conectoma de un *Xenopus* joven, basándose en mediciones que se realizaron en sistemas nerviosos aislados de renacuajos químicamente fijados, donde las neuronas individuales se habían llenado con neurobiotina. Las neuronas posteriormente fueron rastreadas visualmente, y fotografiadas. Para cada neurona, supusieron que el campo detritico se extendía uniformemente entre los extremos dorsoventrales, como se muestra en la figura 21. Consideraron a la médula espinal como un cilindro horizontal, y realizaron cortes sagitales a través de él, generando rectángulos, eliminando la tercera dimensión. La ventaja de este modelo yace en que ellos ocuparon patrones de conectividad sináptica para, posteriormente, poder interpretarlos en términos biológicos.

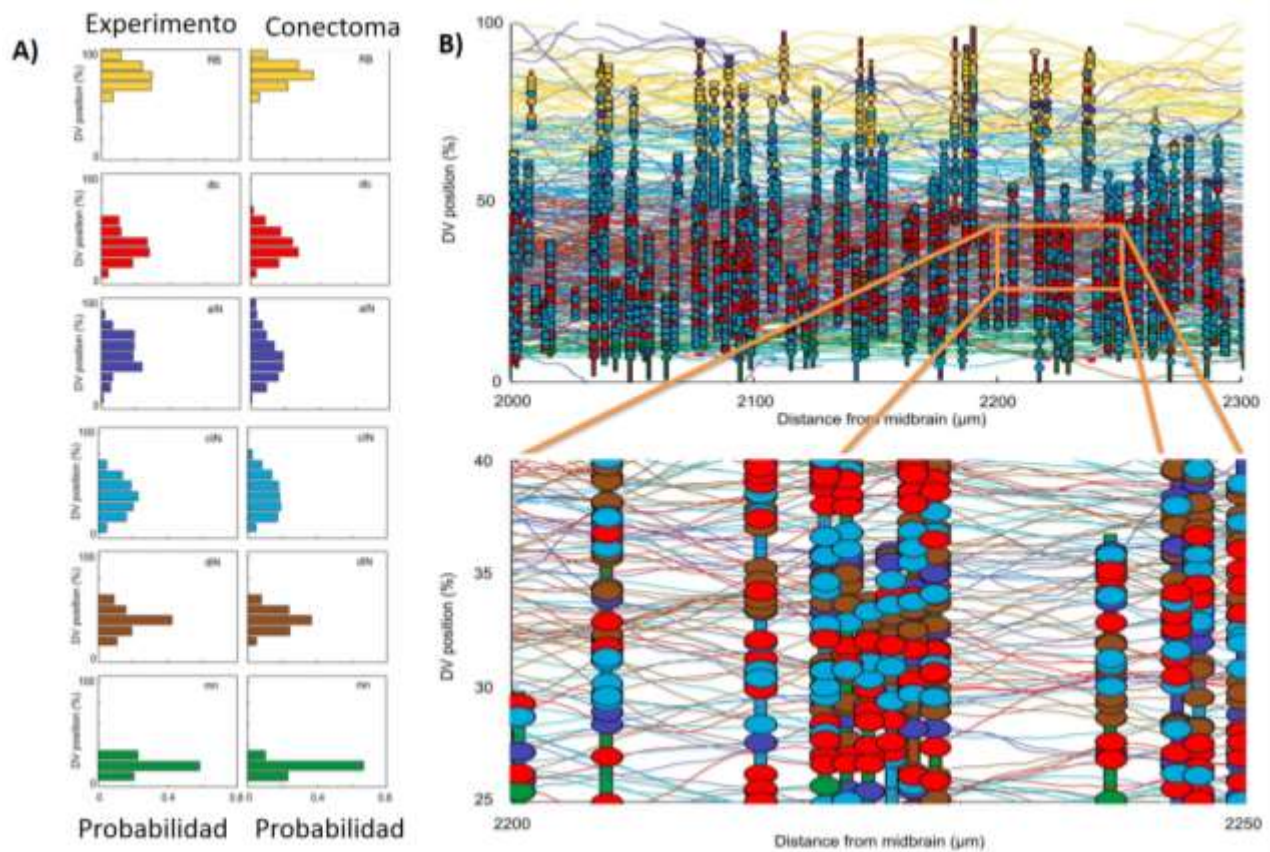


Figura 21. **A) Distribución de axones en el eje dorsal ventral (DV).** Existe una buena unión entre la distribución experimental (Izquierda) y el conectoma (Derecha), en cada caso, DV es dividido en 10 partes. **B) Visualización del conectoma. Superior.** Se muestran 300  $\mu\text{m}$  de longitud del conectoma, las barras verticales indican las dendritas de neuronas individuales, mientras que las líneas horizontales indican la trayectoria del crecimiento de los axones. Inferior. Fragmento pequeño de una rebanada del conectoma. Los colores y profundidades corresponden a los tipos de neuronas como se muestran en A, Neuronas sensoriales Rohon Beard (RB), interneuronas comisurales sensoriales dorsolaterales ascendentes (dla) y dorsolaterles comisurales (dlc). Interneuronas descendentes (dIN), comisurales (cIN) y ascendentes premotoras (aIN), motoneuronas (mn). (Borisjuk et al., 2011)

## 6. Resultados

Se realizaron dos experimentos en gatos descerebrados (Gato 1 y Gato 2) y se obtuvo el registro de Potenciales Sinusoidales del Dorso de la Médula Espinal (CDP, por sus siglas en inglés), el cual tuvo su mayor amplitud en el segmento L6, como fue descrito por Cuellar y cols. en 2009 y Tapia y cols. en 2013.

Asimismo, obtuvimos el registro de interneuronas espinales lumbares mediante la matriz de tres (Gato 1) y cinco (Gato 2) electrodos de tungsteno distribuidos a lo largo de los segmentos L4 a S1. En cada electrodo se pudo corroborar la existencia de neuronas con patrón de descarga ON-OFF y OFF-ON clásicas (Tapia et al 2013, Cuellar et al 2018). También se observó que la excitabilidad de estas neuronas disminuye progresivamente conforme nos alejamos del punto donde se observó la máxima amplitud del CDP (segmento L6).

Por otra parte, en varios segmentos espinales lumbares encontramos otros cuatro tipos de respuestas neuronales adicionales durante el rascado ficticio, que se pueden anexar a las dos previamente descritas del segmento L6. La primera de ellas, consta de un incremento de descarga justo al inicio y al final del rascado. Este caso se correlaciona con el inicio y fin del ciclo alternante del Gastrocnemio Medial. A este tipo neuronal lo hemos llamado ONstartOFF-ONend (por “Start” de inicio y “End” de fin, en inglés). Por contraste, hemos visto un comportamiento “opuesto”. Es decir, las neuronas presentan un estado de descarga basal al inicio y fin del rascado, disminuye su descarga; sin embargo, durante el rascado incrementan su descarga. Esta disminución corresponde al inicio y fin de actividad del Tibial Anterior, por lo que a dicho tipo neuronal lo hemos denominado OFFstart-ON-OFFend.

El tercer grupo de comportamiento consiste en neuronas que presentaban una alta descarga antes del rascado; sin embargo, cuando se inicia la tarea motora, la descarga disminuía su frecuencia y no se restablecía después del término del rascado. Esta disminución se relaciona con el inicio de descarga del nervio Tibial Anterior. A este tercer tipo neuronal lo hemos denominado ON-OFF-OFF. Por último, encontramos neuronas que están parcialmente silenciadas e incrementan su descarga justo a la mitad del rascado. A estas neuronas las denominamos OFF-OFF-ON, Cabe mencionar que la cantidad de descargas fue similar a lo

visto en las neuronas ON-OFF y OFF-ON; es decir, una mayor cantidad de descargas cerca de donde se observó la mayor amplitud del CDP (segmento L5) (figura 23).

Realizamos “rasters” e histogramas por cada grupo de descarga. En la figura 22 mostramos la actividad de “rasters” de las neuronas organizadas por tipo, donde se juntaron los datos de los tres electrodos en todas las profundidades registradas. Obtuvimos registros de una mayor cantidad de neuronas del tipo OFF-ON. Este resultado es consistente con lo presentado en la figura 17, mientras que la cantidad de neuronas de los otros tipos fue semejante entre los pares de grupos que formamos como antagonistas.

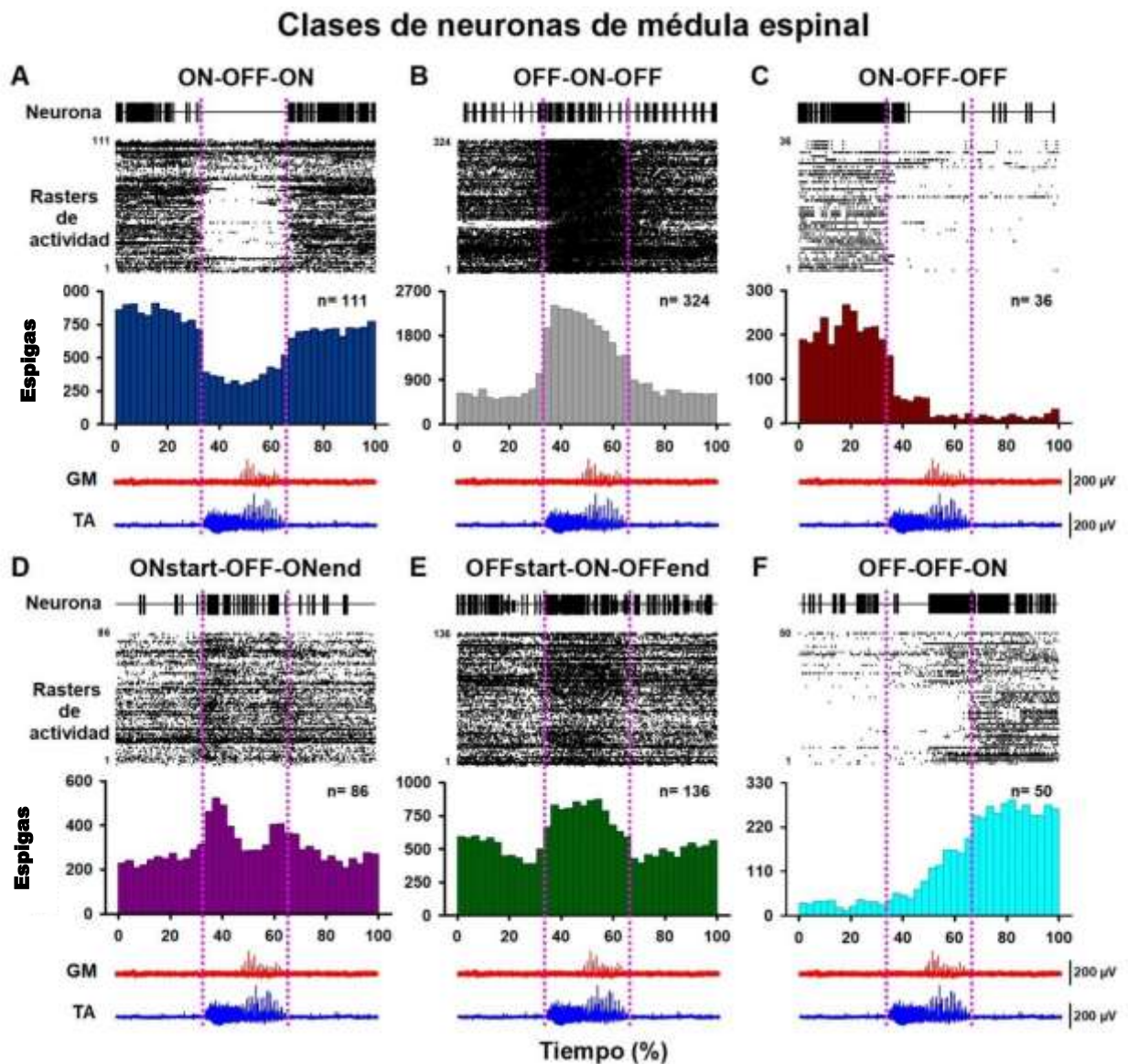


Figura 22. “Rasters” de actividad de todos los electrodos y profundidades por cada tipo de descarga en ambos experimentos. Se puede observar que se registró un mayor número de neuronas de las clases OFF-ON-OFF con respecto a los demás grupos.

## Mapas Topograficos de incidencia para cada clase de neurona

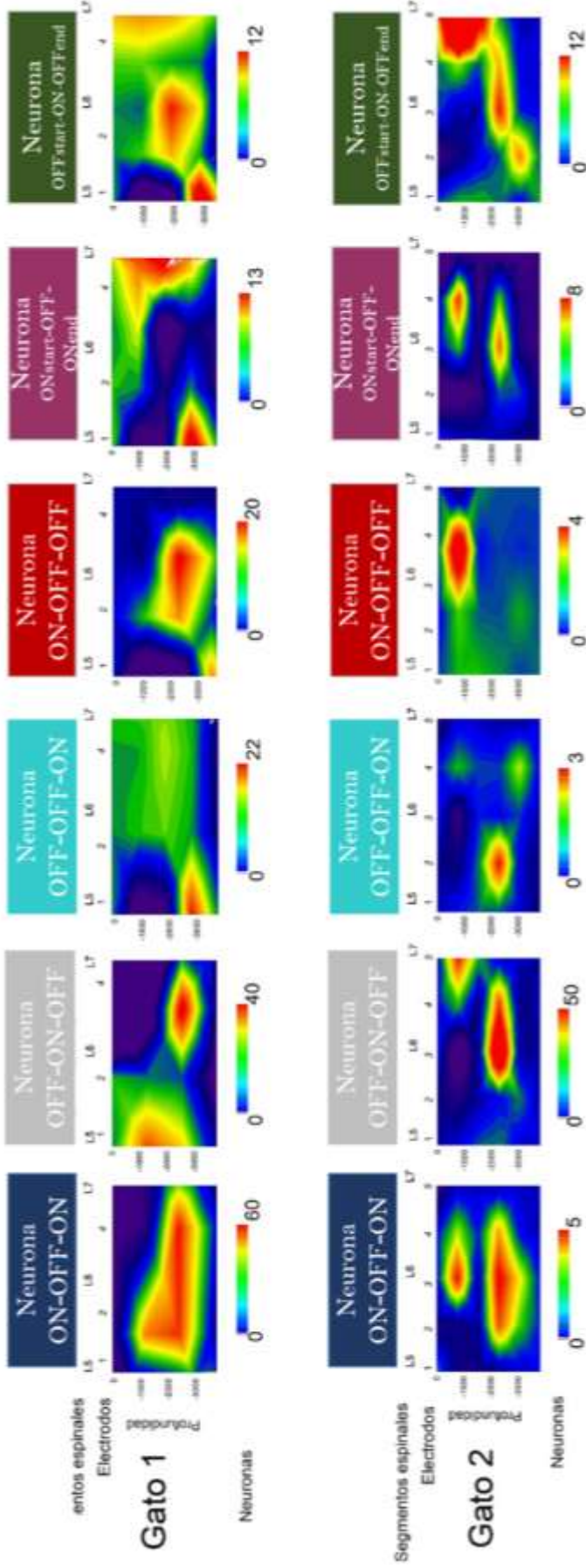


Figura 23. Mapas topográficos. Se muestran las incidencias para cada clase de neuronas respecto a su ubicación a lo largo y profundo de la médula espinal. En el gato 1, se muestran los tres electrodos que se pudo registrar, mientras que en el gato 2, se muestra registro en los cinco electrodos

## Distribucion de neuronas a lo largo de la médula espinal

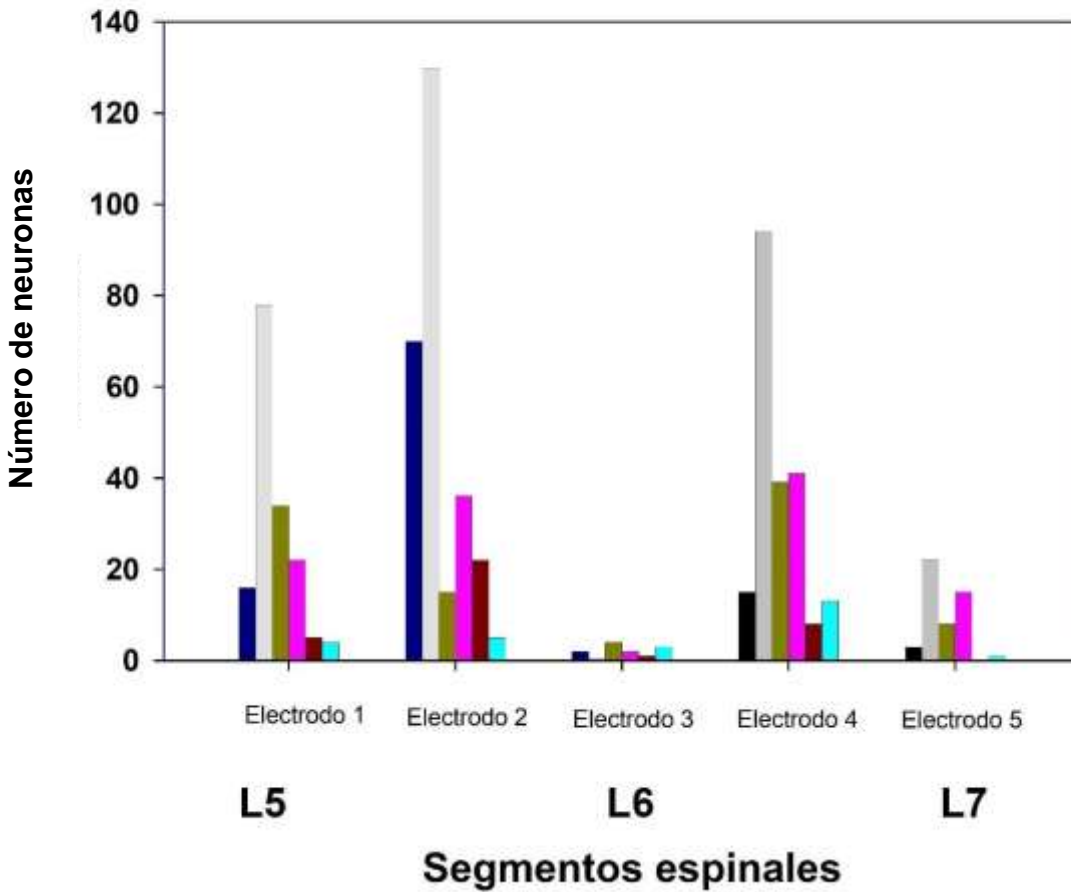
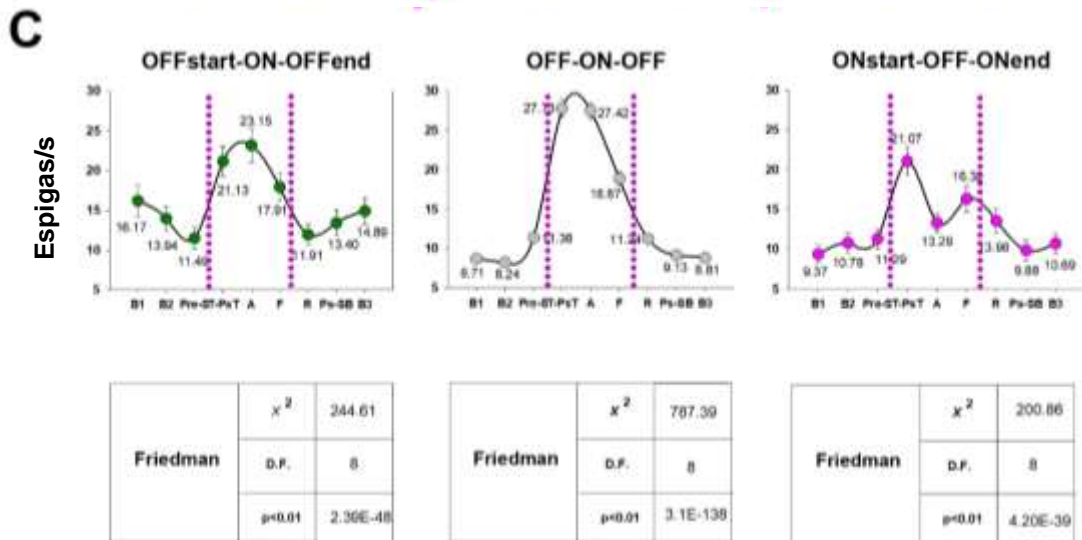
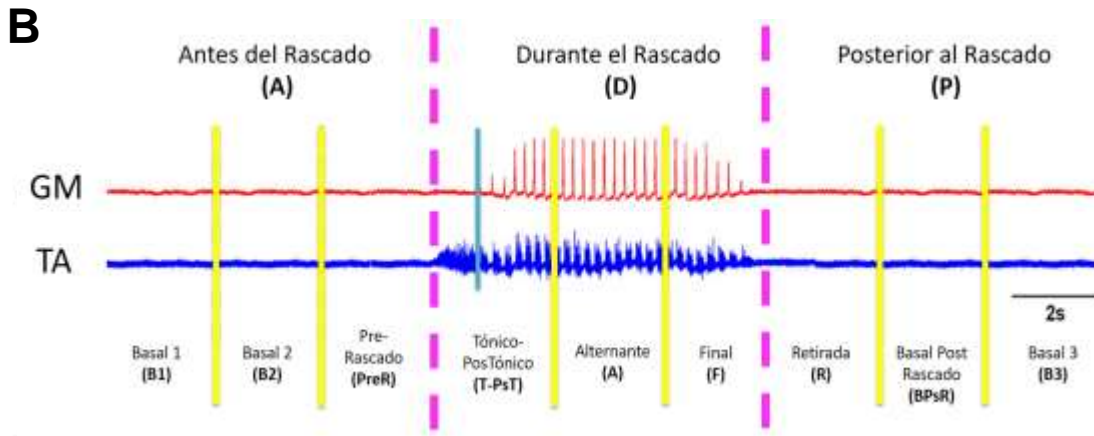
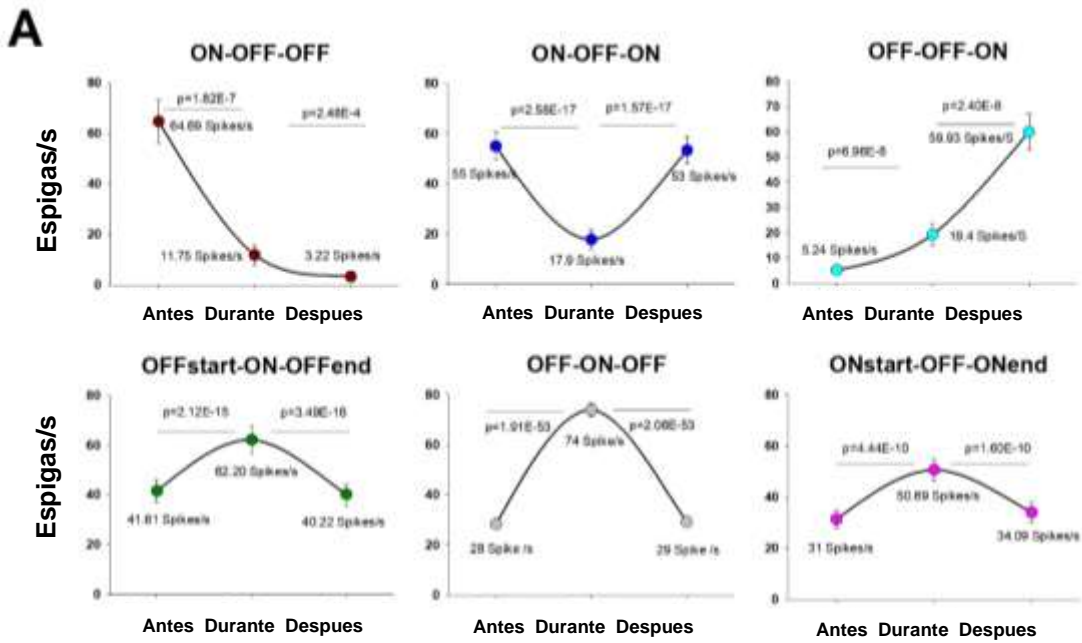


Figura 24. Distribución de neuronas a lo largo de la médula espinal. Se muestra las clases de neuronas que se encuentran a lo largo de la médula espinal. En esta gráfica se muestran todas las neuronas registradas en el gato 1 y 2.

Cabe mencionar que la distribución de estos seis tipos de interneuronas parece no estar homogéneamente distribuidas en cuanto a la profundidad (figura 23) y a la longitud (figura 24) de la médula espinal. Nótese que la mayor cantidad de registros obtenidos por el electrodo 1 se hicieron a una profundidad de 2500 a 3800  $\mu\text{m}$ , mientras que para el electrodo 2 se realizaron a una profundidad de 2300 a 3800  $\mu\text{m}$ . Finalmente, para el electrodo tres, la mayor cantidad de registros obtenidos se hicieron entre 3200 a 3580  $\mu\text{m}$ . Estos datos concuerdan con lo descrito previamente por Eccles et al en 1956, donde ellos describen que las interneuronas Ia y Ib se extienden desde 1500 $\mu\text{m}$  a 2600  $\mu\text{m}$ . Este resultado también es consistente con los datos de Dai et al en 2005 y de Jankowska et al. 2015. Estas profundidades de nuestros registros corresponden a las láminas V, VI y parte superior de la lámina VII. Es por ello que podemos sugerir que tenemos registros tanto de interneuronas IA y células de Ranshaw, como lo describe Carr et al. en 1998. Dado que hemos encontrado estos patrones de descarga, estas células podrían estar interconectadas con el generador central de patrones. Esto implicaría que las células de Ranshaw se podrían conectar con las interneuronas Ia y estas últimas, modular a las motoneuronas, generando un ciclo reverberante que controla la ritmicidad durante el rascado.

Los rasters y los histogramas (figura 22) confirman la existencia de seis clases de patrones de descarga durante un episodio de rascado, atribuibles a diferentes tipos de interneuronas. Una vez descrita la existencia de estas neuronas en los todos los electrodos, se procedió a comparar sus histogramas con respecto al inicio del rascado. Observamos un comportamiento peculiar en los experimentos. Al inicio del episodio de rascado las neuronas OFFs-ON-OFFe, disminuyen su actividad de descarga seguidas de las neuronas ON-OFFOFF, que, en lo contrario, incrementan su actividad de descarga. Por otra parte, las neuronas OFF-ON-OFF incrementan su descarga, inhibiendo a las ON-OFF-ON, lo que a su vez disminuye la inhibición de las neuronas ON-OFF-OFF. Esto favorece la activación de las neuronas ONs-OFF-ONe, seguidas del incremento de actividad de las OFF-ON-OFF, seguidas de las neuronas OFFs-ON-OFFe y OFF-OFF-ON. Finalmente, las neuronas OFF-ON-OFF disminuyen su descarga y se mantiene incrementada la actividad de las neuronas OFF-OFF-ON. Con base a la figura 26 se puede observar parcialmente un retraso de fase de sincronía en estos grupos neuronales

Figura 25. Comparación de tipos de descarga. **A)** Se observa la variación de descarga de las neuronas a lo largo del episodio de rascado. **B)** Fraccionamiento de duración del rascado,

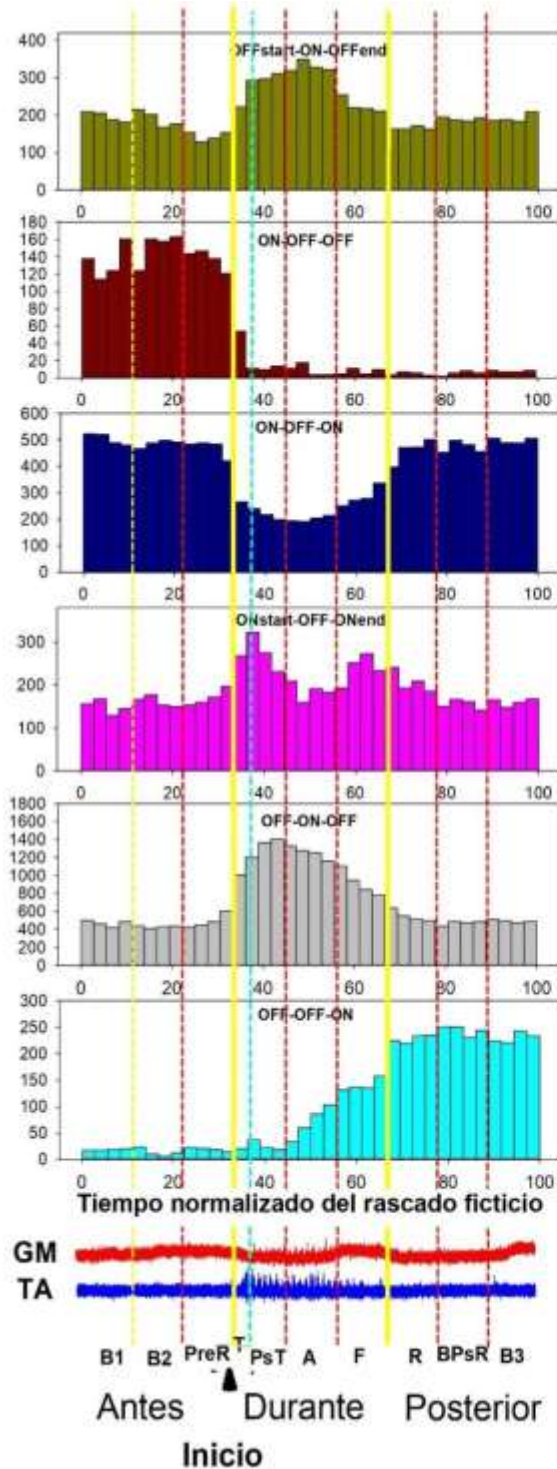


on la finalidad de observar a detalle la variación de descarga C) Comparación detallada de tipos de descarga OFF-ON-OFF, OFFs-ON-OFFe y ONs-OFF-OFFe

## Comparación de histogramas

### Exp. 327

Potenciales Unitarios Extracelulares (Espigas)



## Comparación de histogramas

### Exp. 336

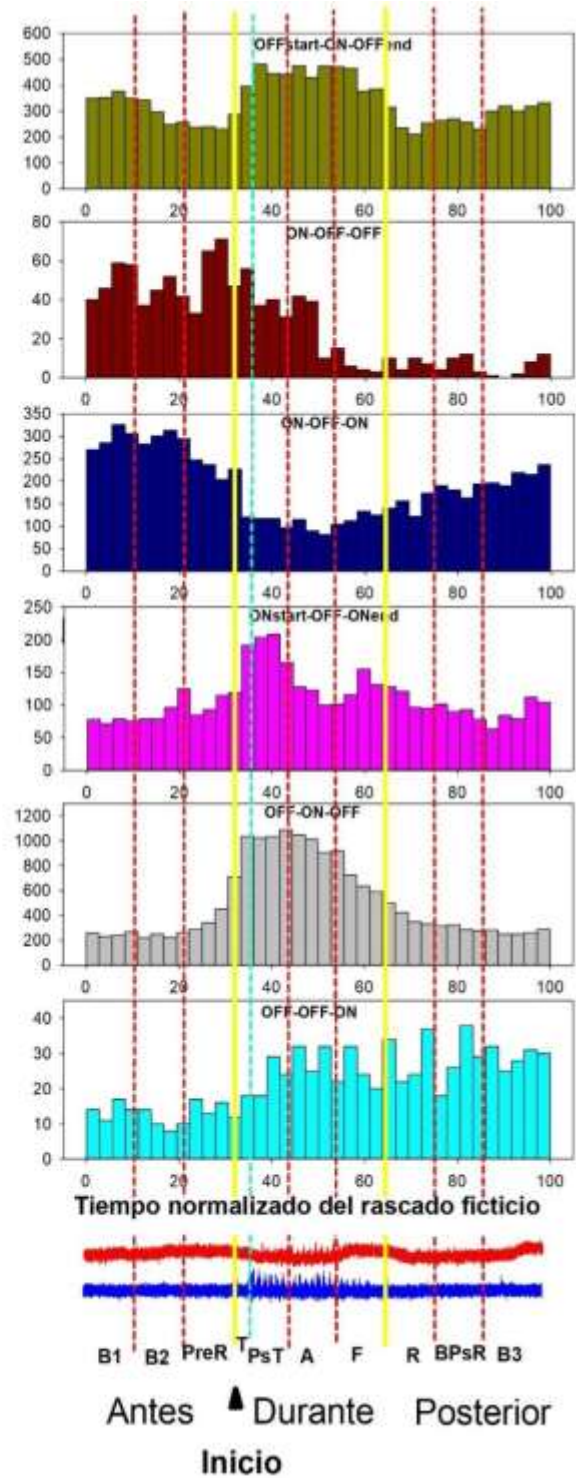


Figura 26. Comparación de histogramas de frecuencias de Potenciales Unitarios Extracelulares (Espigas), se puede observar la descarga de los diferentes tipos de interneuronas

en cada fase del rascado. B1(Actividad Basal 1), B2 (Actividad Basal 2), PreR (Actividad Previa al rascado), T (Fase Tónica del rascado), PdT (fase consecutiva a la Fase Tónica), A (Fase Alternante del rascado), F (Fase final del Rascado), R (Retirada), BPsR( Basal post rascado), B3 (Actividad Basal 3)

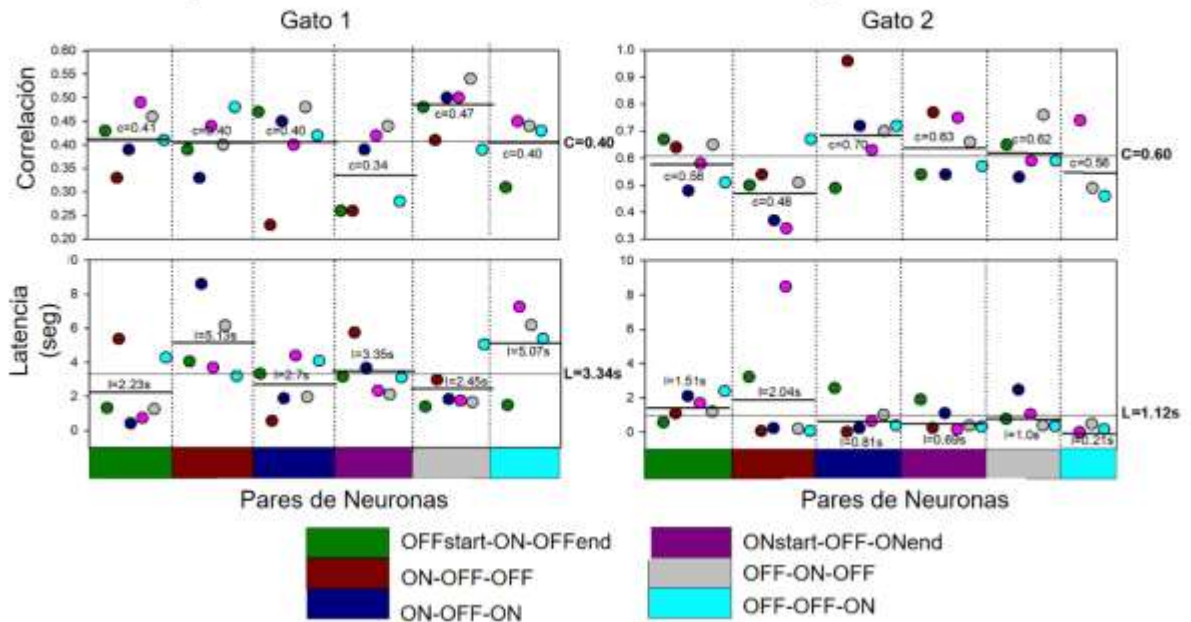
Una vez analizados los diferentes tipos de descarga, se procedió a analizar las tasas de disparo de estos grupos de interneuronas espinales Antes, Durante y Después del Rascado. Como se puede observar la figura 26, en la fase previa al rascado, las neuronas presentan una descarga basal.

Posteriormente, durante la fase de rascado existe una disminución en la descarga de las neuronas ON-OFF-ON (Azul) y ON-OFF-OFF (Cian), mientras que hay un incremento en la descarga de neuronas OFFs-ON-OFFe (verde), ONs-OFF-ONe (rosa) y OFF-ONOFF (gris) durante la fase de alterante (grupo 2 de interneuronas). Es por ello que se realizó una segmentación más detallada de las fases del rascado, con el fin de observar estos cambios transitorios en la descarga de las neuronas (Figura 25 C). La duración del registro se dividió en 9 partes iguales, como se muestra en la figura 24. Podemos ver que existe un incremento en la descarga cuando inicia el rascado, en el periodo T-PsT, y en el caso de las neuronas ONs-OFF-ONe, su mayor actividad corresponde a la fase Tónica. Simultáneamente realizamos la filtración, integración y rectificación de la señal. Con base en este procesamiento efectuamos la correlación cruzada y se obtuvo el retraso entre señales proveniente de las interneuronas analizadas, así como de las motoneuronas (Figura 27 A). Durante el registro se optó por subir y bajar los electrodos para poder tener un amplio espectro de registro. Cabe mencionar que cada electrodo se desplazó de forma independiente, explorando a lo largo del recorrido varias neuronas a diferentes profundidades. En todas las correlaciones cruzadas, el lag o retraso hace referencia a la separación temporal desde el inicio del registro hasta donde se encuentra la mayor correlación entre pares de neuronas. Este retraso se expresa en segundos. En todas las tablas de correlaciones cruzadas se muestra el promedio de retrasos y de correlaciones. Posteriormente se realizó un estudio detallado de correlaciones tomando en cuenta la ubicación por electrodo (por segmento espinal) y la clase de neurona que se correlacionaba (Figura 28A).

Asimismo, para observar la relación que tienen las diferentes clases de neuronas con respecto al rascado, se procedió a realizar la correlación cruzada respecto a cada motoneurona. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 28 B.

A

## Comparación de correlaciones y latencias



B

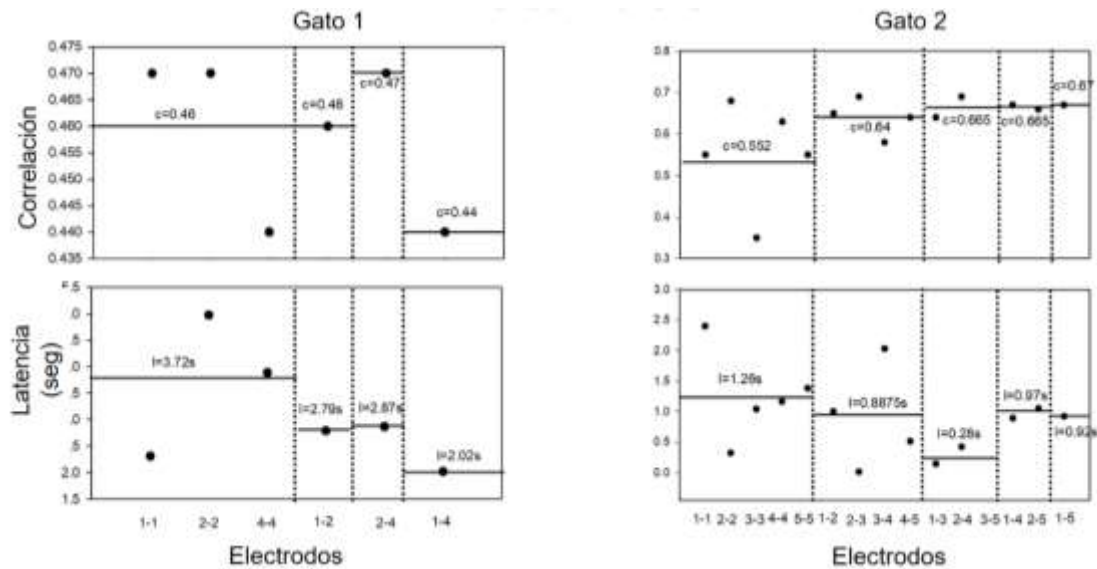
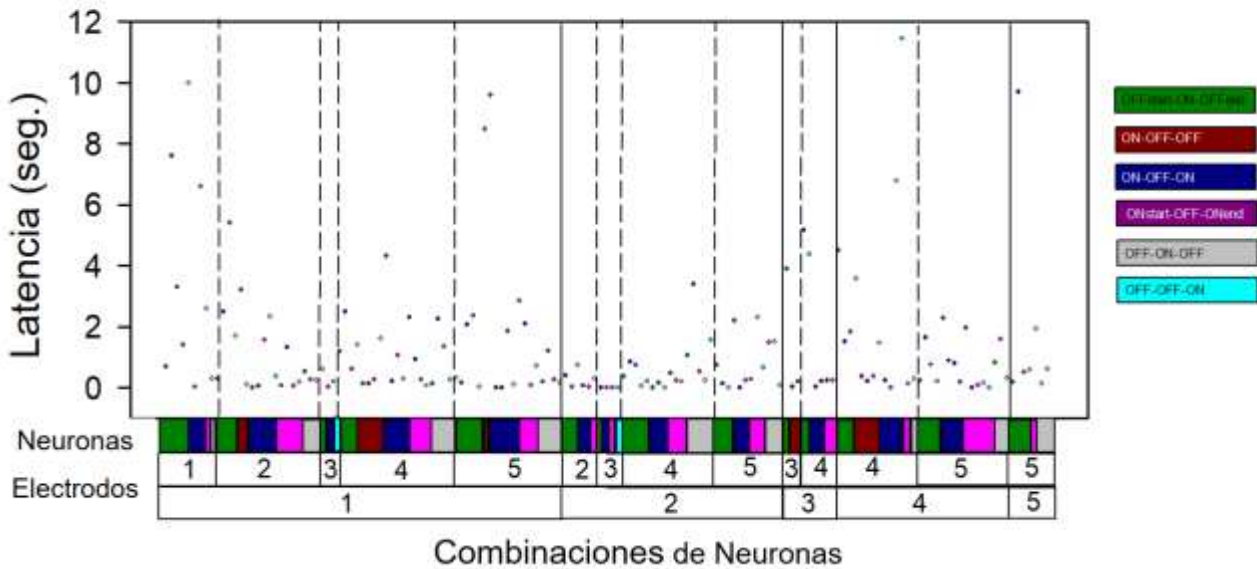


Figura 27. Correlación cruzada. A) Se muestra la correlación cruzada entre tipos de neuronas, independientemente de la ubicación en el electrodo registrado. B) Se muestran la correlación entre interneuronas entre electrodos, sin importar la clase de neurona.

**A**

## Latencias entre neuronas por electrodo



**B**

## Comparación de correlaciones y latencias entre interneuronas y motoneuronas

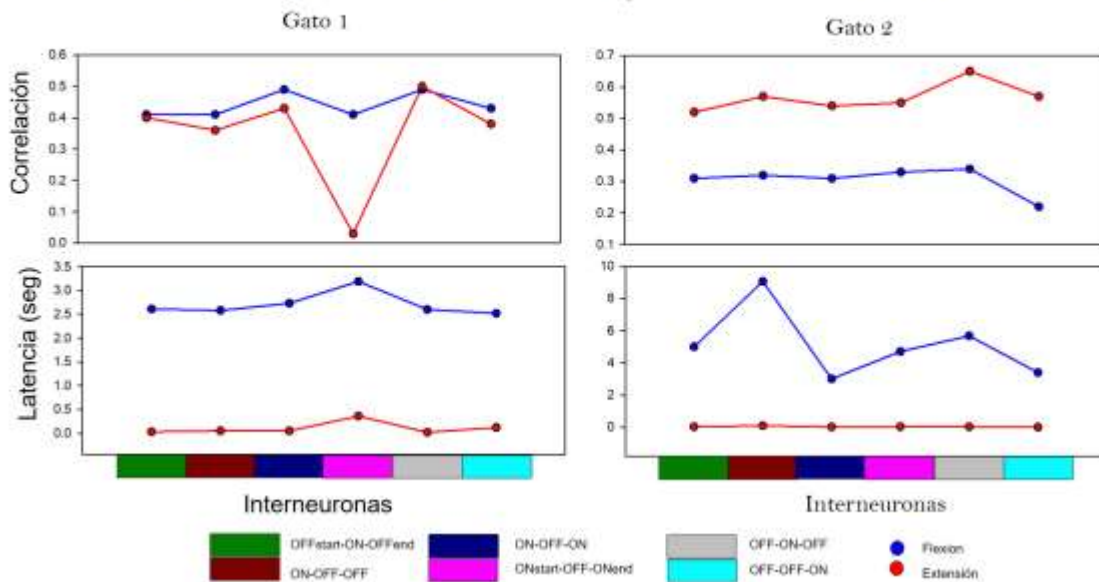


Figura 28. A) Correlación cruzada considerando el tipo de neurona y su ubicación en la medula espinal B) Correlación entre clases de neuronas respecto a las motoneuronas. Se puede observar el promedio de correlaciones, así como el promedio de latencias que presenta cada clase de interneuronas con respecto a cada motoneurona.

## 7. Discusión

Un enfoque importante de esta investigación fue el registro simultáneo de potenciales extracelulares unitarios mediante microelectrodos intraespinales, a lo largo de los segmentos L5-L7, durante la tarea motora ficticia del rascado. Con dicho enfoque, encontramos diversos tipos de descarga y distribución a lo largo de la médula espinal.

### 7.1 Descripción de patrones de descarga en las clases neuronales ON-OFF

Diversos trabajos han estudiado la existencia de patrones de descarga de interneuronas en la médula espinal durante la locomoción (Berkinblint et al, 1978, Buchanan J, y Grillner S. 1987, Pratt y Jordan, 1987, Deliagina y Feldman 1981, Dai et al, 2005) y el rascado (Berkowitz 2007, Jankowska 2007), así como los neurotransmisores involucrados para generar patrones rítmicos en diversas especies (Higashijima, 2004, Wahlstrom-Helegren 2019) incluyendo el gato (Bannatyne et al., 2003, Matsuyama et al., 2004b). Con base en estos antecedentes y nuestros resultados, podemos confirmar los resultados de Tapia et al en 2013 y Cuellar et al en 2018, de la existencia de neuronas ON-OFF y OFF-ON. Asimismo, con base a la figura 21, mostramos un incremento de nuevas clases de descarga en la médula espinal.

Se puede observar que las neuronas presentan una modulación en su frecuencia de descarga a lo largo del rascado (Imagen 25), lo que podría implicar un papel funcional para desarrollar dicha tarea motora. Cuando se normalizaron los registros y analizaron por segmentos de misma longitud, antes (A), durante (D) y posterior (P) a los rascados, se observó cómo el rascado afectaba la frecuencia de descarga de las interneuronas en las clases ON-OFF-ON (A:12.32±1.5 PA/s, D:3.57±0.6 PA/s, P:10.79±1.0 PA/s), OFF-OFF-ON (A:1.26±0.4 PA/s D:3.59±0.8PA/s P: 8.14±0.9PA/s), ON-OFF-OFF (A: 8.72±1.3 PA/s D:1.56±0.6 PA/s P:0.43±0.1). Se observó cómo dichas descargas son contundentemente diferentes entre sí generando un incremento en la clasificación (Figura 25 A).

Por otro lado, en los grupos OFF-ON-OFF (A:5.91±0.3 PA/s D:15.14±0.7PA/s P: 6.25±0.4PA/s), OFFstart-ON-OFFend (A:7.01±0.7 PA/s D:10.45±0.8PA/s P:6.9±0.7PA/s) y ONstart-OFF-ONend (A:7.61±0.9 PA/s D:11.46±1.1PA/s P:

$8.0 \pm 1.0 \text{ PA/s}$ ) realizamos un estudio más detallado por segmentos más pequeños con la finalidad de resaltar las diferencias en la descarga de interneuronas a lo largo de la cronología del rascado (22). En este sentido, descubrimos que al inicio y final del rascado las neuronas OFFstart-ON-OFFend son las primeras en modificar (disminución) su frecuencia de descarga en el periodo que nombramos Pre-rascado. Esto nos hace pensar que existe una posible inhibición por parte de otro grupo de neuronas, que previamente se haya incrementado o mantenido activado en momentos antes del rascado. Asimismo, el grupo de neuronas ONstart-OFF-ONend mostraron un incremento en la frecuencia de descarga en el periodo al que llamamos Tónico-PosTónico, (Figura 25 C), llegando a un máximo de descarga en el fin del periodo Tónico del rascado. Debido a esta relación, se podría asociar la descarga de estas neuronas con la activación de motoneuronas flexoras (Figura 25). Es decir, parecería que funcionarían como neuronas “gatilladoras” del rascado, que posteriormente, durante dicha tarea motora, son inhibidas por otro grupo de neuronas para desarrollar la porción alternante. Dentro de esta segmentación, podemos observar cómo la población de neuronas OFF-ON-OFF presenta su mayor frecuencia de descarga en el periodo PostTónico, y decae su descarga.

## **7.2 Distribución de las clases de neuronas en la médula espinal**

La distribución de todos los grupos de neuronas aquí descritos, se presenta a lo largo de la región lumbar L5 a L7 (Figura 24), lo cual coincide en ubicación con neuronas que presentan descargas descritas por Dai y cols. 2005 y con la ubicación de núcleos de células motoras descritos por Jankowska y col en 2015. Cabe mencionar que desconocemos los tipos de interneuronas registradas, ya que encontramos la existencia de estas descargas desde 800 hasta 3500  $\mu\text{m}$ , espacio suficiente para poder registrar interneuronas IN-Ia, IN-Ib, comisurales y Células de Renshaw (Brownstone 2008, Carr et al, 1998, Matsuyama et al., 2006). Sin embargo, realizando un promedio de profundidades, encontramos un cierto orden de profundidad donde las neuronas OFF-OFF-ON se encuentran a  $-1962 \mu\text{m}$ , ON-OFF-ON a  $-2160 \mu\text{m}$ , OFF-ON-OFF a  $-2240 \mu\text{m}$ , ONs-OFF-ONe a  $-2264 \mu\text{m}$ , OFFs-ON-OFFe a  $2322 \mu\text{m}$ , ON-OFF-OFF a  $-2537 \mu\text{m}$  (Figura 23). Estos resultados son consistentes con los reportados por Dai y cols. 2005.

Con base en esta distribución, podríamos suponer el orden de variación en la descarga de estos grupos neuronales en dirección dorsal-ventral, como se propone en el modelo de Miller y Scott en 1977 y por Mc Crea & Rybak 2008.

### **7.3 Generación de patrones de descarga de interneuronas**

Para fines prácticos de discusión, dividiremos en pares a los subtipos de neuronas que exhibieron descargas antagonistas (Grupo1: ON-OFF-ON/ON-OFF-ON, Grupo2: ONOFF-OFF/OFF-OFF-ON, Grupo3: ONs-OFF-ONe/OFFs-ON-OFFe).

El comportamiento del Grupo1 (figura 22) presenta una descarga similar a la descrita por Wisel en 1959 y Hubel en 1960, en la presencia de un punto luminoso sobre el campo visual. De manera similar, en el sistema motor, por Georgeopoulos y cols. 1981, donde se registró la actividad de la corteza motora y se observa un incremento en la descarga de las interneuronas durante el movimiento de la extremidad. El histograma de frecuencias presenta la misma forma de descarga que una neurona OFF-ON-OFF espinal, que posteriormente Tapia en 2013 y Cuellar 2018 describieron. En este sentido los estudios intracelulares han sugerido que dicha respuesta ON y OFF a nivel del encéfalo puede ser resultado de entradas excitatorias e inhibitorias en células simples (Borg-Graham et al, 1998). Por lo que el bloqueo de receptores GABA puede resultar en la conversión de células simples de la Formación Reticular en estructuras complejas (Sillito, 1975, Nelson et al. 1994), implicando una superposición entre excitación e inhibición. Así mismo, estudios de imagen de calcio en ratones Knock-in GAD67-GFP sugieren que neuronas GABAérgicas exhiben una débil selección que las neuronas no-GABAérgicas (Sohya et al, 2007), y considerando que la actividad de las neuronas inhibitorias tiene mayor actividad que las neuronas excitatorias (Swadlow, 1989, Azouz et al., 1997). Por lo anteriormente dicho, podemos suponer elementos funcionales similares que actúan en la médula espinal y que provocaran la variación en la frecuencia de descarga de estas interneuronas espinales.

Respecto al Grupo 2, observamos la existencia de una alta frecuencia de descarga de las interneuronas previas al inicio del rascado, la cual disminuye justo al inicio del rascado (fase tónica) y terminando el rascado no recobran su frecuencia de descarga inicial (ON-OFF-OFF). En el caso antagonista, previo al rascado, su frecuencia de descarga es mínima, justo

a la mitad del rascado incrementa la frecuencia de rascado, y terminado el mismo, llega a su máximo nivel de descarga (OFF-OFF-ON, figura 25 A).

Considerando que el discriminador de espigas Waveclus se basa en la morfología de los potenciales extracelulares de las neuronas, y que la morfología de dichos potenciales pudiera haber cambiado debido a una modulación provocada por el propio rascado, por retroalimentación entre motoneuronas y células de Ransaw (Miller y Scott, 1977, McCrea y Rybak, 2008), lo que sugiere que las neuronas ON-OFF-OFF y OFF-OFF-ON pudieran ser la segmentación de neuronas ON-OFF-ON clásicas. En este sentido, Semyanov y Kullmann en 2001, observaron que la morfología de las corrientes de los potenciales de acción se ve modificada cuando se activan los receptores a kainato, que también se encontraban incluso en los axones. En este sentido, los receptores axonales distales pueden conducir a una despolarización, que es suficiente para generar corrientes regenerativas de propagación en el propio axón. Este fenómeno puede ser la base de la intensa liberación de GABA provocada por bajas concentraciones de kainato. La existencia de estos receptores a kainato en la médula espinal fueron mostrados por primera vez por Li y col. en 1999 en las astas dorsales (laminas II y III de Rexed). Dichos receptores contribuyen a la transmisión sináptica entre fibras aferentes y neuronas de las astas dorsales. Podemos sugerir que existen mecanismos similares a mayores profundidades, donde se ubican las interneuronas que registramos, generando modulación en la descarga a lo largo del rascado.

El comportamiento del Grupo 3 muestra al inicio y final del rascado un incremento (ONstartOFF-ONend) o disminución (OFFstart-ON-OFFend) de descarga neuronal. Dicha actividad asemeja a la actividad de receptores de tipo fásico, realizada por receptores mecánicos en la piel (Corpúsculo de Pacini). Sin embargo, dicho comportamiento no corresponde a la activación de estos receptores, ya que es rascado ficticio. Por otra parte, Alford y Grillner en 1989, sugieren que los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> pueden ser modulados fásicamente en interneuronas de la médula espinal durante la locomoción ficticia en lampreas. En este sentido, observaron que la despolarización rápida puede provocar un solo pico en los axones, el cual fue seguido por una sola fase de post-hiperpolarización. Hasta el momento no se ha descrito un comportamiento similar en locomoción o rascado; sin embargo, sugerimos que puede ser mediante modulación fásica que se presenta este comportamiento, debido a la retroalimentación de las interneuronas

Asimismo, Shu, Hasenstaub y McCormick en 2003, mostraron que los circuitos corticales locales operan a través de un equilibrio proporcional de excitación e inhibición generadas a través de conexiones recurrentes locales. Mostraron que la operación de dichos circuitos puede generar actividad auto sostenible que puede activarse y desactivarse mediante entradas sinápticas. La actividad auto sostenible genera la capacidad de tener múltiples estados de actividad dentro de las redes recurrentes locales y de larga distancia. Que, en su forma más simple, es similar a un “flip-flop” (ON-OFF) de la red, la cual involucra a casi todas las neuronas. Ellos proponen que esta capacidad de generar periodos de actividad auto sostenibles proporciona un mecanismo computacionalmente poderoso mediante el cual las redes corticales pueden resolver una variedad de tareas. Estas modificaciones rápidas en la excitabilidad y la actividad son útiles para realizar un seguimiento de la información, como las posiciones de los ojos o de la cabeza, o para acoplar el mundo sensorial que cambia rápidamente a las respuestas motoras apropiadas.

#### **7.4 Análisis de correlaciones cruzadas**

La secuencia de covarianza cruzada (normalizada para dar valor 1 para trenes completamente correlacionados) se probó para determinar si existía correlación entre las secuencias de descarga de las neuronas obtenidas simultáneamente entre cada electro a lo largo de los segmentos L4-L5 de la médula espinal. Un procedimiento similar al descrito por Mezzarane y Kohn en 2001 en el reflejo H. De acuerdo con Brockwell y Davis (1991) la correlación cruzada que se obtiene a partir de secuencias experimentales -sin procesar- puede indicar correlación artefactual, incluso cuando las dos series de tiempo son independientes. Es por ello que cada secuencia se integró trapezoidalmente, se filtró y rectificó. Posteriormente, para el intervalo de confianza del 95% para la correlación cruzada, se determinó como  $\pm 1.96/\sqrt{N - |K|}$ . Las muestras de correlación cruzada fuera de los intervalos de confianza sugieren una correlación entre las dos series. Este análisis es similar al realizado en el reflejo H por Ceballos-Villegas y cols. en 2017; sin embargo, nuestro trabajo es novedoso en hacer correlaciones con neuronas intraespinales.

Las correlaciones cruzadas medias entre interneuronas mostraron una baja pero significativa correlación con un retraso aparentemente estocástico de forma general (Figura 28 A). Con base en esto, podríamos sugerir que las neuronas registradas no contribuyen a

generar una dirección de propagación de actividad neuronal rostro-caudal, como lo sugiere Buchanan en 1999 en el modelo de la lamprea en el nadado ficticio, o Cuellar y cols., 2009, en la onda viajera. Sin embargo, los diferentes tipos de correlaciones cruzadas de forma independiente, mostraron diferentes tiempos de latencias entre señales, empezando desde los 0 s. Esto podría sugerir una reverberación de actividad de las neuronas; es decir, una vez ya activados ciertas poblaciones de neuronas, se propaga la actividad rostro-caudal y retroalimenta al circuito de forma caudal rostral, favoreciendo el incremento en la correlación en tiempos diferentes a 0 s.

Por otro lado, las correlaciones observadas entre las diferentes clases de interneuronas y motoneuronas, muestran un menor retraso en las motoneuronas extensora con respecto a las motoneuronas flexoras. Esto podría implicar que la mayor correlación se realiza casi al inicio del registro; es decir, la actividad de la motoneurona extensora va como un seguidor en la descarga de interneuronas, mientras que la motoneurona flexora muestra una mayor variación en su correlación a lo largo del registro. Esto sugiere que, de acuerdo con las latencias, estas pueden tener un mayor incremento en la correlación, sin embargo, pueden presentar picos donde la correlación no es máxima pero si significativa. Esto nos estaría indicando que las motoneuronas flexoras servirían como un andamiaje para desarrollar el rascado. De ser cierto eso, si bloqueáramos la actividad de esta motoneurona, el rascado disminuiría o modificaría su actividad.

El fenómeno de retroalimentación aquí mencionado es un elemento importante para desarrollar la locomoción como lo muestran Grillner y Wallen en 1985 y 1987 en el modelo de la lamprea. En dicho modelo, las motoneuronas exhiben oscilaciones de potencial de membrana en presencia de NMDA y tetrodotoxina, y estas variaciones afectan también a las interneuronas. Asimismo, Buchanan 1999, muestran interacciones de retroalimentación a través de la estimulación antidrómica de raíces ventrales, estimulando a las células nerviosas ubicadas en el mismo segmento ipsilateral de la médula espinal de la lamprea. Por otra parte, Saltiel et al, en 2015, mostraron la sinergia temporal de secuencias motoras y tipográfica en la médula espinal de la rana. En particular, mostraron que la locomoción consiste en una secuencia de activaciones sinérgicas, las cuales están relacionadas con NMDA. En este sentido, Saltiel et al, en 2015, distinguieron siete segmentos en la locomoción, los cuales se retroalimentan para desarrollar cada ciclo. Con la comparación de la secuencia de activación sinérgica, se sugiere que la salida locomotora se logra mediante

una onda viajera rostrocaudal en un modelo de dos capas. Nuestros resultados serían consistentes con esta retroalimentación propuesta por Saltiel en 2015 y con el modelo propuesto por Kato et al en 2013, donde se muestra que la onda viajera es resultado de impulsos propagados tanto rostral-caudal como caudal-rostral.

## **7.5 Propuesta de conectoma y generador central de patrones GCP**

Con base en las latencias y correlaciones mostradas en las figuras 25, 27 y 28 podemos construir un circuito donde las interneuronas se conectan para generar un circuito reverberante como lo expusimos en el apartado anterior. Este circuito muestra el flujo de impulsos nerviosos de entre grupos neuronales a lo largo y profundo de la médula espinal como se muestra en las figuras 29 y 30. A diferencia de Borisyyuk et al. 2011, donde ellos realizaron su conectoma con base a conexiones físicas teñidas por medio de neurobiotina, nuestro modelo de conectoma, se basa en el registro eléctrico funcional intraespinal. Medimos la correlación entre cada neurona, y posteriormente, con base a sus latencias y grado de correlación, unimos estos grupos poblacionales, obteniendo un trazado más pulcro y fácil de seguir en la trayectoria de la actividad neuronal. Para ello tomamos en cuenta el modelo desarrollado por Kato et col en 2013.

En dichos circuitos, cada círculo representa una clase de interneuronas que corresponden al código de colores antes mencionado y los cuales son proporcionales al tamaño de su población. En este sentido, podemos observar que las neuronas ON-OFF-ON (Azul) son las más superficiales, y se encontrarían en regiones de transición entre láminas sensoriales y láminas integradoras. Asimismo, también se puede observar que las neuronas más abundantes son las OFF-ON-OFF (Blancas) y OFFstart-ON-OFFend (Verdes) seguidas por las ON-OFF-ON (Azules).

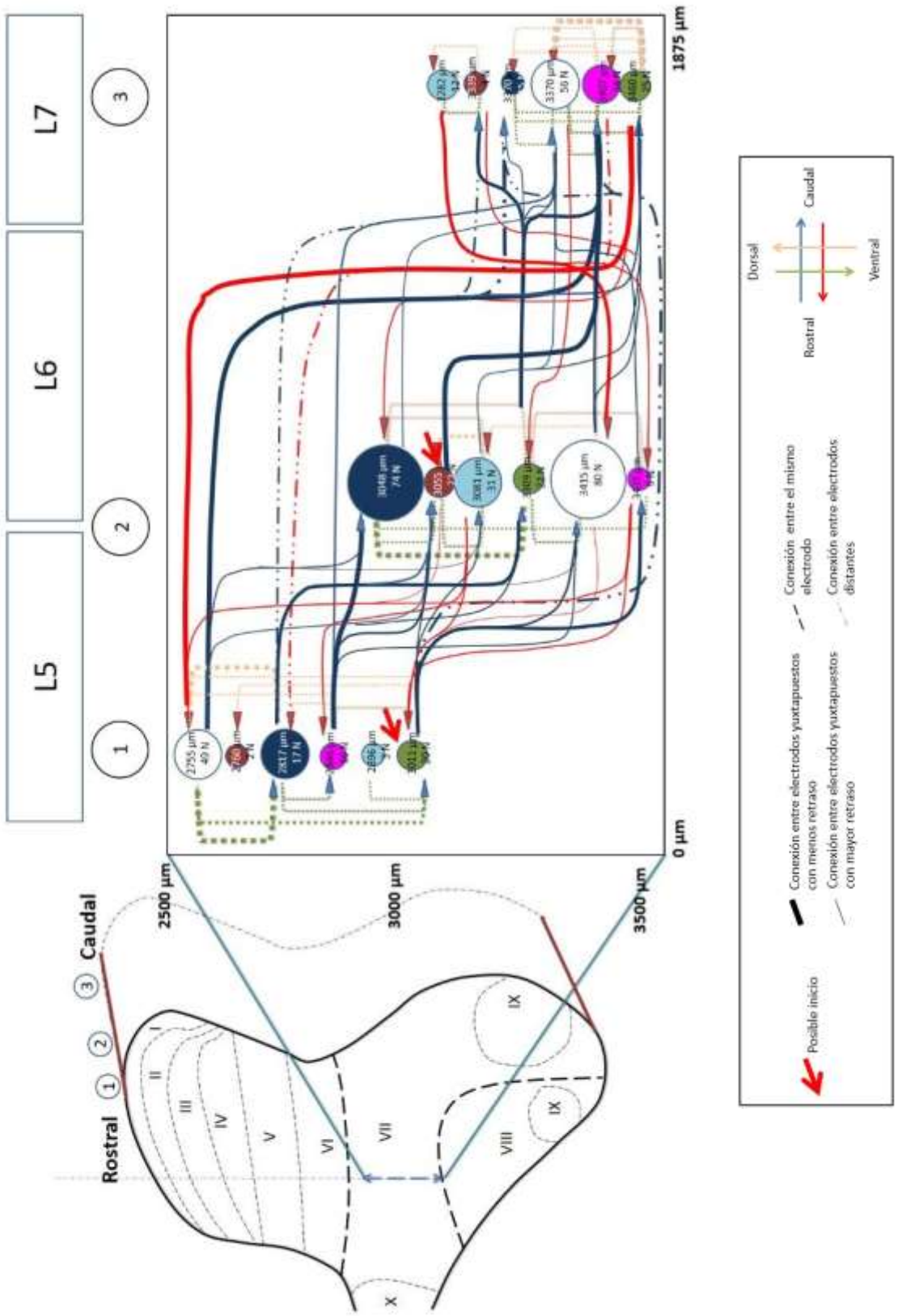


Figura 29. Conectoma Gato1. Se puede observar el mapa topográfico de incidencia y conexiones posibles entre núcleos neuronales, conectoma en la región lumbar de L4 a L6 durante la tarea motora del rascado ficticio

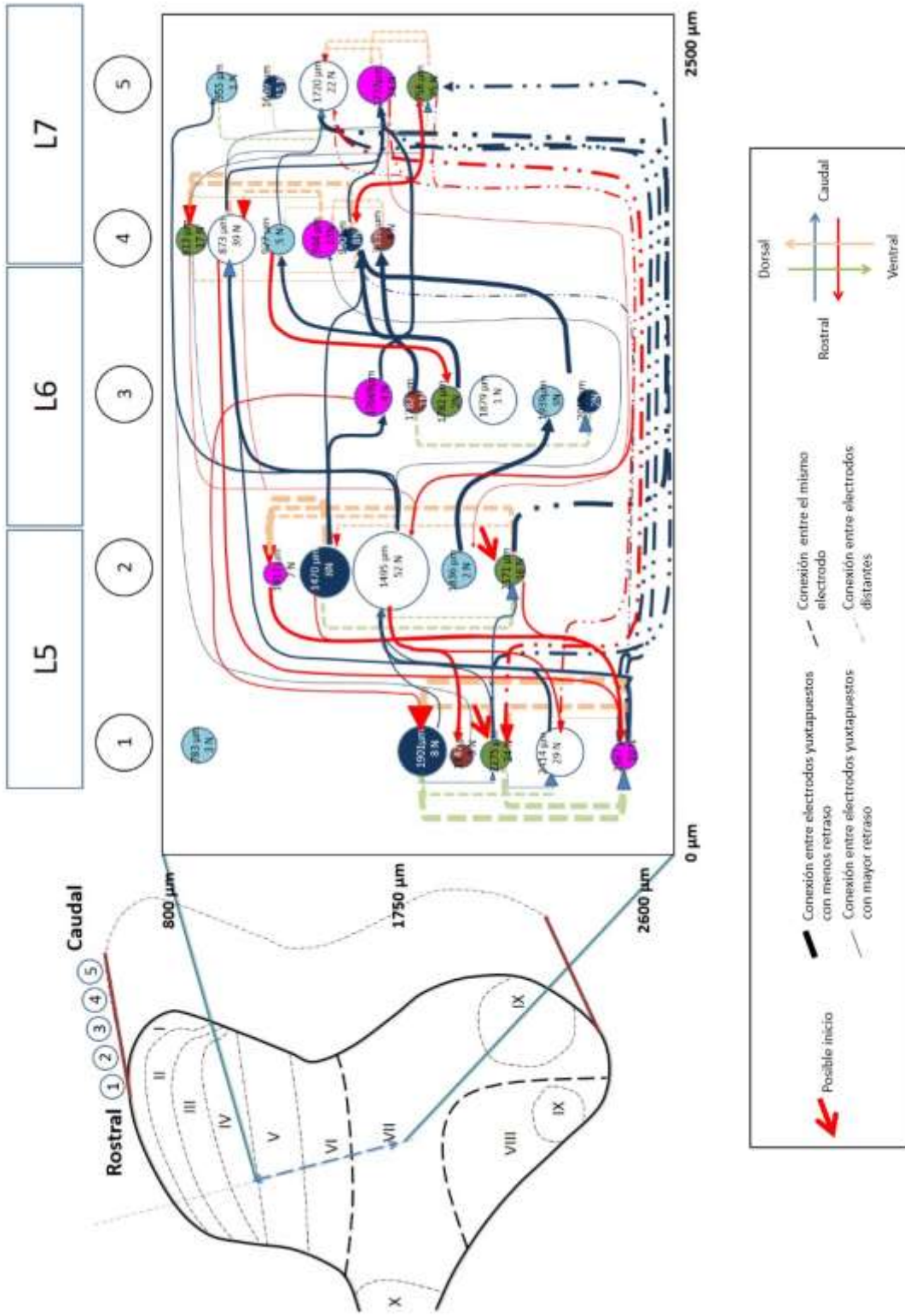


Figura 30. Conectoma Gato 2. Se puede observar el mapa topográfico de incidencia y conexiones posibles entre núcleos neuronal la región lumbar de L4 a L6 durante la tarea motora del rascado ficticio, se puede observar los cinco microelectrodos de región lumbar

Por otro lado, McCrea y Rybak en 2008, proponen la arquitectura del generador central de patrones para la locomoción. En este sentido, lo hacen mediante modelado matemático y consideran que este generador debe de estar formado por tres niveles, generador de ritmo, formador de patrones y salida motora. Con base en este modelo, además de considerar el trabajo realizado por Cuellar et al en 2018, tomamos la información de las figuras 25, 26 27 y 28 para proponer un modelo de arreglo. Dicho modelo exhibe las poblaciones neuronales que se conectan y se modulan para generar la tarea del rascado. En la figura 26, se muestra que tipo de neurona incrementa su descarga durante el rascado ficticio. Por lo que se puede observar que existen grupos neuronales que están activos durante la fase previa y después del rascado. En este sentido presentan una actividad de tipo tónico, que inhibe la activación de motoneuronas (Figuras 25 y 26, Neuronas OFFstart-ON-OFFend). Esta inhibición se elimina cuando se presenta un estímulo adecuado sobre la piel para generar el rascado, o por inhibición espontánea, por activación de otras vías sobre las mismas neuronas OFFstartON-OFFend. Esta inhibición de neuronas, permitiría un incremento de actividad de neuronas OFF-ON-OFF, que a su vez inhibirían a las neuronas ON-OFF-ON, afectando la estabilidad del circuito y permitiendo la generación del ritmo. Ello podría ocurrir por activación de neuronas ONstart-OFF-ONend, las cuales, se verían inhibidas por la activación de neuronas OFF-OFF-ON.

Con base en nuestros resultados experimentales y la figura 26, proponemos un modelo de generador central de patrones más detallado, el cual sintetiza todas vías de comunicación entre los grupos neuronales (Figura 32). Es una figura adimensional, pero que tiene su ubicación temporal en la variación de la descarga neuronal.

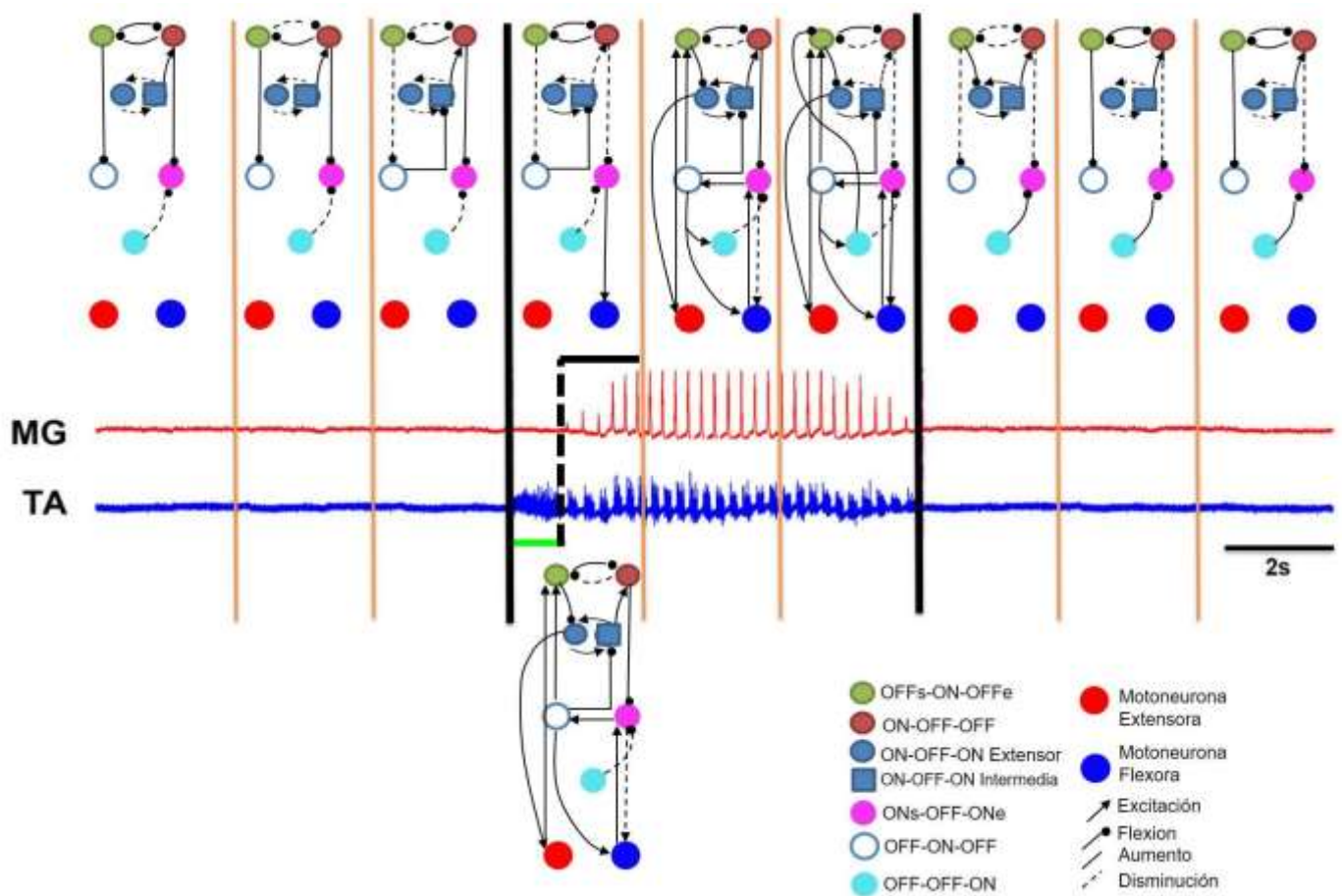


Figura 31. Activación secuencial de poblaciones neuronales durante el rascado ficticio. Se puede observar la actividad neuronal en cada fase del rascado, en este sentido la activación de grupos neuronales (OFFs-ON-OFFe) permite que las motoneuronas no expresen algún tipo de descarga. Esta es una representación secuencial de la actividad de las diferentes clases de neuronas ON-OFF tomando en cuenta trabajos de McCrea & Ribak 2008 y Cuellar et al 2018. En este sentido cada esfera de color representa una población neuronal, no neuronas aisladas. La alternancia se genera gracias al circuito reverberante de inhibición y activación principalmente de neuronas OFFs -ONOFFe, ON-OFF-ON, OFF-ON-OFF y ONs-OFF-ONe.

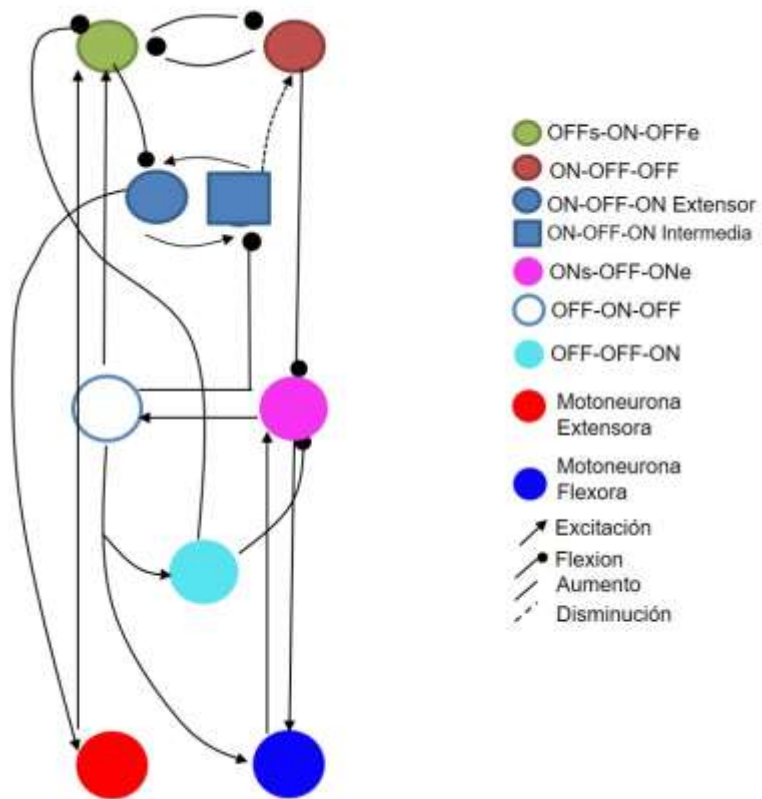


Figura 32. Propuesta de generador central de patrones para el rascado. Se ilustra a grupos de neuronas que generan el rascado en el gato. Asimismo, todas las vías posibles que comunican dichos grupos neuronales, para entender de manera secuencial de activación e inhibición.

## 8. Conclusiones y perspectivas

En esta tesis se ha mostrado que las neuronas de las clases ON-OFF y OFF-ON espinales no se encuentran homogéneamente distribuidas rostro-caudalmente en los segmentos L5 a L7. Sin embargo, si presentan un retraso de fase de sincronía similar entre pares de neuronas de la misma clase.

Por otra parte, este estudio incrementa la cantidad de clases de neuronas, de dos a seis tipos, estos incluyen a: ON-OFF-ON, OFF-ON-OFF, ON-OFF-OFF, OFF-OFF-ON, ONstart-OFF-ONend y OFFstart-ON-OFFend, las cuales podrían estar implicadas en el generador central de patrones para desarrollar el rascado.

Finalmente, dada la naturaleza del registro, no es posible mostrar la propagación única rostro caudal de actividad eléctrica, sin embargo, gracias a las correlaciones cruzadas, se pudo encontrar un circuito de retroalimentación de impulsos neuronales a lo largo y profundo de la médula espinal, lo que permite un mayor procesamiento de los impulsos nerviosos. En esto podría estar implícita la onda viajera en la médula espinal lumbar en el gato durante el rascado ficticio.

Los patrones de disparo de estas neuronas asemejan a “interruptores” o “puertas” que encienden o apagan la actividad de disparo eléctrico. En este sentido sugerimos que podrían ayudar a desarrollar nuevos modelos de computación neuronal para el generador central de patrones y poder replicar la tarea motora del rascado.

## 9. Participaciones en congresos

**Gutiérrez-Ojeda J**, Hernández LF, De la Torre Valdovinos B, Huidobro N, Manjarrez E, **Internal-switches of a central pattern generator for scratching in the cat**, Global Connectome Society for Neuroscience, Enero 11-13 202, Evento Virtual, Poster.

# 10. Bibliografía

- Alford, S., Christenson, J., y Grillner, S. (1991). *Modulación Fásica Presináptica GABAA y GABAB Mediada por el Receptor en Axones de Interneuronas de Motor Espinal*. *European Journal of Neuroscience*, 3 (2), 107-117. doi: 10.1111 / j.1460-9568.1991.tb00071.x
- Alvarez, FJ, & Fyffe, RE (1999). The continuing case for the Renshaw cell. *J Physiol* 584, doi.org/10.1113/jphysiol.2007.136200
- Aoki, M., & Mori, S. (1981). *Locomotion elicited by pinna stimulation in the acute precollicularpost- mammillary decerebrate cat*. *Brain Research*, 214(2), 424-428. doi:10.1016/00068993(81)91206-3
- Azouz R, Gray CM, Nowak LG, McCormick DA (1997) Physiological properties of inhibitory interneurons in cat striate cortex. *Cereb Cortex* 7:534 -545.
- Bannatyne, B.A., Edgley, S.A., Hammar, I., Jankowska, E., Maxwell, D.J., 2003. Networks of inhibitory and excitatory commissural interneurons mediating crossed reticulospinal actions. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2273-2284.
- Bannatyne BA, Liu TT, Hammar I, et al. (2009) Excitatory and inhibitory intermediate zone interneurons in pathways from feline group I and II afferents: differences in axonal projections and input. *J Physiol (Lond)* 587, 379-399.
- Berkinblit, M., Deliagina, T., Feldman, A., Gelfand, I., & Orlovsky, G. (1978a). Generation of scratching. I. Activity of. *J Neurophysiol*, 41:1040-1057.
- Berkinblit, M. B., Deliagina, T. G., Feldman, A. G., Gelfand, I. M., & Orlovsky, G. N. (1978b). Generation of scratching. II. Nonregular regimes of generation. *Journal of Neurophysiology*, 41(4), 1058-1069. doi:10.1152/jn.1978.41.4.1058
- Borg-Graham LJ, Monier C, Frégnac Y (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393:369 -373.
- Borisyuk, R., Kalam al Azad, A., Conte, D., Roberts., A., Soffe, S., (2011) Modeling the connectome of a simple spinal cord, *Frontiers in neuroninformatics*, doi: 10.3389/fninf.2011.00020
- Boron, W., Bulpaep, E, (2017) *Fisiología Médica*, Elsevier, España
- BrockwellPJ., Davis RA (1991) *Times series: Theory and methods* 2<sup>nd</sup> ed. Springer
- Brown, T.G (1914) On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system, *Journal of physiology*, 48 (1), 18-46

- Brownstone, R. M. (2008). Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis. *Brain research reviews*, 13-21.
- Buchanan, J., & Grillner, S. (1987). Newly identified “glutamate interneurons” and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science*, 236(4799), 312–314.  
doi:10.1126/science.3563512
- Buchanan, J. (1999) The roles of spinal interneurons and motoneurons in the lamprey locomotor network, *Progress in Brain Research*. Vol 132, Elsevier Science
- Buck, John R., Michael M. Daniel, and Andrew C. Singer. (2002). *Computer Explorations in Signals and Systems Using MATLAB®*. 2nd Edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall,
- Carr, PA, Alvarez, FJ, Leman, EA & Fyffe, RE (1998). Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *Neuroreport* 9, 2657–2661. Cuellar. (January 21, 2009). Propagation of Sinusoidal Electrical Waves along the Spinal. *The Journal of Neuroscience*, 29(3):798 – 810.
- Ceballos-Villegas M. Saldaña Mena J.J., (2017) The complexity of H-wave Amplitude Fluctuations and their bilateral Cross-covariance are modified according to the previous fitness history of young subjects under track training *Front. Hum. Neurosci.* [doi.org/10.3389/fnhum.2017.00530](https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00530)
- Cuellar C., Tapia J., Quevedo J., Linares. P., Martinez L., Manjarrez E., (2009) Propagation of sinusoidal Waves along the Spinal Cord during a Fictive Motor Task., *Journal of Neuroscience*,
- Cuellar. (2018). The spinal neurons exhibit an ON-OFF and OFF-ON Firing Activity Around the Onset of Fictive Scratching Episodes in the Cat. *Frontier in Cellular Neuroscience*.
- Dai X., Noga B., Douglas J.R., Jordan M., (2005) localization of spinal Neuron Activated During Locomotion Using the C-fos immunohistochemical Method, *J Neurophysiol* 93: 3442-3452, 2005
- K.R. Delaney, A. Gelperin, M.S. Fee, J.A. Flores, R. Gervais, D.W. Tank, D. Kleinfeld Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (1994), pp. 669-673
- Deliagina TG, F. A. (1975). Modulation of activity of Renshaw cells during scratching. *Neurophysiology*, 10: 209-211.
- Deliagina TG, F. A. (1981). Activity of Renshaw Cells During Fictive Scratch Reflex in the Cat. *Ex brain* 42:108-115

- Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N., and Pavlova, G. A. (1983). The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp. Brain Res.* 53, 81–90. doi: 10.1007/BF00239400
- Dubin, M.W. et Cleland, B.G. (1977) Organization of visual inputs to interneurons of the lateral geniculate nucleus of the cat. <https://doi.org/10.1152/jn.1977.40.2.410>
- Eccles, J.C. Fatt, P. Landgren, S., Winsbury, G.J., (1954) Spinal Cord potential generated by volleys in the large muscle afferents. *J Physiol*
- Freeman (1978), Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex *Electroenceph. Clin. Neurophysiol*, 44 pp. 586-605
- Georgopoulos, A.P. Kalaska, J. F., Caminiti, R., Massey, J., (1982) On The relations between the directions of two-Dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex, Vol
- Grillner, S. and Wallén, P. (1985) The ionic mechanisms underlying NMDA receptor induced, TTX-resistant membrane potential oscillations in lamprey neurones active during locomotion. *Neurosci. Lett.*, 60: 289-294.
- Hagmann, P. (2005). From Diffusion MRI to Brain Connectomics. PhD Thesis, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne.
- Hagmann, P., L. Cammoun, X. Gigandet, et al. (2008). Mapping the structural core of human cerebral cortex. *PLoS Biol.* 6: e159.
- Hartline. (1938). The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *Am. J. Physiol.*, 121: 400–415.
- Higashijima, S.-I., Schaefer, M., & Fetcho, J. R. (2004). *Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. The Journal of Comparative Neurology*, 480(1), 19–37. doi:10.1002/cne.20279
- Horwitz, B. (2003) The elusive concept of brain connectivity. *Neuroimage* 19: 466-470.
- Hubel, D. (1960) Single unit activity in the lateral geniculate body and optic tract of unrestrained cats, *J.Physiol.* 150, pp 91-104
- Ito K., (2010) Technical and organizational considerations for the long-term maintenance and developed of digital brain atlases and web-based databases. *Front. Syst. Neurosic.*
- Jankowska, E. (2007). Spinal interneural networks in the cat: elementary components. *Brain Research Reviews*, 46-55.
- Jankowska, E. (2015) On the distribution of information from muscle spindles in the spinal cord; how much does it depend on random factors? *J. Anat.* 227 pp 184-193

- Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell, Principles of Neural Science (Elsevier, New York, 1991), 3rd ed
- Kandel, E. R. (2013). *Principles of neural science*. (McGraw-Hill, Ed.) New York.
- Kato H, Cuellar CA, Delgado-Lezama R, Rudomin P, Jimenez-Estrada I, Manjarrez E, Mirasso CR . Modeling zero-lag synchronization of dorsal horn neurons during the traveling of electrical waves in the cat spinal cord. **Physiol. Rep.** 1(2): e00021., doi: 10.1002/phy2.21. ISSN 2051817X. (2013) 1-14. A Journal from the American Physiological Society and the Physiological Society UK. Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved
- Kiehn O: (2006,) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306.
- Kopell, N. ., Ermentrout, G.B. Symmetry and phase locking in chains of weakly coupled oscillators *Comm. Pure Appl. Math*, 39 (1986), pp. 623-660
- KUFFLER, S. W. (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.* 16: 47-68,.
- Kuhta y Smith (1990). Scratch responses in normal Hindlimb Kinematics and Muscle Synergies . *Journal of Neurophysiology* .
- Kuramoto Chemical Oscillations, Waves and Turbulence, Springer Verlag, New York (1984)
- Lam, L.B. Cohen, M. Wachowiak, M.R. Zochowski Odors elicit three different oscillations in the turtle olfactory bulb *J. Neurosci*, 20 (2000), pp. 749-762
- Li, P., Wilding, TJ, Kim, SJ, Calejesan, AA, Huettner, JE y Zhuo, M. (1999). *Transmisión sináptica sensorial mediada por receptor de kainato en la médula espinal de mamíferos.* *Nature*, 397 (6715), 161-164. doi: 10.1038 / 16469
- Marder, E., Bucher, D. (2001) Central patten generators and the control of rythmic movements, *Current Biology*.
- Martínez, J., Pedreira, C., Ison, MJ y Quian Quiroga, R. (2009). *Simulación realista de grabaciones extracelulares.* *Journal of Neuroscience Methods*, 184 (2), 285-293. doi: 10.1016 / j.jneumeth.2009.08.017
- Matsuyama, K., Nakajima, K., Mori, F., Aoki, M., Mori, S., 2004b. Lumbar commissural interneurons with reticulospinal inputs in the cat: morphology and discharge patterns during fictive locomotion. *J. Comp. Neurol.* 474, 546-561
- Matsuyama, K., Kobayashi, S., Aoki, M., 2006. Projection patterns of lamina VIII commissural neurons in the lumbar spinal cord of the adult cat: an anterograde neural tracing study. *Neuroscience* 140, 203-218.

- Mc Clure, R. D. (1973). *Cat anatomy: an atlas, text and dissection guide*. Lea & Febiger.
- McCrea, D. A., & Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Research Reviews*, 57(1), 134–146.  
doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.006
- Mezzarane R. Kohn. Bilateral Soleus H-Reflexes in humans elicited by simultaneous trains stimuli: Symmetry, Variability and covariance.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00129.2001>
- Miller, s. and Scott, PD (1977) The spinal locomotor generator. *Experimental Brain Research*, 30: 387-403
- Nelson S, Toth L, Sheth B, Sur M (1994) Orientation selectivity of cortical neurons during intracellular blockade of inhibition. *Science* 265:774 –777.
- Pikovsky, A. Rosenblum, M, and Kurths, J., (2001) *Synchronization*, Cambridge University Press, Cambridge,
- Pratt, A. et Jordan, M., (1987) Ia inhibitory Interneurons and Renshaw cell as contributors to the spinal mechanisms of fictive locomotion, *Journal of Neurophysiology*
- Precht, L.B. Cohen, P.P. Mitra, B. Pesaran, D. Kleinfeld Visual stimuli induce waves of electrical activity in turtle cortex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (1997), pp. 76217626
- Precht, T.H. Bullock, D. Kleinfeld Direct evidence for local oscillatory current sources and intracortical phase gradients in turtle visual cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000), pp. 877-882
- Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., & Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Computation*, 16(8), 1661–1687. doi:10.1162/089976604774201631
- Ribary, A. Ioannides, K. Singh, R. Hasson, J. Bolton, F. Lado, A. Mogilner, R. Llinas Magnetic field tomography of coherent thalamocortical 40-Hz oscillations in humans *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991), pp. 11037-11041
- Roelfsema, A.K. Engel, P. Konig, W. Singer Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas *Nature*, 385 (1997), pp. 157-161
- Rosales, L. F. (2004), La función de correlación cruzada como elemento de diagnóstico para los modelos ARMA(p,q), Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Escuela de Estadística.
- Rose PK, S. S. (2003). Sensory-motor control: a long-awaited behavioral correlate of presynaptic inhibition. *Nature Neuroscience*, 1243–5.

- Rybak, IA, Stecina, K, Shevtsova, NA & McCrea, DA (2006b). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol* **577**, 641–658.
- Saltiel, P., d'Avella, A., Wyler-Duda, K., & Bizzi, E. (2015). Synergy temporal sequences and topography in the spinal cord: evidence for a traveling wave in frog locomotion. *Brain Structure and Function*, *221*(8), 3869–3890. doi:10.1007/s00429-015-1133-5
- Semyanov A., Kullmann D., (2001) Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons, *Nature*
- Sherrington. (1910). Notes on the scratch-reflex of the cat. *Quart J Exp Physiol*, *3*:213-220.
- Shünke. (2007). *Prometheus, texto y atlas de anatomía, Cabeza y neuroanatomía*. China: Panamericana.
- Shu, Y., Hasenstaub, A., & McCormick, D. A. (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, *423*(6937), 288–293. doi:10.1038/nature01616
- Siegel, A. S. (2015). *Essential Neuroscience* (3<sup>o</sup> ed.). Wolter Kluwer.
- Sillito AM (1975) The contribution of inhibitory mechanisms to the receptive field properties of neurones in the striate cortex of the cat. *J Physiol* *250*:305–329
- Snell, R. (2003). *Neuroanatomía clínica, Medica Panamericana*. China : Medica Panamericana
- Sohya K, Kameyama K, Yanagawa Y, Obata K, Tsumoto T (2007) GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca<sup>2+</sup> imaging in transgenic mice. *J Neurosci* *27*:2145–2149.
- Sporns, O., G. Tononi & R. Kotter. (2005). The human connectome: a structural description of the human brain. *PLoS Comput. Biol.* *1*: e42
- Sporns O., (2011) The human connectome: a complex network, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* *1224* doi; 10.1111/j.1749-6632.2010.05888.x
- Stoica, Petre, and Randolph Moses (2005). *Spectral Analysis of Signals*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall
- Swadlow HA (1989) Efferent neurons and suspected interneurons in S-1 vibrissa cortex of the awake rabbit: receptive fields and axonal properties. *J Neurophysiol* *62*:288 – 308.
- Tapia, J.A. et al (2013). Reticular activating system of a central pattern generator: premovement electrical potentials. . *Physiological Reports*, e00129.

- Thomas, RC & Wilson, VJ ( 1965). Precise localization of Renshaw cells with a new marking technique. *Nature* 206, 211– 213.
- Wahlstrom-Helen, S., Montgommery, J., Vanpelt, S., Biltz, J., Peck, J., Masino, M., (2019) Glutamate receptor subtypes differentially contribute to optogenetically-activated swimming in spinally-transected zebrafish larvae. *J. Neurophysiol*  
<https://doi.org/10.1152/jn.00337.2019>
- Wallén, P. and Grillner, S. (1987) N-methyl-o-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J. Neurosci.*, 7:
- Ward, M. Shannon et al, (2010) Stochastic Resonance Modulates Neural Synchronization within and between Cortical Sources, *Plos One*,  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014371>
- WHELAN, P. (1996). *CONTROL OF LOCOMOTION IN THE DECEREBRATE CAT*. *Progress in Neurobiology*, 49(5), 481–515. doi:10.1016/0301-0082(96)00028-7
- Wisel, T. (1959) Recording inhibition and Excitation in the Cat's Retinal Ganglion Cells with intracellular Electrodes, *Nature*, januaruy 4
- Young, P. Y. (1997). *Neuroanatomia clinica funcional* . España : Masson

# 11. Cronograma de actividades

En la siguiente tabla, mostramos el cronograma de avances de la tesis hasta esta versión final.

| <b>Semestre de la Maestría</b> | <b>Expectativa de desarrollo del proyecto</b>                         |
|--------------------------------|---|
| <b>Primavera 2019</b>          | Presentación de Protocolo con propuesta de proyecto de investigación  |
| <b>Otoño 2019</b>              | Continuación de experimentos y análisis                               |
| <b>Primavera 2020</b>          | Fase final de experimentos y análisis                                 |
| <b>Otoño 2020</b>              | Presentación de conclusiones del proyecto y entrega de la tesis final |