

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y

NEUROCIENCIAS

“Identificación de las interneuronas implicadas en el control del ritmo locomotriz por las aferentes musculares extensoras del grupo I en el gato”

T E S I S

Que presenta:

**I.B.Q. LUCÍA ESTHER DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ**

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

en la especialidad de

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Co-directores de tesis:

**Dr. Jorge Noel Quevedo Durán**

**Dr. Hans Hultborn**

Ciudad de México

Agosto 2016

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
**CONACyT**, por haberme otorgado la beca de maestría  
del 1 de septiembre de 2014 al 31 de agosto de 2016

Al **Dr. Jorge Noel Quevedo Durán**, por ser  
un excelente guía y asesor. Por todas sus  
enseñanzas y por darme la oportunidad de  
formar parte de su laboratorio.

Al **Dr. Hans Hultborn**, por compartir  
conmigo este maravilloso proyecto.

A mis amigos: **Elvia, Jonathan y Leo**,  
por su apoyo incondicional, sus consejos,  
y las experiencias tan divertidas.

A **Jorge R. Calvo y Alejandro Carapia**,  
por su apoyo técnico y las buenas pláticas.

Al **Dr. Pablo Rudomin** y al **Dr. Rodolfo Delgado**,  
por su asesoría y por sus consejos.

## Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>2.1</b> Estructuras supraespinales implicadas en la locomoción.....	6
<b>2.2</b> Modelos para el estudio de las redes neuronales espinales implicadas en la locomoción.....	11
<b>2.2.1</b> Modelo de la preparación in vivo del gato.....	11
<b>2.2.2</b> Preparaciones de médula espinal aislada.....	14
<b>2.3</b> Organización de los generadores centrales de patrones (CPGs).....	15
<b>2.3.1</b> Hipótesis de los hemicentros de Graham Brown.....	15
<b>2.3.2</b> Modulación monoaminérgica de los circuitos espinales que generan la locomoción.....	17
<b>2.3.3</b> Modelos de los CPGs.....	20
<b>2.4</b> Circuitos neuronales espinales que generan la locomoción.....	30
<b>2.4.1</b> Interneuronas involucradas en la alternancia ipsi y contralateral durante la locomoción.....	31
<b>2.4.2</b> Interneuronas involucradas en la alternancia flexión - extensión durante la locomoción.....	33
<b>2.4.3</b> Interneuronas candidatas a formar parte del generador del ritmo.....	34
<b>2.5</b> Influencia de las vías aferentes sobre la locomoción.....	35
<b>2.5.1</b> Papel de las aferentes propioceptivas en la modulación de la locomoción.....	35
<b>2.5.2</b> Papel de las aferentes cutáneas en la modulación de la locomoción....	46
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	50
<b>3.1</b> Relevancia del proyecto.....	52
<b>4. Hipótesis</b> .....	52
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	53
<b>5.1</b> Objetivo general.....	53
<b>5.2</b> Objetivos particulares.....	53
<b>6. MÉTODOS</b> .....	54
<b>6.1</b> Preparación.....	54
<b>6.2</b> Estimulación y registro.....	55
<b>6.3</b> Generación de la locomoción ficticia.....	57
<b>6.4</b> Registro intracelular de las motoneuronas y extracelular de las interneurona....	58
<b>7. Resultados</b> .....	59

7.1	Registro en el núcleo motor de los EFPs producidos por la estimulación de nervios extensores de la articulación del tobillo.....	59
7.2	Locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA.....	61
7.3	EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I durante la locomoción inducida por L-DOPA.....	62
7.4	Localización de las interneuronas espinales activadas por la estimulación de aferentes musculares del grupo I.....	68
7.5	Criterios para determinar si las interneuronas activadas por aferentes musculares del grupo I forman parte las vías neuronales que regulan el ritmo de la locomoción.....	69
7.5.1	Activación rítmica durante la fase de extensión.....	69
7.5.2	Activación por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I.....	70
7.5.3	Activación producida por la estimulación de las FRA contralaterales....	71
7.5.4	Las interneuronas que median el “resetting” hacia la extensión no pertenecen a interneuronas de proyección ni comisurales.....	72
7.5.5	Naturaleza excitadora de las interneuronas de último orden activadas por aferentes musculares extensores del grupo I.....	73
7.5.6	Las interneuronas activadas por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I y rítmicamente durante la extensión, exhiben un patrón de disparo con un perfil similar al “resetting” hacia la extensión.....	74
8.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	75
8.1	Consideraciones metodológicas.....	76
8.2	Locomoción ficticia inducida por L-DOPA y modelo de los hemicentros o “half-centres”.....	78
8.3	Las fibras aferentes del grupo Ib producen una excitación de las motoneuronas extensoras a través de una vía que se expresa durante la locomoción.....	79
8.4	Interneuronas implicadas en el “resetting” hacia la extensión.....	81
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	83
10.	<b>REFERENCIAS</b> .....	85

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Organización de las estructuras y vías involucradas en la modulación, inicio y ejecución de la locomoción.....	8
<b>Figura 2.</b>	Preparaciones in vivo e in vitro de mamíferos para el estudio de la locomoción ficticia.....	12
<b>Figura 3.</b>	Contracciones rítmicas y alternadas de un músculo flexor y uno extensor en el gato espinalizado y desaferentado.....	16
<b>Figura 4.</b>	Modulación noradrenérgica de los reflejos producidos por la estimulación de aferentes del reflejo del reflejo flexor (FRA).....	19
<b>Figura 5.</b>	Modelo de la organización de los CPGs propuesto por Graham Brown con base en las respuestas producidas por la estimulación de las fibras aferentes del reflejo flexor (FRA) en presencia de L-DOPA.....	22
<b>Figura 6.</b>	Modelos teóricos de los CPGs.....	25
<b>Figura 7.</b>	Modelo teórico del CPG del roedor con una dominancia del hemicentro flexor.....	28
<b>Figura 8.</b>	Fases de la locomoción en cuadrúpedos.....	36
<b>Figura 9.</b>	Durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA la estimulación de las aferentes musculares Ib produce un “resetting” hacia la extensión.....	40
<b>Figura 10.</b>	Supresión de la inhibición no recíproca y surgimiento de una excitación oligosináptica al estimular aferentes musculares Ib durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA en el gato.....	42
<b>Figura 11.</b>	Vías neuronales implicadas en la reacción de corrección del tropiezo durante la locomoción ficticia en el gato al estimular fibras aferentes cutáneas.....	49
<b>Figura 12.</b>	Arreglo experimental de la preparación del gato descerebrado y espinalizado con locomoción ficticia inducida por la administración i.v. de L-DOPA.....	56
<b>Figura 13.</b>	Potenciales extracelulares de campo (EFPs) antidrómicos producidos por la estimulación de nervios extensores.....	60
<b>Figura 14.</b>	Registro de la actividad ENG en los nervios extensores del tobillo al estimular en el núcleo motor.....	61
<b>Figura 15.</b>	Episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA.....	62
<b>Figura 16.</b>	Durante la locomoción ficticia la estimulación de aferentes extensores del grupo I produce EPSPs oligosinápticos.....	64
<b>Figura 17.</b>	EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I en motoneurona extensora del GS.....	66

<b>Figura 18.</b>	Modulación de los EPSPs oligosinápticos extensores del grupo I dependiente de la fase del ciclo locomotriz.....	67
<b>Figura 19.</b>	EFPs producidos por la estimulación de aferentes extensores del grupo I en el núcleo intermedio.....	68
<b>Figura 20.</b>	EFPs producidos por la estimulación de aferentes extensores del grupo I en el núcleo intermedio.....	70
<b>Figura 21.</b>	Interneurona activada por la estimulación de las aferentes del grupo I del nervio extensor GS con un tren de 3 pulsos. Trazo superior, registro extracelular de una interneurona activada durante la fase de extensión.....	71
<b>Figura 22.</b>	Interneurona candidata para mediar el “resetting” hacia la extensión activada por la estimulación de aferentes del reflejo flexor contralaterales (cFRA).....	72
<b>Figura 23.</b>	EFPs excitadores registrados en el núcleo motor con la técnica de promediación disparada por la espiga (STA) de una sola interneurona.....	73
<b>Figura 24.</b>	El patrón de disparo de las interneuronas candidatas se correlaciona con el patrón del “resetting” hacia la extensión.....	75
<b>Figura 25.</b>	Diagrama esquemático que muestra la organización del CPG de la locomoción y la convergencia de las fibras aferentes Ib y FRA contralaterales sobre el hemicentro extensor del CPG.....	81
<b>Figura 26.</b>	Esquema de la vía interneuronal que media el “resetting” hacia la extensión producido por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I.....	84

## ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina / serotonina
AC	<i>Alternating current</i> - corriente alterna
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
BG	<i>Basal ganglia</i> - ganglios basales
<i>c / co</i>	Contralateral
CDP	<i>Cord dorsum potential</i> – potencial del dorso de la médula
CN	Núcleo cuneiforme
CPG	<i>Central pattern generator</i> - Centro generador de patrones
DA	Dopamina
DC	<i>Direct current</i> - Corriente directa
DTF	<i>Dorsal tegmental field</i> - Área tegmental dorsal
DLF	<i>Dorsolateral funiculus</i> – Funículo dorsolateral
E1	Extensión primaria
E2	Extensión secundaria
E3	Extensión terciaria
EDL	Extensor Digitorum longus
EFP	<i>Extracellular field potential</i> - Potencial extracelular de campo
ENG	Electroneurogramas
EPSP	<i>Excitatory postsynaptic potential</i> - Potencial postsináptico excitador
FDHL	Flexor Digitorium y Flexor Hallucis Longus
FRA	<i>Flexor reflex afferents</i> - Aferentes de reflejo flexor
FT	Factor de transcripción
GABA	Ácido gamma-aminobutírico

GS	Gastrocnemio-Sóleo (gastrocnemio lateral, medial y sóleo),
HRP	Peroxidasa de rábano
<i>i</i>	Ipsilateral
i.v.	Inyección intravenosa
IPSP	<i>Inhibitory postsynaptic potential</i> - potencial postsináptico inhibitor
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoaminoxidasa
MCtx	Corteza motora
MLR	<i>Mesencephalic locomotor region</i> - Región locomotriz mesencefálica
MN	Motoneurona
NA	Noradrenalina / norepinefrina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAD	<i>Primary afferent depolarization</i> - Despolarización de aferentes primarias
PBSt	Bíceps Posterior y Semitendinoso
PF	<i>Pattern formation</i> - red formadora de patrones
PIR	<i>Postinhibitory rebound</i> - rebote postinhibidor
PL	Plantaris
PPN	Núcleo pedunculopontino
Qx314	N- etil bromuro de lidocaína
RF	Formación reticular
RG	<i>Rhythmic generator</i> - red generadora del ritmo
SmAB	Semimembranoso y Bíceps Anterior
SP	Peroneo Superficial
SRL	<i>Subthalamic locomotor region</i> - Región locomotriz subtalámica

STA	<i>Spike trigger averaging</i> - promediación disparada por espiga
SU	Sural
TA	Tibial Anterior
Tha	Tálamo
VCtx	Corteza visual
VTF	<i>Ventral tegmental field</i> - Área tegmental ventral
xT	<i>Times threshold</i> - veces por umbral

## 1. RESUMEN

En la médula espinal existe un circuito neuronal denominado Generador Central de Patrones (CPG) capaz de producir el patrón rítmico y alternado entre las fases de flexión y extensión de la locomoción, en ausencia de la información sensorial y supraespinal. Se ha descrito en el gato que en condiciones de reposo, la activación de las fibras aferentes extensoras del grupo I produce una inhibición no recíproca en las motoneuronas extensoras. En cambio, durante la locomoción la activación de las mismas fibras produce EPSPs oligosinápticos en motoneuronas extensoras. Es decir, la inhibición no recíproca se revierte hacia una excitación y se convierte en un sistema de retroalimentación positiva. De hecho, durante la locomoción ficticia, la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I durante la fase de flexión, produce un desacoplamiento del ritmo locomotriz al suprimir la flexión en curso y adelantar la fase de extensión subsiguiente, generando un “resetting” hacia la extensión. La presente tesis estuvo dirigida a estudiar la vía interneuronal que media el “resetting” hacia la extensión e identificar electrofisiológicamente las interneuronas implicadas.

Los experimentos se llevaron a cabo en la preparación *in vivo* del gato. Bajo anestesia con isoflurano y oxígeno, se expuso la médula espinal mediante una laminectomía y se disecaron diversos nervios periféricos. Se practicó una descerebración a nivel precolicular postmamilar y se suspendió la anestesia. Posteriormente, los animales fueron espinalizados a nivel cervical alto, y paralizados con bromuro de pancuronio. Las salvas aferentes se registraron en el dorso de la médula (CDP) y los nervios se estimularon con intensidades expresadas en veces por umbral. Con la finalidad de localizar los núcleos motores de los nervios extensores, se registraron los potenciales extracelulares campo (EFPs) antidrómicos mediante el electrodo de tungsteno en el hasta ventral de la médula espinal al activar los nervios extensores. Una vez localizados los EFPs de mayor amplitud en los núcleos motores, se aplicaron pulsos de microestimulación en el mismo sitio y se registraron los electroneurogramas (ENGs) de los nervios

extensores. Las motoneuronas extensoras se registraron intracelularmente por medio de micropipetas de vidrio llenas con acetato de potasio + QX314. A fin de localizar las proyecciones de las aferentes extensoras del grupo I en el núcleo intermedio, se registraron los EFPs ortodróxicos por medio de una micropipeta de vidrio llena con glutamato de sodio. Con esta misma micropipeta se registró la actividad extracelular de las interneuronas activadas por aferentes musculares extensoras. Para descartar interneuronas comisurales o de proyección, se estimuló el núcleo intermedio contralateral y los funículos dorsolaterales (DLF) ipsi y contralaterales, respectivamente. Finalmente, se indujo locomoción ficticia por medio de la inyección intravenosa de nialamida (aplicada al inicio del experimento) y de L-DOPA (precursor de monoaminas), la cual se monitorizó mediante el registro de los ENG en los nervios periféricos.

Observamos que durante la locomoción ficticia, en lugar de la inhibición no recíproca clásica, la estimulación de fibras aferentes extensoras del grupo I produjo una excitación oligosináptica en motoneuronas extensoras, con una latencia compatible con 3 interneuronas interpuestas. Registramos interneuronas que cumplieran con la mayoría de los siguientes criterios: i) activación rítmica durante la fase de extensión, ii) activación mono, di o trisináptica por la estimulación de aferentes musculares extensoras del grupo I, iii) activación polisináptica por la estimulación de aferentes del reflejo flexor contralaterales y iv) exhibición de un patrón de disparo idéntico al patrón de “resetting” hacia la extensión. Algunas interneuronas fueron activadas antidrómicamente desde el núcleo motor y sus espigas estuvieron asociadas a EFPs negativos en el mismo sitio, lo cual sugiere que se trata de interneuronas de último orden. Las interneuronas candidatas no pertenecen a interneuronas de proyección o comisurales.

Consideramos que las interneuronas registradas reúnen algunas características necesarias para formar de la vía neuronal activada por las fibras extensoras del grupo I durante la locomoción. Estas interneuronas podrían formar parte del generador del ritmo de la locomoción ya que su activación está asociada

a un cambio en la temporalidad del mismo, es decir, a un “resetting” hacia la extensión.

## ABSTRACT

The alternating and rhythmic pattern between flexor and extensor muscles during locomotion is generated by local spinal neuronal networks, termed Central Pattern Generators, or CPGs. CPGs are modulated by supraespal pathways and the sensory information arising from the ongoing movements. It is known that at rest, stimulation of group I extensor afferents in the cat produces the classical non-reciprocal inhibition in extensor motoneurons. However, during locomotion stimulation of the same afferents evokes an oligosynaptic excitation in extensor motoneurons, with a latency compatible with 3 interneurons interposed between extensor afferents and extensor motoneurons. This reflex reversal means that the negative feedback system activated at rest, is converted into a positive feedback system during locomotion. In addition, during the flexion phase of L-DOPA-induced fictive locomotion stimulation of extensor group I afferents interrupted the ongoing flexor activity and anticipated the following extensor burst, i.e. a resetting to extension. The aim of this work was to study the interneuronal pathway mediating group I oligosynaptic EPSPs on extensor motoneurons during L-DOPA-induced fictive locomotion, and to identify the candidate interneurons implicated. We assume that some of these interneurons actually belong to the rhythm-generating layer of the CPG since it causes a resetting of the rhythm.

All the experiments were performed in the decerebrate and paralyzed cat. Peripheral nerve dissection, laminectomy and decerebration were made under isoflurane anesthesia. Decerebration was performed at a precollicular-postmamillary level. Subsequent spinalization at C<sub>1</sub> was performed. Fictive locomotion was induced by the injection of Nialamide (50 mg/kg) followed by L-DOPA (100 mg/kg). Ankle extensor motoneurons were recorded with K<sup>+</sup>-acetate-filled micropipettes. Orthodromic extracellular field potentials (EFPs) and interneuron spikes were recorded in the intermediate nucleus and the ventral horn with Na<sup>+</sup>-glutamate-filled micropipettes (to be able to cause tonic firing of interneurons).

We recorded candidate interneurons to mediate the resetting to extension based on the following criteria: i) rhythmic activation during the extension phase, ii) mono-, di-, or trisynaptic activation by extensor group I afferents, iv) polysynaptic activation by stimulation of contralateral flexor reflex afferents. Some interneurons were antidromically activated from extensor motor nuclei and their spikes associated to negative EFPs in the same motor nucleus, suggesting they were last-order excitatory interneurons.

We conclude that interneurons recorded fulfill the characteristics to belong to the neuronal pathway activated by extensor group I afferents during locomotion. As the activity of interneurons exhibit the same pattern as the 'resetting to extension', they may belong to the rhythm generating layer of the CPG for locomotion.

## 2. INTRODUCCIÓN

Al conjunto de movimientos que permite a un animal desplazarse de un lugar a otro se le denomina locomoción, actividad estereotipada y repetitiva que involucra movimientos rítmicos y alternados de las extremidades o apéndices (Rossignol, 1996). Existen distintas modalidades de la locomoción como nadar, volar, reptar y caminar. Puede ser generada de manera automática por redes neuronales a nivel de la médula espinal, sin la intervención de estructuras supraespinales ni de la información sensorial. Los circuitos de neuronas espinales implicados en la generación del ritmo locomotriz y la alternancia flexión-extensión e ipsi-contralateral, se denominan generadores centrales de patrones o CPGs (“Central Pattern Generators”, por sus siglas en inglés) (Graham Brown, 1911, 1914).

Aparentemente la locomoción puede ser una actividad simple, no obstante, el conjunto de patrones motrices que la compone es muy complejo, debido a que involucra la activación de un gran número de músculos y no sólo de aquellos de las extremidades en movimiento. En efecto, la activación de cada uno de estos músculos depende de la modulación continua de vías supraespinales, así como de la información sensorial proveniente de la periferia, las cuales son integradas por los CPGs (Fossberg y Grillner 1973). De hecho, ya que la locomoción tiene lugar en ambientes muy variables, los movimientos deben ser frecuentemente modificados para adaptarse a las condiciones del entorno.

A continuación se describen brevemente los mecanismos implicados en el inicio y regulación de la actividad locomotriz tanto a nivel supraespinal como espinal.

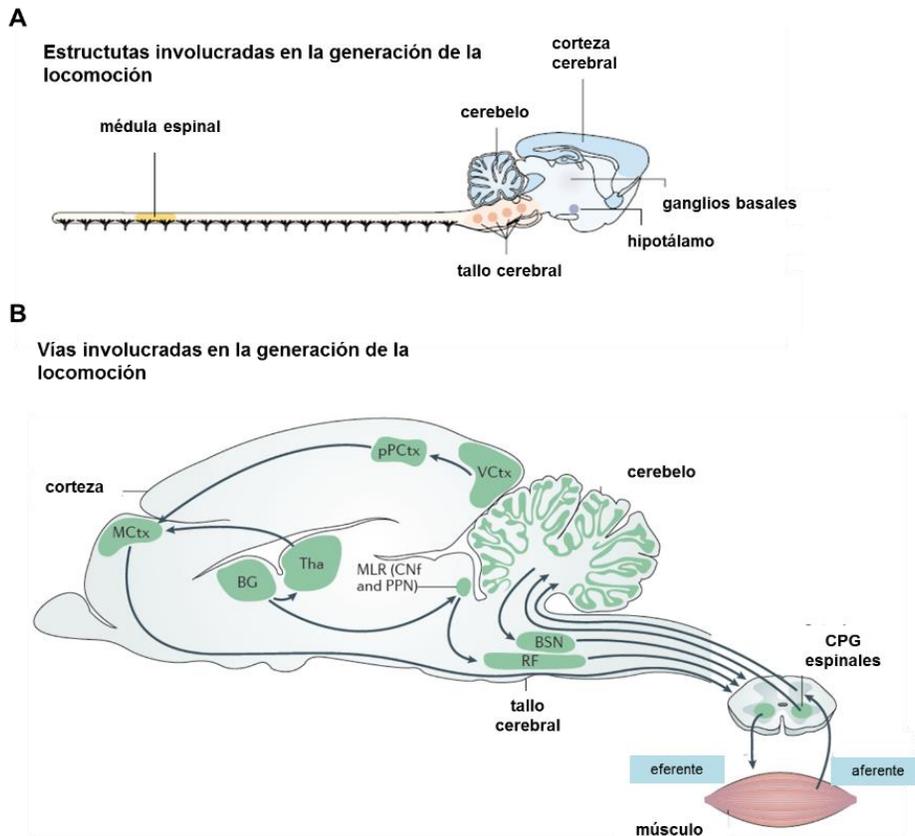
### 2.1. Estructuras supraespinales implicadas en la locomoción

Con base a lo propuesto por Graham Brown (Graham Brown, 1911 y 1914) los CPGs son capaces de generar una actividad locomotriz rítmica y alternada sin influencias supraespinales ni sensoriales. No obstante, el inicio y el control de la locomoción están determinados por la activación de estructuras supraespinales,

como la corteza cerebral, los ganglios basales (BG), el tallo cerebral y el cerebelo, así como por la información sensorial del cuerpo en movimiento. Por lo tanto, para que se genere una locomoción adecuada, se requiere de la integración de la información supraespinal y sensorial a nivel de los circuitos neuronales espinales implicados en la locomoción, i.e., en los CPGs.

Como cualquier actividad motriz, los movimientos que conforman la locomoción se encuentran sujetos a distintos tipos de regulación. Se requiere de: i) un sistema encargado de la selección de dichos movimientos; ii) un sistema que de inicio a la actividad locomotriz; iii) las redes neuronales espinales encargadas de su generación (CPGs); iv) un sistema de retroalimentación sensorial que module y adapte la locomoción acorde a las condiciones del medio ambiente; v) un sistema neuromodulador supraespinal que regule la actividad de los CPGs y vi) un sistema de comparación entre los movimientos planeados y ejecutados, a nivel del cerebelo, para corregir y adaptar el patrón motriz. Sin olvidar que el inicio y la ejecución de la locomoción dependen de los cambios posturales que se organizan en el tallo cerebral. En la Figura 1 se muestra un resumen de la organización de las estructuras neuronales que controlan la actividad locomotriz ([Rossignol 1996](#); [Grillner, 2003](#); [Kiehn y Dougherty, 2013](#)).

El desarrollo de la actividad locomotriz depende de distintos factores, tales como la exploración del medio o la de búsqueda de alimento. Estas conductas son esenciales para seleccionar los patrones motrices adecuados para el desarrollo de la locomoción con un propósito determinado. Dicha selección es posible debido a la participación de estructuras telencefálicas, como de los ganglios basales y los núcleos lateral y medial del hipotálamo (ver Figura 1A) ([Rossignol, 1996](#); [Whelan, 1996](#)).



**Figura 1. Organización de las estructuras y vías involucradas en la modulación, inicio y ejecución de la locomoción.** **A**, estructuras que participan en la generación y modulación de la locomoción. **B**, interacción entre las estructuras implicadas en la locomoción. La información sobre la planeación del movimiento por los ganglios basales (BG) es enviada al tálamo (Tha), que a su vez se comunica con la corteza motora (MCtx). Al mismo tiempo los BG proyectan a la región locomotriz mesencefálica (MLR), la cual se conforma por los núcleos cuneiforme (CN) y pedunculopontino (PPN), para dar inicio a la actividad locomotriz. A través de la formación reticular (RF) y de los núcleos del tallo cerebral, la MLR envía información a los CPGs espinales, los cuales generan el patrón motriz final. Al igual que los CPGs, el cerebelo y la corteza visual (VCtx) reciben información de la periferia para ajustar los patrones motrices al entorno. *Modificada de Grillner, 2003 y Kiehn, 2016.*

La información proveniente de la corteza y el tálamo es integrada por el cuerpo estriado, cuyas neuronas envían proyecciones a los núcleos de salida de los ganglios basales: el globo pálido interno y la sustancia negra reticulada. Estas estructuras proyectan a los núcleos cuneiforme (CN) y pedunculopontino (PPN), los cuales constituyen la región locomotriz mesencefálica (MLR, “mesencephalic locomotor region”, por sus siglas en inglés) (García-Rill et al., 1986; Shik et al., 1966, 1997). Ya que las neuronas de estos núcleos de los ganglios basales son

gabaérgicas, ejercen una inhibición tónica sobre la MLR durante el reposo. Como se puede observar en el esquema de la Figura 1B. Una vez que se ha seleccionado un patrón locomotriz determinado, esta modulación inhibitoria disminuye, lo que facilita la activación de la MLR y así el inicio de la locomoción. De hecho, se ha descrito que la inyección local de antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> en la MLR, tales como la bicuculina o la picrotoxina, induce locomoción en la preparación del gato descerebrado; mientras que la inyección de GABA o del agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol, bloquea la actividad locomotriz (García-Rill et al., 1985).

Entonces, para dar inicio a la locomoción debe existir un proceso de desinhibición sobre la MLR. Sin embargo, para que ello ocurra, otras estructuras del tallo cerebral son esenciales. Orlovsky (1969) demostró que la estimulación eléctrica de la región locomotriz subtalámica (SRL, por sus siglas en inglés) en el gato descerebrado, también es capaz de producir actividad locomotriz. Además, este mismo investigador observó que después de lesionar la región lateral del hipotálamo, donde se localiza la SRL, era imposible inducir una actividad locomotriz (Orlovsky, 1969), demostrando así la importancia de esta región en el inicio de la locomoción.

Posteriormente, Mori y colegas (1989) describieron otras dos regiones del tronco encefálico cuya actividad determina que se inicie o se suprima la locomoción. Observaron que al estimular el área tegmental dorsal o DTF (“dorsal tegmental field”, por sus siglas en inglés), se disminuía el tono muscular y por ende se inhibía la actividad locomotriz, mientras se estimulaba la MLR en gatos en libre movimiento. En contraste, la activación del área tegmental ventral VTF (“ventral tegmental field”, por sus siglas en inglés), incrementaba el tono muscular, facilitando así el inicio de la locomoción en respuesta a la estimulación de la MLR (Mori et al., 1989). Además, en sus estudios Mori y colegas lograron dilucidar las estructuras que establecen conexiones con el DTF o el VTF, por medio del trazado anterógrado y retrógrado con la peroxidasa de rábano (HRP). Demostraron que ambas áreas recibían proyecciones de la MLR y del área dorsal posterolateral del hipotálamo, que

corresponden a la SLR. Particularmente, la DTF recibe conexiones de los núcleos *locus coeruleus* y *subcoeruleus* y proyecta al núcleo reticular *pontis oralis*. A su vez, la técnica de trazado con HRP reveló la tinción de algunas de las neuronas del núcleo reticular *caudalis* y algunas otras del núcleo Rafé *magnus*, así como del núcleo reticular *parvocellularis* y *gigantocellularis* en el bulbo raquídeo. Por su parte, la VTF recibe proyecciones del núcleo subtalámico y del núcleo *locus coeruleus*, hace conexión con el núcleo Rafé *magnus*, y los núcleos reticulares *oralis*, *caudalis* y *parvocellularis* (Otha et al., 1988; Mori y et al., 1989). Con base a esta información y a lo descrito previamente por Shik et al. (1966) se ponen de manifiesto aquellas estructuras encefálicas involucradas en la neuromodulación de la actividad de los CPGs espinales, y se puede descartar una conexión directa de la MLR con la médula espinal.

De manera general, como se ilustra en la Figura 1B, podemos considerar a la MLR como un centro de integración de la información que proviene de estructuras telencefálicas, como los ganglios basales y el hipotálamo. Una vez que la MLR ha procesado esta información, a través de las neuronas glutamatérgicas y acetilcolinérgicas de los núcleos cuneiforme y pedunculopontino (Shik et al., 1966; Whelan, 1996) es enviada a los distintos núcleos de la formación reticular antes mencionados, para dar inicio a la actividad locomotriz. Finalmente, la información es transmitida a los CPGs espinales, donde se integran para ejecutar un patrón motriz determinado (Shik et al., 1966; Rossignol, 1996; Kiehn y Dougherty, 2013). La actividad de los CPGs es modulada, además, por la información propioceptiva que proviene de las extremidades en movimiento. Parte de esta retroalimentación sensorial es procesada por el cerebelo, el cual compara, corrige y coordina los movimientos ejecutados con los movimientos planeados. Lo anterior permite la adaptación del patrón motriz al entorno donde se desarrolla la locomoción (Kiehn y Dougherty, 2013).

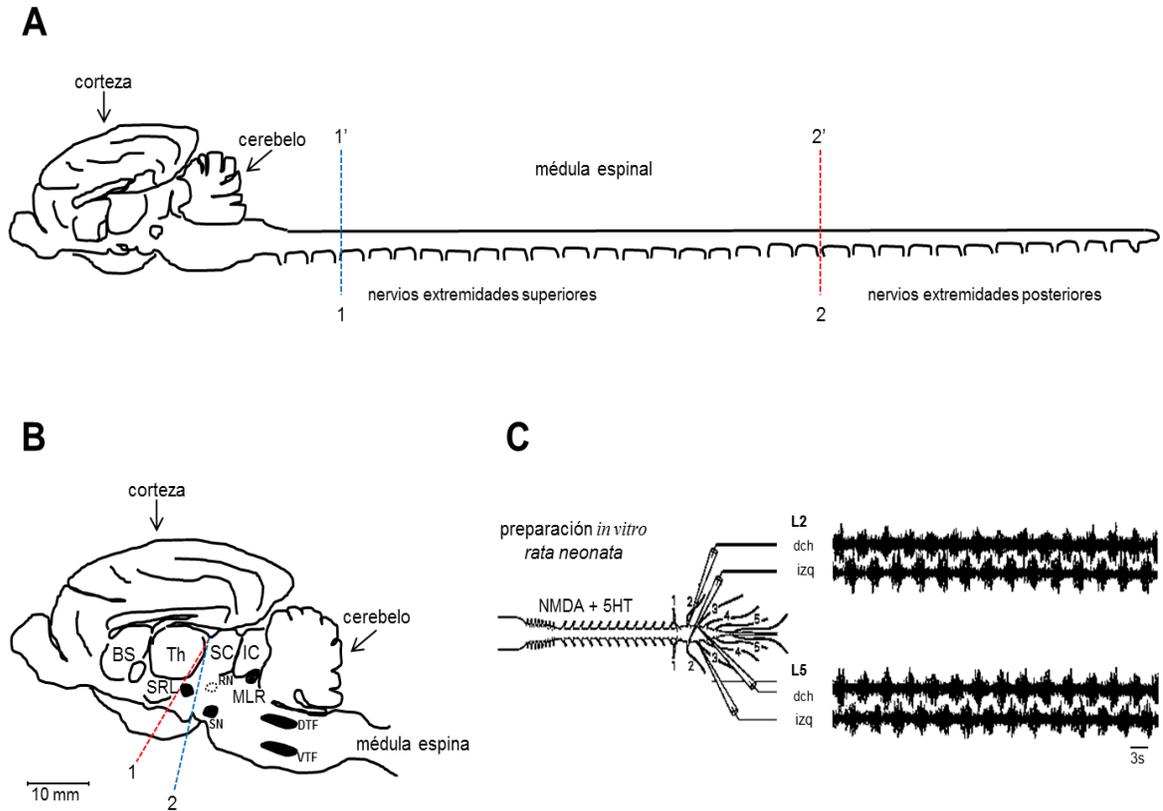
## 2.2. Modelos para el estudio de las redes neuronales espinales implicadas en la locomoción

### 2.2.1. Modelo de la preparación *in vivo* del gato

Se han desarrollado diversos modelos en mamíferos que permiten el estudio de los circuitos neuronales implicados en la locomoción. El modelo más utilizado ha sido el gato en sus distintos abordajes, como la preparación descerebrada, espinalizada o intacta en libre movimiento. Cada una de las preparaciones tiene características que las distinguen y el uso de una u otra depende del tipo de registros que se pretenda efectuar.

**Gato espinalizado.** En este tipo de preparación la médula espinal se secciona a nivel cervical o torácico bajo, como se puede ver en la Figura 2A, por lo que los segmentos espinales que controlan los músculos de las extremidades superiores o inferiores quedan aislados de estructuras supraespinales (Rossignol, 1996; Whelan, 1996). Es así como se puede estudiar el papel de los circuitos espinales que generan el patrón motriz en ausencia de información supraespinal. Para producir la locomoción en este tipo de preparación, después de la espinalización se administran fármacos como la nialamida (un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO)), la L-dihidroxifenilalanina o L-DOPA (un precursor de las monoaminas), el L-5-hidroxitriptofano (precursor de la 5-HT), la clonidina (agonista de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos), etc. (Rossignol, 1996; Whelan, 1996).

**Gato descerebrado.** En este tipo de preparación se puede producir locomoción de dos maneras distintas, dependiendo del nivel en el cual se efectúe la descerebración, como lo indica el esquema de la Figura 2B:



**Figura 2. Preparaciones in vivo e in vitro de mamíferos para el estudio de la locomoción ficticia.** **A**, sección espinal a nivel cervical alto (línea punteada en azul 1'-1) que se efectúa antes de la administración de L-DOPA para inducir la locomoción ficticia en el gato descerebrado. La línea punteada roja de 2'-2 indica una espinalización a nivel torácico. En ambas preparaciones se puede registrar la actividad electromiográfica de los músculos de las extremidades posteriores durante la marcha del gato en una banda sin fin. **B**, la línea punteada roja (1) indica el nivel de la sección para la descerebración precolicular premamilar. En esta preparación se puede inducir locomoción espontánea. La línea punteada azul (2) muestra el nivel de la sección para una descerebración postmamilar, en cuya preparación se puede inducir locomoción ficticia por la estimulación de la región locomotriz mesencefálica, MLR. **C**, preparación de la médula espinal aislada de la rata neonata, en la cual se puede generar locomoción ficticia (registrada en los electroneurogramas de las raíces ventrales L2 y L5, ipsi y contralaterales) mediante la aplicación de 5-HT o NMDA. *Modificada de Principes of Neural Science 5a Ed.*

**Descerebración precolicular premamilar.** Para obtener este tipo de preparación se hace un corte en el borde rostral de los colículos superiores, en dirección dorsoventral y hacia el extremo rostral de los cuerpos mamilares (Hinsey et al., 1930). Con este tipo de descerebración la preparación puede exhibir locomoción espontánea en una banda sin fin.

**Descerebración precolicular postmamilar.** Este tipo de descerebración se obtiene realizando una sección del mesencéfalo a nivel del borde rostral de los colículos superiores, pero en dirección dorsoventral hacia el extremo caudal de los cuerpos mamilares (Hinsey et al., 1930). En esta preparación se requiere de la estimulación eléctrica de la región locomotriz mesencefálica (MLR, por sus siglas en inglés) (Shik et al., 1966, 1967).

**Preparación desaferentada.** Se ha descrito que la médula espinal contiene los circuitos necesarios para generar la locomoción en ausencia de la información supraespinal y sensorial (Graham Brown, 1911). La preparación desaferentada se obtiene seccionando las raíces dorsales de la médula espinal, lo que permite estudiar la actividad locomotriz generada por los CPGs en ausencia de información sensorial. Sin embargo, la pérdida de la información sensorial reduce la excitabilidad de las neuronas (interneuronas y motoneuronas) espinales, lo que puede inducir cambios en la actividad locomotriz.

**Preparación paralizada.** Esta preparación consiste en bloquear la transmisión sináptica de la placa neuromuscular mediante el uso de antagonistas a los receptores colinérgicos nicotínicos, como la d-tubocurarina o el bromuro de pancuronio, lo que da como resultado una parálisis muscular. En la preparación paralizada se suprime el movimiento, sin embargo, la información sensorial debida al estiramiento muscular permanece intacta, por lo que se hace necesario, además, seccionar los nervios musculares (desnervar) (Rossignol, S. 1996). En las preparaciones desnervadas y paralizadas la actividad locomotriz se registra electroneurográficamente en los axones motores de los nervios musculares seccionados. Al patrón motriz registrado en ausencia de movimiento se le conoce como locomoción ficticia.

La utilización de preparaciones paralizadas *in vivo*, como en el caso del gato, permiten estudiar con más detalle la conectividad de las interneuronas implicadas en la locomoción mediante registros intra y extracelulares, es decir, se pueden

conocer sus múltiples aferencias al estimular diferentes nervios cutáneos y musculares, así como estructuras supraespinales.

### **2.2.2. Preparaciones de médula espinal aislada**

Otro modelo que permite el estudio de la locomoción es la preparación *in vitro* de la médula espinal de roedores neonatos. En este caso, la médula es removida y colocada en un baño de solución fisiológica (líquido cefalorraquídeo artificial). Se registra la actividad electroneurográfica en las raíces ventrales y la locomoción ficticia se induce en presencia de neuromoduladores de los CPGs, como el NMDA, la 5-HT o la DA, o un “cocktail” de ellos, como se muestra en la Figura 2C (Kienh, 2006). Si bien esta preparación permite efectuar estudios farmacológicos y electrofisiológicos, e identificar hasta cierto punto aquellas interneuronas involucradas en la generación de la locomoción, tiene la limitante de no permitir una caracterización completa de dichas interneuronas con base a sus patrones de activación por vías sensoriales y descendentes, como en las preparaciones *in vivo* del gato.

No obstante, con el advenimiento de la biología molecular hoy en día es posible identificar poblaciones de interneuronas con base a marcadores moleculares específicos en ratones transgénicos, y de manipularlas genéticamente de manera constitutiva o condicional (ver adelante). Por ejemplo, se puede expresar el receptor a la toxina diftérica en una población definida de interneuronas e investigar el efecto de su silenciamiento sobre el patrón motriz de la locomoción después de la aplicación de la toxina. También se pueden expresar las proteínas sensibles a la luz “channelrodopsine” o “halorodopsine” en grupos específicos de interneuronas e investigar el efecto de su activación o inhibición, respectivamente, por medio de la luz (optogenética) sobre una conducta motriz determinada (Goulding, 2009).

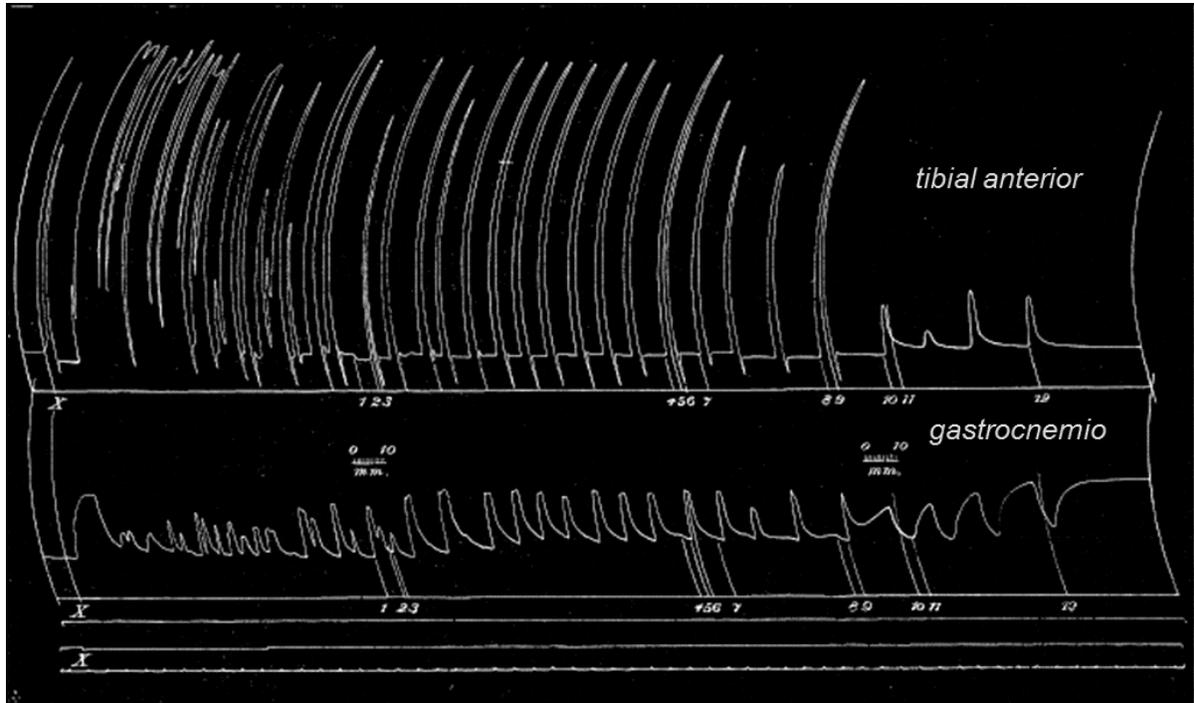
## **2.3. Organización de los generadores centrales de patrones (CPGs)**

### **2.3.1. Hipótesis de los hemicentros de Graham Brown**

Sherrington observó la presencia de reflejos espinales en animales descerebrados y espinalizados, en particular propuso la existencia de una inhibición mutua entre músculos flexores y extensores, la cual consistía en un reflejo unilateral flexor y un reflejo extensor cruzado (Sherrington, 1910). Por su parte, Graham Brown comenzó a estudiar el posible origen de movimientos que conforman la marcha de los animales. Observó que durante la locomoción la extremidad que entra en contacto con el terreno se extendía para soportar el peso e impulsar el cuerpo hacia el siguiente paso; mientras que la extremidad contralateral se encontraba totalmente flexionada. Gradualmente la extremidad extendida comenzaba a flexionarse y a su vez, la extremidad flexionada se extendía poco a poco, generando así el patrón alternado característico de la locomoción, el cual se supuso dependía de la información sensorial proveniente de los músculos en movimiento (Graham Brown, 1911). Lo anterior lo llevó a proponer que la marcha involucra una serie de patrones motrices alternados y rítmicos en los músculos flexores y extensores de las extremidades en movimiento; y que los mecanismos que dominan esta actividad motriz debían ocurrir en la médula espinal.

Para apoyar su hipótesis, Graham Brown llevó a cabo estudios en animales espinalizados a nivel torácico bajo y con las raíces dorsales seccionadas, es decir, excluyendo la información supraespinal y sensorial. Observó que en estos animales se generaba una actividad alternada entre los músculos flexores y extensores, como se puede apreciar en los registros de la Figura 3. Por lo que concluyó que efectivamente dicho patrón de actividad rítmica y alternada es un proceso llevado a cabo por redes neuronales intrínsecas en la médula espinal, cuya actividad es

independiente de la información que proviene de estructuras supraespinales y de la información sensorial periférica (Graham Brown, 1911).



**Figura 3. Contracciones rítmicas y alternadas de un músculo flexor y uno extensor en el gato espinalizado y desaferentado.** Registros quimográficos de la contracción del músculo flexor tibial anterior y del músculo extensor gastrocnemio en un gato espinalizado a nivel torácico bajo y desaferentado (raíces dorsales seccionadas). Nótese la contracción rítmica y alternada entre el músculo flexor y el extensor. Con base en estos experimentos Graham Brown propuso su modelo de los hemicentros (ver texto). *Graham Brown, 1911.*

Asimismo, Graham Brown (1914) demostró que los animales en un estado profundo de anestesia presentaban una especie de marcha refleja, a la cual denominó “*narcosis progression*”, que ocurrió de manera espontánea después de la espinalización. Una característica de la “*narcosis progression*” es la supresión de los reflejos espinales; no obstante, al estirar un músculo flexor registró los reflejos flexores unilaterales, pero no así reflejos extensores contralaterales. Esto lo llevó a concluir que existen dos redes neuronales independientes: una que controla la flexión y otra que controla la extensión, a las cuales denominó “hemicentros”. Con base a lo anterior y a sus estudios previos sobre la alternancia entre la actividad de

los músculos flexores y extensores (ver Figura 3), Graham Brown propuso que el hemicentro flexor y el hemicentro extensor se inhiben mutuamente, lo cual conduce al patrón alternante característico de la marcha (Graham Brown, 1914).

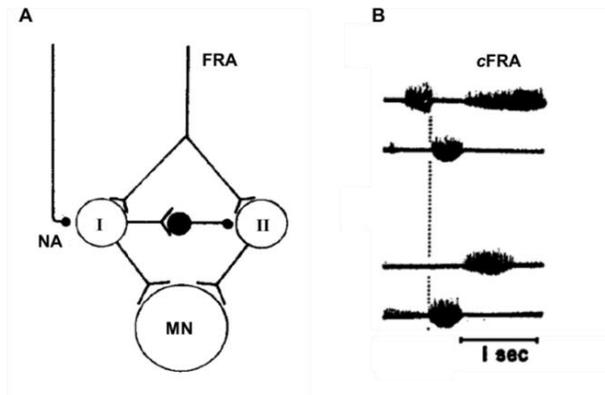
En resumen, con base a sus primeros estudios, Graham Brown (1911) propuso que en la médula espinal existen las redes neuronales esenciales para producir el patrón rítmico y alternado de la locomoción en ausencia de la retroalimentación sensorial y del control supraespinal. Dichas redes deberían tener una organización tal que permitiera la alternancia entre la flexión y la extensión y estar conformadas en dos módulos independientes, denominados hemicentros: un hemicentro flexor y un hemicentro extensor, inhibidos recíprocamente entre sí (Graham Brown, 1914). Aunque en primera instancia Graham Brown propuso que dicha inhibición recíproca se daba a nivel de las motoneuronas (Graham Brown, 1911), con base en observaciones posteriores, postuló la siguiente hipótesis: la alternancia que se da entre los músculos flexores y extensores durante la “*narcosis progression*” en el animal desaferentado y espinalizado, consiste en una fuerte inhibición que ejerce el hemicentro activo sobre el hemicentro silente. Dicha inhibición cesa tras la “fatiga” del hemicentro activo, lo que permite la excitación del hemicentro inactivo. A pesar de que la actividad de los hemicentros no requiere de la propiocepción, la red interneuronal que comprende los hemicentros estaría interpuesta entre las fibras aferentes primarias y las motoneuronas (Graham Brown, 1914).

### **2.3.2. Modulación monoaminérgica de los circuitos espinales que generan la locomoción**

Actualmente se sabe que los CPGs se localizan a nivel espinal lumbo-sacro (L<sub>6</sub>-S<sub>1</sub>) en el caso de las extremidades posteriores de los mamíferos (Jankowska y col. 1967 b; Grillner y Zangger, 1979; Kienh, 2006). La excitabilidad de las neuronas que conforman los CPGs se incrementa en respuesta a diversos neuromoduladores, como las monoaminas [serotonina (5-HT), dopamina (DA) y

noradrenalina (NA)], así como a agonistas de los receptores NMDA y por algunos péptidos como la sustancia P y la vasopresina.

En efecto, se ha descrito que la inyección intravenosa (i.v.) de la L-DOPA, un precursor de monoaminas, en el gato espinalizado y descerebrado produce la activación rítmica y alternada de motoneuronas flexoras y extensoras con un patrón similar a la locomoción, como se observa en la Figura 4B, (Jankowska et al., 1967a y b). Andén y colegas (1966 a y b) observaron que la estimulación de las aferentes del reflejo flexor (flexor reflex afferents o FRA, por sus siglas en inglés) producía un reflejo de flexión de latencia corta. Esta vía es inhibida después de la administración i.v. de L-DOPA y se promueve la “apertura” o desinhibición de una vía polisináptica, generándose descargas de latencia larga y duración prolongada en las motoneuronas flexoras, (Figura 4A) con la aparición concomitante de una despolarización de las aferentes primarias (PAD) en fibras del grupo Ia (Andén et al., 1966 a). Los autores atribuyeron este efecto a la DA y NA, productos del metabolismo de la L-DOPA en las terminales noradrenérgicas. Asimismo, observaron que los bloqueadores de los adrenoreceptores  $\alpha$  (fenoxibenzoamina y clorpromazina) reducían la acción de L-DOPA, lo cual los llevó a proponer la participación de una vía involucrada en la liberación de NA con la consecuente activación de adrenoreceptores  $\alpha$  (Andén et al., 1966 b).



**Figura 4. Modulación noradrenérgica de los reflejos producidos por la estimulación de aferentes del reflejo flexor (FRA).** **A**, esquema que ilustra las vías activadas por la estimulación de las aferentes del reflejo flexor (FRA). En condiciones control, la estimulación de las FRA con un tren de pulsos activa la vía I, generando reflejos de latencia corta en las motoneuronas (MN), y a su vez una inhibición de la vía II a través de una interneurona inhibidora hipotética. Después de la administración de L-DOPA, el mismo estímulo “abre” la vía II que genera los reflejos de latencia prolongada en las MNs. Este efecto se debe a las acciones inhibitorias de la noradrenalina (NA) sobre la vía I, con la consecuente desinhibición de la vía II. **B**, páneles superior e inferior, electroneurogramas de un nervio flexor (trazos superiores) y de un nervio extensor (trazos inferiores). La estimulación de las FRA contralaterales (cFRA) produce una descarga flexora seguida de una descarga extensora. Esta es la primera evidencia de la inducción de locomoción ficticia por la L-DOPA tras la estimulación de las FRAs. Andén et al., 1966; Jankowska et al., 1967a

Posteriormente, Barbeau y Rossignol (1991) reportaron que la administración de clonidina (agonista de los adrenoreceptores  $\alpha_2$ ) y de la misma L-DOPA en gatos espinalizados, producía una actividad alternada en músculos flexores y extensores, similar a los patrones de la locomoción en animales intactos. Mientras que la inyección de quipazina (agonista de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub>), 5-hidroxitriptofano (precursor de la serotonina) o apomorfina (antagonista dopaminérgico) incrementaba la amplitud y duración de la actividad flexora y extensora, en gatos espinalizados con locomoción espontánea. Estas observaciones confirman la existencia de una modulación supraespinal sobre la actividad de los CPGs y que el inicio de la locomoción involucra la participación de vías monoaminérgicas supraespinales (Barbeau y Rossignol, 1991). Asimismo, Kiehn y colegas (1992) observaron que la inyección intratecal de NA en gatos espinalizados y paralizados deprimía los reflejos de latencia corta producidos por la estimulación de las FRAs, promoviendo los reflejos de latencia larga y duración

prolongada. Además, observaron que la NA producía una alternancia entre la actividad flexora y extensora, es decir, locomoción ficticia, tal y como se había reportado por el grupo de Lundberg ([Andén et al., 1966 a y b](#); [Jankowska et al., 1967 a y b](#)).

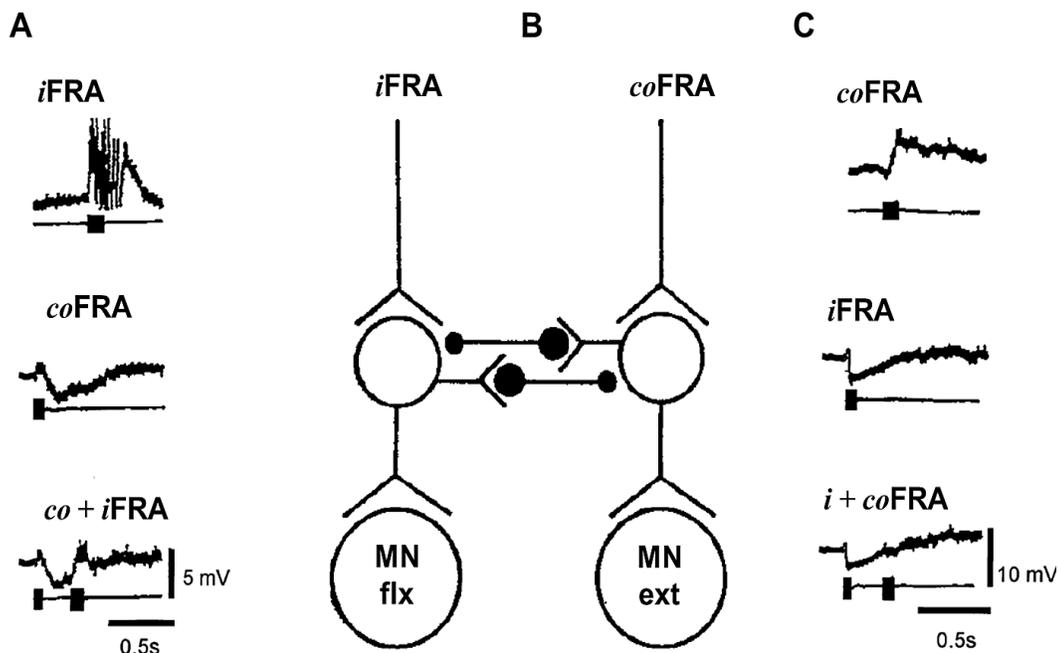
### **2.3.3. Modelos de los CPGs**

#### ***Modelo del CGP de un nivel***

El primer modelo del CPG de la locomoción fue propuesto en 1911 por Graham Brown, quien demostró en animales desaferentados y espinalizados que en la médula espinal existen redes neuronales capaces de generar patrones rítmicos y alternados entre músculos flexores y extensores, es decir, en ausencia de la información supraespinal y sensorial ([Graham Brown, 1911](#)). Además, propuso que las contracciones de los músculos extensores y flexores son controladas por dos sistemas de neuronas, un sistema flexor y uno extensor, a los cuales denominó “half-centres”, o hemicentros, que se inhiben de manera recíproca generándose así la alternancia ([Graham Brown, 1911, 1914](#)).

En 1967 Jankowska y colegas descubrieron en gatos espinalizados con locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA y nialamida, un circuito neuronal compatible con la hipótesis de los hemicentros (esquema de la Figura 5). Primeramente, observaron que la L-DOPA deprimía los reflejos de latencia corta producidos por la estimulación de las FRAs y daba lugar a reflejos de latencia larga y duración prolongada, confirmando lo antes descrito por Andén y colegas ([1966](#)). En presencia de L-DOPA la estimulación de las FRA ipsilaterales produce una descarga flexora ipsilateral de duración prolongada, mientras que la estimulación de las FRA contralaterales produce una descarga extensora ipsilateral con las mismas características, patrón muy similar a la locomoción, es decir, una alternancia entre las fases de flexión y extensión (ver Figura 5A y 5C, respectivamente) ([Jankowska](#)

et al., 1967a). Estos mismos autores observaron, a partir de registros intracelulares de motoneuronas flexoras y extensoras que, en efecto, la estimulación de las FRA ipsilaterales precedida de la estimulación de las FRA contralaterales, y viceversa, producía una inhibición recíproca que tenía lugar a nivel premotoneuronal, es decir, en la red de interneuronas que genera la actividad locomotriz. Esta inhibición no estaba relacionada con la PAD producida por la L-DOPA en las fibras aferentes Ia (Jankowska et al., 1967 a y b). Efectivamente, después de varios minutos de la inyección de L-DOPA la locomoción se produce espontáneamente, de tal manera que se considera que las vías reflejas activadas por las FRA forman parte de los circuitos neuronales generadores de la locomoción (Jankowska et al., 1967a; Lundberg, 1966). Asimismo, los autores registraron extracelularmente interneuronas en la lámina VII de Rexed que se activaban por la estimulación de las FRA ipsi o contralaterales y disparaban rítmicamente con las fases de flexión o extensión. Estas interneuronas fueron consideradas como candidatas a formar parte de los CPGs (Jankowska, et al., 1967b).



**Figura 5. Modelo de la organización de los CPGs propuesto por Graham Brown con base en las respuestas producidas por la estimulación de las fibras aferentes del reflejo flexor (FRA) en presencia de L-DOPA. A, trazo superior,** registro intracelular de una motoneurona flexora al estimular aferentes del reflejo flexor ipsilaterales (*iFRA*) con un tren de pulsos (estímulo de prueba). *Trazo intermedio,* registro de la misma motoneurona al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes del reflejo flexor contralaterales (*coFRA*). *Trazo inferior,* aplicación del estímulo de prueba precedido por el estímulo condicionante con el intervalo de tiempo indicado. Nótese la inhibición de los EPSPs producidos por la estimulación de las *coFRA*. **C,** mismo formato que en A, pero con el registro de una motoneurona extensora ipsilateral. En este caso, el estímulo de prueba fue aplicado a *coFRA* y el estímulo condicionante a *iFRA*. Nótese la inhibición de los EPSPs producidos por la estimulación de *iFRA*. Con base en estos datos se confirmó el modelo de los CPGs, basado en la organización de los hemicentros, los cuales se inhiben de manera recíproca a nivel premotoneuronal, como se ilustra en el esquema en **B**. *Jankowska et al., 1967a.*

Con base en la hipótesis de los hemicentros se han propuesto varios modelos. El modelo más sencillo consiste de un hemicentro flexor y uno extensor ([Jankowska, et al., 1967 a y b](#)), es decir, de un solo nivel, cuyas características son: 1) conformación por dos grupos de interneuronas excitadoras (hemicentros), un grupo proyectando a las motoneuronas flexoras y otro a las extensoras, respectivamente (Figura 5B); 2) interconexión inhibitoria mutua entre el hemicentro flexor y el extensor que permite una alternancia entre ambos, 3) un mecanismo de “fatiga” que reduce la excitación del centro activo permitiendo una reducción en la

inhibición del hemicentro inactivo; 4) la inhibición de los músculos antagonistas debe estar acoplada a la excitación de los agonistas y 5) por último, las articulaciones de cada extremidad deben poseer su propio CPG (ver más adelante) (Jankowska, et al., 1967 a y b; McCrea & Rybak, 2008).

Acorde a la hipótesis de los hemicentros de Graham Brown, la alternancia de la actividad locomotriz es el resultado de la organización intrínseca de las interneuronas en cada hemicentro (Figura 5B). Sin embargo, dicho patrón de alternancia puede ser modulado por la información sensorial proveniente de las extremidades en movimiento, directamente sobre los CPGs o sobre las motoneuronas. De hecho, Engberg y Lundberg (1969) propusieron que las aferencias propioceptivas podrían generar un patrón más complejo que la simple alternancia básica entre flexión y extensión (Engberg y Lundberg 1969).

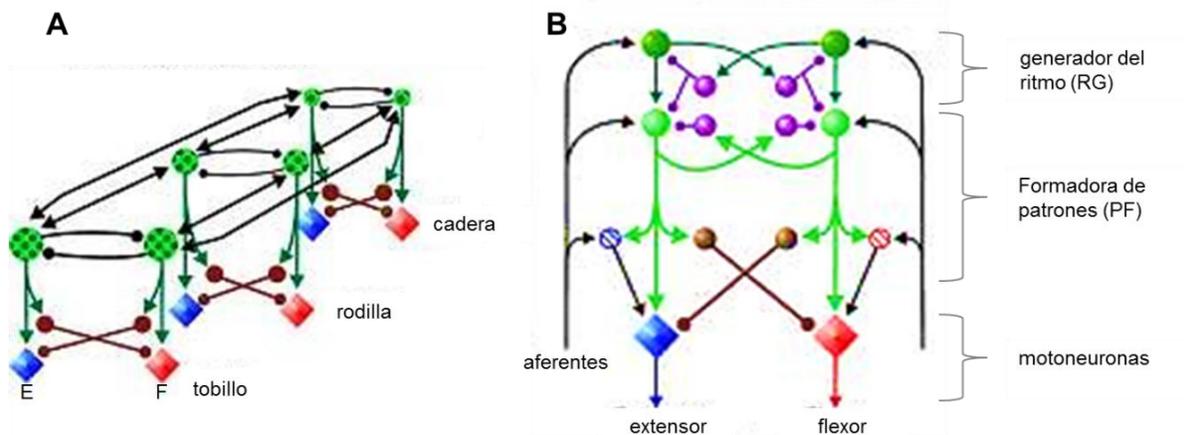
Más tarde, a mediados de los 70's Grillner y colaboradores, con base en sus observaciones en la preparación del gato descerebrado y desaferentado, concluyeron que los CPGs no sólo producen una alternancia entre la flexión y la extensión, sino que también pueden generar movimientos más especializados para cada articulación. Por lo que propusieron que la arquitectura de los CPGs está constituida por unidades generadoras de disparo ("Unit Burst Generators" o UBGs, por sus siglas en inglés), que controlan subgrupos de motoneuronas para los músculos de cada articulación (cadera, rodilla y tobillo), como se ilustra en la Figura 6A. Es importante enfatizar que este modelo preserva la hipótesis de Graham Brown, es decir, la existencia de una inhibición mutua entre los hemicentros flexor y extensor de cada articulación, así como conexiones excitadoras recíprocas entre los UBGs (Grillner y Zangger, 1975; Grillner, 1981).

### ***Modelo de un doble nivel***

Aunque la organización de los CPGs de un solo nivel puede explicar los patrones motrices alternados y estereotipados de la locomoción, sobre todo en especies más simples, como la lamprea o el pez cebra; no explica el fenómeno de ausencias espontáneas (“deletions”) de actividad flexora o extensora durante la locomoción ficticia (McCrea y Rybak, 2008). Estas “deletions” se manifiestan como periodos silentes en la actividad de un grupo de motoneuronas durante la locomoción. Por ejemplo, la fase flexora puede estar ausente en uno o varios ciclos de la locomoción, mientras que la extensión prosigue con su ritmo normal, o viceversa (Rybak et al., 2006). Estas observaciones llevaron a proponer una arquitectura de los CPGs con dos niveles. Dicho modelo fue propuesto inicialmente por Perret y Cabelguen en 1980 (Perret y Cabelguen, 1980), el cual se conforma por una red neuronal generadora del ritmo (RG), funcionalmente separada de una red formadora de patrones (PF). Es decir, entre el RG y las motoneuronas se encuentra la red intermedia formadora de patrones (PF), lo cual se ilustra en la Figura 6B.

Perret y Cabelguen observaron, en el gato talámico y con locomoción espontánea, que además de los músculos puramente flexores y extensores, hay músculos que exhiben un patrón de activación complejo durante ambas fases (flexión y extensión), por lo que los denominaron músculos bifuncionales. Esto los llevó a suponer que la locomoción consta de una fase flexora, una extensora y dos fases de transición, por lo que la organización de los CPGs debía ser tal que permitiera la activación de cada músculo de acuerdo a la fase del ciclo locomotriz (Perret y Cabelguen, 1980). Con base en los registros intracelulares en motoneuronas, estos mismos autores propusieron un modelo en el cual tanto las motoneuronas flexoras como extensoras recibían comandos excitadores de los hemicentros flexor y extensor, respectivamente, y que debería existir una inhibición recíproca entre los hemicentros. Mientras que las motoneuronas bifuncionales deberían recibir comandos de ambos hemicentros dependiendo de la fase de

transición del ciclo locomotriz. Para que ello ocurriera los CPGs tendrían que ser modulados por las aferentes propioceptivas. Además, su modelo consideró la existencia de una red que controlaba la temporalidad y el ritmo locomotriz, la cual se suponía operaba de forma independiente a la red formadora de patrones. Es decir, el ritmo locomotriz y los patrones de disparo de las motoneuronas eran hasta cierto punto independientes (Perret y Cabelguen, 1980).



**Figura 6. Modelos teóricos de los CPGs.** **A**, modelo de la unidad generadora de disparo (UBG) propuesta por Grillner. Cada articulación (cadera, rodilla y tobillo) posee un hemisegmento flexor y uno extensor, los cuales se hallan comunicados entre sí a través de conexiones excitadoras, como se indica en el esquema. En este caso aún prevalece la propuesta de un solo nivel en la estructura del CPG. **B**, modelo de doble nivel propuesto por el grupo de McCrea, el cual consiste en un nivel regulador del ritmo (RG) y una red formadora de patrones (PF) interpuesta entre el RG y las motoneuronas. Ambos niveles reciben información periférica. Tanto el modelo de Grillner como el de McCrea conservan la organización recíproca de los hemisegmentos propuestos en el modelo de Graham Brown. *McCrea y Rybak, 2008.*

Posteriormente, McCrea y colegas observaron que existen dos tipos de “deletions” durante la locomoción ficticia: 1) aquellas que están asociadas a un cambio de fase en los ciclos de la locomoción, es decir, que modifican o interrumpen el ritmo locomotriz, produciendo un desacoplamiento de la temporalidad del mismo, por lo que las denominaron “resetting deletions”. Puesto que se altera la temporalidad del ritmo, estas ausencias deben ocurrir en el RG, y 2) las “non-resetting deletions”, las cuales no están asociadas a un cambio de fase en la

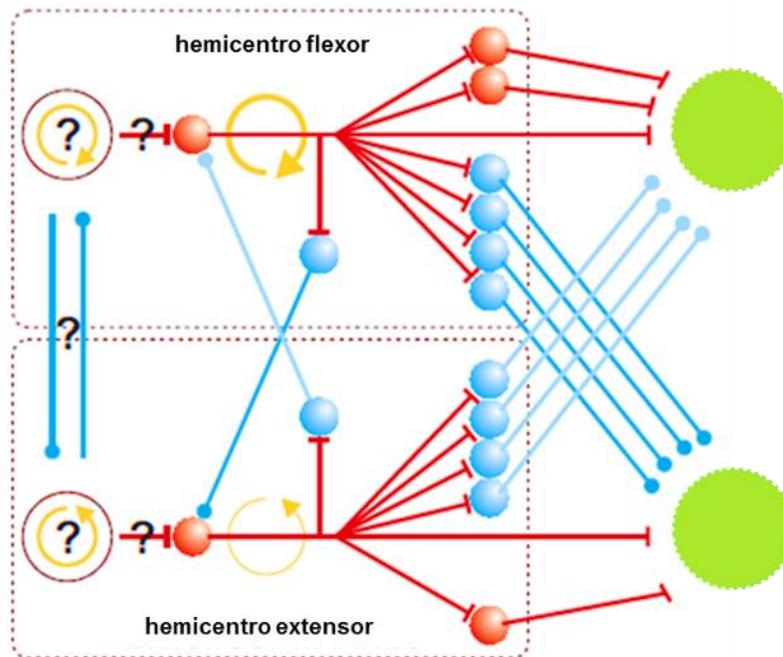
actividad rítmica de la locomoción, pero se relacionan con una ausencia de actividad en las motoneuronas flexoras o extensoras, modificando el patrón de la actividad motriz sin alteraciones en el ritmo (Rybak et al. 2006 a y b). Puesto que no se produce una alteración en la temporalidad del ritmo, estas “deletions” deben ocurrir río abajo, es decir, en el PF. Otra evidencia de la conformación del CPG por dos niveles es el efecto de la estimulación de vías aferentes cutáneas y musculares. Por ejemplo, la estimulación de aferentes musculares Ib, provenientes de nervios extensores del tobillo durante la fase de flexión, produce una supresión de la flexión en curso y una anticipación de la extensión, es decir, un “resetting” del ritmo hacia la extensión (Conway et al., 1987). Este desacoplamiento del ritmo debe ocurrir a nivel del RG. Sin embargo, la estimulación de fibras aferentes musculares Ia provenientes de músculos flexores durante la fase de flexión, produce sólo un incremento en la amplitud de la flexión en curso, sin cambios en el ritmo (McCrea, 2001). Estas acciones deben entonces ocurrir en el PF, dado que no se producen cambios en la temporalidad del ritmo locomotriz.

Es así como la separación de los CPGs en dos niveles, un RG y un PF, permite explicar el control independiente de la generación del ritmo locomotriz y de los patrones motrices que se manifiestan en la actividad de las motoneuronas. Al mismo tiempo, el modelo de dos niveles explica la influencia de las vías aferentes sobre el RG sin afectar los patrones de activación de las motoneuronas, o sobre el PF sin cambiar el ritmo de la locomoción (Rybak et al., 2006 b).

### ***Modelo asimétrico***

Si bien, se ha descrito que la arquitectura de los CPGs está basada en una inhibición recíproca a nivel premotoneuronal entre el hemicentro flexor y el extensor (Graham Brown, 1914; Jankowska et al., 1967 a y b; Grillner y Zangger 1975), algunos estudios sugieren que existe una predominancia de la flexión, lo que ha llevado a proponer un arreglo asimétrico de los CPGs (Brownstone y Wilson, 2008).

En los trabajos de Pearson y colaboradores con *Periplaneta americana*, ya sea intacta o desaferentada, en los cuales se midió la actividad de los músculos elevador (flexor) y depresor (extensor) de la coxa, se observó que estos animales muestran un patrón alternado entre la flexión y la extensión durante la locomoción. No obstante, durante la locomoción rápida había un incremento en la duración de las descargas del músculo elevador, no así en el depresor; es decir, se exhibía una dominancia de la flexión sobre la extensión, sin pérdida de la alternancia (Pearson 1972). Además, en experimentos previos se había observado que los músculos flexores eran capaces de activarse en ausencia de la extensión (Pearson e Iles, 1970). Con base a sus observaciones, Pearson e Iles propusieron un modelo que consiste de un grupo de interneuronas que se activan de manera fásica con las motoneuronas flexoras del músculo elevador, y a su vez inhiben a las motoneuronas extensoras del músculo depresor. Al final de la actividad flexora, debía existir una “fatiga” que liberaba a las motoneuronas extensoras de su inhibición, lo que permitiría a un grupo de interneuronas excitadoras activar a la motoneuronas del músculo extensor (depresor) (Pearson e Iles, 1970; Pearson, 1972). Si bien este modelo se ajusta a lo que ocurre en vertebrados simples, se desconoce si los CPGs en mamíferos tienen una organización simétrica o asimétrica.



**Figura 7. Modelo teórico del CPG del roedor con una dominancia del hemicentro flexor.** La naturaleza asimétrica de las conexiones recíprocas con una dominancia de la flexión sobre la extensión se esquematiza como una diferencia en el número de interneuronas excitadoras (rojas) e inhibitoras (azules) que proyectan sobre las motoneuronas flexoras (F) y extensoras (E). Se puede observar una mayor excitación sobre las motoneuronas flexoras y una mayor inhibición sobre las motoneuronas extensoras. Estos dos grupos de interneuronas de último orden están bajo un control común de interneuronas excitadoras relacionadas con la flexión o la extensión, que podrían, o no, poseer capacidades rítmogénicas. La red relacionada con la flexión opera de manera más robusta y estable y con mayor capacidad rítmogénica que la red extensora (como indican las flechas circulares amarillas). Río arriba se encontraría la red generadora del ritmo con los módulos flexor y extensor (indicados con signos de interrogación) recíprocamente inhibidos, cuya naturaleza se desconoce, aunque podría corresponder a las interneuronas que expresan el FT Shox2. *Endo y Kiehn, 2008.*

En el 2008 Brownstone y Wilson propusieron una arquitectura asimétrica de los CPGs, con un generador del ritmo exclusivamente flexor, considerando que en la preparación de la médula espinal aislada de la rata neonata existe un dominio de la actividad flexora en niveles lumbares altos (L<sub>2</sub>). En su modelo, el CPG está constituido por un generador flexor del ritmo (asimétrico) y una red formadora de patrones que obedece la hipótesis de los hemicentros de Graham Brown. La red generadora del ritmo excita de manera directa al hemicentro flexor de la red

formadora de patrones; mientras que inhibe el hemicentro extensor a través de una interneurona inhibidora interpuesta (Brownstone y Wilson, 2008).

Por otra parte, Berg y Hounsgaard (2007) propusieron un modelo que consiste en un balance entre la inhibición y la excitación en las motoneuronas durante el rascado ficticio de la tortuga. Con este modelo trataron de explicar el patrón alternado de la locomoción, lo cual generó bastante controversia, ya que ponía en duda la existencia de los hemicentros y su inhibición mutua (Graham Brown, 1911, 1914; Jankowska et al., 1967 a y b). Sin embargo, estos autores llegaron a esta conclusión con base a registros intracelulares de motoneuronas flexoras, así como en el análisis de las variaciones en las conductancias inhibidoras y excitadoras de las motoneuronas registradas únicamente durante la fase de flexión del rascado (no se muestra la contraparte extensora del rascado), sin la contraparte extensora. Más tarde, Endo y Kiehn (2008) observaron que en efecto existen cambios en las conductancias inhibidoras y excitadoras de las motoneuronas flexoras y extensoras durante la locomoción ficticia en la rata neonata. Demostraron, además, que la variación de las conductancias inhibidoras es mayor que aquella de las conductancias excitadoras. Sin embargo, las variaciones de las conductancias no ocurren en paralelo, como se observó en la tortuga (Berg y Housgaard, 2007), sino que existe una alternancia entre la inhibición y la excitación. Es decir, durante la flexión las motoneuronas flexoras exhibían un incremento en las conductancias excitadoras, mientras que durante la extensión las mismas motoneuronas presentaban un aumento en las conductancias inhibidoras, es decir un patrón opuesto y no paralelo. Lo inverso ocurría para las motoneuronas extensoras (Endo y Kieh, 2008). Aunque se observó una dominancia de las conductancias que ocurren durante la flexión (tanto excitadora como inhibidora) en comparación con las que ocurren durante la extensión, estos datos reafirman la existencia de un CPG bipartita de la locomoción; i.e., un hemicentro flexor y uno extensor inhibidos recíprocamente (Ver Figura 7).

## 2.4. Circuitos neuronales espinales que generan la locomoción

Se ha demostrado que en la preparación de la médula espinal aislada *in vitro* del ratón neonato, la administración conjunta de 5-HT y NMDA (un agonista de los receptores ionotrópicos a glutamato AMPA/Kainato), produce una actividad rítmica y alternada similar a la locomoción, siendo ésta reforzada por administración adicional de DA (Kiehn, 2006; Endo y Kiehn, 2007). La acción de estos neuromoduladores incrementa la excitabilidad de las neuronas que conforman los CPGs a través de la activación de receptores específicos, cuyos mecanismos no se conocen con precisión. En la actualidad todavía se desconoce la identidad de las neuronas que conforman los CPGs en los mamíferos.

Estudios previos en la lamprea muestran que el nado de estos animales consiste de movimientos alternados de los músculos ipsi y contralaterales, a través de una inhibición recíproca entre las motoneuronas respectivas (Grillner et al., 1995). Estas observaciones concuerdan con el modelo de los hemicentros propuesto por Graham Brown. Asimismo, se ha observado que la aplicación de NMDA en la médula espinal aislada de la lamprea induce nado ficticio con las mismas características que el nado natural (Brodin y Grillner, 1985 a y b, Grillner et al., 1995; Grillner 2003). Grillner y su grupo encontraron que, en efecto, las neuronas glutamatérgicas de la formación reticular que proyectan a la médula espinal activan a las interneuronas excitadoras del CPG, que a su vez activan a las motoneuronas y a un conjunto de interneuronas comisurales inhibitoras (Buchanan, 1982), logrando así el patrón alternado característico del nado en la lamprea (Grillner et al., 1995).

Con base a sus observaciones, Grillner et al. (1995) determinaron que la generación del nado en la lamprea, y por ende la actividad de los CPGs, depende de la apertura de canales ionotrópicos glutamatérgicos sensibles a NMDA, lo que produce potenciales de meseta o "*plateau potentials*". La activación de los receptores NMDA se facilita con la aparición del rebote postinhibidor (PIR) que

ocurre después del cese de la inhibición producida por las interneuronas comisurales inhibitorias contralaterales (Grillner, et a, 1995). El PIR facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  por medio de la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y T, lo que a su vez conduce a la activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . El incremento en la conductancia de  $K^+$  reduce los “*plateau potentials*” suprimiendo así la actividad del CPG ipsilateral. Es así como se produce una desinhibición en el CPG contralateral, repitiéndose el ciclo dando como resultado el patrón alternado característico del nado en la lamprea (Grillner, et a, 1995; Grillner, 2003).

En el caso de los CPGs de mamíferos, mediante la utilización de ratones transgénicos y de herramientas de la biología molecular, como la optogenética, se han podido identificar algunas de las interneuronas que forman parte de los circuitos espinales implicados en la locomoción. Gracias a estos abordajes y al empleo de técnicas clásicas de electrofisiología y conductuales, se han podido identificar aquellas interneuronas que modulan la alternancia ipsi y contralateral, la alternancia flexión-extensión, incluso algunas interneuronas candidatas a formar parte del generador del ritmo de la locomoción.

#### 2.4.1. Interneuronas involucradas en la alternancia ipsi y contralateral durante la locomoción

Se ha descrito que la alternancia o sincronía entre los lados ipsi y contralateral se debe a la activación de interneuronas comisurales, cuyos axones atraviesan la línea media de la médula espinal. Estas interneuronas comisurales pueden ser de naturaleza inhibitoria y excitadora. Dichas neuronas pertenecen a la estirpe neuronal  $V_0$  y expresan el factor de transcripción (FT) DBX1 (“*developing brain homeobox 1*”) así como el FT *Evx1/2*, y fueron identificadas por el grupo de Jessell (Pierani et al., 2001; Moran-Rivard et al., 2001). A este respecto, Lanuza et al. (2004) demostraron que la mutación del gen *Dbx1*, en efecto, altera la coordinación ipsi y contralateral en el ratón.

Recientemente, Talpalar et al. (2013) observaron que la ablación genética de las interneuronas  $V_0$  suprime la alternancia entre los movimientos ipsi y contralaterales generando un patrón tipo “*hopping*”, es decir, los ratones con esta condición exhiben movimientos sincronizados similares al salto de los canguros (Talpalar et al., 2013). Las interneuronas  $V_0$  se dividen en dos subpoblaciones: i) las  $V_{0D}$  inhibitoras, que expresan el FT PAX7, las cuales regulan la alternancia ipsi y contralateral de la locomoción que ocurre a frecuencias bajas, por ejemplo durante la marcha, no así cuando el animal corre o galopa y ii) las  $V_{0V}$  excitadoras, cuyos marcadores genéticos son los FTs PAX7 y EVX1. Se ha observado que la ablación de estas interneuronas produce sincronía entre los movimientos ipsi y contralaterales durante el galope; no obstante, se mantiene la alternancia cuando el ratón camina. Por consiguiente, las interneuronas  $V_{0V}$  modulan la coordinación ipsi y contralateral que ocurre durante la locomoción a altas frecuencias (Kiehn, 2016).

Otra población de neuronas espinales que regulan la alternancia ipsi y contralateral son las interneuronas  $V_{2a}$ , las cuales expresan los FTs Chx10 y GATA3 (Goulding, 2009). De hecho, se ha demostrado que los ratones *knock out*, que no expresan el gen Chx10 y por ende carecen de las interneuronas  $V_{2a}$ , son incapaces de alternar los movimiento ipsi y contralaterales de las extremidades durante la locomoción (Steven, et al., 2008). Además, en este trabajo se mostró, a través de marcaje anterógrado, que las interneuronas  $V_{2a}$  proyectan ipsilateralmente excitando a las interneuronas comisurales descritas por Lanuza et al., (2004). Finalmente, Steven et al. (2008) encontraron que las interneuronas Chx10 ( $V_{2a}$ ) no forman parte del generador del ritmo locomotriz (RG), pero sí reciben información proveniente del mismo, lo cual sugiere que forman parte de la red generadora de patrones (PF) de los CPGs.

#### 2.4.2. Interneuronas involucradas en la alternancia flexión - extensión durante la locomoción

Otra característica de la actividad locomotriz es la alternancia rítmica que existe entre los músculos flexores y extensores. Ello se debe principalmente a la organización intrínseca de los CPGs (Graham Brown 1911, 1914; Jankowska et al., 1967 a y b). No obstante, la inhibición recíproca mediada por las interneuronas Ia, que reciben este nombre debido a que son activadas por las aferentes Ia del huso muscular (Jankowska, 1992; Kiehn, 2016), también juega un papel importante. Durante la flexión, las interneuronas Ia reciben información de las aferentes del grupo Ia de músculos flexores e inhiben a las motoneuronas extensoras y viceversa, es decir, durante la extensión las interneuronas activadas por las aferentes Ia de músculos extensores inhiben a las motoneuronas flexoras (Jankowska, 1992). Además, existe una inhibición recíproca entre las mismas interneuronas Ia, que también son inhibidas por las interneuronas de Renshaw (Hultborn, 1976: citado por Kiehn, 2016; Jankowska, 1992).

Aunque la inhibición recíproca mediada por las interneuronas Ia ocurre a nivel de las motoneuronas, la activación rítmica de las mismas durante la locomoción sugiere que éstas reciben información directamente de los CPGs. A nivel premotoneuronal, también existe una inhibición recíproca entre los hemicentros extensor y flexor por un conjunto de interneuronas inhibitoras, lo que permite la alternancia entre la flexión y la extensión (Graham Brown, 1914; Jankowska et al., 1967 a y b).

Con base en las herramientas de la biología molecular, en el ratón se han podido identificar distintas interneuronas que participan en la modulación de la transición entre la fase flexora y extensora. Tal es el caso de las interneuronas V<sub>1</sub> que expresan el FT En1 y las interneuronas V<sub>2b</sub>, cuyo marcador genético es GATA3 (Goulding, 2009; Kiehn, 2016). En el trabajo de Gosgnach et al. (2006) se demostró que las interneuronas V<sub>1</sub> son unilaterales y de naturaleza inhibitora, que no sólo

dan origen a las interneuronas Ia y de Renshaw, sino también a interneuronas que posiblemente formen parte de los CPGs. Los autores observaron en ratones “*knock out*” que no expresan el FT En1 una disminución en la frecuencia de la actividad locomotriz sin afectar, “aparentemente”, la alternancia flexión-extensión (Gosgnach et al., 2006).

Recientemente, Zhang y colegas (2014) encontraron que la ablación genética de las  $V_{2b}$  en un principio no afecta la alternancia entre la flexión y la extensión. No obstante, demostraron que tanto las interneuronas  $V_1$  como las  $V_{2b}$  están implicadas en la regulación de la transición entre las fases de flexión y extensión, ya que el bloqueo de la transmisión sináptica de ambas interneuronas revierte el patrón alternado entre flexión-extensión hacia movimientos sincronizados (Zhang et al., 2014; Kiehn, 2016).

#### **2.4.3. Interneuronas candidatas a formar parte del generador del ritmo**

Como se indicó con anterioridad, la locomoción es una actividad rítmica, por lo tanto debe existir un elemento dentro del CPG que regule la temporalidad del ciclo locomotriz. A este respecto, los modelos propuestos actualmente para el CPG están conformados por dos capas: una red reguladora del ritmo (RG) y otra formadora de los patrones motrices (FP) (Perret y Cabalguen, 1980; Rybak et al., 2006 a y b; ver secciones posteriores).

Las características que deben poseer las interneuronas que controlan la temporalidad de la locomoción, es decir, la generación del ritmo, son: i) activación rítmica en fase con el ciclo de la locomoción, ii) naturaleza excitadora, iii) localización unilateral sin proyecciones ascendentes, iv) ausencia de conexiones con las motoneuronas, es decir, no ser de último orden y v) expresión de conductancias apropiadas para generar oscilaciones rítmicas, como las corrientes persistentes de entrada (PICs) y las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo T y de  $K^+$  tipo h, que producen el rebote postinhibidor (Willson et al., 2005; Dourghety et al., 2103; Kiehn 2016). En efecto, trabajos previos con modelos simples, como la lamprea, han

identificado interneuronas con los criterios ya señalados (Buchanan and Grillner, 1987; Roberts et al., 1998; Li et al., 2006). No obstante, en mamíferos no ha sido todavía posible, aunque se han descrito dos clases de interneuronas candidatas, las cuales expresan los FT Hb9 y Shox2 (Willson et al 2005; Dourghety et al., 2103).

## **2.5. Influencia de las vías aferentes sobre la locomoción**

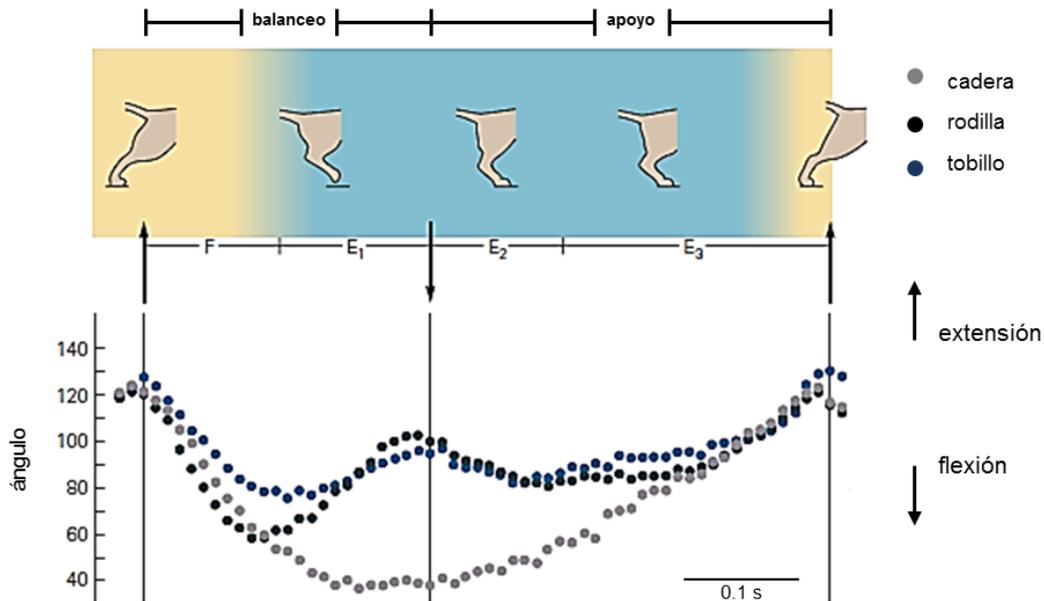
Si bien, a partir de las preparaciones de locomoción ficticia se ha observado que los CPGs tienen la capacidad de producir un patrón rítmico y alternado característico de la actividad locomotriz en ausencia de las vías aferentes (Graham Brown, 1911,1914; Jankowska et al., 1697 a y b), en condiciones reales los animales exhiben distintos tipos de locomoción en un medio ambiente que cambia constantemente. Para ello se requiere la influencia de la información sensorial con el fin de adaptar la locomoción acorde a los cambios en el ambiente. Por consiguiente, las fibras aferentes deben tener acceso a las redes neuronales implicadas en la locomoción, es decir, al RG y al PF de los CPGs (Whelan et al., 1995; Schomburg et al., 1998).

El papel de la información sensorial en el control de los circuitos neuronales espinales que generan la locomoción no se conoce con precisión. Diversos estudios han demostrado que la información propioceptiva y cutánea pueden modular la actividad de los CPGs espinales de distintas formas, ya sea modificando únicamente el patrón de disparo de las motoneuronas, o bien cambiando el ritmo y la temporalidad de los ciclos locomotrices (McCrea, 2001).

### **2.5.1. Papel de las aferentes propioceptivas en la modulación de la locomoción**

Los patrones de contracción de los músculos durante la locomoción se agrupan en dos fases principales: i) el “*power-stroke*”, que se basa en la propulsión o el impulso de los movimientos y ii) el “*return-stroke*”, que se refiere al regreso del cuerpo a la posición inicial para comenzar el siguiente ciclo locomotriz. De acuerdo al tipo de locomoción, se acuñan términos específicos para nombrar dichas fases.

En el caso de la marcha en animales terrestres, como el gato y el ser humano, se denominan fase de apoyo y balanceo, respectivamente, las cuales se subdividen en 4 etapas: flexión (F), extensión primaria (E1), extensión secundaria (E2) y extensión terciaria (E3), que se ilustran en la Figura 8 (Pearson, 2008).



**Figura 8. Fases de la locomoción en cuadrúpedos.** El esquema superior representa los movimientos de la extremidad posterior del gato durante la actividad locomotriz. En la gráfica inferior se muestran los cambios en el ángulo de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) como se indica, durante las fases de balanceo y apoyo de la marcha del gato. Tomada de *Principles of Neural Science 5a Ed*; Adaptada de Engberg y Lundberg, 1969.

La fase de balanceo comienza con la flexión de las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo. Enseguida, de manera gradual se exhibe una ligera extensión de la rodilla y del tobillo (Fase E1), lo que permite que la pata se mueva hacia adelante preparando a la extremidad para soportar el peso del cuerpo y dar inicio a la fase de apoyo. Posteriormente, las articulaciones de la rodilla y tobillo se flexionan levemente, aun cuando los músculos correspondientes se encuentran en

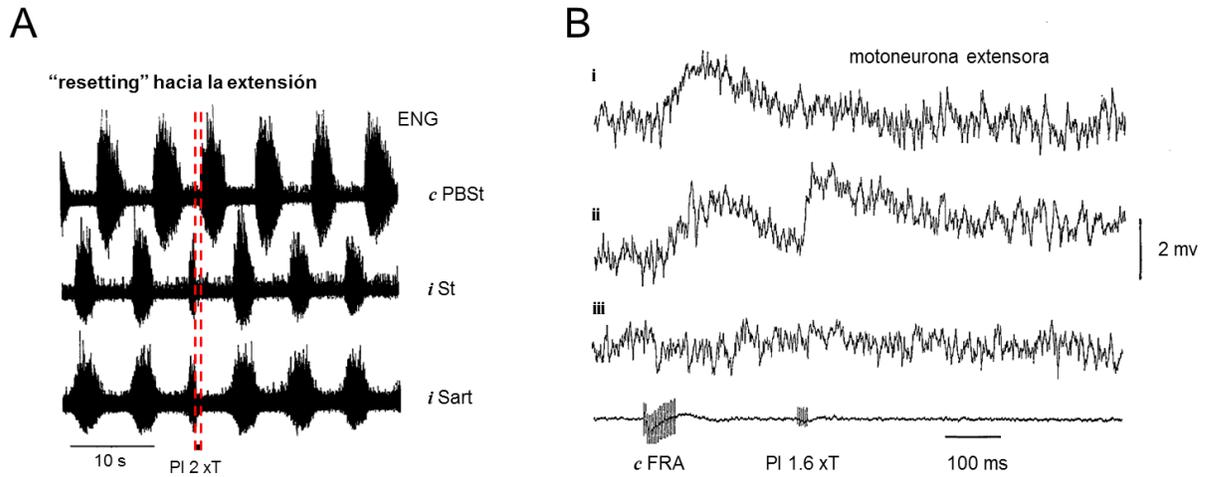
extensión. Ello se debe al “muelleo” que ocurre al soportar el peso del cuerpo en las extremidades. Al mismo tiempo, la articulación de la cadera empieza a extenderse (Fase E2), lo cual contribuye al equilibrio y soporte al cuerpo. Finalmente, durante la Fase E3 la fuerza de contracción sobre los músculos extensores de las tres articulaciones se incrementa, es decir, la extremidad se encuentra totalmente extendida para impulsar el siguiente paso (propulsión de la zancada), (Engberg y Lundberg, 1969; Grillner y Rossignol, 1978; Rossignol, 1996).

Sin embargo, para que el patrón motriz pueda ser adaptado al terreno, se requiere de la participación de la información sensorial, sobre todo de aquella proveniente de los músculos activos durante la locomoción. Desde hace décadas se han efectuado diversos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que integran la información propioceptiva y supraespinal para modular la actividad de los CPGs. Una de las principales funciones que se han atribuido a la información de las aferentes propioceptivas del grupo I es la regulación de la transición entre las fases de apoyo y balanceo de la locomoción. Forssberg y Grillner (1973) propusieron que la información propioceptiva de las extremidades activas durante la marcha en una banda sin fin en gatos espinalizados, puede modificar los patrones motrices y adaptar el ritmo locomotriz a las distintas velocidades de la banda. Posteriormente, Grillner y Rossignol (1978) observaron en gatos descerebrados que al mantener flexionada la articulación de la cadera en una extremidad posterior, se interrumpía la marcha en esa extremidad. En cambio, al extender la misma articulación en un ángulo mayor a 95°, la extremidad reanudaba la marcha, por lo que concluyeron que la información propioceptiva de la cadera era crucial para el inicio de la locomoción (específicamente, el inicio de la fase de balanceo). Por su parte, Duysens y Pearson (1980) observaron en el gato descerebrado con locomoción espontánea, que la extensión manual de la articulación del tobillo suprimía la marcha en esa extremidad, por lo que concluyeron que el inicio de la fase de balanceo, además de depender del ángulo de extensión de la articulación de la cadera, también depende de una disminución en la fuerza de contracción en los músculos extensores de la articulación de tobillo, (Duysens y Pearson, 1980).

Asimismo, observaron que al estirar brevemente los músculos del tríceps surae (extensores del tobillo) durante la locomoción, se producía un acortamiento de la fase flexora, mientras que con un estímulo más prolongado, la flexión se inhibía por completo. Lo anterior los llevó a suponer que la supresión de la flexión ejercida por un incremento de la fuerza de contracción en el músculo extensor del tobillo previene el inicio de la fase de balanceo cuando los músculos extensores se encuentran activos durante la fase de apoyo. Es decir, la información sensorial extensora regula la transición de la fase de apoyo a la fase de flexión (Duysens y Pearson, 1980).

En 1987, Conway y colegas observaron en el gato descerebrado y espinalizado con locomoción ficticia inducida por L- DOPA, que la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I durante la fase de flexión produce una supresión de la flexión en curso y una anticipación de la fase de extensión, es decir, un desacoplamiento del ritmo, o “*resetting*”, hacia la extensión, como se ilustra en la Figura 9A. Asimismo, a partir de registros intracelulares de motoneuronas extensoras, observaron que la estimulación de las fibras aferentes del grupo I producía EPSPs oligosinápticos, en lugar de la inhibición no recíproca que se registra en condiciones control. Encontraron, además, que la estimulación condicionante con un tren de pulsos a las FRA contralaterales producía una defacilitación de los EPSPs oligosinápticos, lo cual sugería una convergencia de ambas vías a nivel premotoneuronal, es decir, en el hemicentro extensor (ver Figura 9B). Estos mismos autores propusieron que el “*resetting*” hacia la extensión se debía a la activación de las fibras aferentes del grupo Ib, y no a las del grupo Ia, ya que el estiramiento de los músculos extensores producía un desacoplamiento del ritmo locomotriz, mientras que la estimulación mediante vibración del tendón de Aquiles (para activar solamente fibras Ia) no tenía ningún efecto (Conway et al., 1987). Con base a los datos anteriores, Conway y colegas concluyeron que las fibras aferentes del grupo Ib son las responsables de los cambios en la temporalidad del ritmo de la locomoción, es decir, del “*resetting*” hacia la extensión. Por consiguiente, las aferentes del grupo Ib tendrían un acceso directo al generador del

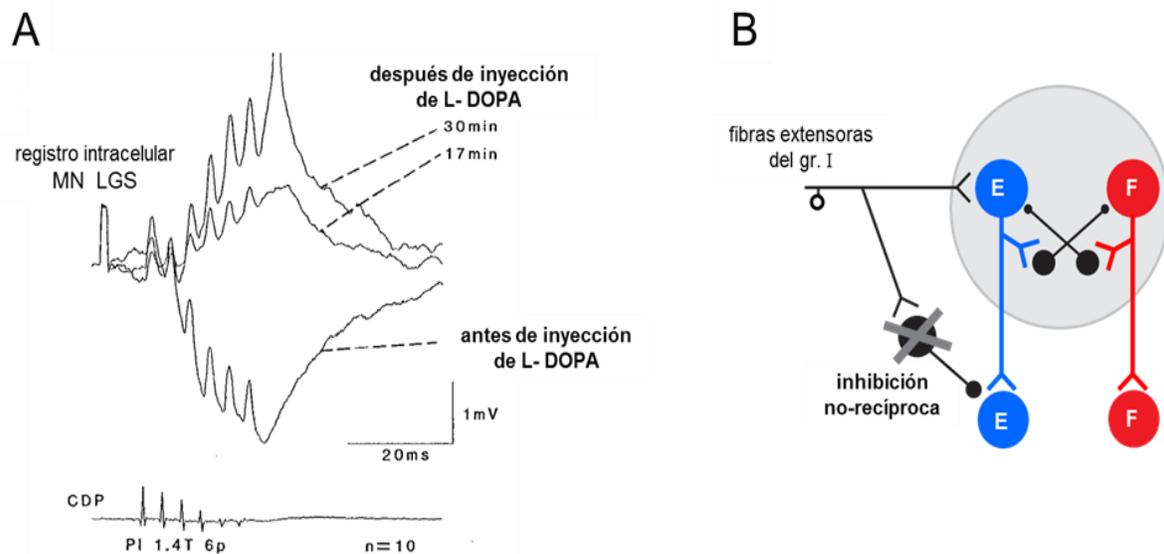
ritmo (RG) del CPG (Conway et al., 1987). Además, Pearson y Collins (1993) encontraron que durante la locomoción inducida por clonidina en gatos descerebrados, la estimulación eléctrica de las aferentes extensoras del grupo Ib incrementaba la actividad de otros nervios extensores; mientras que en ausencia de la actividad locomotriz la activación de las fibras Ib producía una reducción en la descarga de los mismos (Pearson y Collins, 1993). Debido a lo anterior, los autores propusieron que las fibras aferentes del grupo Ib tienen la capacidad de excitar al RG del hemicentro extensor durante la locomoción, lo que implica que la información que proviene de dichas fibras refuerza la actividad de los músculos extensores, y por ende la fase de apoyo (Pearson y Collins, 1993).



**Figura 9. Durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA la estimulación de las aferentes musculares del grupo Ib produce un “resetting” hacia la extensión. A**, de arriba abajo, electroneurogramas (ENG) de los nervios bíceps posterior y semitendinoso contralateral (*cPBSt*), semitendinoso ipsilateral (*iSt*) y sartorio ipsilateral (*iSart*). La estimulación del nervio plantaris (PI) con una intensidad 2 xT durante la fase de flexión, interrumpe de manera abrupta la flexión en curso y adelanta la extensión subsiguiente (líneas rojas punteadas), es decir, produce un “resetting” hacia la extensión. **B**, registro intracelular de una motoneurona extensora al estimular las FRA contralaterales (*cFRA*, trazo *i*), al estimular el nervio PI con una intensidad 1.6 xT precedido de una estimulación condicionante a *cFRA* con el intervalo indicado (trazo *ii*), y al estimular el nervio PI únicamente (trazo *iii*). Se puede observar que la estimulación del nervio PI no produce ninguna respuesta. Sin embargo, al preceder con un estímulo condicionante a las *cFRA*, se produce una facilitación de los EPSPs en la motoneurona registrada. Conway *et al.*, 1987.

En un estudio realizado por el grupo de Pearson (Pearson *et al.*, 1992) se describió que la activación de las aferentes del grupo I provenientes de nervios extensores del tobillo produce una sincronización (“entrainment”) del ritmo locomotriz acoplado a la frecuencia de estimulación, durante la locomoción ficticia inducida por clonidina en el gato espinalizado. En efecto, los autores observaron que la estimulación eléctrica de los nervios extensores, así como el estiramiento rítmico (pulsos de 10 N/ 500 ms) de los músculos extensores del tobillo (tríceps surae) generaba una actividad electromiográfica en los músculos extensores en fase con la extensión (Pearson *et al.*, 1992). Con base en los resultados de los grupos de Pearson y Conway se puede inferir que las aferentes extensoras del grupo Ib tienen acceso al generador del ritmo del CPG de la locomoción y juegan un papel fundamental en la regulación de la temporalidad del ciclo locomotriz.

Es evidente que la información propioceptiva proveniente de los músculos extensores modula el ritmo de la locomoción. Sin embargo, aún no se ha logrado descifrar con certeza cuáles son las vías interneuronales implicadas. En 1994 Gossard y colaboradores (Gossard et al., 1994) reportaron que durante la locomoción ficticia en el gato, la activación de las aferentes del grupo I provenientes de nervios extensores del tobillo produce EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas extensoras. Además, observaron que la inhibición disináptica no recíproca clásica, registrada en condiciones de reposo, se suprimía; es decir, había una reversión de la inhibición hacia una excitación (ilustrado en Figura 10). Se propuso que la reversión de una retroalimentación negativa hacia una retroalimentación positiva reforzaría la fase de apoyo en curso permitiendo mantener el equilibrio durante la marcha. Similarmente a lo observado por Conway y colegas (Conway et al., 1987), estos autores observaron que al aplicar un tren de estímulos a las aferentes del grupo Ib durante la fase de flexión se producía un “*resetting*” hacia la extensión (Gossard et al., 1994).



**Figura 10. Supresión de la inhibición no recíproca y surgimiento de una excitación oligosináptica al estimular aferentes musculares del grupo Ib durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA en el gato. A, trazos superiores,** PSPs registrados en una motoneurona extensora (MN LGS), antes y 17 y 30 min después de la administración de L-DOPA, como se indica. *Trazo inferior,* salva aferente registrada en el dorso de la médula espinal (CDP). El nervio plantaris (PI) se estimuló con un tren de 6 pulsos con una intensidad 1.4 xT. Nótese que previamente a la inyección i.v. de L-DOPA se producen potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) correspondientes a la inhibición no recíproca, mientras que después de la L-DOPA el mismo estímulo genera EPSPs oligosinápticos y una supresión aparente de la inhibición no recíproca. **B,** esquema que representa los resultados en A, es decir, la activación de una vía interneuronal excitadora que forma parte del CPG extensor (en azul) y la supresión de la inhibición no recíproca por algún mecanismo desconocido. *Adaptada de Gossard et al. 1994.*

Mediante el registro extracelular de interneuronas en el núcleo intermedio de la médula espinal, estos autores observaron que algunas de ellas respondían a la estimulación de las fibras aferentes del grupo Ib y de las FRA contralaterales, y que disparaban repetitivamente durante la fase de extensión (Jankowska et al., 1967 a y b; Gossard et al., 1994). Estos hallazgos los llevó a proponer que existe una vía interneuronal que es modulada por la información sensorial transmitida por las aferentes Ib y por las FRAs contralaterales, y que las interneuronas de esta vía forman parte del RG del hemicentro extensor del CPG de la locomoción, ya que su activación produce una regulación del ritmo locomotriz (Gossard et al., 1994).

Más tarde, Whelan et al. (1995) observaron en el gato descerebrado con locomoción espontánea en una banda sin fin que la estimulación eléctrica de las aferentes del grupo Ib de los músculos extensores del tobillo prolongaba la fase de extensión e inhibía la fase de flexión, es decir, se producía un “resetting” hacia la extensión. Además, concluyeron que la señal que determinaba el inicio de la fase de balanceo era una disminución en la actividad de los músculos extensores al final de la fase de apoyo (Whelan, et al., 1995).

Con base a lo descrito anteriormente, se puede decir que, en efecto, la activación de las aferentes del grupo Ib provenientes de músculos extensores puede modular la temporalidad del ciclo locomotriz y la transición entre las fases de apoyo y de balanceo. Sin embargo, ello no descarta que las fibras aferentes provenientes del huso muscular también puedan regular el ritmo y el patrón motriz de la locomoción. A este respecto, Guertin et al. (1995), mostraron en el gato descerebrado con locomoción ficticia inducida por la estimulación de la MLR, que la activación selectiva de las aferentes extensoras del grupo Ia a través del estiramiento muscular durante la fase de extensión produce un incremento en la amplitud de la descarga extensora y una prolongación de la misma, fenómeno conocido como “*extension enhancement*”, sin cambios en la temporalidad del ritmo (Guertin et al., 1995). Estos efectos ocurrieron de igual manera al aplicar un estímulo eléctrico sobre las aferentes primarias extensoras del tobillo durante la extensión. Asimismo, estos autores también observaron un “*resetting*” hacia la extensión (Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Whelan et al., 1995) al estimular con un tren de pulsos las fibras Ib del tobillo durante la fase de flexión. No obstante, la activación de las aferentes primarias extensoras de las articulaciones de la cadera y la rodilla, durante la fase de extensión fue menos efectiva para producir “*extension enhancement*”, y no produjo un “*resetting*” hacia la extensión (Guertin et al., 1995).

Si bien aparentemente la influencia que ejercen las fibras aferentes flexoras del grupo I sobre la generación del ritmo locomotriz es menor que aquella que proviene de las aferentes extensoras del grupo I, existe evidencia de que las

aferentes flexoras del grupo II pueden modular el ciclo locomotriz. Durante la locomoción ficticia inducida por la activación de la MLR en gatos descerebrados, se ha descrito que las aferentes del grupo II provenientes del huso muscular posiblemente modulan los ciclos locomotrices mediante la activación de interneuronas del núcleo intermedio, que a su vez proyectan de manera directa a los núcleos motores (Perreault et al., 1995). En efecto, Perreault y colegas observaron que la estimulación de las aferentes del grupo II de nervios flexores durante la fase flexión, suprimía la misma y facilitaba el inicio de la extensión subsiguiente, es decir un “resetting” hacia la extensión. Mientras que la activación de estas fibras durante la fase de extensión, no producía cambios en el ritmo locomotriz. Lo anterior sugiere que la información proveniente de las aferentes flexoras del grupo II tiene acceso a los CPGs, en particular al RG, ya que puede modular el ritmo locomotriz (Perreault et al., 1995).

A su vez Hiebert et al. (1996) investigaron la participación de las aferentes flexoras del grupo I en la modulación del ciclo locomotriz. Observaron que la estimulación de las aferentes del grupo I de nervios provenientes de músculos flexores de la cadera promueve la fase de balanceo y produce una reducción de la fase extensora. En el gato descerebrado con locomoción espontánea, la activación de aferentes flexoras del grupo I por estiramiento durante la fase de apoyo, interrumpía la extensión en curso y adelantaba la flexión subsiguiente. Además, la activación de aferentes flexoras del grupo I acortó la flexión contralateral con el correspondiente adelanto de la extensión. No obstante, al estimular eléctricamente las fibras flexoras durante la extensión, estos autores observaron que tanto las fibras aferentes flexoras del grupo I como las del grupo II producían un desacople del ritmo de la locomoción favoreciendo la flexión. Estos resultados los llevaron a concluir que las aferentes de los grupos Ia y II provenientes de músculos flexores promueven la activación del hemicentro flexor con la consecuente inhibición del hemicentro extensor (Hiebert et al., 1996).

Posteriormente, Stecina et al. (2005) observaron en el gato con locomoción ficticia inducida por la estimulación de MLR, que efectivamente la activación de las aferentes flexoras genera “*resetting*” hacia la flexión, pero además puede producir un “*extension enhancement*”. No obstante, este fenómeno es mucho más complejo que el “*resetting*” hacia la extensión. Observaron que al aplicar un tren de pulsos a las fibras de los grupos I y II de nervios flexores de la articulación del tobillo, durante la flexión, se produjeron dos fenómenos: i) un adelanto del inicio de la flexión, una prolongación de la misma y por ende el retraso de la extensión subsiguiente o ii) un “*resetting*” hacia la extensión. El contraste de estos efectos parecía depender del nervio estimulado (TA vs EDL) (Stecina et al., 2005) y de las fibras aferentes activadas; es decir, que la activación de las fibras flexoras del grupo I producía un “*resetting*” hacia la flexión (Hiebert et al., 1996; Stecina et al., 2005), mientras que la activación de aferentes flexores del grupo II, generaba un “*resetting*” hacia la extensión (Perreault et al., 1995; Stecina et al., 2005).

Las aferentes cutáneas, articulares, musculares de alto umbral o FRAs pueden también modular la actividad de los CPGs. De hecho, Lundberg propuso que estas fibras tienen acceso a los CPGs en la médula espinal (Lundberg 1979). En efecto, más recientemente Schomburg et al. (1998) reportaron que las FRAs son capaces de modificar el ritmo locomotriz, y que esta regulación depende de la fase en la cual se hayan activado dichas fibras. Observaron que la estimulación de las FRAs al inicio de la flexión acortaba la duración de la misma, adelantando la extensión, es decir, produciendo un “*resetting*” hacia la extensión, tal y como lo describieron Conway y colegas (1987). Mientras que al activar las FRAs en la etapa intermedia de la flexión, ésta se interrumpía transitoriamente con un adelanto de la extensión. Por último, si la estimulación de las FRAs ocurría al final de la flexión, ésta se suprimía por completo. Con base a estos resultados, Schomburg y colegas (1998) concluyeron que tanto las FRAs como las fibras Ib de músculos extensores deben tener acceso al generador del ritmo, lo que probablemente involucre una interacción entre ambos grupos de fibras, como lo han propuesto Gossard y colaboradores (1994).

En resumen, de acuerdo a lo demostrado por Grillner y Rossignol (1979), la información propioceptiva de la articulación de la cadera es esencial para dar inicio a la fase de balanceo. Con base a los experimentos de Duysens y Pearson (1980) se puede decir que la disminución en la fuerza de contracción de los músculos extensores facilita el comienzo de la locomoción. Es decir, la información de los músculos en movimiento regula la transición entre las fases de apoyo y de balanceo. Además, esta información también puede modificar y modular la temporalidad de del ciclo motriz, y por ende tiene acceso al generador del ritmo. Por ejemplo, la activación de las fibras aferentes extensoras provenientes del órgano tendinoso de Golgi (Ib) suprime la flexión en curso y facilita la extensión generando un “*resetting*” hacia la extensión (Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Whelan et al., 1995). La estimulación de las aferentes del grupo II de nervios flexores produce un “*resetting*” hacia la extensión (Perreault et al., 1995; Schomborg et al., 1998; Stecina et al., 2005), en contraste a la activación de las fibras flexoras del grupo I, que generan un “*resetting*” hacia la flexión (Hiebert et al 1996; Stecina et al., 2005).

Finalmente, debido a que se ha demostrado que la estimulación tanto de las aferentes del grupo Ib, como del grupo I y II de músculos flexores modula los patrones motrices generando un “*enhancement*”, las fibras aferentes de las extremidades en movimiento también tendrían acceso a la red formadora de patrones.

### **2.5.2. Papel de las aferentes cutáneas en la modulación de la locomoción**

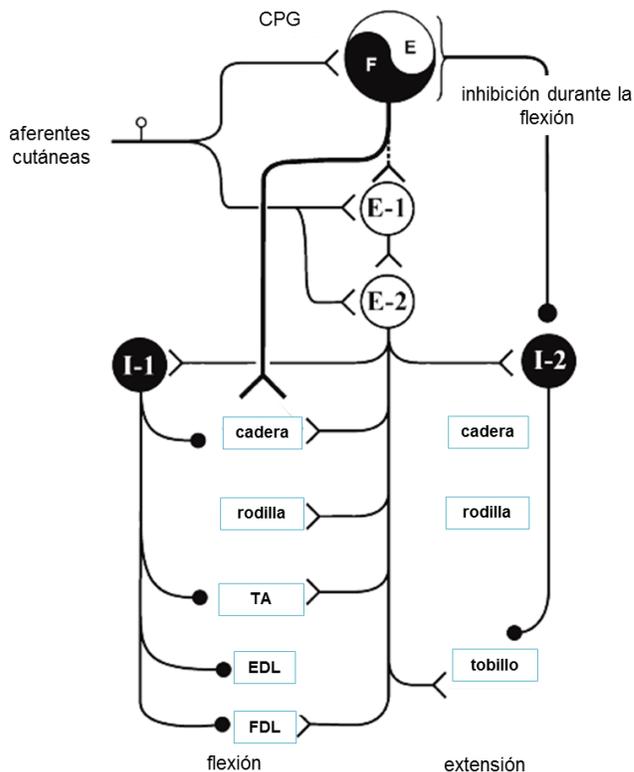
Desde los estudios de Sherrington, se ha observado que la estimulación cutánea de una extremidad puede generar reflejos extensores en animales en reposo. De hecho, con base a sus observaciones propuso que la información sensorial cutánea refuerza la fase de apoyo durante la marcha (Sherrington, 1906; citado de Duysens y Pearson, 1976). Años más tarde, Forssberg y colegas (Forssberg et al., 1975) demostraron que, en efecto, la información transmitida por

las aferentes cutáneas está involucrada en la modulación de las fases de balanceo y apoyo de la locomoción, y que dicha información puede modificar incluso la frecuencia de la actividad locomotriz. Estos autores demostraron en gatos espinalizados a nivel torácico bajo, que la locomoción variaba de una simple marcha al galope, en respuesta a la velocidad de la banda sin fin. Además, cuando el dorso de una pata se expuso a un estímulo táctil, se producía un incremento en la flexión durante la fase de balanceo con la finalidad de evitar el obstáculo. Cuando el estímulo táctil en el dorso de la pata se aplicó durante la fase de apoyo, observaron en este caso un incremento en la actividad de los músculos extensores, seguido de una flexión, a fin de mantener el equilibrio y evitar el tropiezo. Estos datos los llevaron a concluir que existe una inversión de los reflejos o “reflex reversal” que depende de las fases de la locomoción en la cual se presente el obstáculo (Forssberg et al., 1975). Posteriormente, Duysens y Pearson estudiaron en gatos talámicos el efecto de la activación de aferentes cutáneas sobre los ciclos locomotrices. Observaron que la estimulación eléctrica de la superficie plantar de la pata del gato producía un reflejo extensor en el animal en reposo, y que el mismo estímulo aplicado durante la fase de apoyo generaba un incremento de la extensión; mientras que durante la fase de balanceo se producía un incremento en la flexión (Duysens y Pearson, 1976), apoyando los estudios previos de Forssberg y colegas.

La información proveniente de las aferentes cutáneas es crucial para adaptar los movimientos locomotrices en respuesta a un obstáculo y así evitar un tropiezo. A finales de los 70's Forssberg describió en gatos intactos que al estimular el dorso de la pata con una varilla o dar un ligero soplido se producían movimientos compensatorios para no perder el equilibrio durante la marcha. Forssberg denominó a esta serie de reflejos como la “reacción correctiva del tropiezo”, la cual se caracteriza: i) por una descarga de corta latencia en los músculos flexores al presentarse un obstáculo en el dorso de la pata durante la fase de balanceo, evitando así el tropiezo; ii) una supresión de la actividad locomotriz, seguida de una descarga en los músculos extensores y un incremento de la actividad flexora durante la fase de balanceo subsiguiente (Forssberg, 1979). Estos resultados

indican que los animales intactos pueden compensar rápidamente la presencia de perturbaciones durante la marcha, es decir, el reflejo correctivo del tropiezo adapta los movimientos que integran la actividad locomotriz (Forssberg, 1979).

Más tarde, McCrea y su grupo estudiaron los mecanismos involucrados en la reacción correctiva al tropiezo en el gato descerebrado con locomoción ficticia inducida por la estimulación de la MLR. Observaron que al estimular las fibras de bajo umbral del nervio peroneo superficial (SP), que inerva la superficie dorsal de la pata, durante la fase de flexión se producía una excitación breve registrada en los nervios flexores de la articulación del tobillo, seguida de una inhibición; no obstante, los nervios flexores de la rodilla se activaban en fase con los nervios extensores del tobillo. Una vez terminada la estimulación eléctrica del nervio SP, se observó una descarga prolongada en los nervios flexores del tobillo (Quevedo et al., 2005 a). Cuando se estimuló el nervio SP durante la fase de extensión, se generó una descarga más prolongada en los nervios extensores de la articulación del tobillo y se incrementó la actividad en los nervios flexores. Este patrón de actividad electroneurográfica coincide con lo que ocurre con el animal intacto (Forssberg, 1979; Quevedo et al., 2005 a). La inhibición de la flexión durante la estimulación del nervio SP y el incremento ulterior de la actividad flexora después del estímulo, sugiere que las aferentes cutáneas del nervio SP tienen acceso al hemicentro flexor del CPG (Quevedo et al., 2005 a). Por otra parte, ya que la activación de las fibras aferentes cutáneas del nervio SP producían una facilitación de la extensión, pero sin un desacoplamiento del ritmo, se propuso que estas fibras no tienen acceso al hemicentro extensor del CGP (Quevedo et al., 2005 a).



**Figura 11. Vías neuronales implicadas en la reacción de corrección del tropiezo durante la locomoción ficticia en el gato al estimular fibras aferentes cutáneas.** En el esquema se muestra el acceso directo de las fibras cutáneas (del nervio SP) al CPG de la locomoción. Las aferentes proyectan a una red premotoneuronal de interneuronas excitadoras (E-1 y E-2), las cuales activan las motoneuronas flexoras de la cadera, rodilla y tobillo, seguida de una inhibición de las motoneuronas flexoras de las articulaciones de la cadera y tobillo a través de la activación de una interneurona inhibidora (I-1). Las interneuronas excitadoras sólo activan las motoneuronas extensoras de la articulación del tobillo. La activación de las aferentes del nervio SP durante la flexión desinhibe a las motoneuronas extensoras del tobillo al inhibir la interneurona inhibidora I-2. (Modificada de Quevedo et al., 2005 b).

En la Figura 11 se muestra la posible organización de la vía neuronal que media la reacción de corrección al tropiezo, así como la participación de la información cutánea y sus efectos en el hemicentro flexor del CPG. Con base a registros intracelulares de motoneuronas, Quevedo y colegas observaron que la estimulación del nervio SP durante la fase de flexión produce EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas flexoras de la articulación de la rodilla y ESPS oligosinápticos en las motoneuronas extensoras del tobillo, lo cual sugiere que probablemente no existe una interacción directa de estas aferentes con el hemicentro extensor del CPG. También observaron que durante la flexión, la activación del nervio SP produce un incremento de la excitación de las motoneuronas flexoras del tobillo, seguida de una inhibición de la misma (Quevedo et al., 2005 b). Como se ilustra en la Figura 11, las aferentes cutáneas que inervan el dorso de la pata tendrían acceso al hemicentro flexor del CPG, así como a interneuronas excitadoras (E1 y E2), que

a su vez hacen conexión con motoneuronas flexoras de la articulación de la cadera, rodilla y tobillo. Las motoneuronas flexoras de la cadera y tobillo, pero no de la rodilla, también recibirían proyecciones de interneuronas inhibitorias (I-1), con excepción de las motoneuronas flexoras de la rodilla. Además, las interneuronas excitadoras E1 y E2 activadas por aferentes cutáneas del dorso de la pata proyectarían a interneuronas inhibitorias (I-2) encargadas de desinhibir las motoneuronas extensoras del tobillo durante la flexión, logrando así el reflejo de corrección del tropiezo para adaptar los movimientos locomotrices en respuesta a un obstáculo (Quevedo et al., 2005 b).

Hasta el momento, podemos decir que la información sensorial propioceptiva que proviene de fibras aferentes musculares y cutáneas, así como la información sensorial transmitida por las FRAs, puede modular el patrón y ritmo locomotrices, regulando la transición entre las fases de apoyo y balanceo. Todo ello con la finalidad de adaptar los patrones motrices al entorno.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la médula espinal existe un circuito neuronal denominado Generador Central de Patrones (CPG), capaz de producir la actividad locomotriz rítmica y alternante entre las fases de flexión y extensión de la locomoción. A pesar de la evidencia de que el CPG de la locomoción puede funcionar en ausencia de la información sensorial y supraespinal, se sabe que dicha información puede controlar la actividad del CPG para producir un patrón motriz apropiado a la postura del cuerpo y a las condiciones del entorno (Rossignol, 1996).

Estudios en gatos han revelado que la información sensorial propioceptiva de las extremidades en movimiento, sobre todo aquella transmitida por las aferentes del grupo Ib proveniente de los órganos tendinosos de Golgi (sin descartar la información sensorial generada en los husos musculares) regula la transición entre

la fase de apoyo (al final de la propulsión) y el inicio de la fase del balanceo (inicio del paso, o zancada) (Whelan et al., 1995). Durante la locomoción ficticia inducida por L- DOPA, la estimulación eléctrica de las fibras aferentes extensoras del grupo I, durante la fase de flexión, produce un desacoplamiento del ritmo de la locomoción al suprimir la flexión en curso y promoviendo la extensión (“resetting” hacia la extensión) (Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Hultborn et al., 1998; Schomburg et al., 1998). Es decir, se interrumpe la fase de balanceo para iniciar una nueva fase de apoyo. El sistema nervioso interpreta la información sensorial extensora transmitida por las aferentes musculares de grupo Ib como un incremento en la carga (fuerza de contracción) de los músculos extensores antigravitatorios que soportan el peso del cuerpo, y la necesidad de mantener la fuerza en los mismos para no perder el equilibrio (Pearson & Collins, 1993; Pearson 2008). Dicho de otra manera, durante la locomoción la información sensorial transmitida por las fibras aferentes Ib se transforma en un sistema de retroalimentación positiva de fuerza. Sin embargo, en condiciones de reposo la estimulación de las fibras extensoras Ib producen una inhibición (inhibición no-recíproca, o autogénica) en las motoneuronas extensoras, conformando un sistema de retroalimentación negativa (Baldissera et al., 1981). Hasta el momento se desconoce la naturaleza de las interneuronas involucradas en el “resetting” hacia la extensión (ver Gossard et al, 1994). La hipótesis es que estas interneuronas forman parte del generador del ritmo (RG) extensor de la locomoción, las cuales son activadas por las fibras aferentes Ib.

Por consiguiente, en el presente proyecto nos hemos propuesto identificar mediante técnicas electrofisiológicas las interneuronas implicadas en la regulación del ritmo locomotriz al estimular fibras aferentes extensoras del grupo I en la preparación del gato descerebrado con locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA.

### **3.1. Relevancia del proyecto**

El estudio del “resetting” puede servir como una herramienta para dilucidar las vías interneuronales entre las fibras aferentes y las motoneuronas, que operan durante la locomoción. La caracterización de las interneuronas implicadas en el “resetting” nos permitirá identificar elementos pertenecientes al generador del ritmo de la locomoción.

Unas de las consecuencias de las lesiones espinales son la espasticidad y la hiperreflexia. Se sabe que el entrenamiento y el ejercicio de los músculos por debajo de la lesión espinal, así como la estimulación eléctrica funcional de los mismos, reducen la espasticidad e hiperreflexia, y en pacientes con secciones espinales incompletas se favorece la recuperación de los movimientos voluntarios y de la marcha ([Rossignol et al., 2015](#)). Estas observaciones sugieren que con estas estrategias terapéuticas las vías interneuronales activadas por la información sensorial están sujetas a cambios plásticos importantes. Por consiguiente, el estudio de la organización de estas vías neuronales tiene implicaciones clínicas relevantes.

## **4. HIPÓTESIS**

Las interneuronas que median los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) oligosinápticos, producidos por la estimulación de fibras aferentes musculares extensoras del grupo I durante la locomoción ficticia en el gato, producen el desacoplamiento o “resetting” del ritmo locomotriz hacia la extensión.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Identificar las interneuronas implicadas en el desacoplamiento o “resetting” hacia la extensión durante la locomoción ficticia en el gato inducida por L-DOPA con base a una serie de criterios establecidos.

### 5.2. Objetivos particulares

1. Desarrollar la preparación del gato descerebrado con la médula espinal cervical (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) y lumbosacra (T<sub>12</sub>- L<sub>7</sub>) expuestas mediante una laminectomía y con nervios periféricos disecados.
2. Inducir la locomoción ficticia mediante la inyección de nialamida y L-DOPA en el gato descerebrado y espinalizado a nivel cervical alto.
3. Determinar la expresión de los EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I y registrados intracelularmente en motoneuronas extensoras de la articulación del tobillo (PI, GS y FDHL) durante la locomoción ficticia.
4. Registrar la actividad extracelular de interneuronas activadas rítmicamente durante la locomoción ficticia, que cumplan con los siguientes criterios:
  - a. Actividad rítmica durante la fase de extensión.
  - b. Activación con una latencia mono, di o trisináptica por la estimulación de aferentes musculares extensoras del grupo I.
  - c. Ausencia de activación por la estimulación de los funículos dorsolaterales, tanto ipsi como contralaterales, para descartar: i) interneuronas de proyección hacia la médula espinal rostral y estructuras supraespinales y ii) interneuronas comisurales.
  - d. Activación polisináptica producida por la estimulación de aferentes de reflejo flexor (FRA) contralaterales.

- e. Activación antidrómica desde los núcleos motores extensores para determinar proyecciones monosinápticas con las motoneuronas extensoras, en el caso de las interneuronas de último orden.
- f. Generación de EFPs de signo negativo registrados en el núcleo motor, mediante la técnica de promediación disparada por la espiga de una sola interneurona (“spike triggered averaging” o STA, por sus siglas en inglés), para corroborar que se trata de interneuronas excitadoras.
- g. Activación de las interneuronas con el mismo patrón que el “resetting” hacia la extensión al estimular las fibras aferentes musculares extensoras del grupo I.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Preparación

Se utilizan gatos adultos de sexo indistinto, de 3-5 kg, los cuales se anestesian con isoflurano (1 – 1.5 %) en oxígeno. Para registrar la presión arterial, se disecciona la arteria carótida derecha y se cánula después de ligar el extremo distal. Posteriormente, se cánula la vena yugular izquierda para la administración de soluciones y fármacos. Al inicio de la cirugía se aplican por vía intravenosa: dexametasona (4 mg/ml), vitamina K (10 ml), 30 ml de solución salina (NaCl 0.9 %) y atropina por vía subcutánea (0.04 mg). Para mantener un equilibrio ácido-base y un aporte calórico adecuados se perfunde una solución de bicarbonato de sodio (100 mM) en solución glucosada al 5 %, a razón de 7 ml / h. A fin de inhibir a la enzima MAO que degrada las monoaminas, se aplica nialamida (50 mg/kg) por vía intravenosa en un periodo de 4 horas mediante una bomba de infusión continua.

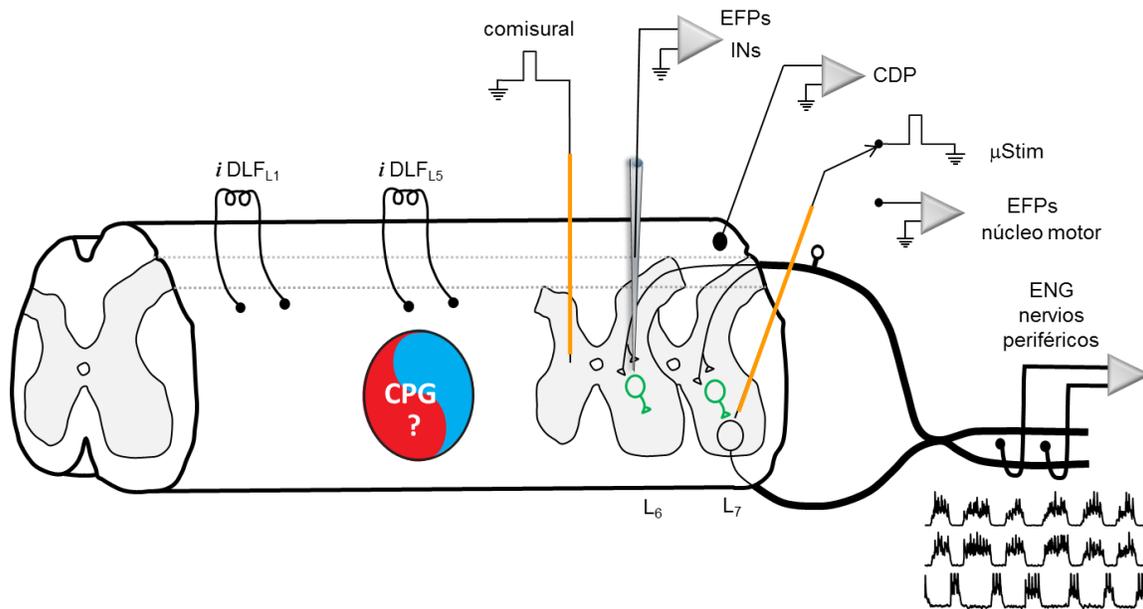
A continuación, se efectúa una traqueostomía para colocar una cánula y posteriormente conectar el respirador artificial, después de la descerebración y previamente a la parálisis del animal. Se disecan los nervios periféricos de la extremidad posterior ipsilateral de los músculos extensores: *Semimembranoso* y *Bíceps Anterior* (SmAB), *Gastrocnemio-Sóleo* (GS; gastrocnemio lateral, medial y

sóleo), *Plantaris* (PI), *Flexor Digitorum* y *Flexor Hallucis Longus* (FDHL); de los músculos flexores: *Tibial Anterior* (TA), *Extensor Digitorum longus* (EDL); del nervio bifuncional: *Bíceps Posterior* y *Semitendinoso* (PBSt) y los nervios cutáneos: *Sural* (SU) y *Peroneo Superficial* (SP). También se disecan algunos nervios de la extremidad posterior contralateral: GS, TA, SU y SP. Posteriormente, se exponen los segmentos espinales torácicos bajos y lumbosacros (T<sub>12</sub>-L<sub>7</sub>) mediante una laminectomía. La preparación se transfiere a un estereotáxico para exponer la médula espinal cervical alta (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) y efectuar una craneotomía. Se procede a realizar una descerebración a nivel precolicular-postmamilar, removiendo el tálamo y la corteza cerebral. No es hasta entonces que se prescinde de la anestesia con isoflurano y la preparación se conecta a un respirador artificial previa paralización con bromuro de pancuronio (0.04 mg / h).

## **6.2. Estimulación y registro**

Se remueve la duramadre de la médula espinal lumbosacra y se efectúan pequeñas ventanas (parches) en la piamadre en aquellos sitios en donde se insertarán las micropipetas para registro y los electrodos de tungsteno (estimulación / registro) (ver Figura 12).

Los potenciales del dorso de la médula (CDPs) generados por la estimulación de los nervios periféricos se registran mediante un electrodo monopolar de plata en forma de esfera, colocado sobre la columna dorsal ipsilateral a nivel L<sub>7</sub>. Los nervios periféricos se montan en electrodos de plata bipolares en forma de gancho para su estimulación o registro. Para la estimulación se utilizaron pulsos únicos de 200  $\mu$ s de duración, o trenes de pulsos a una frecuencia de 300 Hz. La intensidad de estimulación se expresa en múltiplos del umbral de las fibras más excitables (xT), es decir, la intensidad que activa las fibras de menor umbral y que produce la salva aferente más pequeña en el dorso de la médula espinal.



**Figura 12. Arreglo experimental de la preparación del gato descerebrado y espinalizado con locomoción ficticia inducida por la administración i.v. de L-DOPA.** Se ilustran los electrodos de estimulación de los funículos dorsolaterales ipsilaterales ( $iDLF_{L1}$  y  $iDLF_{L5}$ ). Los correspondientes electrodos contralaterales no se muestran; el electrodo de tungsteno contralateral para la estimulación antidrómica de las interneuronas comisurales; la micropipeta de vidrio para registrar los EFPs o la actividad extracelular de las interneuronas (INs); el electrodo de plata en forma de esfera para registrar las salvas aferentes en el dorso de la médula (CDP); el electrodo de tungsteno colocado en el núcleo motor ipsilateral para registrar los EFPs ortodrómicos al estimular los nervios periféricos o los EFPs producidos por la actividad de una sola IN, así como para estimular antidrógicamente las INs de último orden; los electrodos que registran la actividad ENG en los nervios periféricos durante la locomoción ficticia inducida por la inyección i.v. de L-DOPA.

Con el fin de localizar los núcleos motores de los músculos extensores de la articulación del tobillo se inserta un electrodo de tungsteno monopolar a nivel L<sub>6</sub> caudal o L<sub>7</sub> rostral a través del funículo dorsolateral con un ángulo de  $\sim 20^\circ$ . Primeramente se registran los potenciales extracelulares de campo (EFPs) antidrómicos producidos por la estimulación de los nervios extensores, normalmente a una profundidad de 1.4 – 1.7 mm. Enseguida se aplican pulsos de estimulación con intensidades mínimas ( $< 10 \mu A$ ) a través del mismo electrodo y se registran los electroneurogramas (ENGs) en los nervios extensores (Figura 12).

Para localizar las proyecciones intraespinales de las fibras aferentes musculares extensoras se registran los EFPs ortodrómicos producidos por la estimulación de los nervios musculares extensores de la articulación del tobillo: PI, GS y FHD, con una intensidad 2 xT, con la cual se activan fibras aferentes del

grupo I. Los EFPs ortodrómicos se registran con micropipetas llenas con glutamato de sodio 3M y con una resistencia de 3 – 7 MΩ. El glutamato se utiliza para incrementar la actividad espontánea de las interneuronas al inyectar corriente negativa, si es necesario.

Con el objeto de descartar a las interneuronas comisurales que proyectan contralateralmente, se coloca un electrodo monopolar de tungsteno (0.1 MΩ) en la médula espinal contralateral a nivel L<sub>6</sub>-L<sub>7</sub> para activar antidrómicamente a dichas interneuronas. Asimismo, para verificar que las interneuronas registradas no poseen proyecciones ascendentes, se colocan electrodos de plata bipolares en los funículos dorsolaterales (DLFs) ipsi y contralaterales: *iDLF*<sub>L1</sub>, *iDLF*<sub>L4</sub>, *cDLF*<sub>L4</sub> y *cDLF*<sub>L5</sub>, para activar antidrómicamente los axones ascendentes de las interneuronas, con pulsos únicos de una intensidad < 40 μA (ver Figura 12).

### **6.3. Generación de la locomoción ficticia**

Antes de proceder a la inducción de la locomoción ficticia se efectúa una espinalización a nivel cervical alto (C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub>) con la finalidad de suprimir la inhibición tónica proveniente del tallo cerebral sobre las vías neuronales activadas por aferentes del reflejo flexor (FRA), previa aplicación intraespinal de lidocaína en el sitio de la sección. La locomoción ficticia se induce con la aplicación de dosis individuales de 50 mg/kg del metiléster de L-DOPA. En caso necesario se aplican dosis subsecuentes de este fármaco y además naloxona (1 mg/kg) o 4-aminopiridina (0.5 mg/kg). La locomoción ficticia se monitorea a partir de los electroneurogramas (ENGs) registrados en los nervios disecados con electrodos bipolares de plata en forma de gancho. Se utilizan amplificadores diferenciales AC con un ancho de banda de 30 Hz – 3 kHz.

#### **6.4. Registro intracelular de las motoneuronas y extracelular de las interneuronas**

En la primera serie de experimentos se registraron las motoneuronas extensoras con micropipetas de vidrio llenas con acetato de potasio 2 M y QX314 (100 mM) para bloquear los canales rápidos de sodio. Las micropipetas se insertaron sobre el funículo dorsolateral a nivel L<sub>6</sub>-L<sub>7</sub> con un ángulo de 20° en dirección medial (no ilustrado en la Figura 12). Las motoneuronas se identificaron antidrómicamente al estimular los nervios musculares extensores. Se registraron los EPSPs ortodrómicos evocados por la estimulación de los nervios extensores durante la locomoción ficticia. Los EPSPs que ocurrían durante la fase de flexión y de extensión fueron separados y promediados por medio del programa “Analysis” del Spinal Cord Research Centre de la Universidad de Manitoba, Canadá.

Para identificar aquellas interneuronas relacionadas con la locomoción (más específicamente las interneuronas activadas rítmicamente durante la fase de extensión), en otra serie de experimentos se registraron los EFPs por medio de una micropipeta de vidrio, llena con glutamato de sodio (3 M) y con una resistencia de 3 – 7 MΩ. La micropipeta se introdujo a través de la columna dorsal izquierda a nivel L<sub>6</sub> caudal o L<sub>7</sub> rostral, con un ángulo de 0-10° en dirección medial.

Primeramente se determinó si las interneuronas se activaban rítmicamente durante la fase de extensión. Enseguida se investigó si eran activadas por la estimulación de fibras aferentes extensoras del grupo I de los nervios *iGS*, *iPI* o *iFDHL*. Para examinar si las interneuronas registradas eran de último orden, se evaluó su activación antidrómica al estimular el núcleo motor a través del electrodo fino de tungsteno utilizado inicialmente para registrar los EFPs antidrómicos en el núcleo motor, aplicando un pulso único con una intensidad menor a 40 μA.

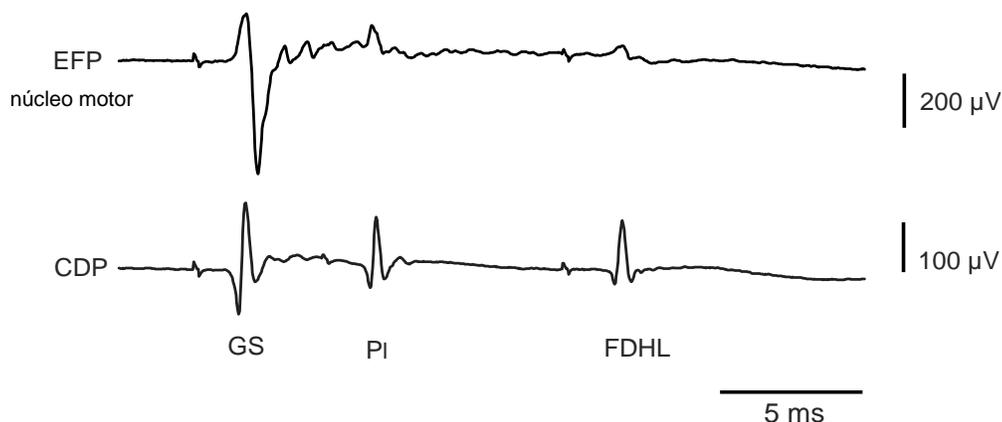
Para el registro de las motoneuronas e interneuronas se utilizó un amplificador de electrodos Axoclamp-2B (Molecular Devices) en modo de “bridge” con un ancho de banda DC-10 kHz y una frecuencia de muestreo de 30 kHz. Para

la captura y análisis de datos se utilizó una tarjeta Digidata 1322A y el programa pClamp10 (Molecular Devices).

## **7. RESULTADOS**

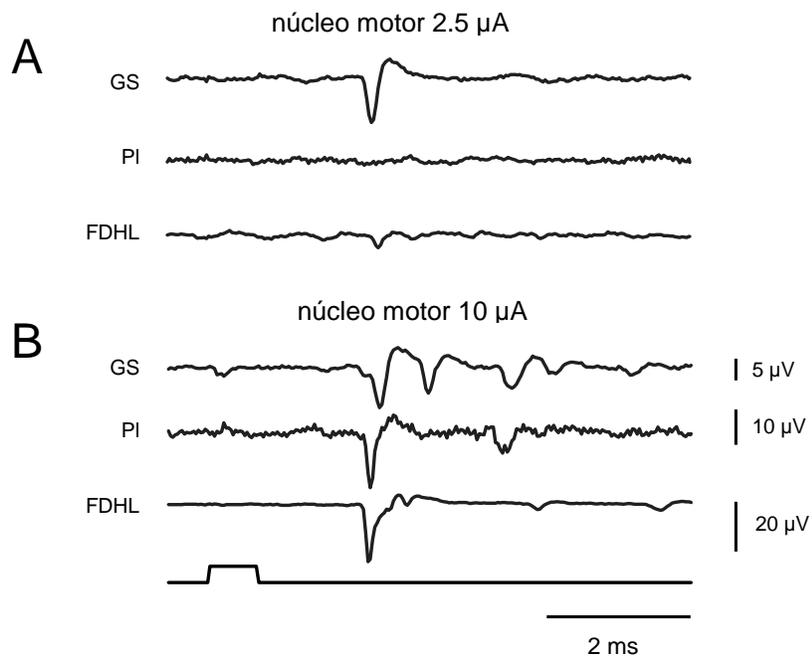
### **7.1. Registro en el núcleo motor de los EFPs producidos por la estimulación de nervios extensores de la articulación del tobillo**

Para localizar los núcleos de las motoneuronas extensoras, se registraron a través de un electrodo de tungsteno los EFPs antidrómicos producidos por la estimulación de nervios extensores. La Figura 13 muestra los EFPs producidos por la estimulación de los nervios extensores GS, PI y FDHL con una intensidad 2 xT a una profundidad de 1.8 mm. En este caso sólo se registraron EFPs al estimular el nervio GS. Considerando el inicio abrupto de los EFPs podemos establecer que son de naturaleza antidrómica y que el electrodo de tungsteno se localiza en el núcleo de las motoneuronas del GS. Subsecuentemente a los EPSPs puede notarse una oscilación de alta frecuencia característica de la activación de las interneuronas de Renshaw.



**Figura 13. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) antidrómicos producidos por la estimulación de nervios extensores.** *Trazo superior*, EFPs antidrómicos producidos por la estimulación de los nervios GS, PI y FDHL con una intensidad 2 xT a una profundidad de 1.8 mm a nivel L<sub>7</sub>. *Trazo inferior*, CDPs registrados en el dorso de la médula espinal a nivel L<sub>7</sub>. Los trazos representan el promedio de 48 barridos

Una vez localizados los EFPs antidrómicos de mayor amplitud, en este caso evocados por la estimulación eléctrica del nervio GS, se procedió a registrar los ENGs en los nervios extensores producidos al aplicar un pulso de microestimulación, a través del electrodo de tungsteno, en el mismo sitio donde se localizaron los EFPs antidrómicos de mayor amplitud (Figura 14). Se puede observar que la estimulación del núcleo motor con una intensidad de 2.5 μA (Figura 14A) sólo produjo actividad en el ENG del nervio GS. Sin embargo, al incrementar la intensidad de estimulación a 10 μA (Figura 14B), también se puede observar actividad ENG en los nervios PI y FDHL, posiblemente debido a la dispersión de corriente hacia un mayor número de núcleos motores. Los componentes de mayor latencia del nervio GS se deben quizás a la actividad sináptica subsecuente a la activación directa de las motoneuronas.

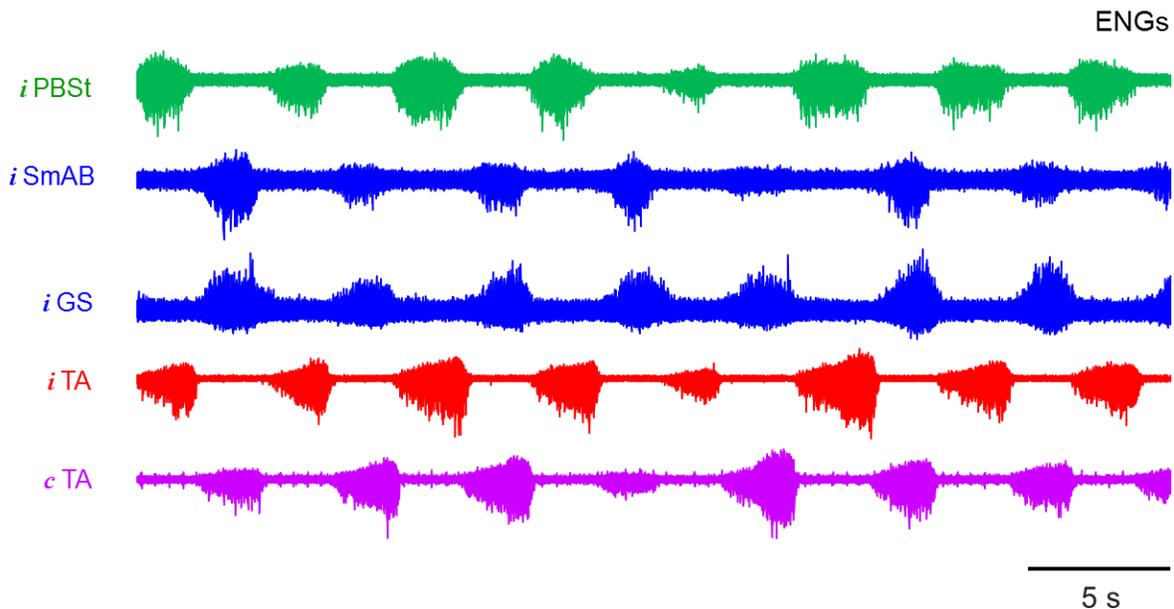


**Figura 14. Registro de la actividad ENG en los nervios extensores del tobillo al estimular en el núcleo motor. A,** ENGs registrados en los nervios extensores GS, PI y FDHL al estimular en el área del núcleo motor del GS con una intensidad de 2.5  $\mu\text{A}$ . **B,** mismo formato que en A, pero con una intensidad de estimulación de 10  $\mu\text{A}$ . El trazo inferior corresponde al el marcador del estímulo.

## 7.2. Locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA

Uno de los objetivos la presente tesis fue desarrollar la preparación de locomoción ficticia en el gato descerebrado y espinalizado a nivel cervical C<sub>1</sub> (ver métodos). En la Figura 15 se muestra un episodio de locomoción ficticia inducido por la administración de 100 mg/kg de L-DOPA, previa aplicación de nialamida (50 mg/kg). Se puede observar una actividad electroneurográfica rítmica y alternada entre nervios extensores (*iSmAB* y *iGS*) y flexores (*iTA*) ipsilaterales. Asimismo, se observa una alternancia entre la flexión ipsi y contralateral en los nervios *iTA* y *cTA*. En esta preparación el nervio bifuncional PBSt se comporta como flexor. Este patrón alternado y rítmico de la locomoción ficticia conserva las características de la locomoción espontánea observada en el gato descerebrado a nivel precolicular premamilar, así como de la locomoción generada por la estimulación de la MLR en

el gato descerebrado a nivel precolicular postmamilar, y de la locomoción real. No obstante, la locomoción inducida con L-DOPA tiende a ser más lenta, en este caso con una frecuencia de 0.2 Hz.



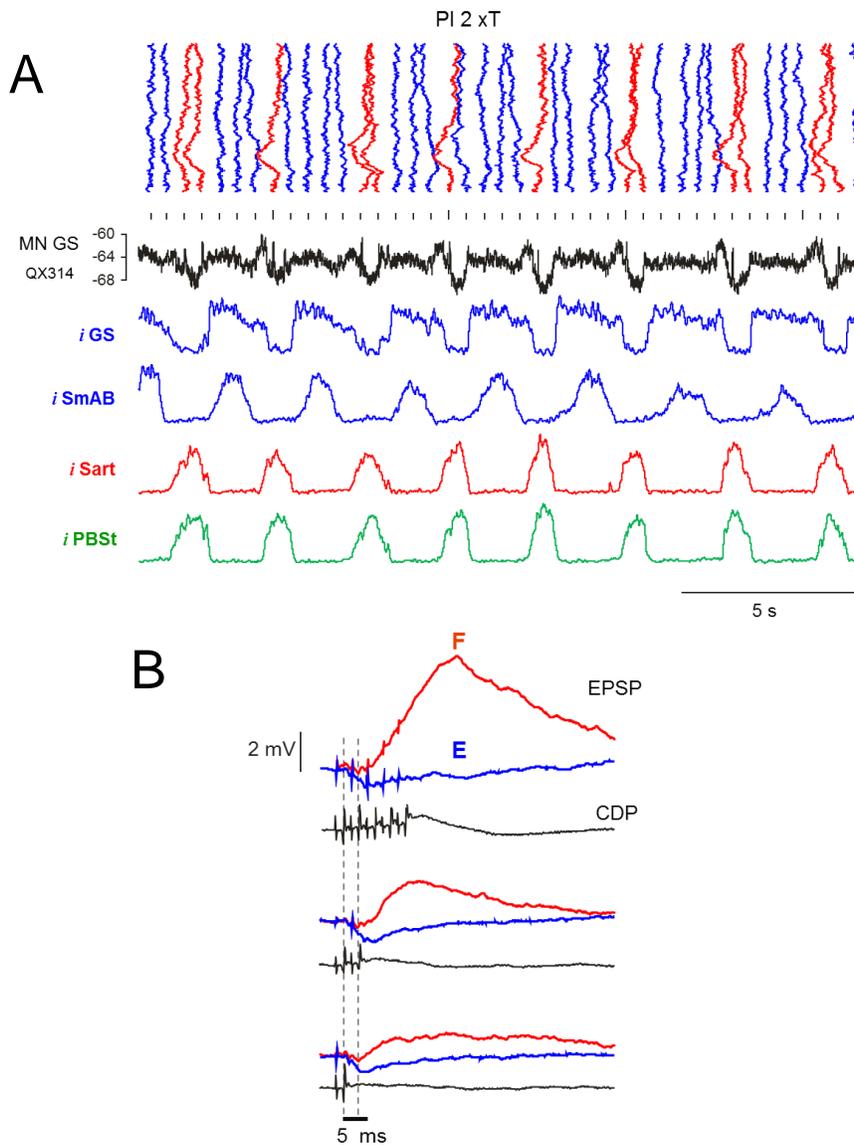
**Figura 15. Episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA.** De arriba abajo, ENGs crudos de los nervios musculares ipsilaterales *iPBSt* (bifuncional), *iSmAB* (extensor), *iGS* (extensor) e *iTA* (flexor), y del nervio flexor contralateral *cTA*, como se indica en el margen izquierdo. La frecuencia de la locomoción es de 0.2 Hz. Nótese la alternancia entre los nervios flexores y extensores, e ipsi y contralaterales.

### 7.3. EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I durante la locomoción inducida por L-DOPA

La Figura 16 muestra el registro intracelular de una motoneurona extensora del músculo GS y los ENGs simultáneos durante un episodio de locomoción ficticia. Se puede observar que la motoneurona exhibe oscilaciones rítmicas durante la fase de extensión, denominadas potenciales oscilatorios locomotrices o LDPs (“locomotor drive potentials”, por sus siglas en inglés). La motoneurona no generó potenciales de acción ya que la micropipeta contenía QX314, un bloqueador de los

canales rápidos de sodio. La estimulación del nervio extensor heterónimo PI con una intensidad  $2 \times T$  a una frecuencia de 2 Hz, produjo EPSPs oligosinápticos (desplegados de manera vertical) que se hacen más evidentes durante la fase de flexión (trazos en rojo, Figura 16A).

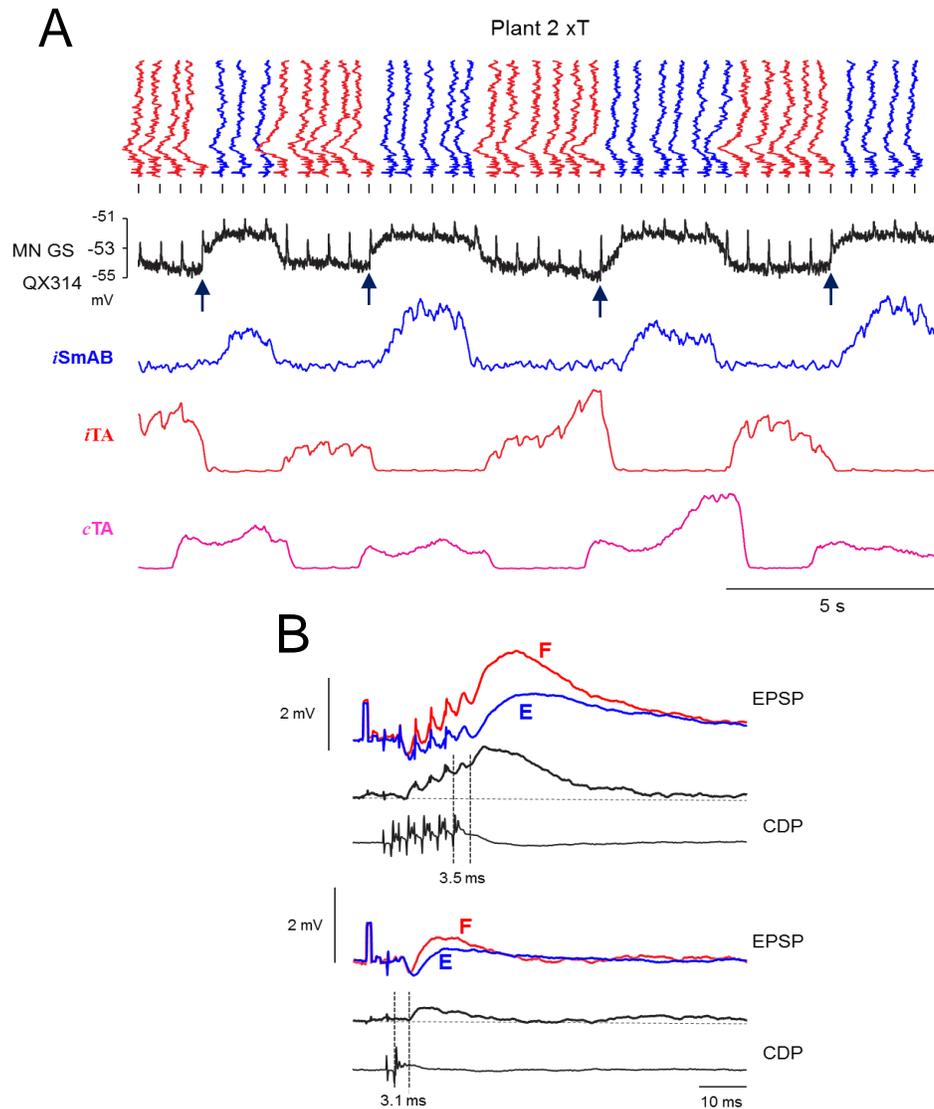
En la Figura 16B se muestran los EPSPs registrados en la misma motoneurona al estimular con 1, 2 y 5 pulsos el nervio extensor PI con una intensidad  $2 \times T$ . Los EPSPs se separaron en función de su ocurrencia durante las fases de flexión (en rojo) o extensión (en azul). La latencia estimada al inicio de los EPSPs fue de 3.5 ms, la cual es compatible con tres interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes del grupo I y las motoneuronas extensoras. Se puede notar claramente que los EPSPs son de mayor amplitud durante la fase de flexión. Durante la fase de extensión se registra una pequeña deflexión negativa, que posiblemente corresponde al EFP, ya que no se sustrajo el potencial extra del intracelular. Sin embargo, habría que descartar la presencia de IPSPs durante la extensión. La ausencia de EPSPs durante la fase de extensión podría deberse a: i) una oclusión con la despolarización que ocurre en la motoneurona durante la extensión o ii) una reducción de la fuerza impulsora debida a la despolarización, lo cual conduce a una reducción en la amplitud de los EPSPs.



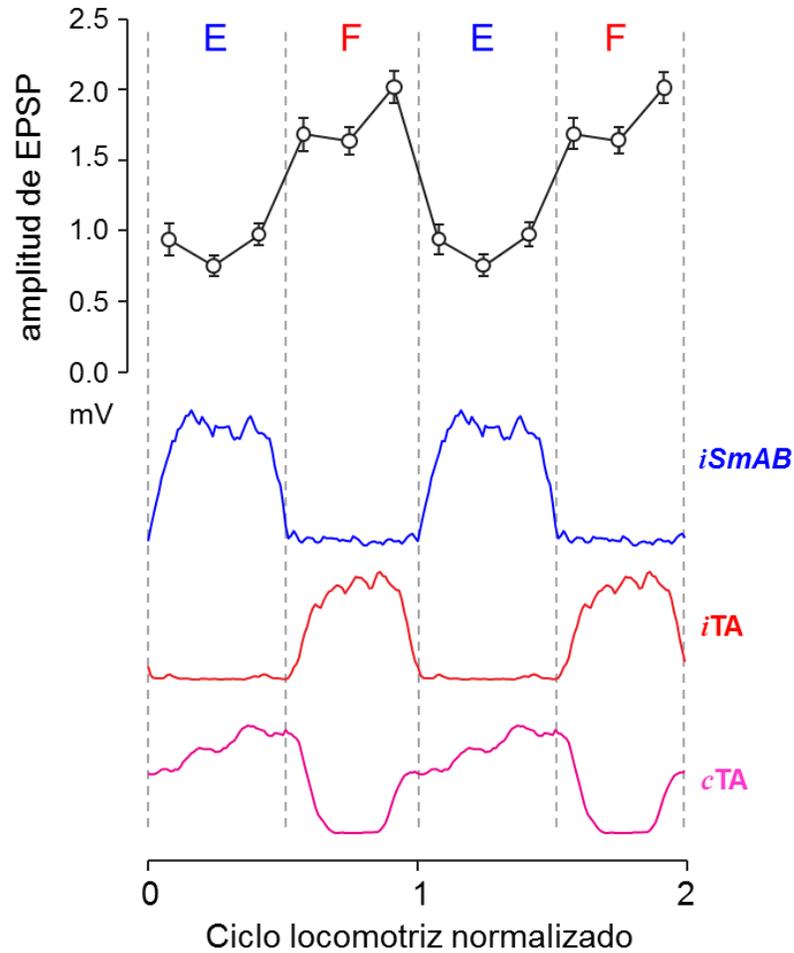
**Figura 16. Durante la locomoción ficticia la estimulación de aferentes extensores del grupo I produce EPSPs oligosinápticos.** **A**, trazos superiores, registro intracelular (desplegado vertical y horizontalmente) de una motoneurona extensora del GS. Los registros verticales se muestran con una base de tiempo más rápida. Las líneas verticales indican el marcador del estímulo aplicado al nervio PI con una intensidad 2 xT y una frecuencia de 2 Hz. Trazos inferiores, ENGs registrados en los nervios indicados durante un episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA. Nótese que la motoneurona exhibe oscilaciones rítmicas durante la locomoción en fase con el ENG del nervio GS. **B**, trazos superiores, EPSPs registrados en la misma motoneurona al estimular el nervio PI con 5, 2 y 1 pulso (2 xT, 2 Hz). Trazos inferiores, salva aferente registrada en el dorso de la médula espinal (CDP). Nótese que los EPSPs se expresan solamente durante la fase de flexión (F) y que al estimular con un mayor número de pulsos se produce una facilitación temporal. La latencia medida desde el pico del primer componente positivo de la salva aferente al inicio del EPSPs fue de 3.5 ms (líneas punteadas).

La Figura 17A ilustra el registro intracelular de otra motoneurona del músculo extensor GS durante un episodio de locomoción en un experimento diferente, con el mismo formato que la Figura 16. La latencia de los EPSPs producidos por la estimulación del nervio PI con una intensidad 2 xT osciló entre 3.1-3.5 ms, compatible con tres interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes del grupo I y las motoneurona (Figura 17B). En este caso es importante resaltar que los EPSPs oligosinápticos también se registraron durante la fase de extensión, aunque con una menor amplitud, es decir, no fueron completamente ocluidos. Lo cual indica que las fibras aferentes del grupo I del nervio PI son capaces de activar las interneuronas durante la fase de extensión. De hecho, la fase de extensión en la motoneurona se inicia con la generación de un EPSPs oligosináptico producido por la estimulación del nervio PI (flechas, Figura 17A).

En la Figura 18 se muestra una gráfica de la modulación dependiente del ciclo de locomoción sobre la amplitud de los EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación del nervio PI con una intensidad 2 xT (misma motoneurona de la Figura 18). Para este efecto, se separaron y promediaron los EPSPs que ocurrieron durante las fases de flexión y de extensión de los ciclos normalizados de un episodio de locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA. Se puede observar claramente que los EPSPs oligosinápticos tienen una mayor amplitud durante la fase de flexión que la de extensión. Es decir, existe claramente una modulación de los EPSPs dependiente de la fase del ciclo de la locomoción. La menor amplitud de los EPSPs durante la extensión refuerza la idea de una posible oclusión sináptica ya que las motoneuronas extensoras se encuentran despolarizadas, lo cual conduce a una reducción de la fuerza impulsora para generar los EPSPs.



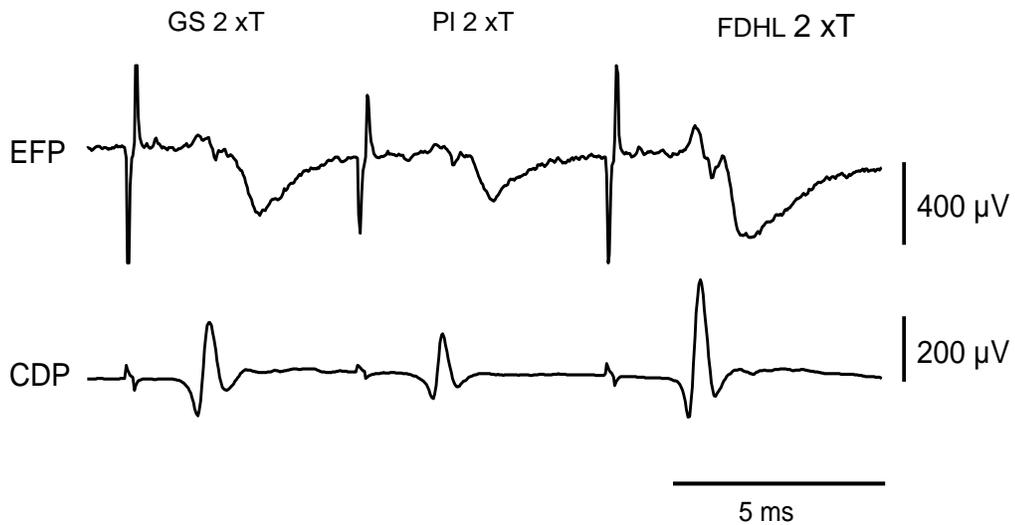
**Figura 17. EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I en otra motoneurona extensora del GS. Mismo formato que la figura 16. A, trazos superiores, registro intracelular (desplegado vertical y horizontalmente) de una motoneurona extensora del GS. Los registros verticales se muestran con una base de tiempo más rápida. Las líneas verticales indican el marcador del estímulo aplicado al nervio PI con una intensidad 2 xT y una frecuencia de 2 Hz. Trazos inferiores, ENGs registrados en los nervios indicados durante un episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA. B, trazos superiores, EPSPs registrados en la misma motoneurona al estimular el nervio PI con 5 pulsos (i) y 1 pulso (ii) (2 xT, 2 Hz). Trazos intermedios, diferencia entre flexión y extensión (F-E). Trazos inferiores, salva aferente registrada en el dorso de la médula (CDP). Nótese que en esta motoneuronas los EPSPs se expresan durante la fases de flexión (F) y extensión (E), aunque con mayor amplitud durante la flexión. La latencia medida desde el pico del primer componente positivo de la salva aferente al inicio del EPSPs fue de 3.5 ms (líneas punteadas).**



**Figura 18. Modulación de los EPSPs oligosinápticos extensores del grupo I dependiente de la fase del ciclo locomotriz.** *Gráfica superior*, amplitud promedio de la de los EPSPs oligosinápticos ocurridos en las fases de flexión (F, n = 55) y extensión (E, n = 63) durante un episodio de locomoción ficticia. Los ciclos del episodio de locomoción (n = 11) fueron normalizados y promediados. Los EPSPs producidos por la estimulación del nervio PI con una intensidad 2 xT fueron separados y promediados (3 bins para la extensión y 3 bins para la flexión). Cada ciclo de la locomoción fue medido del inicio de la fase de extensión al inicio de la fase de extensión subsiguiente. *Trazos inferiores*, ENGs de los nervios *iSmAB*, *iTA* y *cTA*. Los ENGs fueron rectificadas, integrados y promediados (100 bins para cada ciclo). Para mayor claridad se ilustran dos ciclos normalizados. Nótese que los EPSPs producidos durante la fase de flexión tienen mayor amplitud que los EPSPs generados durante la fase de extensión. El análisis se efectuó con el programa "Neuron" del "Spinal Cord Research Centre" de la Universidad de Manitoba, Canadá.

#### 7.4. Localización de las interneuronas espinales activadas por la estimulación de aferentes musculares del grupo I

Con la finalidad de localizar las proyecciones de las fibras aferentes musculares extensoras del grupo I en el núcleo intermedio (láminas VI-VIII de Rexed), en particular de aquellas fibras provenientes de los músculos extensores del tobillo, y por consiguiente las interneuronas activadas por las mismas, se registraron los EFPs a distintas profundidades de la médula espinal (ver métodos). La Figura 19 muestra los EFPs producidos por la estimulación de los nervios GS, PI y FDHL con una intensidad 2 xT y a una profundidad de 2.3 mm, a partir de la columna dorsal. Se puede observar que la estimulación de los 3 nervios produce una negatividad precedida por los potenciales terminales de las fibras aferentes. Esta negatividad corresponde a la activación monosináptica de interneuronas espinales de la lámina VII de Rexed.

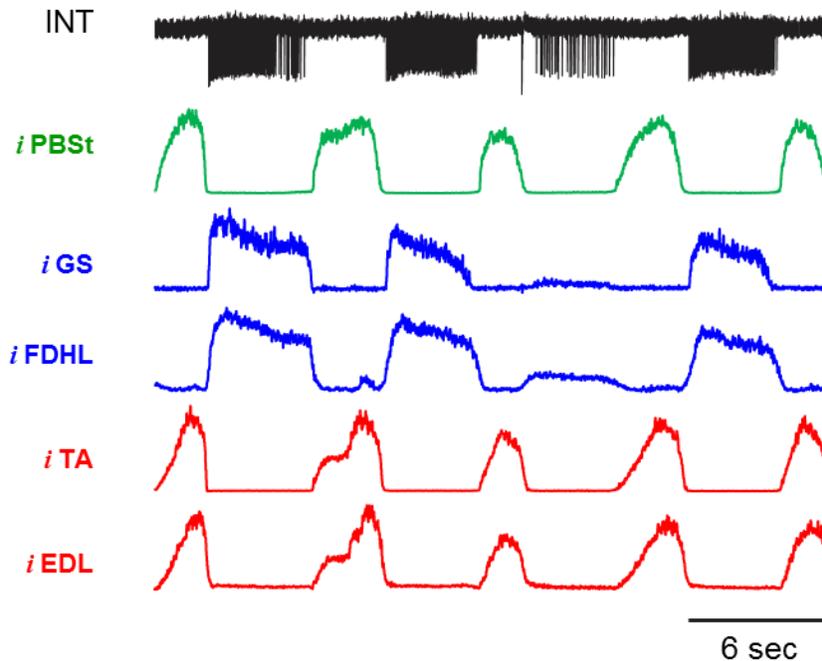


**Figura 19. EFPs producidos por la estimulación de aferentes extensores del grupo I en el núcleo intermedio.** *Trazo superior*, EFPs producidos por la estimulación de los nervios GS, PI y FDHL con una intensidad 2 xT. *Trazo inferior*, CDPs producidos por la estimulación de los mismos nervios. Los EFPs se registraron a una profundidad de 2.3 mm a partir de la columna dorsal, que corresponde a la lámina VII de Rexed. EFPs, negatividad hacia abajo. CDPs, negatividad hacia arriba.

## **7.5. Criterios para determinar si las interneuronas activadas por aferentes musculares del grupo I forman parte las vías neuronales que regulan el ritmo de la locomoción**

### ***7.5.1. Activación rítmica durante la fase de extensión***

Las interneuronas del RG y por ende implicadas en la modulación del ritmo locomotriz exhiben una actividad rítmica durante la locomoción. En particular, las interneuronas candidatas para mediar el “resetting” hacia la extensión, deben activarse rítmicamente durante la fase de extensión, bajo la hipótesis de que pertenecen al RG del hemicentro extensor. La Figura 20 muestra un episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA y el registro extracelular simultáneo de una interneurona de la lámina VII de Rexed a una profundidad de 2.3 mm a nivel L<sub>6</sub> caudal; la cual disparó potenciales de acción rítmicamente con la fase de extensión. En efecto, se puede observar que la frecuencia de disparo de la interneurona se incrementa cuando la extensión es más robusta. Asimismo, se puede observar que al disminuir la amplitud en la descarga de los nervios extensores, la interneurona dispara con una menor frecuencia.

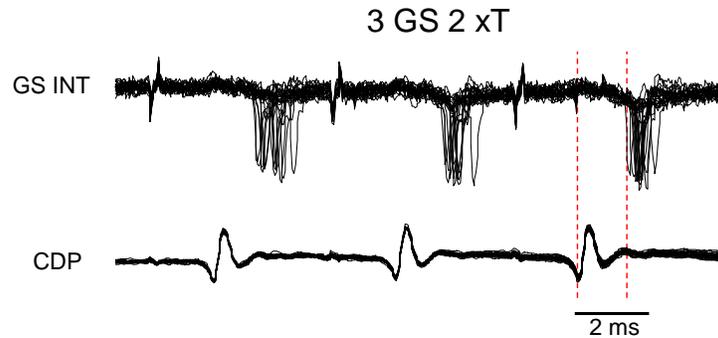


**Figura 20. Activación de una interneurona de la lámina VII de Rexed durante la fase de extensión.** *Trazo superior*, registro extracelular de una interneurona registrada a 2.3 mm de profundidad a partir de la columna dorsal. *Trazos inferiores*, ENGs rectificandos e integrados de los nervios indicados. Nótese que la interneurona dispara ráfagas de potenciales de acción en fase con la fase de extensión y reduce su frecuencia de descarga cuando la actividad ENG extensora (en azul) es menos intensa.

### **7.5.2. Activación por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I**

La latencia de los EPSPs oligosinápticos sugiere una vía de 3 interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes del grupo I y las motoneuronas extensoras. Ello implica que las interneuronas podrían ser activadas mono, di y trisinápticamente por las fibras aferentes provenientes de músculos extensores. La Figura 21 muestra una interneurona activada por la estimulación del nervio extensor GS con un tren de 3 pulsos a una intensidad 2 xT (misma Interneurona que en la Figura 20)

La latencia entre la salva aferente del nervio GS y las espigas de la interneurona fue de ~ 1.5 ms, compatible con una activación disináptica. De hecho, la variabilidad en la latencia de la espiga extracelular de la interneurona sugiere que no se trata de una activación monosináptica.



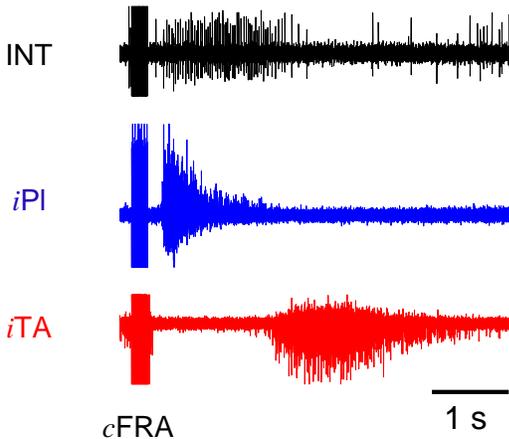
**Figura 21. Interneurona activada por la estimulación de las aferentes del grupo I del nervio extensor GS con un tren de 3 pulsos.** *Trazo superior*, registro extracelular de una interneurona activada durante la fase de extensión. La latencia de la espiga con el tercer estímulo oscila entre 1.22 y 1.88 ms (líneas punteadas), lo cual sugiere una activación disináptica. *Trazo inferior*, CDP producido al estimular el nervio GS con 3 pulsos a una intensidad 2 xT. Las líneas punteadas denotan la latencia de las espigas de la interneurona. La interneurona se registró a una profundidad de 2.3 mm con respecto a la superficie de la columna dorsal.

### 7.5.3. Activación producida por la estimulación de las FRA contralaterales.

De acuerdo a la hipótesis de los hemicentros (Graham Brown, 1911; Jankowska et al, 1967b), en el gato espinalizado después de la inyección i.v. de L-DOPA, la estimulación de las FRA contralaterales facilita la extensión ipsilateral, mientras que la estimulación de las FRA ipsilaterales facilita la flexión ipsilateral, simulando el patrón de alternancia que se observa durante la locomoción. Por ello, un objetivo de este estudio fue determinar si las interneuronas candidatas para mediar el “resetting” hacia la extensión se activaban en respuesta a la estimulación de las FRA contralaterales.

En la Figura 22 podemos observar que la aplicación de un tren de estímulos al nervio TA contralateral con una intensidad 100 xT, produce una descarga de latencia larga y de duración prolongada en el nervio extensor ipsilateral PI (*iPI*), seguida de una descarga en el nervio flexor ipsilateral TA (*iTA*). Durante la descarga extensora se produce una activación concomitante de la interneurona

registrada. Dicha interneurona se activó con la estimulación del nervio GS (3 xT) con una latencia ~ de 1.2 ms (no mostrado).



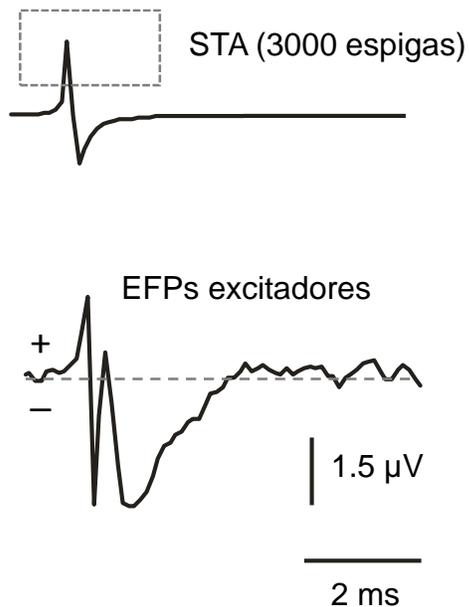
**Figura 22. Interneurona candidata para mediar el “resetting” hacia la extensión activada por la estimulación de aferentes del reflejo flexor contralaterales (*cFRA*).** Trazo superior, registro extracelular de una interneurona activada por la estimulación del nervio TA contralateral con una intensidad 100 xT (*cFRA*). Trazos medio e inferior, ENGs crudos de los nervios ipsilaterales PI (*iPI*) y TA (*iTA*). Nótese que la interneurona dispara en fase con la actividad extensora. La interneurona se registró a una profundidad de 2.6 mm y fue activada por el nervio GS con una latencia ~ de 1.2 ms.

#### **7.5.4. Las interneuronas que median el “resetting” hacia la extensión no pertenecen a interneuronas de proyección ni comisurales**

Para descartar si las interneuronas registradas tienen proyecciones ascendentes, como en el caso de las interneuronas que median la inhibición no-recíproca o de las interneuronas espinotalámicas, se estimularon los fascículos dorsolaterales (DLFs) ipsi y contralaterales a nivel L<sub>1</sub> y L<sub>5</sub>. Asimismo, para excluir a las interneuronas comisurales se colocó un electrodo en el núcleo intermedio contralateral. En cualquiera de los casos mencionados, las interneuronas fueron descartadas y no se tomaron en consideración (datos no mostrados).

**7.5.5. Naturaleza excitadora de las interneuronas de último orden activadas por aferentes musculares extensores del grupo I**

Con la finalidad establecer si las interneuronas activadas antidrómicamente desde el núcleo motor (no mostrado) son de naturaleza excitadora, se registraron los EFPs producidos por la actividad extracelular espontánea de una sola interneurona. Para este propósito, utilizamos la técnica de promediación disparada por la espiga (“spike triggered averaging” o STA, por sus siglas en inglés). La Figura 23 muestra el STA de una interneurona de último orden registrada a una profundidad de 3.3 mm. Se puede observar que después de haber promediado ~3000 espigas y los EFPs asociados, en el núcleo motor se registraron EFPs de signo negativo precedidos por el potencial terminal del axón de la interneurona. El signo negativo de los EFPs indica la presencia de un sumidero de corriente producido por la activación de sinapsis excitadoras, probablemente de naturaleza glutamatérgica.

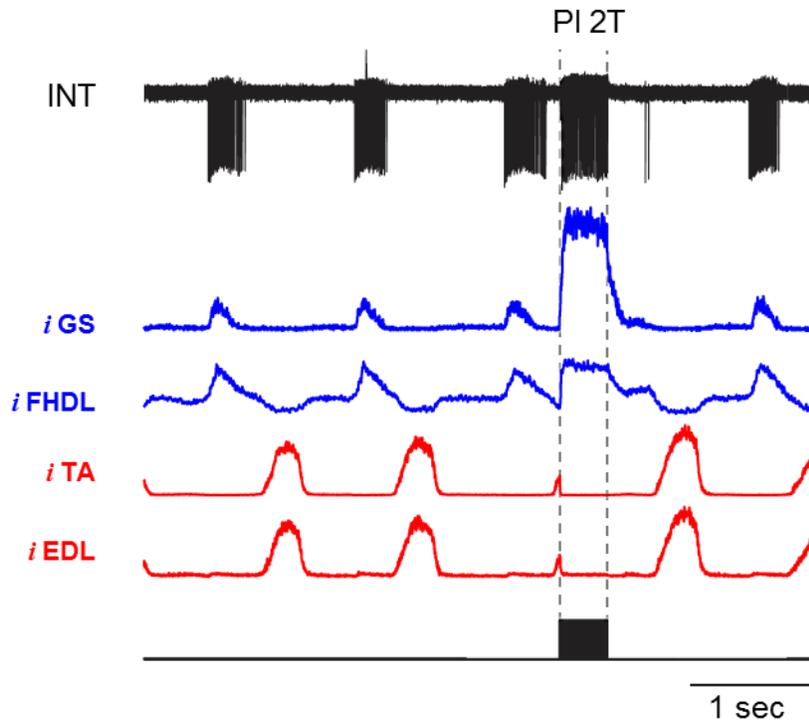


**Figura 23. EFPs excitadores registrados en el núcleo motor con la técnica de promediación disparada por la espiga (STA) de una sola interneurona.** *Trazo superior*, promedio (~3000 muestras) de las espigas extracelulares de una sola interneurona. *Trazo inferior*, promedio de los EFPs registrados en núcleo motor mediante la técnica de STA. El signo negativo de los EFPs indica que son de naturaleza excitadora. El STA se efectuó fuera de línea mediante el programa “Neuron” del “Spinal Cord Research Centre” de la Universidad de Manitoba, Canadá.

**7.5.6. Las interneuronas activadas por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I y rítmicamente durante la extensión, exhiben un patrón de disparo con un perfil similar al “resetting” hacia la extensión**

Con la finalidad de investigar si las interneuronas candidatas para mediar el “resetting” hacia la extensión forman parte del hemicentro extensor del RG, exploramos el patrón de su activación durante el “resetting” del ritmo locomotriz producido por la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I, en particular, del nervio PI, el cual es el más efectivo para promover el “resetting” hacia la extensión.

En la Figura 24 se puede observar que al aplicar un tren de estímulos al nervio extensor del tobillo, PI, con una intensidad 2 xT, durante la fase de flexión, se produce una supresión de la flexión en curso y una anticipación de la fase de extensión subsiguiente, es decir, un “resetting” hacia la extensión. Asimismo, puede notarse que la fase de flexión esperada se adelanta, con un desfaseamiento en el ritmo de la locomoción. Concomitantemente, la actividad de la interneurona, que dispara rítmicamente durante la fase de extensión, “imita” el patrón del “resetting”. Se pudo notar, además, que la actividad ENG registrada en los nervios flexores aumenta en amplitud durante el tren de estimulación al nervio PI y que la interneurona dispara con una mayor frecuencia.



**Figura 24. El patrón de disparo de las interneuronas candidatas se correlaciona con el patrón del “resetting” hacia la extensión.** *Trazo superior*, registro extracelular de una interneurona activada rítmicamente durante la fase de extensión de la locomoción ficticia inducida por L-DOPA. *Trazos intermedios*, ENGs rectificadas e integradas de los nervios iGS, iFHDl, iTA e iEDL. El nervio PI se estimula con un tren de pulsos a una intensidad 2 xT y con una frecuencia de 100 Hz. *Trazo inferior*, marcador de evento del tren de estimulación al nervio PI. La interneurona se registró a una profundidad de 2.3 mm a partir de la superficie de la columna dorsal ipsilateral

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo estudiamos la participación de la información proveniente de las aferentes del grupo I de músculos extensores en la modulación del ritmo locomotriz; específicamente investigamos la vía interneuronal implicada en el “resetting” hacia la extensión producido por la estimulación de fibras aferentes extensoras del grupo I e identificamos las posibles interneuronas involucradas. Para ello se establecieron ciertos criterios que las interneuronas candidatas deberían cumplir (ver objetivos).

Pudimos confirmar que la estimulación de las fibras aferentes del grupo I provenientes de músculos extensores produce EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas extensoras durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA (Figuras 16A y 17A). Los EPSPs que ocurrieron durante la fase de flexión exhiben una mayor amplitud que aquellos registrados durante la fase de extensión, probablemente debido a una oclusión. La latencia promedio de 3.5 ms de los EPSPs oligosinápticos sugiere que existen al menos tres interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes extensoras del grupo I y las motoneuronas (Figuras 16B, 17B y 18).

Bajo la hipótesis de que las interneuronas candidatas participan en la vía implicada en el “resetting” hacia la extensión, efectuamos registros extracelulares en el núcleo intermedio de la médula espinal (lámina VII de Rexed) a nivel L<sub>6</sub>- L<sub>7</sub>. En efecto, observamos que las interneuronas registradas disparan rítmicamente durante la fase de extensión y se activan por la estimulación de las FRA contralaterales (Figura 20 y 22), por lo que las consideramos como candidatas para formar parte del RG del hemicentro extensor. Además, la activación de las interneuronas con un patrón similar al “resetting” hacia la extensión, sugiere fuertemente que ellas están implicadas en dicho fenómeno y que forman parte del RG del hemicentro extensor (Figura 24).

### **8.1. Consideraciones metodológicas**

Los experimentos de este trabajo fueron efectuados en la preparación *in vivo* del gato descerebrado, ya que este modelo de estudio permite analizar más detalladamente y de manera más integrativa la organización y arquitectura de las redes interneuronales que conforman el CPG de la locomoción. A través de técnicas electrofisiológicas clásicas, como el registro intracelular de las motoneuronas y extracelular de las interneuronas ante pulsos de estimulación eléctrica a nervios cutáneos y musculares, y a los funículos dorsolaterales ipsi y contralaterales, así como la microestimulación en el núcleo motor, es posible dilucidar las vías

interneuronales implicadas en la modulación del ritmo y del patrón locomotriz. La preparación *in vivo* del gato descerebrado ofrece grandes ventajas en comparación con las preparaciones *in vitro* de la médula espinal de roedores neonatos. De hecho, los abordajes que utilizan las técnicas de la biología molecular en animales transgénicos para la identificación y caracterización de las interneuronas espinales, utilizan siempre como referencia la información obtenida en el gato. No obstante, es muy factible que la identificación y caracterización de las interneuronas implicadas en la vía que media el “resetting” hacia la extensión, se facilite al combinar ambos abordajes (Kiehn, 2016).

En el proyecto de la presente tesis aplicamos estimulación eléctrica a los nervios musculares con base a las veces por umbral ( $xT$ ) de las fibras más excitables. En realidad, no efectuamos una estimulación funcional de las fibras Ia, provenientes de huso muscular, al aplicar vibración o estiramientos breves de los músculos, ni de las fibras Ib, provenientes del órgano tendinoso de Golgi, al contraer los músculos. Aunque las fibras Ia tienden a tener un menor umbral que las Ib (Baldissera et al., 1981), para el propósito del presente proyecto las agrupamos como aferentes del grupo I cuando estimulamos con intensidades  $\leq 2xT$ , excluyendo a las fibras del grupo II, las cuales se activan preponderantemente con intensidades  $> 2 xT$  y  $\leq 5 xT$ . Las fibras FRA fueron activadas con intensidades de 20-100  $xT$ .

Con la finalidad de producir un “resetting” hacia la extensión, se estimularon las fibras aferentes del grupo I provenientes de los músculos de la articulación de tobillo, en particular del nervio PI, que se ha reportado como el más efectivo para producir el desacoplamiento del ritmo locomotriz (Conway et al., 1897; Gossard et al., 1994; Whelan et al., 1995), y no así los nervios de los músculos extensores de la rodilla y cadera (Guertin et al., 1995).

Se decidió utilizar el modelo de locomoción ficticia inducida por la inyección i.v. de L-DOPA ya que los episodios de locomoción son mucho más duraderos que aquellos que se generan espontáneamente en la preparación descerebrada a nivel

precolicular premamilar, o en la preparación descerebrada a nivel precolicular postmamilar tras la estimulación de la MLR. La locomoción ficticia inducida por la administración de L-DOPA tiende a ser más lenta, pero conserva las características de la locomoción inducida en otras preparaciones, inclusive durante la locomoción real (ver adelante).

## **8.2. Locomoción ficticia inducida por L-DOPA y modelo de los hemicentros o “half-centres”**

La hipótesis de los hemicentros (“half-centres”) asume que el ritmo básico de la locomoción se genera por las interacciones recíprocas entre dos grupos de interneuronas ([Graham Brown 1911, 1914](#); [Lundberg, 1979](#)), los cuales excitan a las motoneuronas flexoras y extensoras, respectivamente. Aunque originalmente esta hipótesis fue considerada completamente especulativa, el trabajo de Lundberg y colaboradores ([Jankowska et al, 1967a, b](#); [Lundberg, 1979](#)) demostraron que efectivamente las vías activadas por las FRA, que se ponen de manifiesto en presencia de L-DOPA (los reflejos FRA de latencia prolongada) se organizan tal y como fue propuesto por Graham Brown. En animales pretratados con nialamida, que potencia el efecto de la L-DOPA, la aplicación de trenes de estímulos a las FRA produce periodos breves de actividad alternada en los nervios flexores y extensores (Figura 22; [Lundberg, 1979](#)). Estas descargas de actividad son precursoras de la locomoción y, de hecho, se considera que involucran las mismas redes neuronales espinales que la locomoción ([Lundberg, 1979](#)).

Con base en la hipótesis de los hemicentros y en los hallazgos sobre la organización de los reflejos producidos en presencia de L-DOPA, Lundberg ([Lundberg, 1969](#)) propuso que el CPG consistía de una excitación alternante de las motoneuronas flexoras y extensoras. Es importante resaltar que este investigador consideró, además, que el patrón simple de alternancia entre flexión y extensión era “modelado” por la actividad propioceptiva refleja, dando como resultado el patrón refinado de la actividad muscular que se observa durante la locomoción real

(Lundberg 1969). De hecho, se ha demostrado que durante la locomoción ficticia se pueden expresar muchas características de la locomoción real (Figura 15; Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Schomburg et al., 1998).

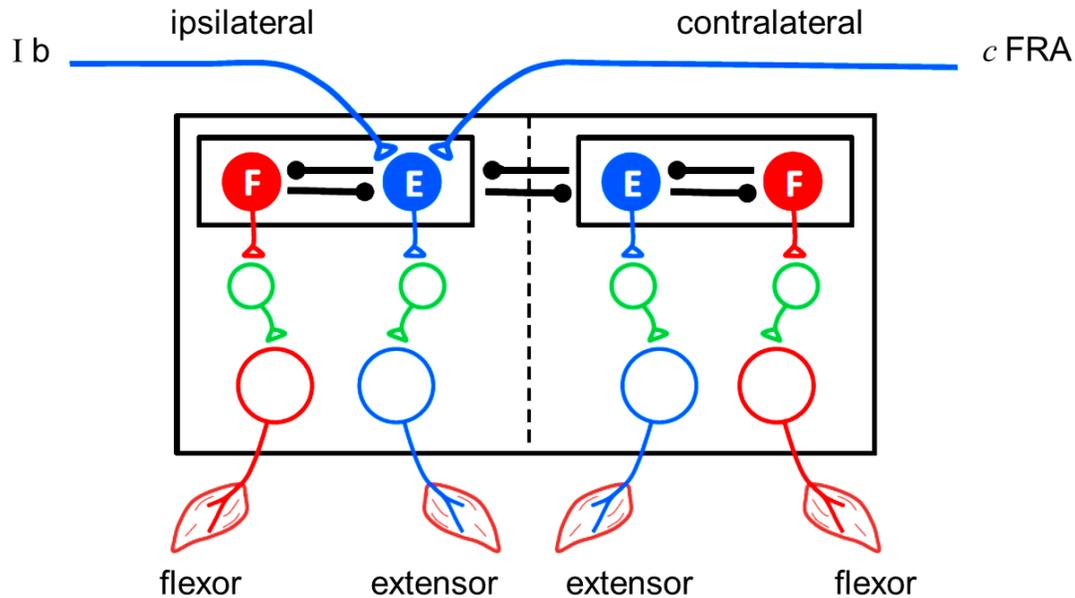
Se ha propuesto que el CPG está conformado por un RG y un PF (Perret y Cabalguen, 1980; Rybak et al., 2006 a y b). El “resetting” hacia la extensión producido por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I durante la fase de flexión (Figura 24; Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Whelan et al., 1995) es una evidencia clara de la existencia del CPG de la locomoción. Puesto que la activación de las fibras aferentes extensoras del grupo I produce un desacoplamiento del ritmo locomotriz, se ha propuesto que dichas fibras tienen acceso al RG (Figura 25).

### **8.3. Las fibras aferentes del grupo Ib producen una excitación de las motoneuronas extensoras a través de una vía que se expresa durante la locomoción**

En el presente trabajo observamos que durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA, la estimulación de fibras aferentes musculares del grupo I provenientes de músculos extensores del tobillo durante la fase de flexión de la locomoción, producen una supresión de la flexión en curso y una anticipación de la fase de extensión subsiguiente, es decir, un “resetting” hacia la extensión (Figura 24; ver Conway et al., 1987). Este cambio en la temporalidad del ciclo locomotriz sólo puede explicarse por una acción directa de las fibras aferentes extensoras del grupo I sobre el generador del ritmo (RG) (Rybak et al., 2006 a y b). Es muy probable que los efectos se deban a la activación de fibras aferentes Ib provenientes de los órganos tendinosos de Golgi, más que a las fibras Ia provenientes de los husos musculares, ya que la contracción muscular, que activa órganos tendinosos de Golgi, es también capaz de producir “resetting”, mientras que la vibración, que activa husos musculares, no produce ningún efecto (Conway et al. 1987).

Mediante el registro intracelular de motoneuronas extensoras en presencia de L-DOPA, hemos confirmado que la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I provenientes de los músculos del tobillo, producen EPSPs oligosinápticos con una latencia de ~3.5 ms (Figuras 16 y 17; ver [Gossard et al. 1994](#)). Este retardo se explica por la presencia de 3 interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes Ib y las motoneuronas extensoras, y no por la activación de neuronas propioespinales localizadas en niveles espinales más rostrales, ya que los EPSPs oligosinápticos se pueden registrar aún después de la sección de la médula espinal a nivel L<sub>6</sub> caudal ([Gossard et al, 1994](#)).

Con base en el “resetting” hacia la extensión producido por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I, hemos considerado que los EPSPs producidos por la estimulación de las mismas, se generan a través del hemicentro extensor del RG (Figura 25). Es decir, al menos algunas interneuronas de la vía activada por las fibras Ib que producen estos EPSPs, pertenecerían al generador del ritmo (RG) extensor. De hecho, la estimulación de las FRA contralaterales facilita los EPSPs producidos por la estimulación de las aferentes Ib, lo cual sugiere una convergencia en el RG extensor (Figura 25; ver [Gossard et al, 1994](#)).



**Figura 25.** Diagrama esquemático que muestra la organización del CPG de la locomoción y la convergencia de las fibras aferentes Ib y FRA contralaterales sobre el hemicentro extensor del CPG.

La posibilidad de que el “resetting” hacia la extensión se deba a una inhibición del hemicentro flexor, que a su vez genere una desinhibición del hemicentro extensor, no debe excluirse. El argumento más sólido a favor de una acción excitadora de las fibras aferentes sobre el hemicentro extensor es la evidencia de EPSPs oligosinápticos en presencia del bloqueador de los receptores glicinérgicos, estricnina, que suprimiría las acciones inhibitorias sobre el hemicentro extensor (Fedirchuk, Bennet, Gorassini y Hultborn, datos no publicados).

#### 8.4. Interneuronas implicadas en el “resetting” hacia la extensión

En el presente trabajo hemos registrado interneuronas que reúnen las características necesarias para formar parte de la vía neuronal activada por las fibras extensoras del grupo Ib durante la locomoción. Las interneuronas se activan rítmicamente durante la fase extensora de la locomoción (Figuras 20, 22 y 24) y su patrón de respuesta a la estimulación de las FRA y de aferentes musculares

extensoras del grupo I son las apropiadas para mediar las respuestas observadas en las motoneuronas extensoras durante la locomoción (Figuras 22 y 24) (ver también Gossard et al. 1994). Las interneuronas registradas se localizan en la lámina VII de Rexed, por debajo del núcleo intermedio, justo cuando los EFPs producidos por la estimulación de las fibras musculares extensoras han desaparecido. Por consiguiente, consideramos que no se trata de interneuronas de primer orden que reciben conexiones monosinápticas de las fibras aferentes del grupo I. Sin embargo, se ha demostrado que algunas interneuronas de primer orden, que se activan rítmicamente durante la locomoción, reciben conexiones monosinápticas de las fibras aferentes del grupo I y de la MLR (Fedirchuk, Stecina, Jordan and Hultborn, en preparación). No obstante, en nuestra preparación espinalizada no es posible determinar la activación de las interneuronas por la estimulación de estructuras del tallo cerebral.

Como se ha mencionado, la vía interneuronal implicada en los efectos de las fibras aferentes extensoras del grupo Ib consiste de al menos tres interneuronas. Nuestra hipótesis es que las interneuronas de segundo y tercer orden forman parte del CPG, es decir, del hemicentro extensor. De hecho, hemos registrado interneuronas activadas antidrómicamente desde un núcleo motor extensor, y mediante la técnica de STA registramos EFPs excitadores en el mismo núcleo (Figura 23). Estas interneuronas corresponderían a las de último orden en la vía oligosináptica entre las fibras Ib y las motoneuronas extensoras. No obstante, resulta difícil saber si las interneuronas de primer orden que reciben conexiones monosinápticas de las aferentes extensoras del grupo Ib y las de segundo orden son de naturaleza excitadora. Se podría especular con base a lo descrito por Dougherty et al. (Dougherty et al., 2013) y Kiehn (Kiehn, 2016) que nuestras interneuronas candidatas podrían formar parte del RG, cuyo fenotipo es glutamatérgico, es decir, excitador, y corresponderían a las interneuronas que expresan el FT Shox2. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que las interneuronas de primer y segundo orden registradas en la vía que media el “resetting” hacia la extensión sean de naturaleza inhibitoria, porque las

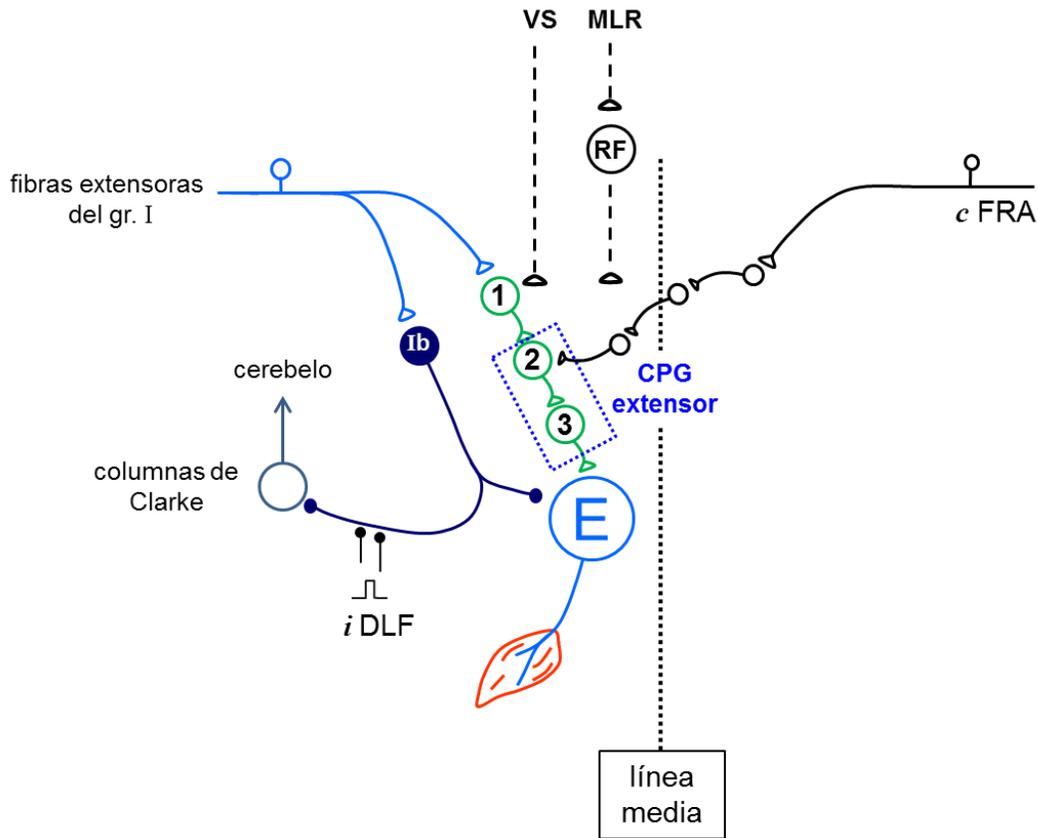
interneuronas que median la inhibición mutua entre el hemicentro extensor y flexor, tendrían un patrón de activación similar. Sin embargo, debe enfatizarse que las interneuronas del RG deben ser excitadoras.

## 9. CONCLUSIONES

En resumen, en este trabajo confirmamos que durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA la estimulación de las fibras aferentes del grupo I de músculos extensores produce EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas extensoras con una latencia promedio de  $\sim 3.5$  ms, compatible con una vía de al menos tres interneuronas interpuestas entre las aferentes extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras (Figura 26). Además, registramos interneuronas que responden a la estimulación de las mismas fibras del grupo I de nervios extensores con latencias mono, di y trisinápticas, y que disparan rítmicamente durante la fase de extensión. Estas interneuronas disparan con un patrón idéntico al “resetting” hacia la extensión producido por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I y no corresponden a interneuronas de proyección (p. ej. la interneurona que media la inhibición no recíproca) ni a interneuronas comisurales. Registramos interneuronas candidatas de último orden de naturaleza excitadora (ver esquema de la Figura 26).

Consideramos que las interneuronas que median los EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas extensoras probablemente corresponden a las interneuronas candidatas que producen el “resetting” hacia la extensión, sobre todo aquellas de segundo y tercer orden (cuadro punteado en azul en la Figura 26), las cuales se localizan en la parte más ventral de la lámina VII de Rexed. En roedores se ha observado que las neuronas con capacidad ritmogénica se localizan más hacia el cuerno ventral de la médula espinal (Kjaerulff y Kiehn, 1996) y las interneuronas

que expresan los FT HB9 y Shox2, candidatas para generar el ritmo locomotriz en roedores, se encuentran localizadas a este nivel (Kiehn 2016).



**Figura 26. Esquema de la vía interneuronal que media el "resetting" hacia la extensión producido por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I.** En condiciones de reposo la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I activa a las interneuronas Ib que median la inhibición no recíproca, las cuales envían proyecciones a las columnas de Clarke, por lo que pueden ser activadas antidrómicamente al estimular los funículos dorsolaterales ipsilaterales (iDLF). Durante la locomoción se suprime la inhibición no recíproca y emergen EPSPs oligosinápticos (□3.5 ms) en las motoneuronas extensoras (E) mediados por una vía de al menos tres interneuronas (1, 2, 3 color verde). Las interneuronas 2 y 3 se han considerado como candidatas para mediar el "resetting" hacia la extensión (ver texto). Se ilustra la modulación de esta vía interneuronal producida por las FRA contralaterales (cFRA) y por las posibles vías descendentes (VS, vestibuloespinal; RF, formación reticular; MLR, región locomotriz mesencefálica).

## 10. REFERENCIAS

1. Andén, N. E., Jukes, M. G. & Lundberg, A. (1996 b). The effect of DOPA on the spinal cord 2. A pharmacological analysis. *Acta Physiol. Scand.* 67:387-397.
2. Andén, N. E., Jukes, M. G., Lundberg, A. & Vyklický, L. (1996 a). The effect of DOPA on the spinal cord 1. Influence on transmission from primary afferents. *Acta Physiol. Scand.* 67: 373-386.
3. Baldissera, F., Hultborn, H. & Illert, M. (1981). Integration in spinal neuronal systems. In: Brooks VB (ed) Motor control. (Hand- book of physiology, sect 1, The nervous system, vol II). Am Physiol Soc, Bethesda, MD. 509–595
4. Barbeau, H. & Rossignol, S. (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult cat chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res.* 546: 250-260.
5. Berg, R. W., Alaburda, A. & Hounsgaard, J. (2007). Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal half-centers. *Science* 315: 390-393.
6. Brodin, L. & Grillner, S. (1985 a). The role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. I. The effects of excitatory amino acid antagonists. *Brain Res.* 360: 139-148.
7. Brodin, L. & Grillner, S. (1985 b). The Role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. II. The Effects of Amino Acid Uptake Inhibitors. *Brain Research.* 360: 149-158.
8. Brownstone, R. M. & Wilson, J. M. (2008). Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis. *Brain Res. Rev.* 57:64-76.
9. Buchanan, J. T. (1982). Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J. Neurophysiol.* 47: 961-975.
10. Conway, B. A., Hultborn, H. & Kiehn, O. (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Exp. Brain Res.* 68: 643-656.
11. Dougherty, K. J., Zagoraïou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., Jessell, T.M. & Kiehn, O. (2013). Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron* 80:920-933.

12. Duysens, J. & Pearson, K. (1976). The role of cutaneous afferents from the distal hindlimb in the regulation of the step cycle of thalamic cats. *Exp. Brain Res.* 24: 245-255.
13. Duysens, J. & Pearson, K.G. (1980). Inhibition of flexor burst generation by loading ankle extensor muscles in walking cats. *Brain Res.* 187: 321-332.
14. Endo, T., Kiehn, O. (2008). Asymmetric operation of the locomotor central pattern generator in the neonatal mouse spinalcord. *J. Neurophysiol.* 100:3043-54.
15. Engberg, I. & Lundberg A. (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiol. Scand.* 75: 614–630.
16. Fedirchuk, B., Noga, B., Carr, P., Jordan, L. M. & Hultborn, H. (1994). Candidate first-order interneurons in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensors in the cat. European Neuroscience Association Meeting, Vienna. Abstract.
17. Forssberg, H. & Grillner, S. (1973). Locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res.* 50: 184-186.
18. Forssberg, H. (1979). Stumbling corrective reaction: a phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *J. Neurophysiol.* 42: 936–953.
19. Forssberg, H., Grillner, S. & Rossignol, S. (1975). Phase dependent reflex reversal during walking in chronic spinal cats. *Brain Res.* 85: 103-107.
20. Garcia-Rill, E. (1986). The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res.* 11: 47-63
21. Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. & Fitzgerald, J. A. (1985). Chemical activation of the mesencephalic locomotor region. *Brain Res.* 330: 43-54.
22. Gossard, J. P., Brownstone, R. M., Barajon, I. & Hultborn, H. (1994). Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Exp. Brain Res.* 98: 213-228.
23. Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 507-518.
24. Graham Brown T. (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 84:308–319.

25. Graham Brown T. (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. *J. Physiol. (Lond.)* 48:18–46.
26. Grillner, S. (1973). Locomotion in the spinal cat: In control of posture and locomotion. *Adv. in Behav. Biol.* 515-535.
27. Grillner, S. (1981). Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In JM.; Mountcastle, VB., editors. *Handbook of Physiology-The Nervous Brookhart System II. American Physiological Society; Bethesda, MD*: 1179-1236.
28. Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 573-86.
29. Grillner, S., Deliagina, T., Ekeberg, O., El Manira, A., Hill, R. H., Lansner, A., Orlovsky, G. N. & Wallén, P. (1995). Neural networks that coordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci.* 18: 270-279  
Grillner, S. & Rossignol, S. (1978). On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats. *Brain Res.* 146: 269-277.
30. Grillner, S., Williams, T. & Lagerbäck, P. A. (1984). The edge cell, a possible intraspinal mechanoreceptor. *Science* 223: 500-503.
31. Grillner, S. & Zangger, P. (1975). How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain. Res.* 88: 367–71.
32. Grillner, S. & Zangger, P. (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp. Brain. Res.* 34: 241-61.
33. Guertin, P., Angel, M. J., Perreault, M. C. & McCrea, D.A. (1995). Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat. *J. Physiol.* 487:197-209.
34. Hiebert, G. W., Whelan, P. J., Prochazka, A. & Pearson, K. G. (1996). Contribution of hind limb flexor muscle afferents to the timing of phase transitions in the cat step cycle. *J. Neurophysiol.* 75:1126-1137.
35. Hinsey, J. C., Ranson, S. W. & McNittin, R. F. (1930). The role of hypothalamus and mesencephalon in locomotion. *Arch. Neurol. and Psych.* 23: 1-43.
36. Hultborn, H. Conway, B. A, Gossard, J. P., Brownstone, R, Fedirchuk, B., Schomburg, E. D., Enriquez-Denton, M & Perreault M. (1998). How do we approach the locomotor network in the mammalian spinal cord? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 16:70-82.

37. Jankowska, E. (1992). Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog. Neurobiol.* 38: 335-378.
38. Jankowska, E., Jukes, M. G., Lund, S. & Lundberg, A. (1967a). The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol. Scand.* 70: 369-388.
39. Jankowska, E., Jukes, M. G., Lund, S. & Lundberg, A. (1967b). The effect of DOPA on the spinal cord. 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol. Scand.* 70: 389-402.
40. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. & Hudspeth, A. J. (2013). Principles of Neuronal Science. N.Y. United States. *McGraw-Hill Companies Inc.* 5th ed.
41. Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 279-306.
42. Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nat. Rev. Neurosci.* 17: 224-238.
43. Kiehn, O. & Dougherty, K. J. (2013). Locomotion: circuits and physiology. In: Neuroscience in the 21st century. PffafDW, ed. 1209-1236. New York, NY: *Springer*.
44. Kiehn, O., Hultborn, H. & Conway, B. A. (1992). Spinal locomotor activity in acutely spinalized cats induced by intrathecal application of noradrenaline. *Neurosci. Lett.* 143: 243-246.
45. Kjaerulff, O. & Kiehn O. (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *J. Neurosci.* 16: 5777-5794.
46. Lanuza, G. M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T. M. & Goulding, M. (2004). Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42: 375–386.
47. Lundberg A. (1969). Convergence of excitatory and inhibitory action on interneurons in the spinal cord. *UCLA Forum Med. Sci.* 11: 231-265.
48. Lundberg A. (1979). Multisensory control of spinal reflex pathways. *Prog. Brain Res.* 50:11-28.
49. McCrea, D. A. & Ryback, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res. Rev.* 57: 134-146.

50. McCrea, D. A. (2001). Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J Physiol.* 533: 41-50.
51. Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M. K., Burrill, J. & Goulding, M. (2001). Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* 29: 385-399.
52. Mori, S., Sakamoto, T., Ohta, Y., Takakusaki, K. & Matsuyama, K. (1989). Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res.* 505: 66-74.
53. Ohta, Y., Mori, S. & Kimura, H. (1988). Neuronal structures of the brain stem participating in postural suppression both in decerebrate cats and in freely moving, awake cats. *Exp. Brain Res.* 5: 181-202
54. Orlovsky, G. N. (1969). Spontaneous and induced locomotion in the thalamic cat. *Biophysics* 14: 115-162.
55. Pearson, K. G. & Iles, J. F. (1970). Discharge patterns of coxal levator and depressor motoneurons of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 52:139–165.
56. Pearson, K. G. (1972). Central programming and reflex control of walking in the cockroach. *J. Exp. Biol.* 56: 173–193.
57. Pearson, K. G. (2008). Role of sensory feedback in the control of stance duration in walking cats. *Brain Res. Rev.* 57: 222-227.
58. Pearson, K. G., Ramirez, J.M. & Jiang W. (1992). Entrainment of the locomotor rhythm by group Ib afferents from ankle extensor muscles in spinal cats. *Exp. Brain Res.* 90: 557-566.
59. Pearson, K.G. & Collins, D.F. (1993). Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity. *J. Neurophysiol.* 70:1009-1017.
60. Pearson, K. G. & James, E. G. (2013). Locomotion. In: Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. & Hudspeth, A. J. 5th ed *Principles of Neuronal Science.* 812-834.
61. Perreault, M. C., Angel, M. J., Guertin, P. & McCrea, D.A. (1995). Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat. *J. Physiol.* 487: 211-220.
62. Perret, C. & Cabelguen, J. M. (1980). Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. *Brain Res.* 187:333-352.

63. Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding M. & Jessell, T. M. (2001). Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* 29: 367-384.
64. Quevedo., J., Stecina, K., Gosgnach, S. & McCrea, D.A. (2005a). Stumbling corrective reaction during fictive locomotion in the cat. *J. Neurophysiol.* 94: 2045–2052.
65. Quevedo., Stecina, K. & McCrea D.A. (2005b). Intracellular analysis of reflex pathways underlying the stumbling corrective reaction during fictive locomotion in the cat. *J. Neurophysiol.* 94:2053–2062.
66. Rossignol, S. (1996). Neuronal control of stereotypic limb movements. Rowell LB, Shepherd JT (eds) *Handbook of Physiology*, section 12. Chapter 5. American Physiological Society, Oxford: 173-216.
67. Rossignol, S., Martinez, M., Escalona, M., Kundu, A., Delivet-Mongrain, H., Alluin, O. & Gossard, J. P. (2015). The "beneficial" effects of locomotor training after various types of spinal lesions in cats and rats. *Prog. Brain Res.* 218:173-198.
68. Rybak I. A., Shevtsova N. A., Lafreniere-Roula M. & McCrea D. A. (2006 a). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J. Physiol.* 577:617–639.
69. Rybak I. A., Stecina K., Shevtsova N. A. & McCrea D. A. (2006 b). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J. Physiol.* 577: 641–658.
70. Schomburg, E. D., Petersen, N., Barajon, I. & Hultborn, H. (1998). Flexor reflex afferents reset the step cycle during fictive locomotion in the cat. *Exp. Brain Res.* 122: 339-350.
71. Shik, M. L., Severin, F. V. & Orlovsky, G. N. (1966). Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid brain. *Biophysics* 11: 756-765.
72. Shik, M. L., Severin, F. V. & Orlovsky, G. N. (1967). Structures of the brain stem responsible for evoked locomotion. *Sechenov Physiological Journal of USSR.* 53: 1125-1132.
73. Sherrington, C. S. (1906) Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J. Physiol Lond.* 34: 1-50.

74. Sherrington C. S. (1910). Flexion-reflex on the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J. Physiol Lond.* 40: 28-121.
75. Stecina, K., Quevedo, J., & McCrea, D. A. (2005). Parallel reflex pathways from flexor muscle afferents evoking resetting and flexion enhancement during fictive locomotion and scratch in the cat. *J. Physiol.* 569:275–290.
76. Talpalar, A.E., Bouvier, J., Borgius, L., Fortin, G., Pierani, A. & Kiehn, O. (2013). Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation. *Nature* 500: 85-88.
77. Whelan, P. (1996). Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog. in Neurobiol.* 49: 481-515.
78. Whelan, P., Hiebert, G. W. & Pearson, K. G. (1995). Stimulation of the group I extensor afferents prolongs the stance phase in walking cats. *Exp. Brain Res.* 103: 20-30.
79. Zhang, J., Lanuza, G. M., Britz O., Wang, Z., Siembab, V.C., Zhang, Y., Velasquez, T., Alvarez, F.J., Frank, E. & Goulding, M. (2014).  $V_1$  and  $V_{2b}$  interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion. *Neuron* 82:138-150.