



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD: ZACATENCO

DEPARTAMENTO: FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS

Cambios en la organización de la conectividad funcional entre
neuronas del asta dorsal de la médula espinal del gato inducidos
por el bloqueo de receptores GABA_A y glicinérgicos

Tesis que presenta

QFI Leonardo Moreno García

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de
Neurobiología celular y molecular

Director de la tesis: Dr. Pablo Rudomin Zevnovaty

Ciudad de México

Septiembre, 2017

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo 2015 a 2017

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	4
Interneuronas involucradas en la generación de los CDPs.	5
Actividad espontánea.	6
Actividad espontánea en la médula espinal.....	7
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	16
Objetivos	17
Objetivo general.	17
Objetivos particulares.	17
Metodología	18
Resultados	21
Efecto de la picrotoxina en preparación con neuroeje intacto.	21
Curso temporal del efecto de la picrotoxina.....	23
Aumento en la actividad espontánea.....	25
Efecto sobre el DRP y la onda positiva generado por estimulación eléctrica y táctil.	29
Cambios en la frecuencia de potenciales seleccionados con base en su forma de onda.	32
Cambios diferenciales entre clases de CDPs seleccionados y clasificados mediante algoritmos de aprendizaje automatizado.	38
Influencia supraespinal sobre la alta sincronización.....	41

Efecto diferencial de la picrotoxina en preparación con lesión espinal entre L5 y L6.	42
Cambio diferencial en los espectros de potencias.	47
Cambios en la ocurrencia de distintas clases de CDPs.	50
Efecto de la estricnina en preparación con neuroeje intacto.	58
Aumento de la actividad espontánea de alta frecuencia.	60
Cambios en la generación de nCDPs.	63
Aumento de la onda positiva inducido por el bloqueo glicinérgico.	64
Discusión	67
Efectos del bloqueo gabaérgico sobre los patrones de correlación.	68
Bloqueo de sinapsis gabaérgicas a nivel espinal.	70
Facilitación de la onda positiva inducida por el bloqueo glicinérgico.	72
Estudios de nocicepción relacionados con el bloqueo gabaérgico.	73
Análisis por forma de onda.	74
Conclusiones	76
Perspectivas	76
Bibliografía	77

Resumen

El sistema nervioso recibe una gran cantidad de estímulos sensoriales. Los mecanismos inhibidores participan en la integración de dicha información. Uno de estos mecanismos es el de la inhibición presináptica que modifica la información sensorial antes de establecer la primera sinapsis en la médula espinal. Esta inhibición está mediada por interneuronas gabaérgicas y está asociada a la despolarización de las aferentes primarias (PAD). La PAD se puede registrar de manera poblacional como potenciales de raíz dorsal (DRPs) o como ondas positivas (onda p) en el dorso de la médula espinal. Existen grupos neuronales en el asta dorsal de la médula espinal que se activan de forma espontánea y pueden activar diversos grupos de interneuronas, incluyendo las que median la inhibición presináptica. Dicha actividad se puede registrar como potenciales del dorso de la médula espinal (CDPs). Esta activación se genera de forma estructurada, la configuración de la conectividad de la red neuronal puede definir la forma en que se procesa la información sensorial. Estudios previos sugieren que el control de la ocurrencia de CDPs puede involucrar mecanismos inhibidores tanto gabaérgicos como glicinérgicos. En este trabajo se utilizaron dos antagonistas distintos (picrotoxina y estriknina), para caracterizar la respuesta de la red neuronal. Encontramos que el bloqueo gabaérgico en preparaciones con neuroeje intacto produce una actividad oscilatoria altamente sincronizada. Dicha actividad depende de la influencia supraespinal. En ausencia de la influencia supraespinal, este bloqueo disminuye la probabilidad de ocurrencia de npCDPs, así como la amplitud de la onda positiva. Sin embargo, en esta misma condición no se modifican los patrones de sincronización. Observamos que el bloqueo glicinérgico facilita la onda positiva de los npCDPs, pero no modifica los patrones de sincronización. Puesto que la administración de los fármacos fue por vía intravenosa, se hace necesario efectuar experimentos con la administración local de diferentes antagonistas, así como el desarrollo de nuevas técnicas de análisis para la detección y clasificación de CDPs.

Abstract

Nervous system receives a great amount of afferent sensorial impulses through different kind of receptors. All this information is processed in order to become meaningful to the system. Inhibitory mechanisms take part in the integration of this information. One of these mechanisms is the presynaptic inhibition which modifies the sensorial information before the first synapse is performed at the spinal cord. This inhibition is mediated by gabaergic interneurons and is characterized by the primary afferent depolarization (PAD), PAD is related with the dorsal root potential (DRP) and positive waves at the cord dorsum. There are neurons in the dorsal horn of the spinal cord that are activated spontaneously and could be commanding interneurons that mediate the presynaptic inhibition, this activity could be registered as cord dorsum potentials (CDPs). This activation is not random, it is structured and could be modified depending on the afferent information and supraspinal influences. The neuronal network configuration could be modulating the integration of sensorial information. Previous experiments suggest that the mechanisms which define the occurrence of CDPs could involve inhibitory gabaergic and/or glicineric mechanisms. In the present work we used two different antagonists (picrotoxin and strychnine), in order to characterize the neuronal network response. We found that blocking gabaergic synapses in the preparations with intact neuroaxis, a highly synchronized activity appeared. At spinal cord, without supraspinal influences, the same antagonist (picrotoxin), decrease the probability of occurrence of npCDPs, along with the positive wave amplitude. Nevertheless, the synchronization pattern is not modified. Administration of the glicineric antagonist, increases the positive wave of the nCDPs, but has no influence on the synchronization patterns. It is necessary to perform experiments with local administration of the antagonists, in addition, we must continue with the development of new data analysis technics to detect and classify CDPs, in order to make a more accurately characterization of the neuronal network response and control.

Introducción

Para la sobrevivencia de los seres humanos y otros organismos, es necesario conocer lo que sucede en el medio que nos rodea. De esta forma se pueden realizar acciones y promover conductas que nos permitan aumentar nuestras probabilidades de sobrevivir. Para obtener información contamos con diferentes receptores que transducen distintos tipos de estímulos (mecánicos, químicos, luminosos) en impulsos nerviosos. Existe una gran cantidad de información sensorial que ingresa al sistema nervioso, por lo que es necesario integrarla de tal forma que tenga significado para el mismo.

La médula espinal es una de las primeras estructuras involucradas en la integración de la información proveniente de aferentes sensoriales. Para este proceso se utilizan diversos mecanismos inhibidores (Felten *et al.*, 2016). Uno de ellos en particular que regula el flujo de la información, es la inhibición presináptica. Un tipo de inhibición presináptica se ha relacionado con la despolarización de aferentes primarias (DAP). Mediante sinapsis axo-axónicas se genera una despolarización en la terminal presináptica mediada por receptores gabaérgicos (Rudomin & Schmidt, 1999). Esta despolarización al modificar el potencial de la membrana en esta zona específica, puede reducir el impulso presináptico. La DAP al producirse en láminas profundas en la médula espinal, se presenta como una onda positiva al registrar los potenciales en el dorso de la médula (CDP). Además al realizar el registro en raíces dorsales, la DAP se registra de manera poblacional como potenciales de la raíz dorsal (DRP), debido a la transmisión electrotónica de la DAP a través del axón (Willis & Coggeshall, 2004). Este tipo de inhibición es de particular interés, debido a su acción local sobre ciertas ramificaciones intraespinales de una misma fibra sensorial.

Antecedentes

En 1987 Rudomin et al. Identificaron un grupo de interneuronas que podían estar involucradas en las vías que median la inhibición presináptica. Estas interneuronas se encontraban en el núcleo intermedio de la médula espinal (figura 1), su actividad estaba relacionada con la modulación de la información de aferentes musculares. Estas interneuronas se clasificaron en dos grupos, la actividad de uno de ellos estaba relacionada con los potenciales inhibidores glicinérgicos (clase I), pero no con DRPs. La actividad del segundo grupo de interneuronas (clase II) estaba asociada con los DRPs, por lo tanto se propuso que estas interneuronas eran gabaérgicas y mediaban la inhibición presináptica. Así mismo, se observó que la actividad de estos dos grupos de interneuronas era precedida por potenciales de signo negativo registrados en el dorso de la médula espinal, cuyo inicio se presentaba 20 – 30 ms antes de los potenciales de acción interneuronales. Por consiguiente, se propuso la existencia de grupos de interneuronas localizados en el asta dorsal, los cuales podrían comandar la actividad de las neuronas de las clases I y II. El hecho de tener dos mecanismos inhibidores implicaba funciones diferentes en la integración sensorial-motora.

Considerando la actividad en el asta dorsal que precede a la activación de las interneuronas de clase I y II, se formularon hipótesis acerca del posible control que podían ejercer estas interneuronas sobre las vías que activan a las interneuronas de clase I y clase II. Se propuso que las interneuronas de clase I y II podrían ser activadas por grupos separados de interneuronas respectivamente, lo que no excluía la posibilidad de que el mismo grupo de interneuronas activara de forma diferencial a las dos clases.

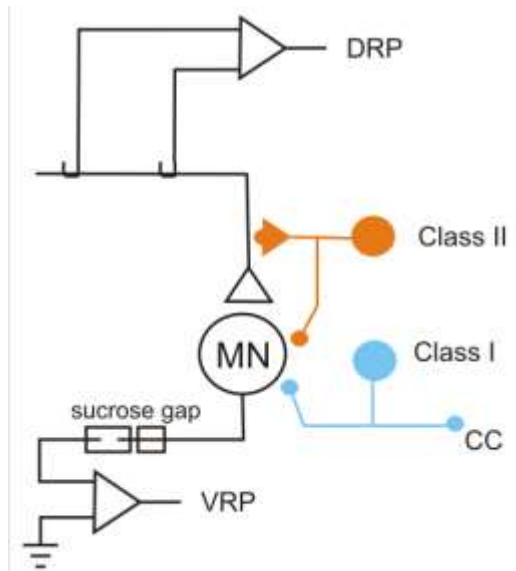


Figura 1. Neuronas inhibitoras del núcleo intermedio. Diagrama del método utilizado para registrar los potenciales de la raíz dorsal y ventral (DRPs y VRPs) asociados con la actividad de una interneurona del núcleo intermedio. Adaptado de Rudomin *et al.*, 1998.

Interneuronas involucradas en la generación de los CDPs.

Manjarrez *et al.* (Manjarrez *et al.*, 2000) estudiaron cómo las redes neuronales que producen los potenciales espontáneos del dorso de la médula (CDPs por sus siglas en inglés), estaban asociados a las vías neuronales que median la despolarización de aferentes primarias de fibras aferentes cutáneas y musculares del grupo I. Además demostraron que estas interneuronas estaban distribuidas en diferentes segmentos espinales, en la misma región donde terminan las aferentes cutáneas de bajo umbral. Otro de los hallazgos importantes fue que la estimulación de aferentes cutáneos de bajo umbral disminuía temporalmente las probabilidades de ocurrencia de los CDPs espontáneos producía, además, una disminución de las fluctuaciones de los reflejos monosinápticos. Estos resultados corroboraron los hallazgos previos de Rudomin & Dutton (1967) sobre las variaciones en los reflejos monosinápticos. Estos autores observaron que al estimular aferentes cutáneos que activan las vías que median la inhibición presináptica, se disminuían las fluctuaciones de los reflejos, lo cual no ocurría al activar las vías que median la inhibición postsináptica. Por lo tanto, concluyeron que la

causa de las variaciones observadas en los reflejos monosinápticos tenía un origen presináptico.

En el 2003 Manjarrez et al. describieron que los CDPs ocurrían de forma síncrona en distintos segmentos espinales (L4-S1). Dicha sincronización no dependía de forma significativa de las aferencias sensoriales y probablemente estaba mediada por las conexiones entre segmentos espinales. Se concluyó que la sincronización en la actividad espontánea de neuronas del asta dorsal de la médula espinal podría estar relacionada con una forma de codificar los estímulos con base en los niveles de sincronización.

A partir de estos hallazgos se han desarrollado trabajos encaminados a comprender el papel de este grupo de interneuronas que exhiben actividad espontánea, tanto en la discriminación sensorial como en el control motor, además de elucidar los mecanismos mediante los cuales estas redes modifican sus conexiones.

Actividad espontánea.

El sistema nervioso presenta una actividad espontánea en diversas estructuras. Se han efectuado estudios acerca de la función de la actividad espontánea durante el desarrollo del sistema nervioso. Se ha confirmado que además de los mecanismos moleculares ya identificados, la actividad espontánea contiene información que capacita al sistema nervioso en particular al sensorial, para que se pueda utilizar la información del medio ambiente una vez que los sentidos se activan (Leighton & Lohmann, 2016). También se ha reportado que en zonas corticales las neuronas presentan actividad espontánea correlacionada con los patrones de actividad de la red neuronal en la que se encuentran (Tsodyks, 1999).

Actividad espontánea en la médula espinal.

En la médula espinal se identificó la actividad espontánea a partir de los trabajos realizados por Gerard & Young (1937). Sin embargo, no fue hasta los trabajos de Ten Cate (1950) y Mark & Gasteiger (1953) que analizaron las características de esta actividad espontánea. Encontraron que la actividad espontánea en la médula espinal continúa aún después de la sección de nervios periféricos e inclusive después de una sección espinal. Aunque estos autores observaron una disminución en la actividad espontánea, propusieron que ésta era intrínseca a las neuronas de la médula espinal. Además propusieron que dicha actividad podría ser modulada por vías supraespinales.

Gasteiger & Ichikawa (1963) continuaron con el estudio de la actividad espontánea en la médula espinal. Encontraron que esta actividad estaba conformada por potenciales de baja frecuencia (4-7 Hz) con una amplitud media de 70 μ V y una duración entre 30 - 40 ms. Se preguntaron si esta actividad tenía un patrón estructurado o si sólo formaba parte del ruido del sistema, además de cuál podría ser su papel fisiológico. Teniendo como antecedente las observaciones en las variaciones de la actividad refleja, aún con estímulos constantes, estos autores concluyeron que probablemente los registros espontáneos observados en la médula espinal, conforman una actividad basal en continuo cambio sobre la cual actúa la actividad refleja.

Con base en los análisis previos sobre la actividad espontánea en la médula espinal y los trabajos realizados en el mismo grupo de trabajo, en los cuales se ha relacionado la actividad espontánea en el dorso de la médula espinal, con la activación de mecanismos inhibidores involucrados en la modulación de información sensorial, se investigó si los CDP espontáneos ocurrían en forma aleatoria o de forma estructurada (Rodríguez et al., 2011). Se encontró que las redes neuronales espinales involucradas en la generación de los CDPs, presentaban actividad espontánea organizada de forma no aleatoria. La estructura fractal hallada, podía modificarse mediante la sección de la

médula espinal entre los segmentos L5 y L6, evidenciando la importancia de la comunicación entre segmentos espinales. Sin embargo al persistir una estructura fractal en los segmentos caudales a la lesión se sugirió que las neuronas a nivel espinal tienen patrones de interconexión intrínsecos.

En trabajos previos se caracterizaron dos tipos de CDPs, uno de ellos presentaba una onda negativa (nCDP) y estaba asociado a la activación de interneuronas de clase I y los CDPs con una onda negativa positiva (npCDP) estaban asociados a la activación de interneuronas de clase II. Con base a estas observaciones en el 2012 Chávez et al., se propusieron discriminar y clasificar los nCDPs y los npCDPs, para estudiar diferencias funcionales asociadas a cada tipo de CDP. Con la metodología utilizada fueron capaces de observar que los npCDPs estaban altamente correlacionados con la aparición de DRPs espontáneos (figura 2). También demostraron que la espinalización y la sección de nervios daban lugar a cambios en la correlación entre los CDPs espontáneos registrados en diferentes segmentos espinales, por lo que postularon que existe una organización intrínseca a la red neuronal subyacente. Además, se pudo corroborar que las interneuronas se encontraban interconectadas de forma bilateral a través de los segmentos lumbo-sacos. De manera interesante, se descubrió que cuando ocurrían los npCDPs había una mayor sincronización entre segmentos espinales, lo cual llevó a postular que para reclutar las vías involucradas en la PAD de aferentes cutáneos y musculares, era necesario que la red neuronal incrementara su sincronización. Esta idea surgió como propuesta alternativa, ya que previamente se había considerado que existían dos grupos diferentes de interneuronas, uno responsable de los nCDPs y otro de los npCDPs.

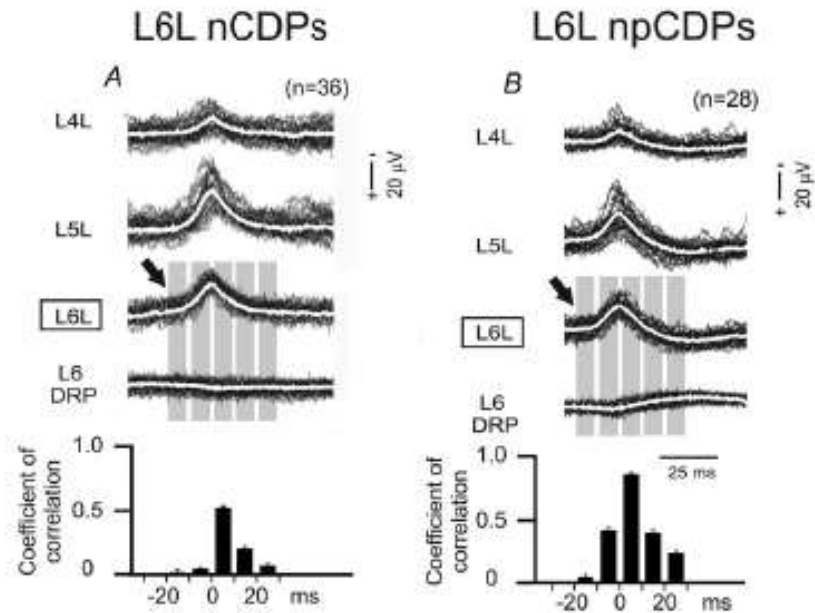


Figura 2. DRPs asociados preferentemente a npCDPs. **A.** CDPs y DRPs espontáneos seleccionados utilizando como referencia los nCDPs del segmento L6 izquierdo. La gráfica muestra la mediana y los errores estándar de los coeficientes de correlación entre los nCDPs y los DRPs. **B.** CDPs y DRPs espontáneos seleccionados tomando como referencia los npCDPs del segmento L6 izquierdo. Tomado de Chávez *et al.*, 2012.

En 2015 (Contreras-Hernández *et al.*, 2015), al identificar la actividad de neuronas de forma individual, comprobaron que la actividad de una misma neurona podían estar asociada a la aparición tanto de un nCDP como de un npCDP. La diferencia fue que había una mayor sincronización de la red neuronal durante la ocurrencia de los npCDPs. Además se observaron periodos sin actividad espontánea antes y después de la aparición de los CDPs. En la figura 3 se puede observar que al superponer varios CDPs espontáneos hay periodos silentes previos y subsecuentes a la aparición de los CDPs. Estos periodos silentes sugerían que pueden ocurrir acciones inhibitoras que se comparten entre las neuronas de la red y que pueden definir la organización estructurada de la misma, además de los cambios inducidos por influencias sensoriales y estructuras supraespinales. En la

figura 4 se ilustra el modelo propuesto para explicar estos fenómenos. Se puede observar un primer modelo en el que diferentes grupos neuronales activan a las interneuronas de la clase I y II, responsables de los nCDPs y npCDPs respectivamente. No obstante, con base en los resultados obtenidos se propone que la misma red neuronal cambia su configuración de tal forma que durante niveles bajos de sincronización, se activan preferencialmente las interneuronas de la clase I sin DRPs (figura 4B). Por otro lado al incrementar la sincronización entre neuronas del asta dorsal, se reclutan las interneuronas de clase II y de esta forma se activan las vías involucradas en la inhibición presináptica asociada a la PAD, responsables de los npCDPs asociados con los DRPs (figura 4C). Los resultados de este trabajo respaldan la idea de la existencia de un mecanismo de control del flujo de la información a nivel espinal basado en los grados de sincronización neuronal. Los grupos de neuronas distribuidas de forma longitudinal y bilateral forman una red dinámica que puede ser la encargada de dicho control.

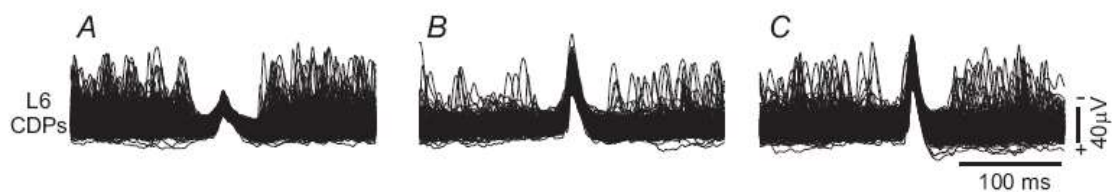


Figura 3. Interacciones inhibitorias entre la actividad espontánea en neuronas del asta dorsal. **A.** Diferentes nCDP espontáneos superpuestos registrados en el segmento L6. **B y C.** npCDP espontáneos superpuestos. Tomado de Contreras-Hernández *et al.*, 2015.

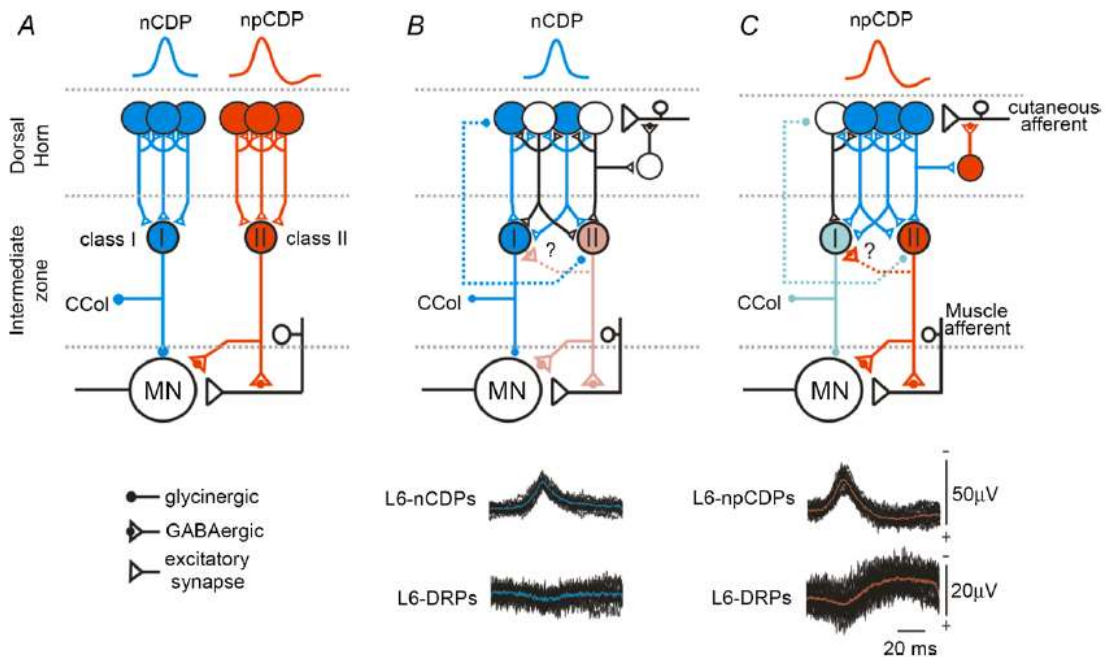


Figura 4. Diagrama comparativo de las redes de neuronas del asta dorsal que controlan las interneuronas de clase I y II de manera independiente o conjunta. **A.** La actividad de las interneuronas de clase I y II son moduladas por grupos separados de interneuronas. **B y C.** La misma red neuronal modula de forma diferencial la actividad de neuronas de clase I y II. **B.** Niveles bajos de sincronización en la red neuronal del asta dorsal activa principalmente las interneuronas de clase I. **C.** Un incremento en la sincronización entre neuronas del asta dorsal recluta las neuronas de clase II, activando de forma preferencial las vías que median la DAP y la inhibición presináptica. Tomado de Contreras-Hernández *et al.*, 2015.

En 2013 se estudió el efecto de la sección de nervios sobre la efectividad sináptica de las aferentes del nervio sural. Se encontró que era posible un control diferencial sobre la eficacia sináptica dependiendo de los sitios intraespinales en donde las aferentes hacían sinapsis. Estos hallazgos posiblemente están relacionados con el procesamiento selectivo de la información sensorial en respuesta a la estimulación de tipo táctil o nociceptiva (Rudomin *et al.*, 2013). La sección de un nervio cutáneo no sólo cambia las probabilidades de generación de CDPs sino también los patrones de la PAD de las terminales nerviosas cutáneas que permanecen intactas. Lo

que significa que los cambios en la generación de potenciales espontáneos en el dorso de la médula reflejan cambios en los circuitos neuronales que median la PAD.

En diferentes trabajos como el mencionado anteriormente se ha realizado la sección de nervios para analizar la respuesta del sistema ante la falta de aferencias sensoriales, sin embargo esta técnica representa en sí un estímulo nociceptivo que genera sensibilización central. En el 2008 se demostró que la inyección intradérmica de capsaicina (componente activo del chile que provoca inflamación y sensibilización central) en un cojinete de la pata del gato aumenta la eficacia sináptica de las fibras aferentes articulares. Es decir, la capsaicina produce un efecto de sensibilización que podría afectar el procesamiento de la información propioceptiva y estar involucrada en la hiperalgesia secundaria (Rudomin & Hernández, 2008). En trabajos más recientes (datos no publicados), se ha encontrado que la aplicación de capsaicina de forma intradérmica en el gato anestesiado con el neuroeje intacto, induce una reorganización de la conectividad funcional de la red neuronal involucrada en la generación de los CDPs. Posteriormente, se observó que los cambios inducidos por la capsaicina eran revertidos temporalmente por la aplicación intravenosa de lidocaína (figura 5). Además, se demostró que los efectos de la lidocaína disminuían considerablemente si se efectuaba una espinalización previa a la aplicación de capsaicina. Desde hace más de 30 años la lidocaína se ha utilizado para tratar el dolor neuropático (Jänig, 2008), además de su uso en la analgesia preventiva (utilización de una técnica o aplicación de un fármaco analgésico con el objetivo de atenuar el dolor postoperatorio, la hiperalgesia y alodinia) (Sáez, 2012).

Como se mencionó previamente sólo se había estudiado la forma de onda de los CDPs en cuanto a su carácter negativo y negativo-positivo (Chávez *et al.*, 2012; Contreras-Hernández *et al.*, 2015). Sin embargo considerando la gran variedad de formas de onda que se observan en los registros de la actividad

espontánea, es posible que formas específicas estén relacionadas con la actividad de ciertos grupos de interneuronas. Por lo tanto ha sido importante analizar formas de onda más específicas, así como su probabilidad de ocurrencia, para poder describir de forma más detallada la organización de la red neuronal en diferentes condiciones del sistema y poder inferir qué información se está codificando en cada configuración de la red neuronal. Actualmente se han estado desarrollando técnicas para el análisis de datos, obtenidos en trabajos previos, que puedan dar mayor información sobre los cambios dinámicos de las redes neuronales. Se ha desarrollado un procedimiento de aprendizaje automático para la selección de CDPs espontáneos con base en su forma y amplitud (Martin *et al.*, 2015).

Con esta metodología se han logrado identificar diferentes clases de CDPs espontáneos. Analizando registros control se ha observado que la probabilidad de ocurrencia de ciertas clases de CDPs es similar durante diferentes registros y que la inyección intradérmica de capsaicina cambia la probabilidad de ocurrencia de clases específicas de CDPs (figura 6). Estos resultados han llevado a sugerir que la misma red neuronal puede adquirir configuraciones que generan los diferentes CDPs y que la acción de diferentes variables, como la inyección intradérmica de la capsaicina cambian la configuración de la red neuronal, incrementando en este caso particular las probabilidades de ocurrencia de CDPs de mayor amplitud. Se ha propuesto también que existen grupos de neuronas acoplados y que éstos son responsables de las diferentes clases de CDPs encontradas. La información sensorial periférica y la modulación supraespinal pueden activar o inhibir a estos grupos de neuronas acopladas.

Con base en los estudios previos han surgido una serie de preguntas: ¿existen otros grupos de neuronas asociados con otro tipo de CDPs además de los n y nps?, ¿cuál es la influencia descendente tanto excitadora como inhibidora que se activa durante nocicepción?, ¿cuáles son los mecanismos de la analgesia preventiva?, ¿qué relación hay entre la actividad espinal con

potenciales en el tálamo, tallo y corteza cerebral?. El presente trabajo se enfocará a investigar la participación de los mecanismos gabaérgicos y glicinérgicos para regular la probabilidad de ocurrencia de los CDPs.

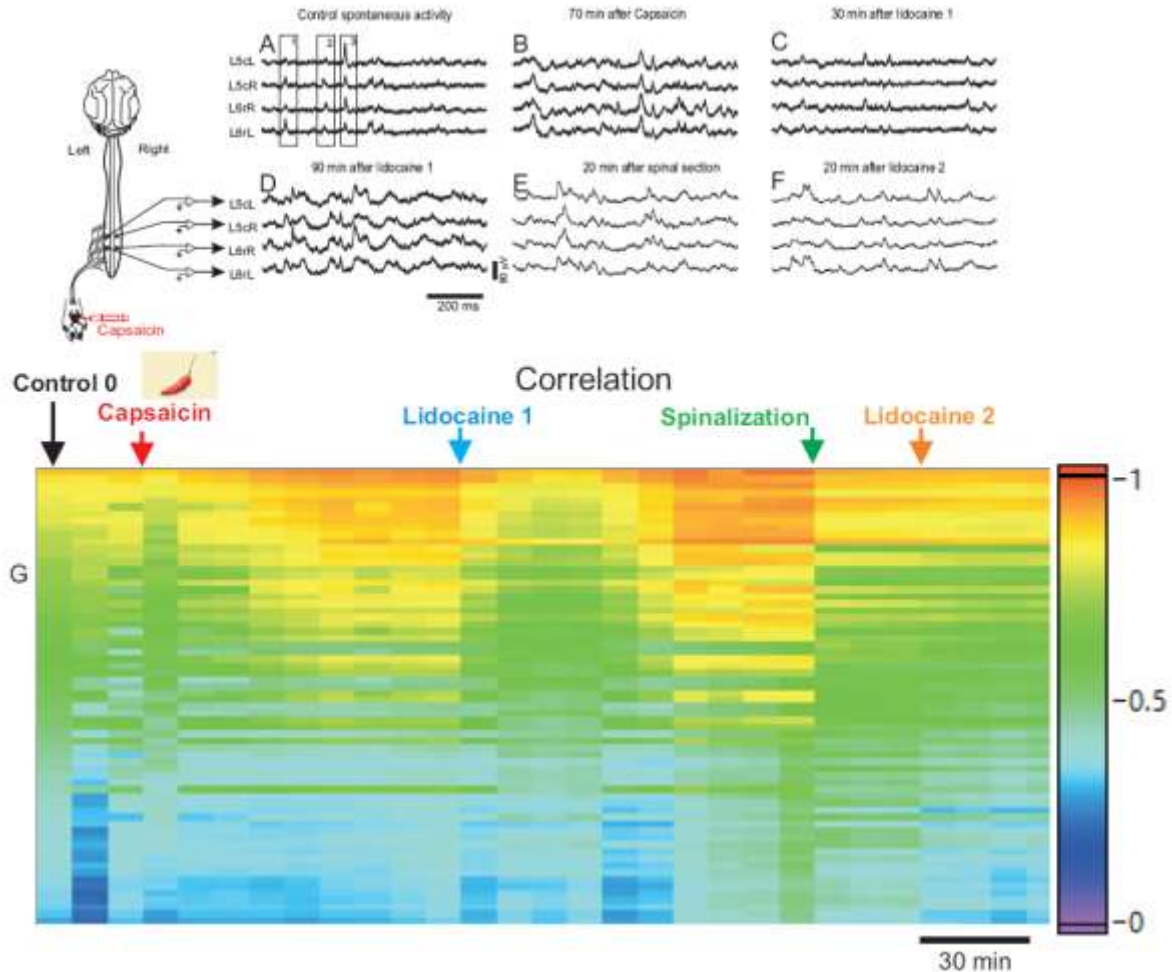


Figura 5. La inyección intradérmica de capsaicina aumenta la sincronización entre la actividad espontánea registrada en el dorso de la médula a través de distintos segmentos espinales. **A.** CDP espontáneos registrados en los segmentos L5 y L6 izquierdo y derecho, antes de la inyección intradérmica de capsaicina. **B.** 70 minutos después de la inyección de capsaicina. **C y D** 30 y 90 minutos después de la inyección sistémica de lidocaína. **E.** 20 minutos después de espinalización. **F.** 20 minutos después de una segunda inyección de lidocaína. **G.** Coeficientes de correlación entre la actividad espontánea de diferentes segmentos espinales (L4-L7), (datos no publicados)

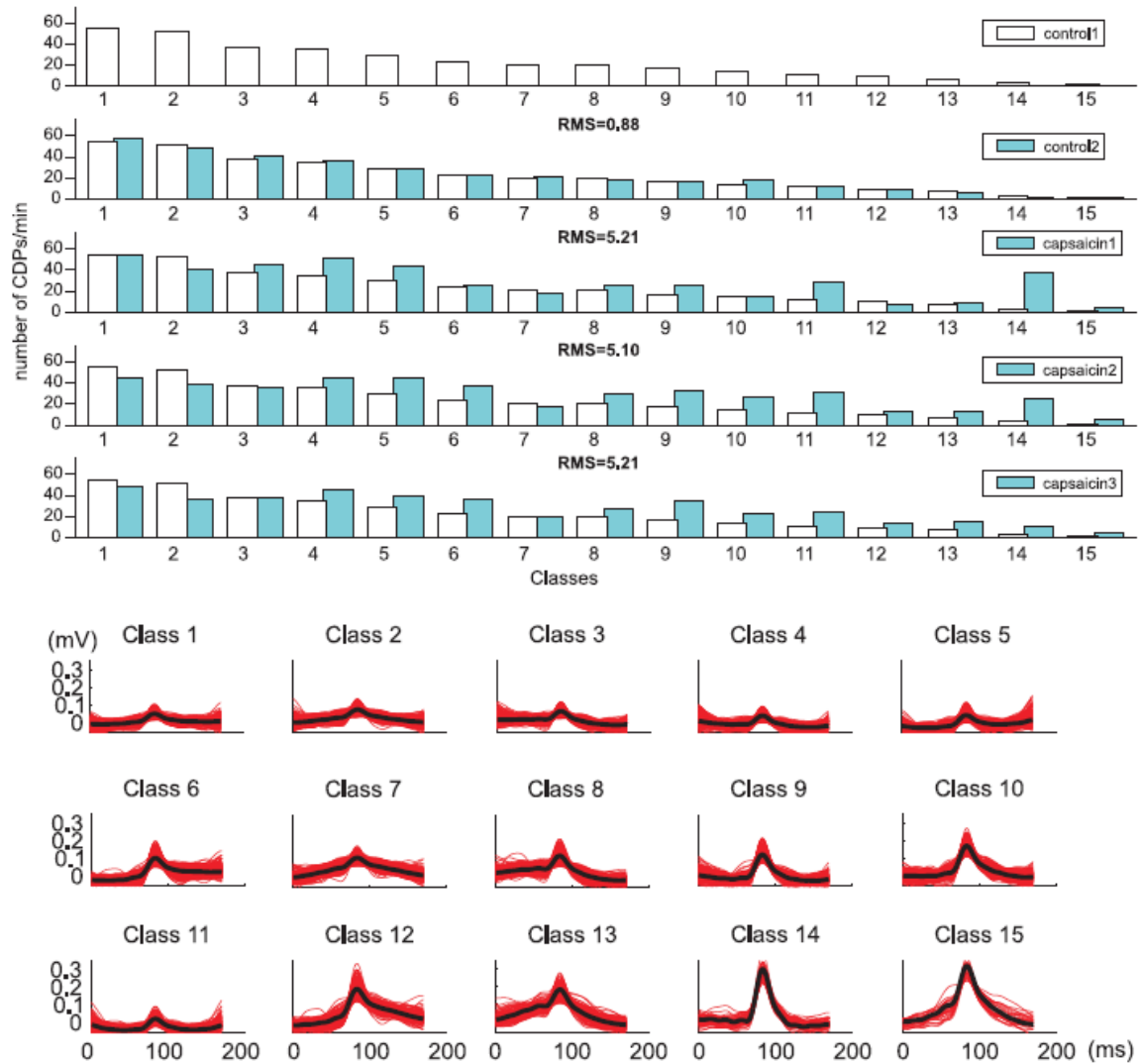


Figura 6. (Panel superior) Histogramas que muestran las variaciones en la frecuencia de ocurrencia de las diferentes clases de CDPs obtenidos durante registros control y en presencia de capsaicina en el segmento L6rl. (Panel inferior) Trazos que muestran las 15 clases seleccionadas de CDPs utilizados para construir los histogramas. Tomado de Martin *et al.*, 2015.

Planteamiento del problema

Existen pocos trabajos relacionados con el estudio de las conexiones funcionales en las redes neuronales de la médula espinal. Sin embargo, se ha observado que las neuronas del asta dorsal de la médula espinal presentan una organización funcional intrínseca no aleatoria, que se puede modificar también de forma estructurada por la información sensorial y la modulación descendente de vías supraespinales. Esta característica tiene gran importancia para comprender el papel de la médula espinal en el desarrollo de diferentes tareas motoras y de discriminación sensorial.

Se propone que los mecanismos inhibidores en particular gabaérgicos y glicinérgicos (figura 3 y 4), juegan un papel importante en la modificación y mantenimiento de la organización de la conectividad funcional entre las neuronas del asta dorsal. Sin embargo, en el caso particular de la capsaicina y la lidocaína, no está claro cómo pueden modificar las probabilidades de ocurrencia de CDPs espontáneos con características específicas y cómo las vías descendentes pueden estar participando en la modulación de estos cambios.

Es por lo tanto importante evaluar los efectos del bloqueo de receptores GABAérgicos y glicinérgicos (picrotoxina y estricnina), sobre los patrones de conectividad y generación de las distintas clases de CDPs.

Hipótesis

Las probabilidades de generación de las distintas clases de CDPs espontáneos dependen en parte de la magnitud y duración de la inhibición asociada con la generación de éstos, que en el caso de los npCDPs puede ser predominantemente gabaérgica y ser modulada por influencias supraespinales.

Objetivos

Objetivo general.

- Examinar en preparaciones con el neuroeje intacto y espinalizadas los cambios en los patrones de sincronización y probabilidades de generación de las distintas clases de CDPs producidas al bloquear sistémicamente receptores GABAérgicos y glicinérgicos.

Objetivos particulares.

- Examinar los cambios en sincronización de los CDPs espontáneos registrados en distintos segmentos espinales producidos por la administración sistémica de picrotoxina o estriknina en preparaciones con el neuroeje intacto o espinalizadas.
- Evaluar los cambios producidos en las probabilidades de generación de las distintas clases de CDPs seleccionadas automáticamente durante la administración de picrotoxina o estriknina en preparaciones con el neuroeje intacto o espinalizadas.
- Cuantificar cambios en la onda positiva asociada a los npCDPs espontáneos, seleccionados automáticamente y en la respuesta producida por estimulación eléctrica y táctil, durante la administración de picrotoxina o estriknina en preparaciones con el neuroeje intacto o espinalizadas.
- Examinar las diferencias entre los efectos de la picrotoxina y estriknina bajo la influencia de estructuras supraespinales y sin esta influencia a nivel caudal a una lesión espinal.

Metodología

Procedimiento general. Se utilizaron gatos adultos, anestesiados inicialmente con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (40 mg/Kg). Se canularon las dos venas radiales para la administración posterior de anestesia y otros fármacos. También se canularon la arteria carótida, la tráquea y la vejiga urinaria. Posteriormente se administraron dosis adicionales de pentobarbital sódico al 10% de manera intravenosa para mantener un nivel adecuado de anestesia. Se monitoreó la presión arterial asegurándose que se encontrara en un intervalo entre 100 y 120 mmHg. Cuando fuera necesario se administró dextran al 10% para regular la presión arterial. Se realizó una laminectomía para exponer la médula espinal en los segmentos lumbares. El animal se paralizó con bromuro de pancuronio y se mantuvo con ventilación artificial.

Registro y estimulación. Los CDPs se registraron con 11 ó 12 electrodos, conforme fuera necesario, colocados en la superficie de la médula espinal entre los segmentos L4 y L7. También se registraron los DRPs en un filamento de raíz dorsal caudal izquierdo (L6-L7). Además se registraron los potenciales de campo intraespinales con microelectrodos de vidrio llenos de NaCl (2 M), con una resistencia entre 1.1 y 1.8 MOhms. Los microelectrodos se insertaron uno en la región lumbar rostral (L4-L5) y otro más caudal (L6-L7) a distintas profundidades hasta localizar potenciales de campo de mayor amplitud generados por la estimulación eléctrica y táctil. Estos registros se digitalizaron para su posterior análisis.

La piel inervada por los nervios sural (SU) y peroneo superficial (SP) de la extremidad inferior izquierda, se estimuló eléctricamente mediante electrodos de aguja insertados subcutáneamente en las zonas correspondientes a los campos receptivos de estos nervios. También se efectuó estimulación táctil producida por el flujo de aire generada por un Pico spritzer (equivalente a 4g/fuerza de filamentos de Von Frey) a través de un par de micropipetas, las cuales se colocaron cerca de la piel del cojinete.

Bloqueo de vías inhibitorias. Para bloquear los receptores GABA_A o glicinérgicos, se administró por vía intravenosa picrotoxina a una dosis de 0.5-1 mg/Kg o de estricnina a una dosis de 0.05-0.2 mg/Kg (Rudomin *et al.*, 1990), en una infusión lenta durante 30 minutos. Al finalizar el experimento se administró una dosis letal de pentobarbital sódico y se removió la médula espinal dejando la punta de las micropipetas para la posterior reconstrucción de la trayectoria. La médula se fijó y deshidrató para el posterior análisis histológico.

Bloqueo reversible, sección entre L5 – L6 y espinalización. Se colocó un termodo sobre el dorso de la médula entre los segmentos T4-T6, a través del cual fluyó un líquido refrigerante para producir un bloqueo por frío de la médula hasta una temperatura de aproximadamente - 4 °C. De esta forma se bloqueó la comunicación con estructuras supraespinales. Posteriormente se interrumpió el bloqueo por frío al circular líquido caliente (25°C aproximadamente) en el termodo hasta llegar a una temperatura fisiológica y restablecer la comunicación entre la médula espinal y las vías supraespinales. Para la sección entre segmentos espinales, se separó la médula entre los segmentos L5 y L6 evitando dañar vasos principales que inervan esta zona, además de no mover los electrodos que se encuentran en el dorso de la médula. En caso de requerir una espinalización completa, se enfría la médula con hielo seco y posteriormente se realiza la sección espinal completa entre T4-T6.

Análisis de datos. Para calcular los coeficientes de correlación de Pearson entre los potenciales espontáneos del dorso de la médula para cada par de segmentos espinales registrados se utiliza la función cor del software R (R Development Core Team, 2016), para evaluar el grado de sincronización entre segmentos espinales. La densidad espectral se estima utilizando el paquete psd de R (Barbour & Parker, 2014) y se realiza el cálculo de la coherencia entre pares de segmentos lumbares, para evaluar cambios en la intensidad y frecuencia de la actividad espontánea, lo cual es una medida

que nos permite conocer el tipo de actividad que se presenta en cuanto a su duración y cuáles fueron los tipos de potenciales que predominaron en la señal.

Selección por forma de onda. Se utilizó software desarrollado anteriormente (Chávez *et al.*, 2012). En el cual se definieron plantillas por el usuario para identificar y clasificar potenciales del dorso de la médula, que coincidieran con la plantilla. Se definieron dos clases de plantillas, una para los npCDPs y otra para los nCDPs. La señal se normalizó para poder seleccionar potenciales de una misma forma de onda con diferentes amplitudes. Posteriormente se desarrollaron programas en R para clasificar los potenciales seleccionados en 4 intervalos de amplitud máxima diferente. Menores de 20 μV , entre 20 y 40 μV , entre 40 y 60 μV y mayores a 60 μV . Así mismo se visualizaron los potenciales seleccionados para confirmar que la forma de onda que se estaba buscando fuera correcta, dependiendo de la plantilla utilizada.

Con la colaboración de la UPC de Barcelona se realizará la identificación y clasificación de los potenciales espontáneos del dorso de la médula con base en su amplitud y duración, aplicando metodologías de aprendizaje automatizado.

Resultados

Efecto de la picrotoxina en preparación con neuroeje intacto.

El primer experimento se realizó con el objetivo de caracterizar la respuesta del sistema con un bloqueo gabérgico, tanto bajo la influencia supraespinal como sin ella. Por lo tanto se utilizó una preparación con el neuroeje intacto. Se administró picrotoxina a una concentración de 0.5 mg/Kg por vía intravenosa, cuya concentración ya había sido utilizada para bloquear parcialmente la actividad gabaérgica (Eccles *et al.*, 1963; Rudomin *et al.*, 1990). En la figura 7 se muestran registros característicos de las diferentes condiciones evaluadas. En un inicio se registró la actividad espontánea sin ningún fármaco (registros control, figura 7A),. Cada uno de los registros fue de 10 minutos de actividad espontánea continua. Se registró esta actividad durante 40 minutos en donde se pudo observar actividad síncrona, como la que se muestran en los recuadros rojos en la figura 7A.

Para poder evaluar los patrones de sincronización así como los cambios que se presentaron, se calcularon los coeficientes de correlación (Pearson) entre cada combinación de pares de segmentos registrados. En estudios previos (Rudomin *et al.*, 1969; Chávez *et al.*, 2012) se utilizó esta herramienta matemática para evaluar cambios en la sincronización entre grupos neuronales, que se han relacionado con cambios en la conectividad de la red neuronal. Los valores de correlación (figura 7B) se ordenaron de forma decreciente para el registro control, este orden se mantuvo constante para las siguientes condiciones. Con estos datos se construyeron las gráficas que se observan en la figura 7B, D y F.

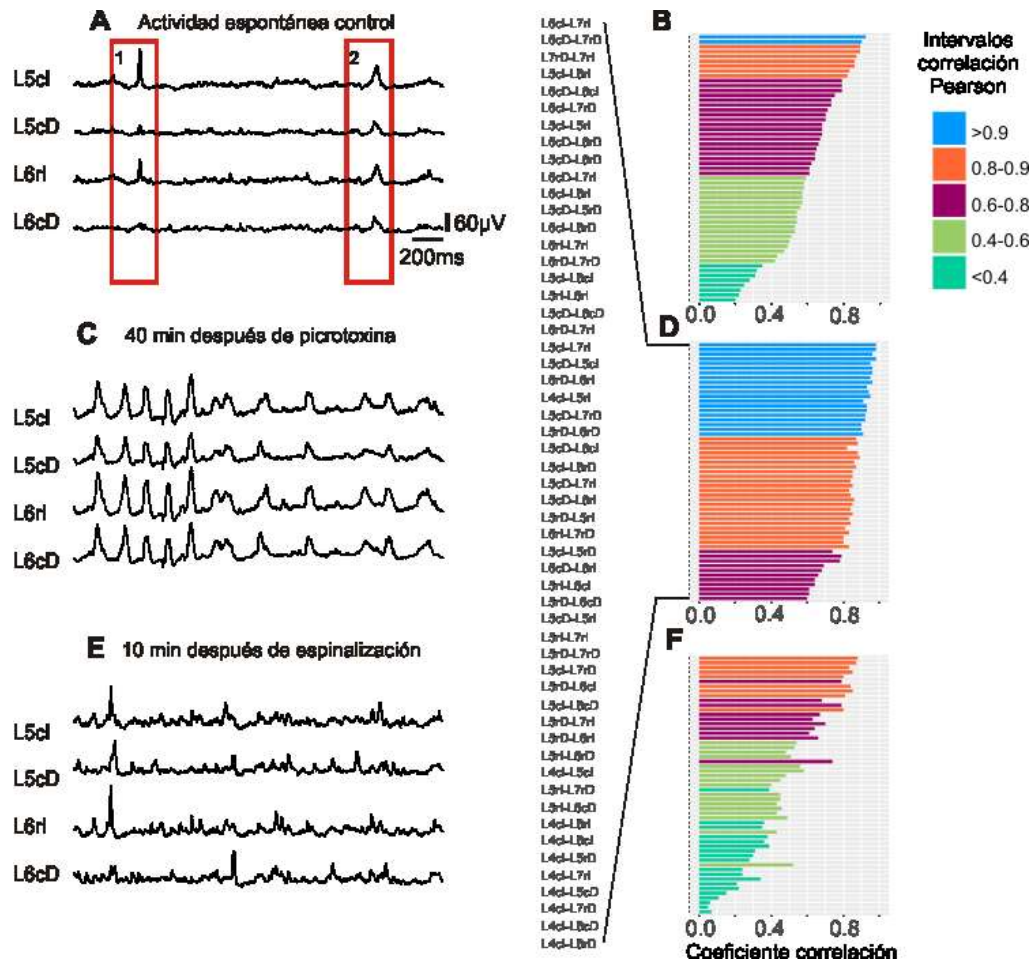


Figura 7. Aumento de la actividad sincrónica entre diferentes pares de segmentos espinales. **A.** Registro representativo de la actividad espontánea en un estado control. En el recuadro 1 se muestran los CDPs con mayor sincronía entre los segmentos ipsilaterales del lado izquierdo. En el recuadro 2 se observa actividad sincrónica en todos los segmentos de forma ipsi y contralateral. **B.** Correlaciones entre pares de segmentos espinales del estado control, ordenados de mayor a menor (este orden se mantiene constante para las siguientes condiciones). **C.** Registro representativo de actividad espontánea 40 minutos después del inicio de la administración de picrotoxina (0.5 mg/Kg). **D.** Correlaciones entre pares de segmentos espinales después de 40 minutos del inicio de la administración de picrotoxina. **E.** Registro representativo 10 minutos después de haber realizado la espinalización. **F.** Correlaciones entre pares de segmentos espinales 10 minutos después de la espinalización.

Como se ilustra en la figura 7C, después de 40 minutos de haber iniciado la administración de picrotoxina, se presentaron periodos de alta sincronización en donde predominaron ondas oscilatorias. Se tiene bien documentado que la picrotoxina en altas concentraciones causa convulsiones (Ramwell & Shaw, 1965). En este experimento se utilizaron dosis subconvulsivas, sin embargo es claro como la sincronización entre todos los segmentos registrados aumento de forma considerable, lo cual se puede observar en la figura 7D, en donde los valores mínimos de correlación se encontraron entre 0.6 y 0.8.

Posteriormente para evaluar la diferencia entre un estado bajo la influencia de las estructuras supraespinales y los efectos a nivel local (espinal), se realizó una espinalización seccionando la médula espinal a nivel cervical. Con esta acción el registro cambió súbitamente como se observa en la figura 7E, donde ya no se observó la actividad altamente sincronizada, sin embargo la actividad no se deprimió por completo y se presentó un aumento en la actividad espontánea de mayor frecuencia y amplitud baja. A pesar de que la sincronización entre los diferentes segmentos disminuyó (figura 7F), todavía se presentó cierto orden en los valores de correlación, diferente a los dos estados previos.

Curso temporal del efecto de la picrotoxina.

Para examinar el curso temporal del efecto de la picrotoxina, se graficaron los valores de correlación para todos los registros realizados, cada uno tuvo una duración de 10 minutos (figura 8A). Nuevamente se ordenaron de forma decreciente tomando como referencia el control 4, el cual corresponde al registro previo a la administración de picrotoxina. En la parte superior de esta gráfica se indica con flechas el momento en el que se administró la picrotoxina y cuando se realizó la espinalización. Los registros control presentaron valores de correlación similares durante 40 minutos. La correlación entre los segmentos aumentó a partir de los 20 minutos posteriores al inicio de la administración de picrotoxina. Este comportamiento

alcanzó un máximo a los 40 minutos de registro y posteriormente presentó una tendencia a disminuir, lo cual se manifestó hasta el último registro previo a la espinalización. Al momento de realizar la espinalización, se observó un cambio repentino en los niveles de correlación y el nuevo patrón observado en los valores de correlación se mantuvo muy constante durante 40 minutos de registro.

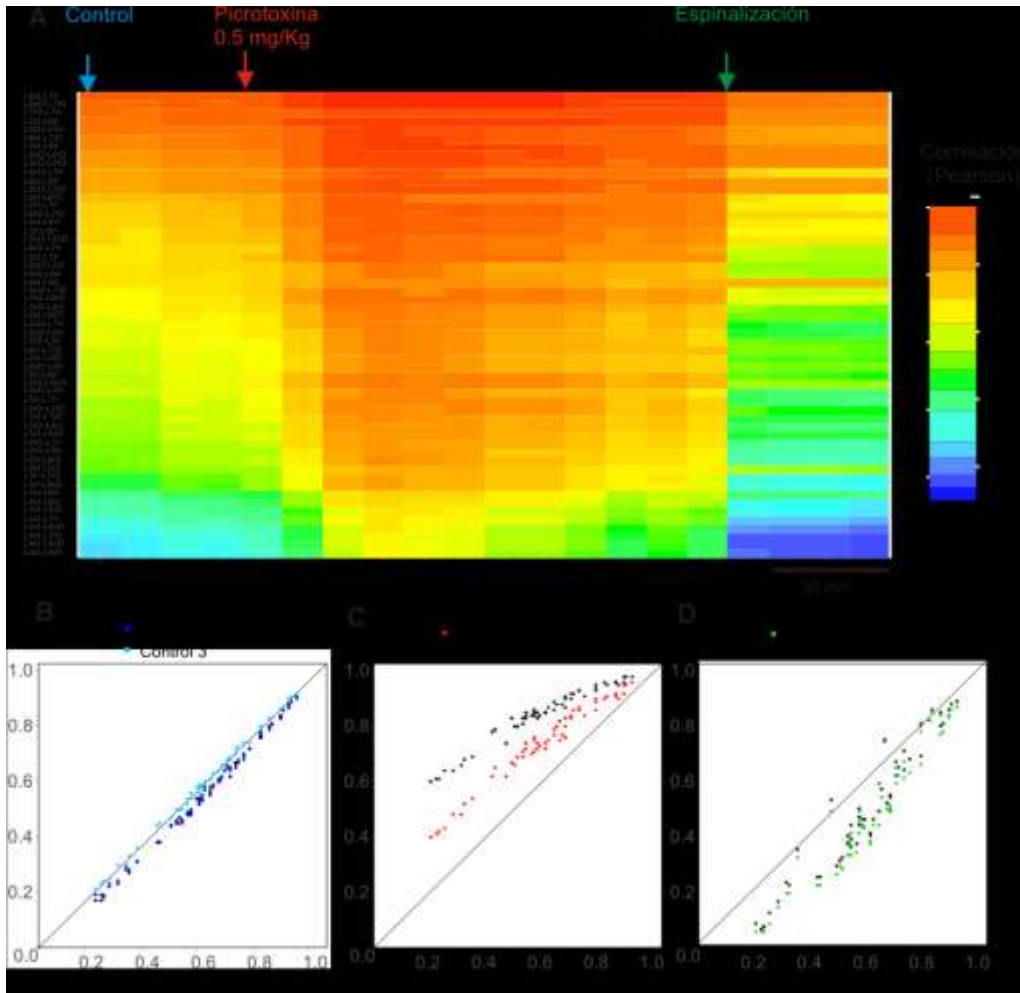


Figura 8. Curso temporal del efecto de la picrotoxina sobre la sincronización.

A. Gráfica general de la correlación calculada entre los diferentes pares de segmentos registrados. Cada columna representa 10 minutos de registro. Se indican con flechas el momento en el cual se administró la picrotoxina (0.5 mg/Kg) y cuando se realizó la espinalización. **B, C, D.** Comparación de los valores de correlación de diferentes registros (eje ordenadas) contra el control 4 (último control registrado previo a la administración de picrotoxina, eje abscisas).

Los cambios en los patrones de correlación se ilustran en las gráficas de la figura 8B, C y D. En este caso se graficaron los valores de correlación de distintos registros, contra los valores del control 4 como referencia. De esta forma se puede observar que los registros control mantienen coeficientes constantes a través del tiempo lo que da como resultado una distribución lineal, similar a una recta con pendiente de uno (Figura 8B). Por lo tanto se graficó una diagonal que sirve como referencia para evaluar diferentes condiciones. En el caso de los efectos de picrotoxina a los 40 y 110 minutos (figura 8C), se observó cómo aumenta de forma general la sincronización entre todos los pares de segmentos, aunque fue más evidente para los pares de segmentos que previamente estaban menos correlacionados. Sin embargo este estado es temporal, ya que a los 110 minutos se pudo observar una disminución con tendencia a acercarse a los valores del control. Los registros de la espinalización presentaron una disminución de los valores de correlación con respecto al control y este patrón fue constante hasta el fin del experimento. Al comparar el patrón de la espinalización a los 10 minutos se pudo apreciar que fue muy similar al obtenido con los registros a los 40 minutos después de la espinalización (figura 8D).

Aumento en la actividad espontánea.

Para evaluar el tipo de la actividad espontánea, en cuanto a la duración de los potenciales, que se presentaron con el bloqueo gabaérgico, se estimaron las densidades espectrales. En 1963 Gasteiger & Ichikawa, determinaron que la actividad espontánea en la médula espinal se caracterizaba por presentar frecuencias entre los 3-6 Hz. Estas frecuencias están relacionadas con la duración de los potenciales. Estos datos coinciden con lo obtenido para los registros control. En la figura 9A se muestran los espectros de los registros del segmento L6rl del control 1 y 4, los componentes espectrales de mayor amplitud se encontraron entre los 2 a 4 Hz. Además al comparar los dos registros (control 1 contra control 4) se observó que fueron semejantes entre sí. Así mismo los valores de los espectros de todos los segmentos

espinales registrados (figura 9B) para el control 4, presentaron mayor amplitud a bajas frecuencias.

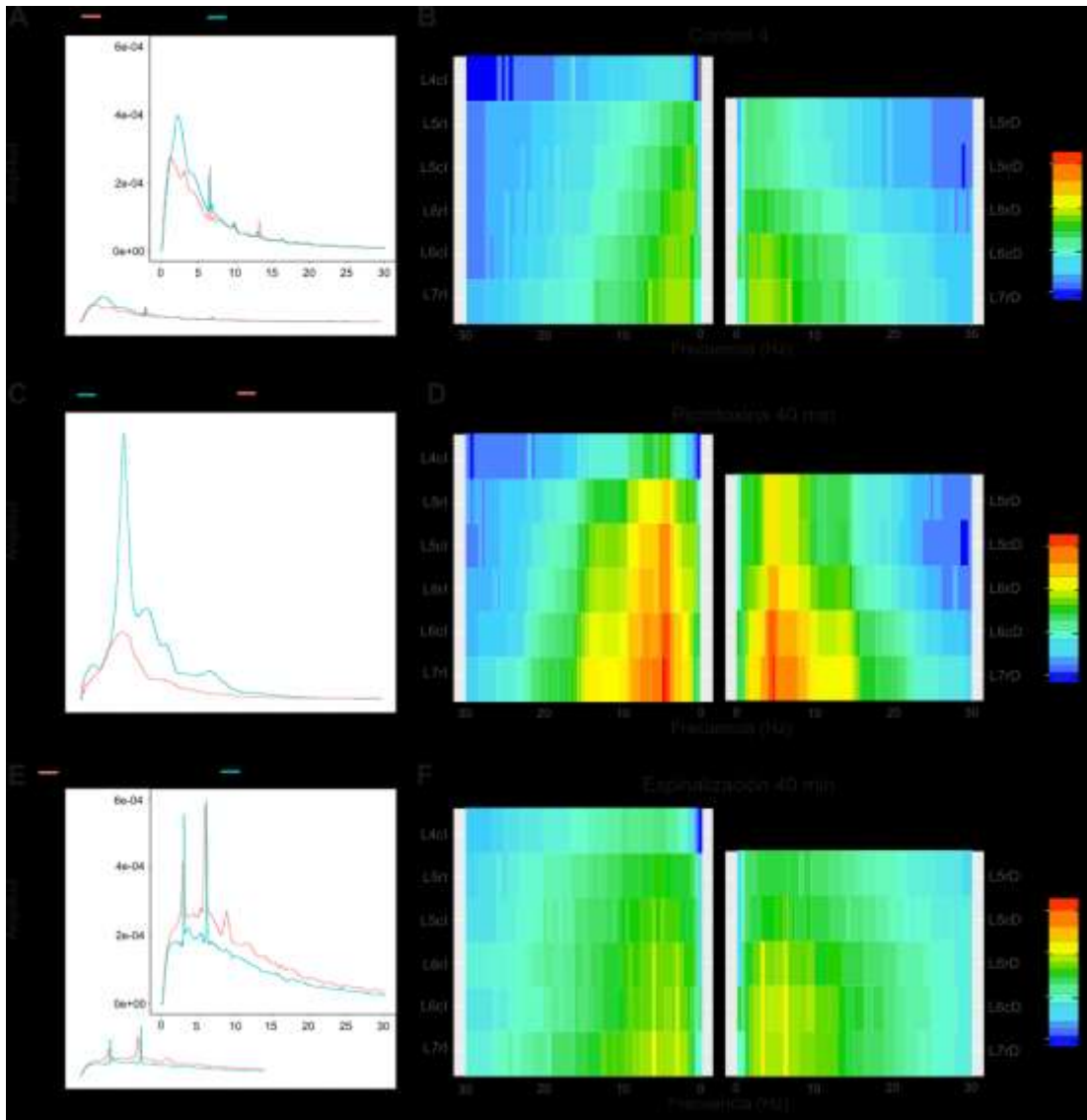


Figura 9. Aumento de la actividad espontánea inducido por picrotoxina. A, C, E. Densidad espectral de potencias del registro del segmento L6r1, en diferentes condiciones. En **A** y **C** se muestra un recuadro con una amplificación del espectro correspondiente. **B, D, F.** Gráficas de contorno con los valores de la densidad espectral de los distintos segmentos registrados en 3 diferentes condiciones. **B.** Registro Control 4. **D.** Registro 40 minutos después de la administración de picrotoxina. **F.** Registro 40 minutos después de la espinalización.

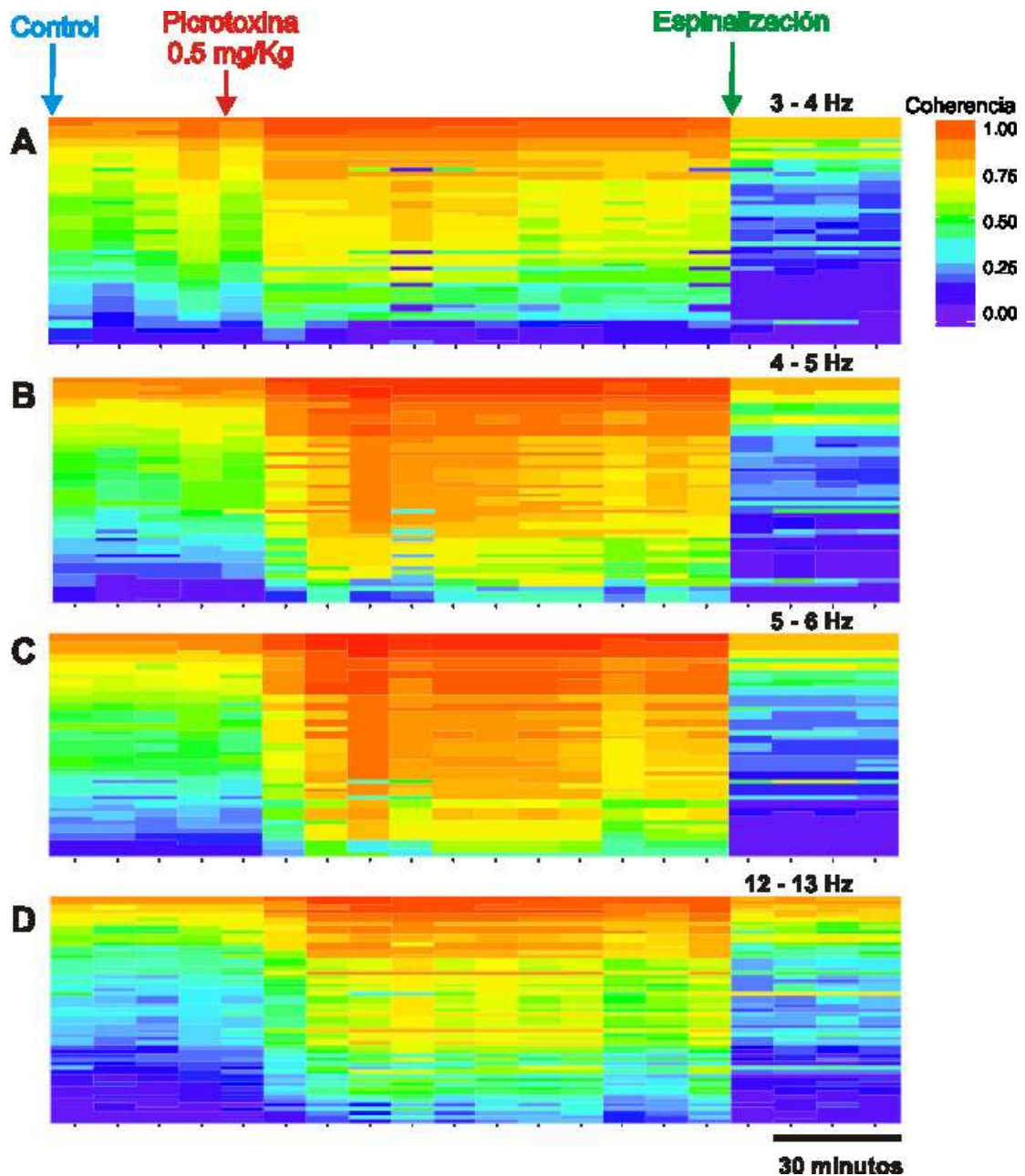


Figura 10. Relación en el aumento de la actividad espontánea entre distintos segmentos espinales a diferentes componentes de frecuencia. A, B, C, D. Valores de coherencia entre las diferentes combinaciones de pares de segmentos, cada columna corresponde a un registro de 10 minutos. Los valores se ordenan de mayor a menor tomando como referencia el control 4. Se eligieron 4 diferentes intervalos de frecuencias. A. De 3-4 Hz, B. De 4-5 Hz, C. De 5-6 Hz, D. De 12-13 Hz.

Posteriormente al administrar la picrotoxina hubo un aumento considerable en la amplitud del componente espectral cercano a los 5 Hz, cuyo máximo se encontró a los 40 minutos posteriores al inicio de la administración (figura 9C). Esto coincide con la aparición de ondas oscilatorias que se observaron en el registro (figura 7C), las cuales predominaron en la señal. En correspondencia con lo observado al calcular los coeficientes de correlación, el efecto fue transitorio y el componente espectral a 5 Hz disminuyó a los 110 minutos posteriores al inicio de la administración. Este mismo fenómeno se observó en los demás segmentos registrados, es decir un aumento en los componentes espectrales entre 4 y 7 Hz, que se presentó incluso en los segmentos más rostrales (figura 9D). Finalmente una vez realizada la espinalización, la actividad espontánea disminuyó y al observar el espectro de potencias se pudo encontrar cierta semejanza con los espectros correspondientes a los registros control. Este comportamiento se mantuvo constante durante todos los registros realizados a partir de la espinalización (figura 9E). Además al comparar las amplitudes del espectro en todos los segmentos registrados se observó que hubo un aumento de las amplitudes en componentes de mayor frecuencia al compararlo con lo que ocurrió en los registros control. Esto también corresponde con lo que se observó en el registro (figura 7E), donde se presentaron potenciales de mayor frecuencia y menor amplitud.

Como se puede apreciar en la figura 9B, D y F, el aumento de amplitud en los componentes espectrales de frecuencias entre 4 y 7 Hz, también se presentó en distintos segmentos espinales. Para determinar la relación entre el tipo de actividad espontánea registrada entre diferentes pares de segmentos, se calculó la coherencia a diferentes intervalos de frecuencia. De esta forma se graficaron los valores de coherencia de forma similar a la gráfica de las correlaciones. Se encontró que a bajas frecuencias entre 3-4 Hz (figura 10A) hay un aumento en los valores de coherencia a partir de los 20 minutos posteriores al inicio de la administración de la picrotoxina. Sin embargo el aumento no fue tan alto, como el que se presentó a frecuencias

de entre 4 y 6 Hz (figura 10B y C). Este aumento tampoco fue tan elevado a mayores frecuencias (figura 10D). La similitud de la gráfica de correlaciones (figura 8A), con las gráficas de coherencias entre 4 y 6 Hz (figura 10B y C), sugiere que los incrementos en la sincronización son ocasionados por las ondas oscilatorias cuyo componente espectral está alrededor de 5 Hz.

Finalmente al observar los registros correspondientes a la espinalización, se encontró que de igual forma que en las correlaciones, se disminuyeron los valores de coherencia a patrones relativamente constantes. Sin embargo, este comportamiento fue diferente a altas frecuencias (12-13 Hz), en donde los valores de coherencia permanecieron en valores ligeramente mayores al compararlo con bajas frecuencias. Esto último puede estar relacionado con el aumento de actividad espontánea de alta frecuencia que se observa tanto en los registros (figura 7E), como en los espectros de potencias (figura 9E y F).

Efecto sobre el DRP y la onda positiva generado por estimulación eléctrica y táctil.

Con los análisis anteriores es posible caracterizar el comportamiento del sistema bajo un bloqueo gabaérgico. Se pudo determinar que la picrotoxina aumenta la actividad sincrónica entre los diferentes segmentos registrados. Dicho fenómeno está relacionado con la aparición de ondas oscilatorias sincronizadas. Además se evidenció la importancia de la influencia supraespinal para que este comportamiento se presente en la médula espinal. Sin embargo no queda claro que ocurrió con los mecanismos gabaérgicos a nivel espinal y si éstos pueden estar relacionados con los cambios en conectividad de los grupos neuronales responsables de la actividad espontánea. Por esta razón se utilizó la generación de una respuesta producida por estímulos eléctricos y estimulación táctil para evaluar si se presentaban cambios en los mecanismos inhibidores relacionados a estos estímulos.

Con ambos tipos de estimulación, se sabe que su respuesta genera potenciales en el dorso de la médula en los segmentos lumbares (Manjarrez *et al.*, 2000) y se activan vías inhibitoras gabaérgicas, que generan PAD, por lo que se presenta una onda positiva asociada al DRP (Eccles *et al.*, 1963). También se realizaron registros con electrodos intraespinales a diferentes profundidades dependiendo en el lugar donde se observó una respuesta máxima, uno se colocó en segmentos rostrales (L4cl-L5rl, 1200 μ) y otro en segmentos caudales (L6rl-L6cl, 1600 μ). En este caso se estimuló eléctricamente la piel que inerva el nervio sural (SU, 5xT) y peroneo superficial (SP, 2xT) y mediante aire a presión se estimuló el cojinete de la extremidad inferior izquierda. La respuesta control previa a la administración de la picrotoxina se ilustra en la figura 11 (registros de color azul). Sólo se muestran los registros de los segmentos L6cl y L7rl, el DRP asociado y el electrodo intraespinal caudal (IFPc).

A los 40 minutos posteriores al inicio de la administración de picrotoxina (registros rojos), se observó una disminución en el DRP producido por el bloqueo gabaérgico de la DAP, tanto para la estimulación eléctrica como para la estimulación táctil. También se presentó una ligera reducción en la onda positiva en el dorso de la médula, asociada al DRP. Además en los potenciales intraespinales, se presentó una respuesta de mayor latencia, probablemente relacionada a la desinhibición de vías oligosinápticas. Esta respuesta oligosináptica puede interferir con lo que se observó en el dorso de la médula y el DRP. Al momento de espinalizar (figura 11, registros verdes), desapareció la respuesta oligosináptica y tanto el DRP como la onda positiva asociada a éste aumentaron a una amplitud mayor a lo observado en registros control. Esto está relacionado con la pérdida de inhibición tónica por parte de estructuras supraespinales. Ambos tipos de estimulación presentaron un comportamiento similar, sin embargo para la estimulación de mecanorreceptores, la disminución en el DRP y la onda positiva en el dorso de la médula espinal fue más evidente.

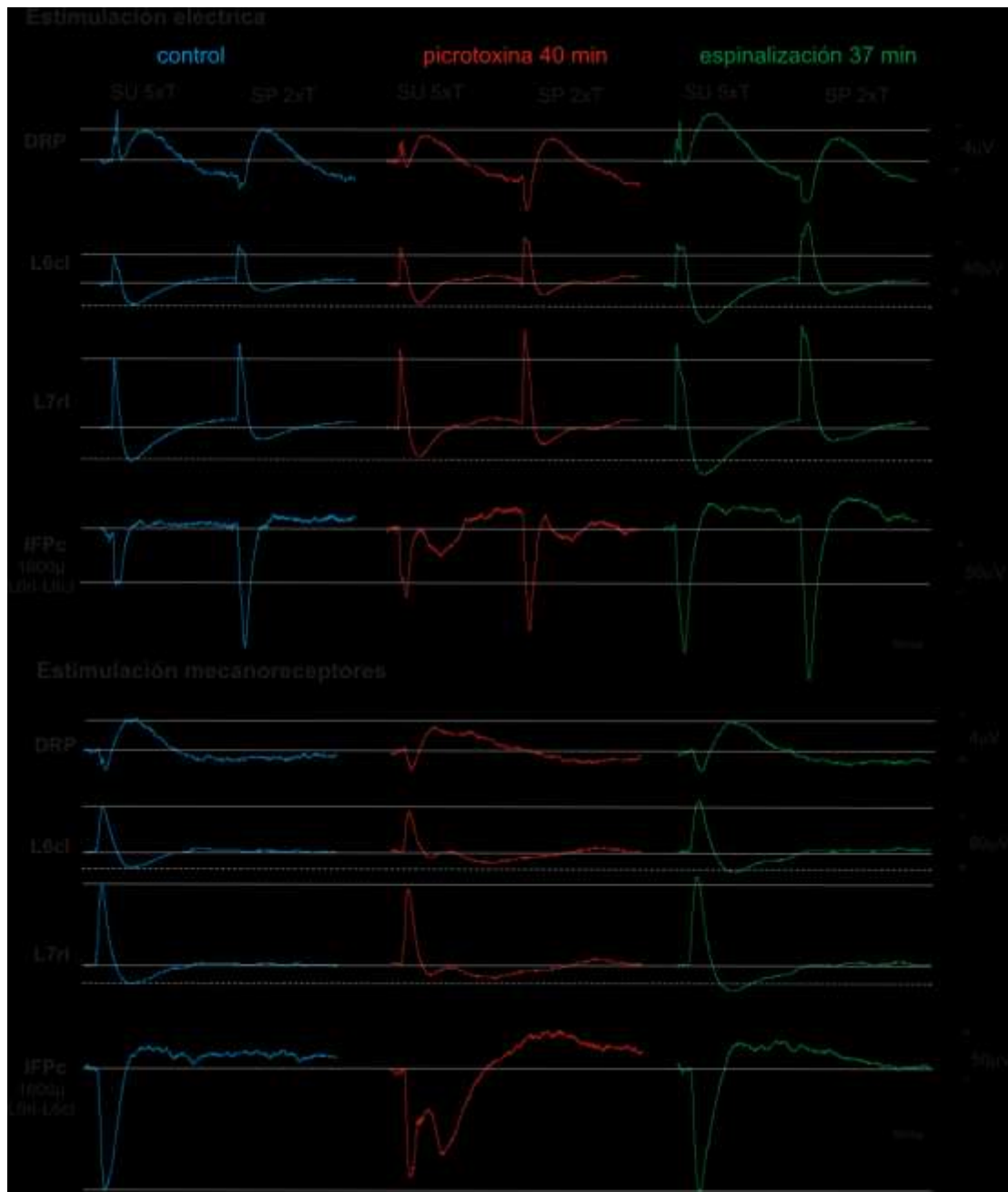


Figura 11. Cambios generados por la administración de picrotoxina y espinalización en las respuestas producidas por estimulación eléctrica y táctil. En los registros superiores se muestra el DRP asociado a la estimulación de los nervios sural (SU, 5xT) y peroneo superficial (SP, 2xT), así como los CDPs de los segmentos L6cl y L7rl y el electrodo intraespinal colocado entre los segmentos L6rl y L6cl a una profundidad de 1600 μ (IFPc). En los registros inferiores se muestra la respuesta a la estimulación táctil de los mismos canales.

Cambios en la frecuencia de potenciales seleccionados con base en su forma de onda.

Debido a que la respuesta oligosináptica podía estar interfiriendo con el análisis del bloqueo gabaérgico a nivel espinal, se utilizó una metodología aplicada anteriormente (Chávez *et al.*, 2012), para seleccionar potenciales con base en la forma de onda. El programa desarrollado para este propósito selecciona los potenciales con base en una plantilla definida por el usuario, de esta forma se pueden separar entre potenciales tipo n y np. Con esta selección se clasificaron los potenciales con base en la amplitud de la onda n y de esta forma identificar cómo cambió su probabilidad de ocurrencia. Se dividieron en 4 amplitudes: menores a 20 μV , entre 20 y 40 μV , entre 40 y 60 μV y mayores a 60 μV .

Los resultados de esta selección se pueden observar en la figura 12. En el lado izquierdo se muestran los potenciales seleccionados sobrepuestos, tanto para los potenciales np (figura 12A) como los potenciales n (figura 12D). Con la metodología utilizada hubo mayor probabilidad de encontrar potenciales de amplitud mayor a los 60 μV para el caso de los np. Al evaluar cómo se modificó su frecuencia de ocurrencia entre las diferentes condiciones, se pudo encontrar que durante el efecto de la picrotoxina, el número de potenciales np por registro de 10 minutos, mayores a 60 μV , aumentó. Sin embargo las otras clases de potenciales con menor amplitud disminuyeron su probabilidad de ocurrencia (figura 12B). Después de haber realizado la espinalización el número de eventos aumentó. Este comportamiento fue más evidente para los potenciales de entre 40 y 60 μV . También con el bloqueo gabaérgico se presentó un aumento en la amplitud media de la onda p de los potenciales seleccionados (figura 12C) y posteriormente disminuyó con la espinalización. Este comportamiento es contrario a lo que se espera para un bloqueo gabaérgico, considerando que la onda p está relacionada con la PAD y la inhibición presináptica de origen gabaérgico (Eccles *et al.*, 1963; Rudomin *et al.*, 1987). Sin embargo por los

análisis anteriores es claro que el aumento en la sincronización que presenta una importante influencia supraespinal, puede estar activando grupos neuronales de láminas más profundas y eso explique el aumento tanto en el número de npCDPs de mayor amplitud así como la magnitud de la onda p.

En el caso de los nCDPs seleccionados con esta misma metodología, se observó que la mayor cantidad de estos potenciales se encontraron entre los 20 y 40 μV (figura 12D). De manera general la cantidad de estos potenciales disminuyó con la administración de picrotoxina y posteriormente aumentó con la espinalización. (figura 12E). También se cuantificó la amplitud media del segmento posterior al nCDP (figura 12F), en este caso se esperaba que no presentara cambios importantes. Sin embargo de acuerdo a lo observado en la gráfica, hay una ligera tendencia a un aumento en su valor con la picrotoxina. Esto puede deberse a que la alta sincronización no permite observar los cambios en la conectividad propios de la red neuronal espinal, como se mencionó previamente.

Para corroborar el argumento de que la alta sincronización afecta el análisis, se observó la relación entre el segmento que se tomó como referencia para la selección, en este caso el segmento L7rl con todos los demás segmentos registrados (figura 13). Como se puede observar para potenciales np, hay una mayor relación con segmentos cercanos y una correlación con el DRP similar a estudios anteriores (Rudomin *et al.*, 1987; Chávez *et al.*, 2012). Además como el canal de referencia fue un registro caudal (L7rl), indicado con un asterisco, es claro que la señal del electrodo intraespinal caudal tiene mayor relación con los potenciales seleccionados que el electrodo rostral, en el cual prácticamente no se observó actividad relacionada (Paneles inferiores figura 13). Este comportamiento se modificó con la picrotoxina, al observar los potenciales a los 40 minutos del inicio de administración (figura 13, paneles rojos). Se puede observar como aumentó la amplitud de los potenciales en todos los segmentos registrados, incluso en los registros del electrodo intraespinal rostral. Posterior a la espinalización el patrón de

aparición de los npCDPs fue similar al registro control (figura 13, paneles verdes). Estas observaciones indican que en la preparación con neuroeje intacto, bajo los efectos de la picrotoxina, predomina los efectos relacionados con la influencia supraespinal. En estas estructuras se pudo presentar una disminución en la inhibición, que por lo tanto sea la causa de un incremento en la excitación observada en la médula espinal. Este efecto parece predominar ante el posible bloqueo a nivel espinal.

Para cuantificar los datos obtenidos mediante la selección, se tomó el conjunto de los potenciales nCDPs y npCDPs respectivamente para cada condición. De esta forma se aplicó el análisis estadístico correspondiente (Welch's anova, Dunnett's Modified Tukey-Kramer Pairwise Multiple Comparison test). Se encontró en el caso de los npCDPs, que la amplitud media de los potenciales correspondientes a los registros de picrotoxina a los 40 y 50 minutos posteriores al inicio de la administración, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a las demás condiciones (figura 14A). Este resultado está relacionado con lo que se observó en el aumento de potenciales de mayor amplitud. La amplitud de la onda p también aumentó a valores estadísticamente significativos a los 40 y 50 minutos posteriores a la administración de picrotoxina (figura 14B). Después de la espinalización se mantuvieron amplitudes significativamente mayores en comparación con los registros control, lo cual se espera debido a la pérdida de la inhibición tónica mencionada previamente.

Los nCDPs a pesar de haber presentado una tendencia a aumentar su amplitud media no muestran diferencia estadística durante el efecto de picrotoxina (figura 14C). De forma similar para la amplitud cuantificada posterior a la onda n (figura 14D), sólo se presentó diferencia significativa para los potenciales del registro correspondientes a los 40 minutos posteriores a la administración de picrotoxina, probablemente por las variaciones que genera el bloqueo gabaérgico sobre la actividad de la línea

basal. También existe la posibilidad de que se hayan seleccionado potenciales np que afecten este valor.

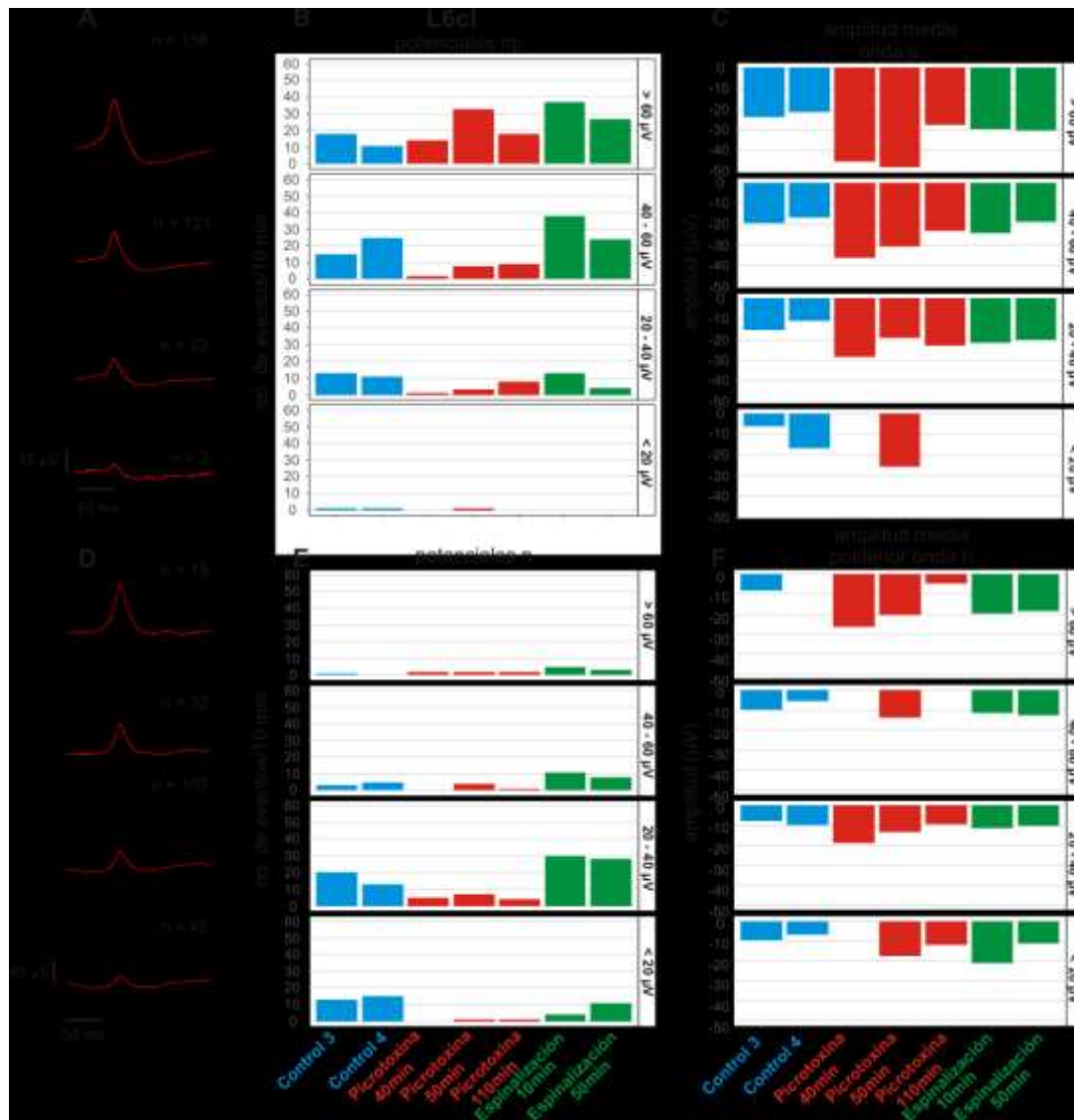


Figura 12. Cambios diferenciales en las probabilidades de generación de potenciales seleccionados y clasificados con base en su forma y amplitud. A, D. Potenciales sobrepuestos seleccionados como np (**A**) y n (**D**) tomando como referencia el segmento L6cl, la línea de color rojo corresponde a la media de los potenciales. Se ordenan con base en la amplitud de la onda n, de superior a inferior: mayores a 60, entre 40 y 60, entre 20 y 40 y menores a 20 μ V. **B, E.** Histogramas que representan el número de eventos de cada clase mostrada en **A** y **D**, por cada 10 minutos de registro. **C.** Cambios en la amplitud media de la onda p de los potenciales np seleccionados (**A**) en las diferentes condiciones.

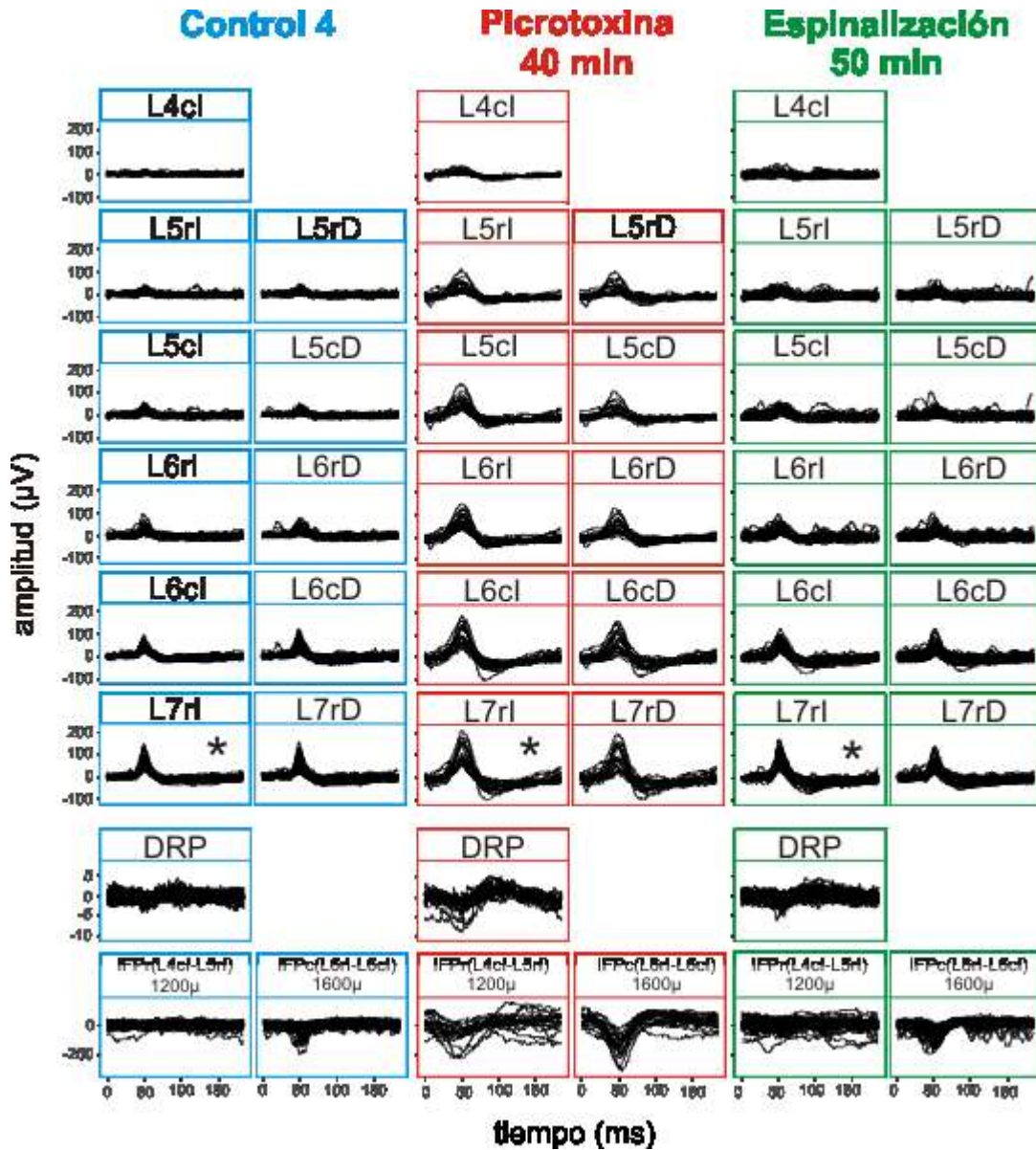


Figura 13. Distribución entre segmentos de los npCDPs seleccionados. Se muestran los CDPs seleccionados tomando como referencia el canal L7ri (*) y los eventos asociados en los demás canales registrados. DRP: potencial de la raíz dorsal, IFPr: potencial de campo intraespinal rostral, IFPc: potencial de campo intraespinal caudal.

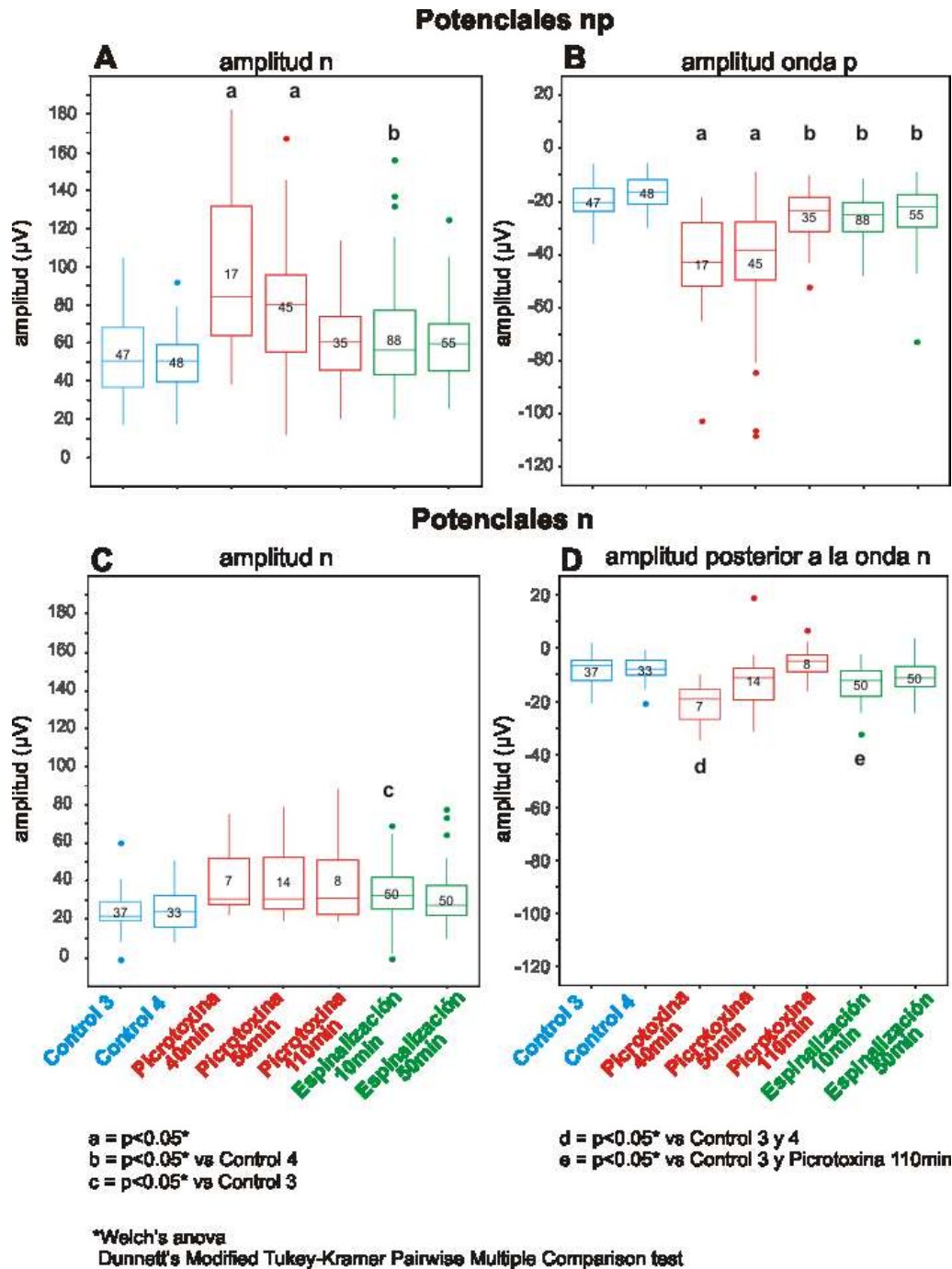


Figura 14. Aumento de la amplitud de la onda negativa y positiva de los npCDPs seleccionados en el segmento L6cl. A. B. C. D. Distribución de la amplitud de los diferentes grupos de potenciales divididos por archivo de registro, en la parte inferior de la figura se indican las condiciones a las que corresponde cada grupo. En el interior de cada caja se encuentra el número de eventos que compone cada grupo y está colocado en el lugar correspondiente a la media de cada uno.

Cambios diferenciales entre clases de CDPs seleccionados y clasificados mediante algoritmos de aprendizaje automatizado.

Con la metodología utilizada, sólo se pudieron seleccionar ciertos tipos de potenciales dividiéndolos en dos grandes grupos, los nCDPs y npCDPs. El programa utilizado sólo fue capaz de identificar un número limitado de estos potenciales. En un registro de 10 minutos hay muchos más potenciales que están involucrados en los cambios en los patrones de correlación. Debido a esta situación se han estado desarrollando metodologías que utilicen algoritmos de aprendizaje automatizado para seleccionar y clasificar la mayor cantidad posible de CDPs espontáneos de manera automática y así realizar un análisis más completo de la ocurrencia de formas de onda específicas.

Con esta nueva metodología se identificaron 12 clases de potenciales (figura 15). También se calculó su probabilidad de ocurrencia por cada registro de 10 minutos, con lo cual se construyeron los histogramas de la columna 2 y 4 (figura 15). Con estos gráficos se pudo observar que los cambios en la probabilidad de ocurrencia fue diferente para cada tipo de potencial. Hay potenciales que no sufrieron cambios considerables como los de los paneles D, E y F (figura 15). Otros potenciales de menor amplitud como los de los paneles B y C (figura 15), disminuyeron sus probabilidades de ocurrencia bajo los efectos de picrotoxina, posterior a la espinalización presentaron una tendencia a aumentar su probabilidad. Por otro lado las clases de potenciales designados con la letra I, J y L (figura 15), que en general fueron de mayor amplitud, aumentaron sus probabilidades de ocurrencia bajo el efecto del bloqueo gabaérgico. Estos resultados pueden relacionarse con los cambios en la configuración de la red neuronal, que llevan a la formación de potenciales específicos.

De forma general este análisis en conjunto con los descritos anteriormente, demostró que el efecto del bloqueo gabaérgico realizado de forma sistémica en una preparación con neuroeje intacto, provoca ondas oscilatorias altamente sincronizadas en la actividad espontánea registrada en el dorso de

la médula, así mismo este fenómeno dependió de la comunicación con estructuras supraespinales. Sin embargo con este experimento no es claro el papel de las vías inhibitoras sobre los cambios en conectividad de las neuronas en la región dorsal de la médula espinal. Tampoco se pudo establecer que las ondas positivas de los npCDPs espontáneos sean de carácter gabaérgico, ya que la alta actividad síncrona evitó la posibilidad de observar cambios a nivel de los mecanismos espinales.

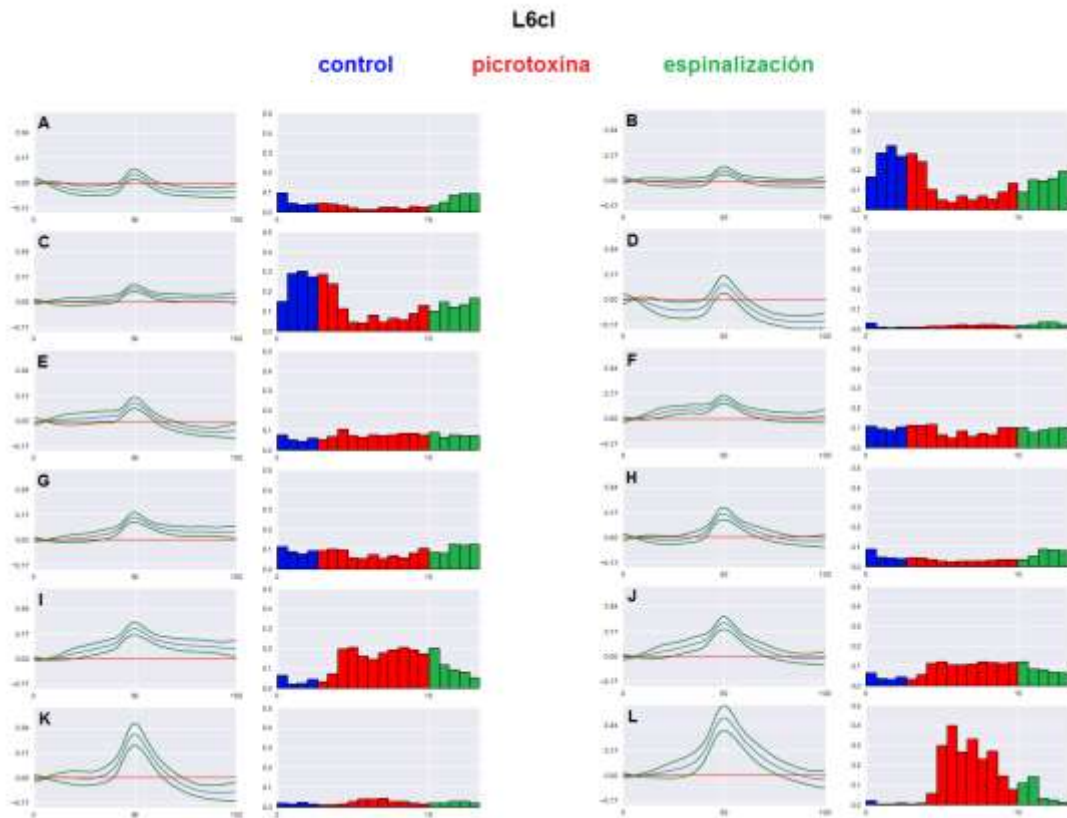


Figura 15. Potenciales del dorso de la médula seleccionados y agrupados mediante algoritmos de aprendizaje automatizado. Se muestran las diferentes clases de potenciales encontradas en el registro del segmento L6cl. A-L. Formas de las diferentes clases de potenciales identificados, a la derecha de clase se muestra el histograma correspondiente a la probabilidad de ocurrencia de cada tipo de potencial. Las barras de color azul corresponden a los registros control, las de color rojo a los registros realizados durante los efectos de picrotoxina y las barras verdes a los registros efectuados una vez realizada la espinalización.

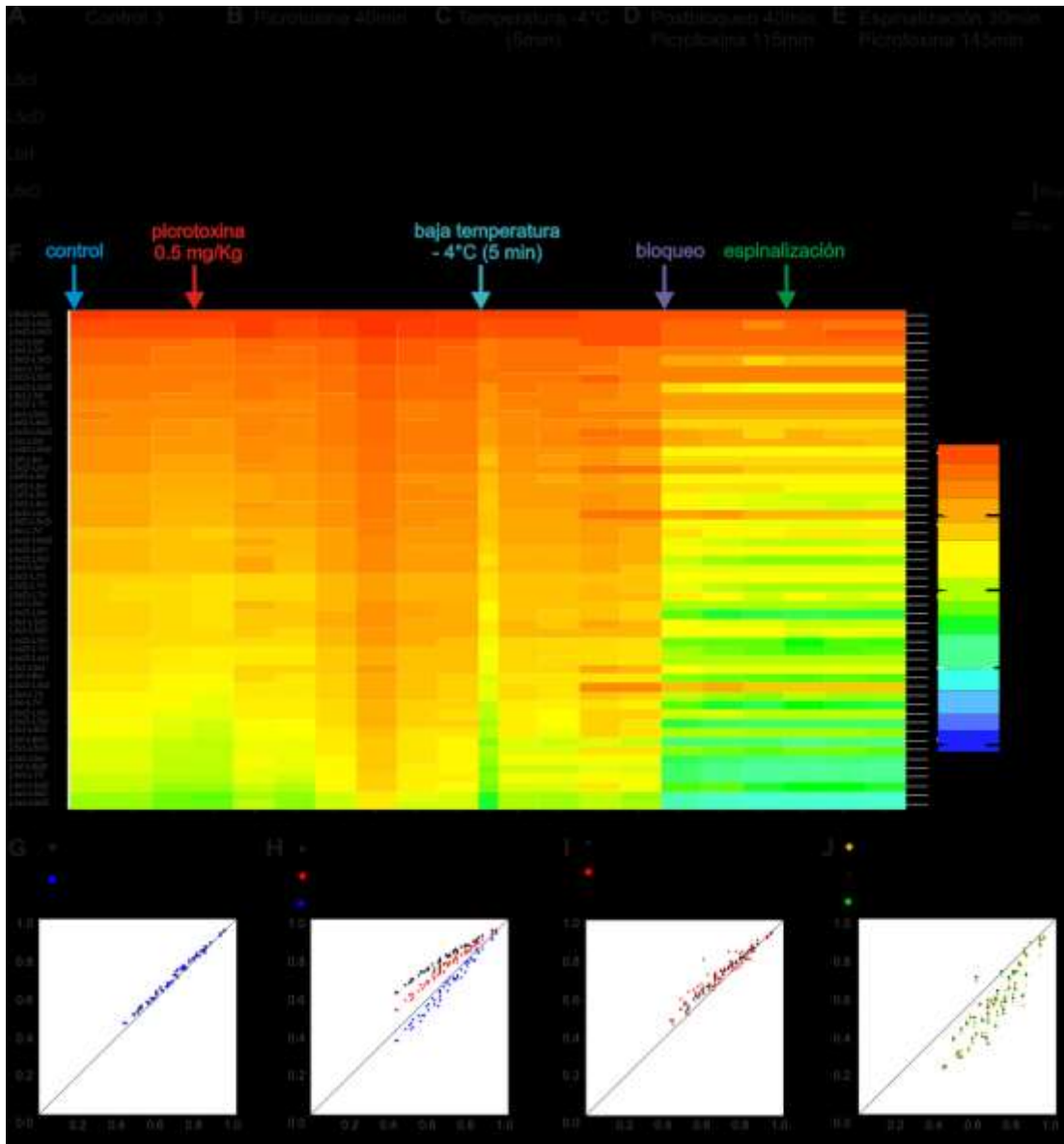


Figura 16. Influencia supraespinal sobre los altos niveles de correlación durante el efecto de picrotoxina. A, B, C, D, E. Registros representativos de las diferentes condiciones evaluadas. **F.** Curso temporal del efecto de picrotoxina, cada columna corresponde a un registro de 10 minutos (excepto el registro de la baja temperatura el cual consta de 5 minutos), los valores de correlación se ordenan de forma decreciente considerando como referencia el control 3, con flechas se indica en qué momento se realizó cada condición. **G, H, I, J.** Comparación entre los valores de correlación de diferentes condiciones (eje ordenadas), contra los valores del control 3 (eje abscisas).

Influencia supraespinal sobre la alta sincronización.

Para poder corroborar si el efecto observado previamente estaba dependiendo de la comunicación con estructuras supraespinales y no había sido efecto de otros posibles fenómenos como es el caso del shock espinal (Atkinson & Atkinson, 1996), se disminuyó la temperatura de la médula espinal, a nivel torácico, para bloquear temporalmente la comunicación con estructuras supraespinales. Este bloqueo temporal se realizó mientras aún se presentaban los efectos de la picrotoxina, administrada a una dosis de 0.5 mg/Kg durante 30 minutos. En los registros se observó una respuesta similar al primer experimento, es decir, con la administración de picrotoxina aparecieron ondas oscilatorias con alta sincronización a través de los diferentes segmentos registrados (figura 16B). En el registro en el cual se disminuyó la temperatura en la médula espinal, el cual sólo duró 5 minutos para evitar daños ocasionados por este bloqueo, se observó una disminución en las oscilaciones síncronas (figura 16C). Posteriormente al retirar el bloqueo por frío, se observó que las oscilaciones volvieron a predominar en el registro (figura 16D). Finalmente al realizar la espinalización, como en el experimento previo, ya no se presentaron las oscilaciones síncronas, sin embargo aumentó la actividad de alta frecuencia (figura 16E). En general se reprodujeron los resultados encontrados en el primer experimento.

El curso temporal del efecto de la picrotoxina, fue similar al primer experimento (figura 16F). En este caso los valores de correlación también fueron aumentando hasta un máximo a los 50 minutos posteriores al inicio de la administración. Después de haber registrado el efecto de picrotoxina durante 70 minutos, se procedió a disminuir la temperatura de la médula espinal. Claramente los valores de correlación disminuyeron durante el bloqueo generado por la disminución de temperatura (figura 16H) y una vez retirado el bloqueo se incrementó la correlación entre los distintos pares de segmentos (figura 16I). Antes de realizar la espinalización se volvió a disminuir la temperatura en la médula espinal, pero esta vez no se retiró el

bloqueo. Así se determinó si la disminución de temperatura fue equivalente a un estado de espinalización. A partir del bloqueo permanente con frío hasta los registros de la espinalización, se mantuvieron valores de correlación similares (figura 16J), lo cual sugiere que la disminución de la temperatura resultó efectiva para bloquear la comunicación con estructuras supraespinales.

Los resultados con esta técnica del bloqueo temporal adicional a los primeros resultados con el neuroeje intacto, sugieren que para la generación de oscilaciones síncronas bajo los efectos del bloqueo gabaérgico es necesario mantener la influencia supraespinal sobre la médula espinal.

Efecto diferencial de la picrotoxina en preparación con lesión espinal entre L5 y L6.

En los experimentos anteriores es difícil interpretar los resultados para explicar los efectos de la picrotoxina a nivel espinal. No se tenían registros de la actividad espontánea en un animal espinalizado previo a la administración del bloqueador. Por lo tanto se procedió a realizar un experimento en el cual se realizó una lesión espinal entre los segmentos L5 y L6, para obtener una serie de segmentos que mantenían comunicación con vías supraespinales (rostral) y otra serie de segmentos que perdieron la comunicación con vías supraespinales (caudal).

Antes de la lesión se presentaban potenciales sincronizados, por ejemplo los resaltados con un recuadro rojo en la figura 17A. Posteriormente como se esperaba, los segmentos caudales a la lesión pierden sincronía con los segmentos rostrales (figura 17B). Al administrar la picrotoxina (0.5 mg/Kg en 30 minutos), comenzaron a presentarse las ondas oscilatorias, pero sólo en la región rostral (figura 17C), corroborando el papel de las estructuras supraespinales en este fenómeno. Finalmente para confirmar los resultados observados, se administró una segunda dosis de picrotoxina en un menor tiempo (0.5 mg/Kg, en 10 minutos), de esta forma la concentración de

microtoxina sería mayor en el sistema y así observar de forma más clara los cambios en las regiones rostral y caudal. Nuevamente las ondas oscilatorias con alta sincronización predominaron en los registros rostrales a la lesión (figura 17D).

Al analizar el curso temporal del experimento, se pudo observar que posterior a la lesión, los valores de correlación que presentaron más variación fueron los caudales, mientras que los rostrales presentaron un pequeño cambio al momento de lesionar, pero posteriormente se mantuvieron constantes durante 1 hora de registro. Este comportamiento está provocado en parte por el daño que provoca la lesión espinal, pero también al comparar la diferencia entre la región rostral y caudal, se pone en evidencia la importancia de la influencia supraespinal para mantener cierto patrón de sincronización.

Para analizar cambios a partir de la lesión, se reordenaron los valores de los coeficientes de correlación, con base al último registro de la lesión espinal, previo a la administración de microtoxina (figura 17E). Posteriormente, similar a los experimentos pasados (figura 8A y figura 16F), las correlaciones a través de los segmentos rostrales aumentaron, en concordancia con lo que se presentó en los registros. Este comportamiento se repitió con la segunda dosis de microtoxina. En los segmentos caudales no se observaron los mismos aumentos en correlación, sin embargo con la segunda administración de microtoxina sí se presentaron aumentos en los segmentos que habían perdido la comunicación con estructuras supraespinales. En este resultado hay que destacar que al observar un esquema de la histología correspondiente (figura 17F), no hubo un corte completo entre los segmentos L5 y L6, ciertas porciones laterales quedaron intactas. Posiblemente estas secciones son las responsables de que se presente un aumento en las correlaciones en la región caudal.

Para cuantificar la diferencia en los cambios de correlación entre la región caudal y rostral, se realizó un análisis estadístico para evaluar las regresiones lineales que se ajustan a la distribución de los grupos de datos al

compararlos contra el control 4 (figura 18). En un inicio al realizar la lesión espinal (figura 18A), los valores del control 1 de la región rostral, no presentaron cambios estadísticamente significativos comparándolos con los valores del registro a los 60 minutos posteriores a la lesión. De manera contrastante los valores de correlación caudales sí presentaron diferencia significativa en cuanto al intercepto en y (ANCOVA, $p < 0.05$). Esto significó que al perder la influencia supraespinal, los patrones de sincronización cambiaron a un estado de menor sincronización, sin embargo se siguió manteniendo un orden, relacionado al control intrínseco de la médula espinal sobre las redes neuronales de la región dorsal de la médula espinal.

Posteriormente se compararon las regresiones lineales de las siguientes condiciones, contra la del último registro previo a la administración de picrotoxina (Lesión 60 min). A los 60 minutos de haber iniciado la administración de picrotoxina, se observó que la ordenada al origen del grupo de datos correspondiente a la picrotoxina en la región rostral, aumentó de forma significativa, contrario a la región caudal (figura 18B). Ésto corrobora la influencia supraespinal, para aumentar la actividad síncrona, y los resultados en la región caudal sugieren que a nivel espinal el bloqueo gabaérgico no modificó los patrones de sincronización de la red neuronal. Posteriormente al disminuir el efecto de la picrotoxina, ya no se presentó diferencia significativa en ninguna de las dos regiones (figura 18C).

Con la segunda dosis de picrotoxina sí se presentó un cambio significativo en ambas regiones de la médula espinal (figura 18D). En la región caudal no se esperaban cambios, sin embargo como se observó en el curso temporal (figura 17), el aumento de las correlaciones pudo deberse a que ciertos segmentos de la médula espinal permanecieron intactos. A través de estas regiones aún pueden ejercer influencia las estructuras supraespinales. Finalmente con los últimos registros realizados con la segunda dosis de picrotoxina, se observó que la región rostral continuaba presentando diferencia significativa en contraste con la región caudal.

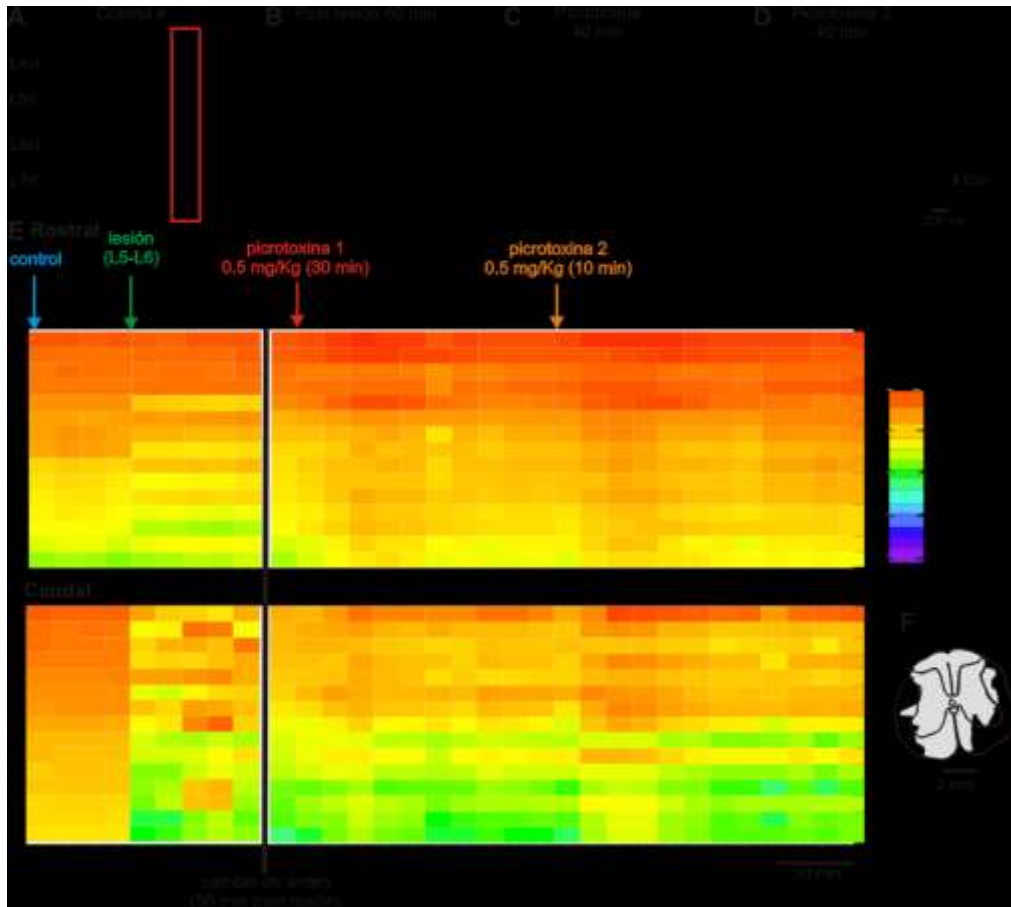


Figura 17. Efectos del bloqueo gabaérgico a nivel espinal. A. Cuarto registro control previo a la lesión espinal. **B.** Registro a los 60 minutos posteriores a la lesión espinal entre L5 y L6. **C.** Registro a los 40 minutos posteriores al inicio de la administración de picrotoxina (0.5 mg/Kg, administrada durante 30 minutos). **D.** Registro a los 40 minutos posteriores al inicio de la administración de una segunda dosis de picrotoxina (0.5 mg/Kg, administrada durante 10 minutos). **E.** Se indican con flechas el momento en que se realizó la lesión espinal y la administración de las dos dosis de picrotoxina. La separación indicada con una barra negra, divide el punto en el que se modificó el orden de los valores de la correlación, tomando en este caso como referencia los valores del registro realizado a los 60 minutos después de la lesión espinal. **F.** Esquema de la histología de la médula espinal entre los segmentos L5 y L6. El área sombreada indica la región en donde se confirmó la lesión de la médula espinal.

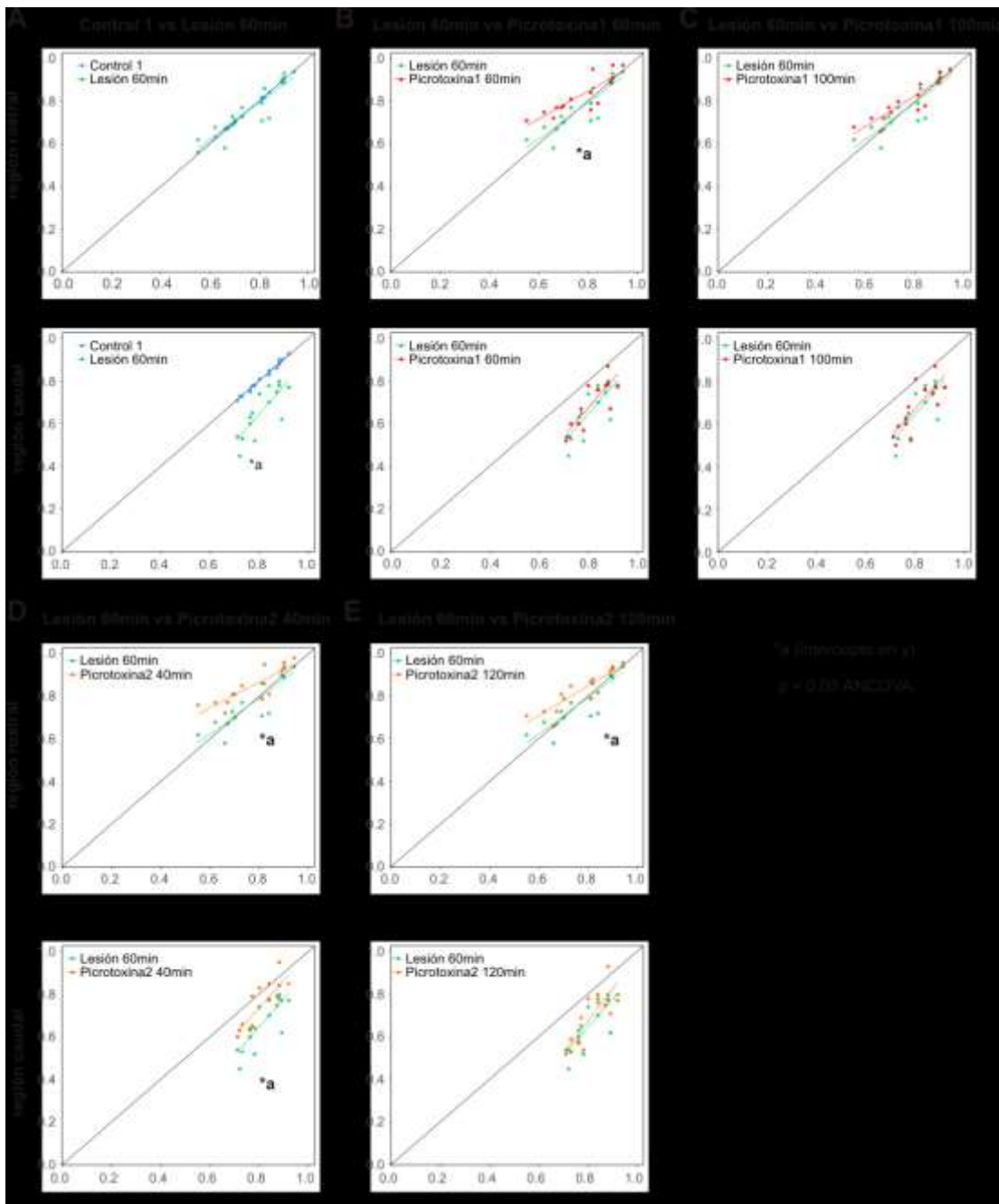


Figura 18. Cambio diferencial en los patrones de correlación con influencia de las vías supraespinales. Se muestra la comparación de los coeficientes de correlación de distintas condiciones (eje ordenadas), contra los valores del control 4. Se ajustó una regresión lineal para cada grupo de datos separando entre la región rostral y caudal a la lesión espinal. Se comparon las regresiones lineales para encontrar diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes y las ordenadas al origen mediante una ANCOVA. a* para el intercepto en $y = p < 0.05$

Cambio diferencial en los espectros de potencias.

De forma semejante al análisis del primer experimento, se estimó el espectro de la densidad de potencias. De esta forma se observó que en el registro control la actividad espontánea presenta los principales componentes de frecuencia alrededor de 3 Hz, lo cual se presentó en todos los segmentos registrados (figura 19A). Al comparar segmentos rostrales y caudales antes de la lesión espinal (figura 19B), se observó que el espectro fue muy similar entre estos dos segmentos (L5rl y L6cl). Después de realizar la lesión espinal, la actividad espontánea disminuye, lo que se refleja en una disminución en la amplitud de los componentes espectrales en las frecuencias que previamente dominaban (entre 4 y 6 Hz). Este comportamiento se observó en todos los segmentos caudales a la lesión (figura 19C). En la región rostral a la lesión también se observó una disminución de la amplitud en el espectro de potencias, sin embargo se mantuvo mayor que la región rostral (figura 19D). Esto indica que la influencia supraespinal es importante para definir el tipo de actividad espontánea.

Con la administración de picrotoxina, se puso en evidencia el aumento de la actividad espontánea en componentes espectrales entre 4 a 8 Hz, sólo en la región rostral. La región caudal no presentó aumentos evidentes en ningún segmento registrado (figura 19E). Al comparar un segmento caudal con uno rostral (figura 19F), es claro como el componente espectral alrededor de 8 Hz que predominaba en la región rostral no estuvo presente en la región caudal. Este aumento posiblemente estuvo relacionado con las ondas oscilatorias que predominaron en los segmentos rostrales, de forma similar a los experimentos anteriores. Sin embargo los espectros sí coinciden en componentes espectrales cerca de 4 y 11 Hz. Aunque en menor medida en la región caudal a la lesión.

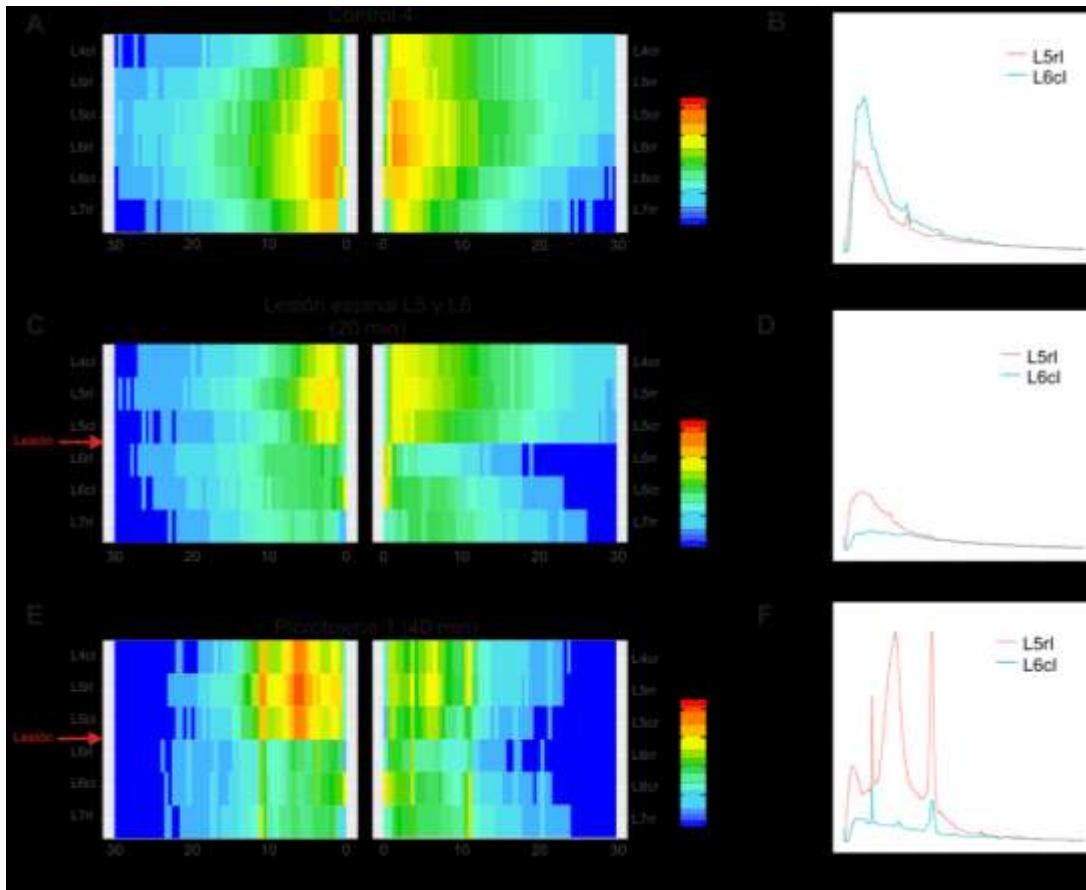


Figura 19. Aumento diferencial de la actividad espontánea inducido por picrotoxina. A, C, E. Gráficas de contorno con los valores de la densidad espectral de los distintos segmentos registrados en 3 diferentes condiciones. **C, E.** La flecha roja indica entre que segmentos se llevó a cabo la lesión espinal. **B, D, F.** Densidad espectral de potencias de dos canales, uno rostral a la lesión (L5r1) y otro caudal a ésta (L6cl), en tres condiciones distintas.

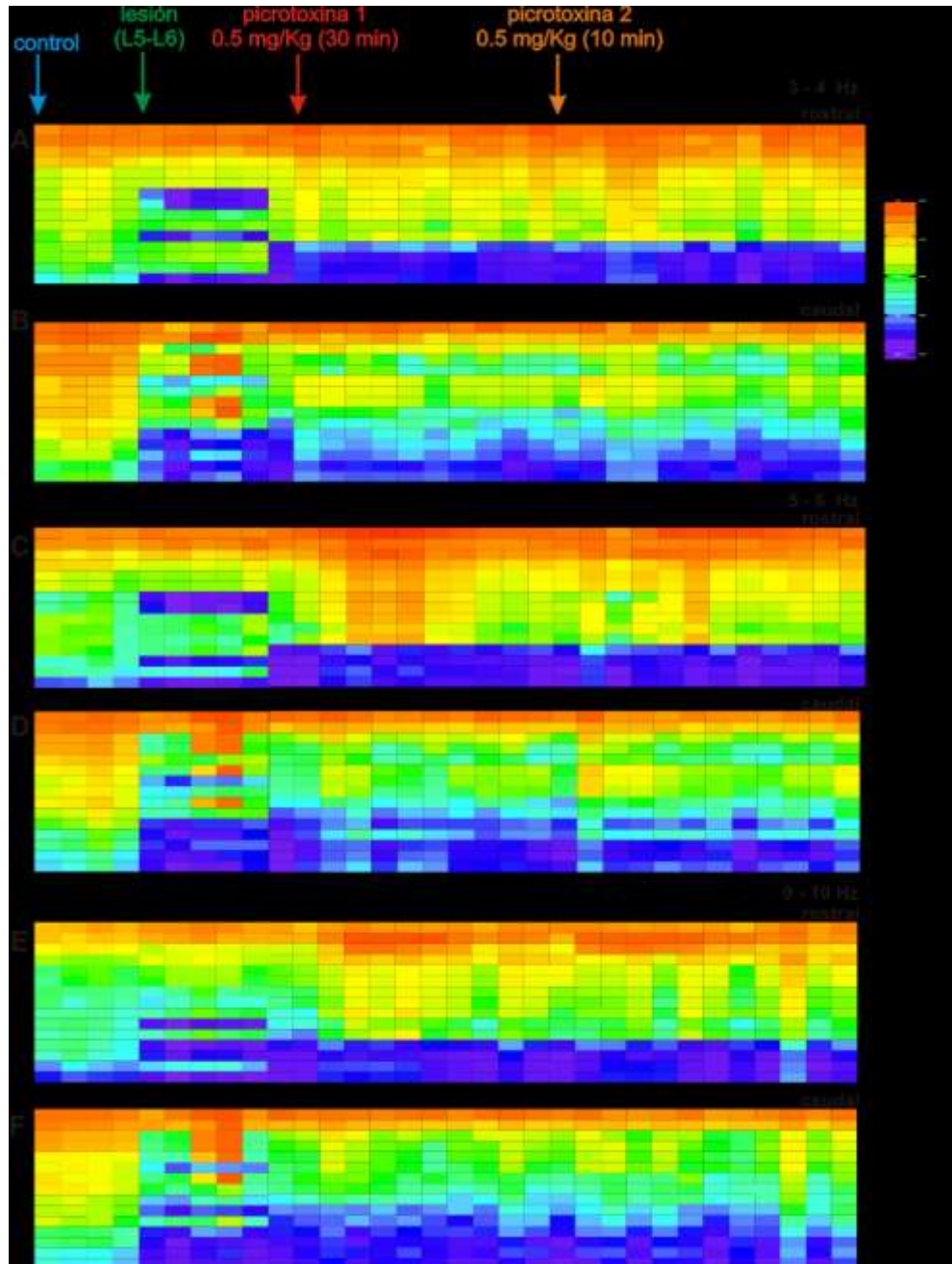


Figura 20. Relación en el aumento de la actividad espontánea diferencial entre distintos segmentos espinales a diferentes componentes de frecuencia. A, B, C, D. Valores de coherencia entre las diferentes combinaciones de pares de segmentos. Cada columna corresponde a un registro de 10 minutos, los valores se ordenan de mayor a menor tomando como referencia el último registro realizado posterior a la lesión espinal. Se eligieron 2 diferentes intervalos de frecuencias separando los valores de la región rostral y caudal a la lesión. **A, B.** De 5-6 Hz, **C, D.** De 9-10 Hz.

Para determinar si los cambios en los espectros de potencia estuvieron relacionados entre los distintos segmentos registrados, se calculó también la coherencia entre diferentes pares de segmentos, separando los resultados entre la región rostral y caudal (figura 20). En este caso se siguió una estrategia de análisis similar al realizado para los valores de correlación, en el cual en un principio se ordenaron los valores con base al control 4. Posteriormente se volvieron a acomodar los valores, tomando como base el último registro previo a la administración de picrotoxina. De esta manera resultó más sencillo observar los cambios posteriores a la lesión espinal, en este caso los valores de coherencia no aumentaron mucho con la administración de las dos dosis de picrotoxina, ni en la parte rostral ni caudal a una frecuencia de entre 3 y 4 Hz (figura 20A y B). En el caso de las frecuencias entre 5 y 6 Hz (figura 20C y D), sí se presentó un aumento en las coherencias en la región rostral con la administración de picrotoxina, a diferencia de la región caudal. Este comportamiento ya no fue tan evidente a frecuencias mayores (figura 20F). El aumento de los valores de coherencias en la región rostral en frecuencias entre 5 y 6 Hz, tuvo consistencia con lo que se observó en los espectros de potencias (figura 19F). Este comportamiento está ligado a lo observado en los valores de correlación, lo que sugiere que las oscilaciones sincronizadas son las responsables del aumento en correlación y coherencia en la región rostral a la lesión.

Cambios en la ocurrencia de distintas clases de CDPs.

Para evaluar los efectos del bloqueo gabaérgico sobre la ocurrencia de distintas clases de CDPs, se seleccionaron nuevamente potenciales con base en su forma de onda en nCDPs y npCDPs. Sin embargo, para este experimento se utilizó como canal de referencia uno rostral (L5rI) y también se realizó una selección tomando como referencia el registro de un canal caudal (L6cl). Con esta técnica se pudieron analizar cambios de la región de la médula espinal que mantuvo comunicación con vías supraespinales y comparar con la que se interrumpió esta comunicación. Se seleccionaron y

clasificaron distintas clases de npCDPs (figura 21). Se ilustran sobrepuestos todos los potenciales encontrados para cada intervalo de amplitud (menores a 20, entre 20 y 40, entre 40 y 60 y mayores a 60 μV), así como sus respectiva media en color rojo tanto para los seleccionados de forma rostral como los de la región caudal (figura 21A y D).

Con los histogramas adjuntos se muestra el número de eventos seleccionados para cada condición, con lo cual se pudo observar que para la región rostral, no se presentaron cambios evidentes con la lesión espinal ni bajo los efectos de picrotoxina (figura 21B). Sólo se presentó una disminución en el número de npCDPs de amplitud entre 40 y 60 μV . En contraste, la región caudal presentó un incremento en los potenciales de entre 20 y 40 μV . Posteriormente con la administración de picrotoxina disminuyó el número de eventos de esta amplitud y este comportamiento se repitió con la segunda dosis de picrotoxina (figura 21E), lo cual concuerda con un bloqueo gabaérgico considerando que los npCDPs están relacionados con la activación de estos mecanismos. Se cuantificó la media de la amplitud de la onda p, en los registros correspondientes a la lesión espinal se encontró una disminución de la onda p, posteriormente bajo los efectos de picrotoxina, en los potenciales mayores a 60 μV hubo un aumento en la onda p. Este comportamiento ya se había observado en el primer experimento (figura 12C), relacionado con la alta sincronización influenciada por vías supraespinales. De manera opuesta, en la región caudal la amplitud de la onda p aumentó con la lesión espinal, posteriormente disminuyó con la administración de picrotoxina. Estos resultados sugieren que el bloqueo gabaérgico fue exitoso, sin embargo cuando médula espinal está en comunicación con vías supraespinales, se generaron las ondas oscilatorias de alta sincronización, lo cual no permitió observar los cambios esperados para este bloqueo sobre la onda p de los npCDPs.

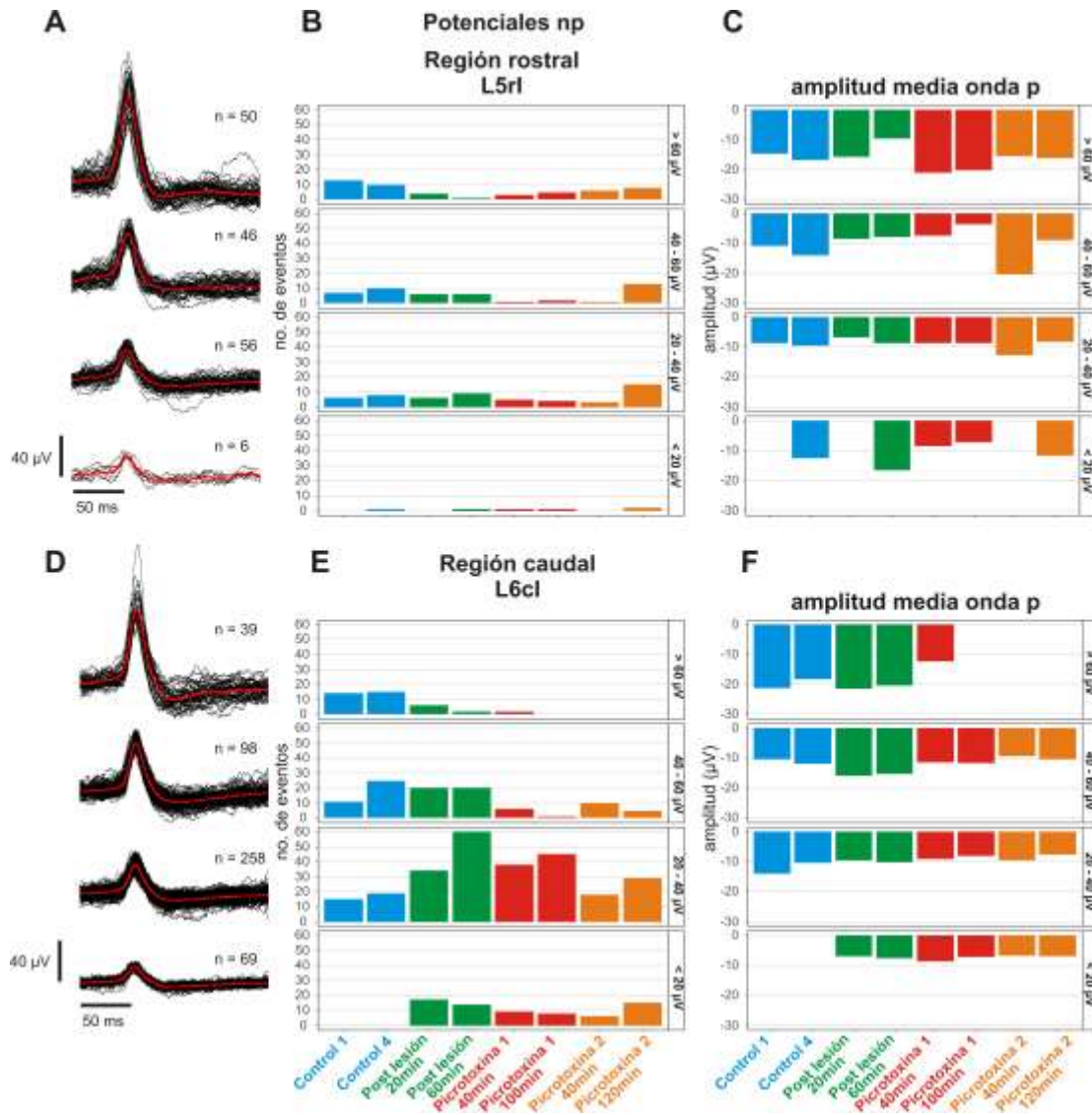


Figura 21. Cambios diferenciales en las probabilidades de generación de potenciales seleccionados como np. **A, D.** Potenciales sobrepuestos seleccionados tomando como referencia el canal L5r1 (**A**) y el canal L6c1 (**D**), la línea de color rojo corresponde a la media de los potenciales. Se ordenan por la amplitud de la onda n, de superior a inferior: mayores a 60, entre 40 y 60, entre 20 y 40 y menores a 20 μV . **B, E.** Histogramas que representan el número de eventos de cada clase mostrada en **A** y **D**, por cada 10 minutos de registro. **C, F.** Cambios en la amplitud media de la onda p de los potenciales np seleccionados (**A** y **D** respectivamente) en las diferentes condiciones.

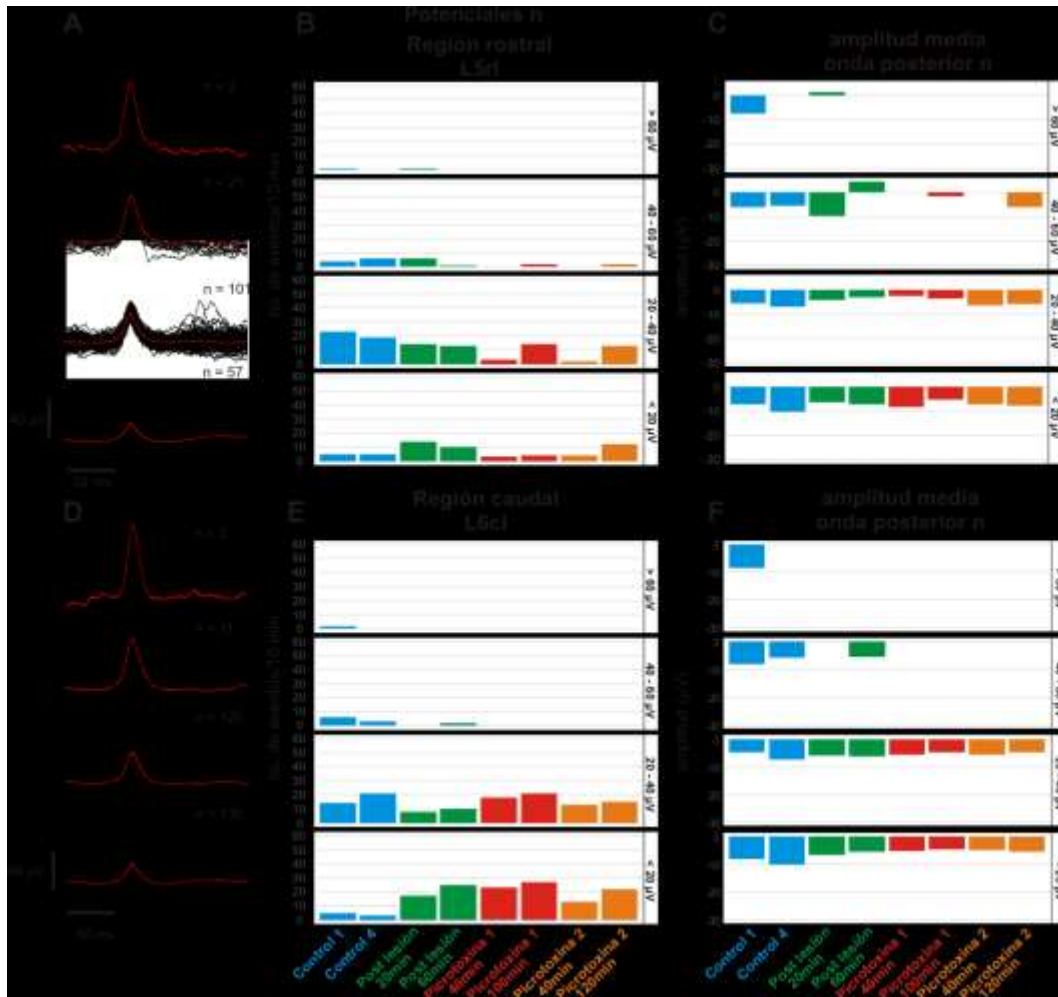


Figura 22. Cambios diferenciales en las probabilidades de generación de potenciales seleccionados como n. **A, C.** Potenciales sobrepuestos seleccionados tomando como referencia el canal L5r1 (**A**) y el canal L6c1 (**C**), la línea de color rojo corresponde a la media de los potenciales. Se ordenan por la amplitud de la onda n, de superior a inferior: mayores a 60, entre 40 y 60, entre 20 y 40 y menores a 20 μ V. **B, D.** Histogramas que representan el número de eventos de cada clase mostrada en **A** y **C**, por cada 10 minutos de registro.

Adicionalmente se seleccionaron los nCDPs, de igual forma que los npCDPs, se realizó una selección con base en registros rostrales y otra tomando como referencia un canal caudal. De esta manera se obtuvieron los potenciales que se muestran en la figura 22A y D. Así mismo se determinó el número de eventos por cada condición lo cual se ilustra en los histogramas adjuntos (figura 22B yE). En este caso también se encontraron diferencias entre la

región rostral y la caudal. Para los nCDPs rostrales, el comportamiento fue similar a lo que se había observado previamente al examinar la respuesta del sistema en preparación con neuroeje intacto (figura 12E). En el cual disminuyó la cantidad de eventos encontrados después de administrar la picrotoxina. Al contrario en la región caudal los potenciales de entre 20 y 40 μV disminuyeron su ocurrencia con la lesión espinal y posteriormente aumentó el número de eventos con la administración de picrotoxina. Probablemente por la desinhibición generada a nivel espinal. Para los eventos menores de 20 μV , primero aumentó su ocurrencia con la lesión espinal y posteriormente no presentaron cambios importantes excepto por el registro a los 40 minutos de haber iniciado la administración de la segunda dosis de picrotoxina en el cual disminuyó el número de eventos encontrados. En cuanto a la onda posterior al potencial n, no se observaron cambios en ninguna condición ni para la región rostral, ni la caudal, lo cual corrobora que la selección fue correcta para identificar nCDPs (figura 22C y F). Es importante destacar que el aumento en los potenciales nCDPs caudales, coincide con la disminución de los npCDPs caudales, sugiriendo un probable cambio de configuración de la misma red neuronal.

Para cuantificar los cambios descritos anteriormente, se realizó el mismo análisis estadístico que se aplicó en el experimento del neuroeje intacto (Welch's anova, Dunnett's Modified Tukey-Kramer Pairwise Multiple Comparison test). Con este análisis se pudo observar que para los potenciales np seleccionados de forma rostral sólo el registro a los 60 minutos posteriores a la lesión, presentó un cambio estadísticamente significativo comparado con las demás condiciones (figura 23A). Para los registros de la primera dosis de picrotoxina, se observó una tendencia a aumentar la media de la amplitud, sin embargo no se determinaron diferencias significativas. Ocurrió el mismo comportamiento para la onda p (figura 23B). Ninguna condición presentó diferencias estadísticamente significativas a pesar de presentarse una tendencia a aumentar la onda p bajo los efectos de picrotoxina.

POTENCIALES np

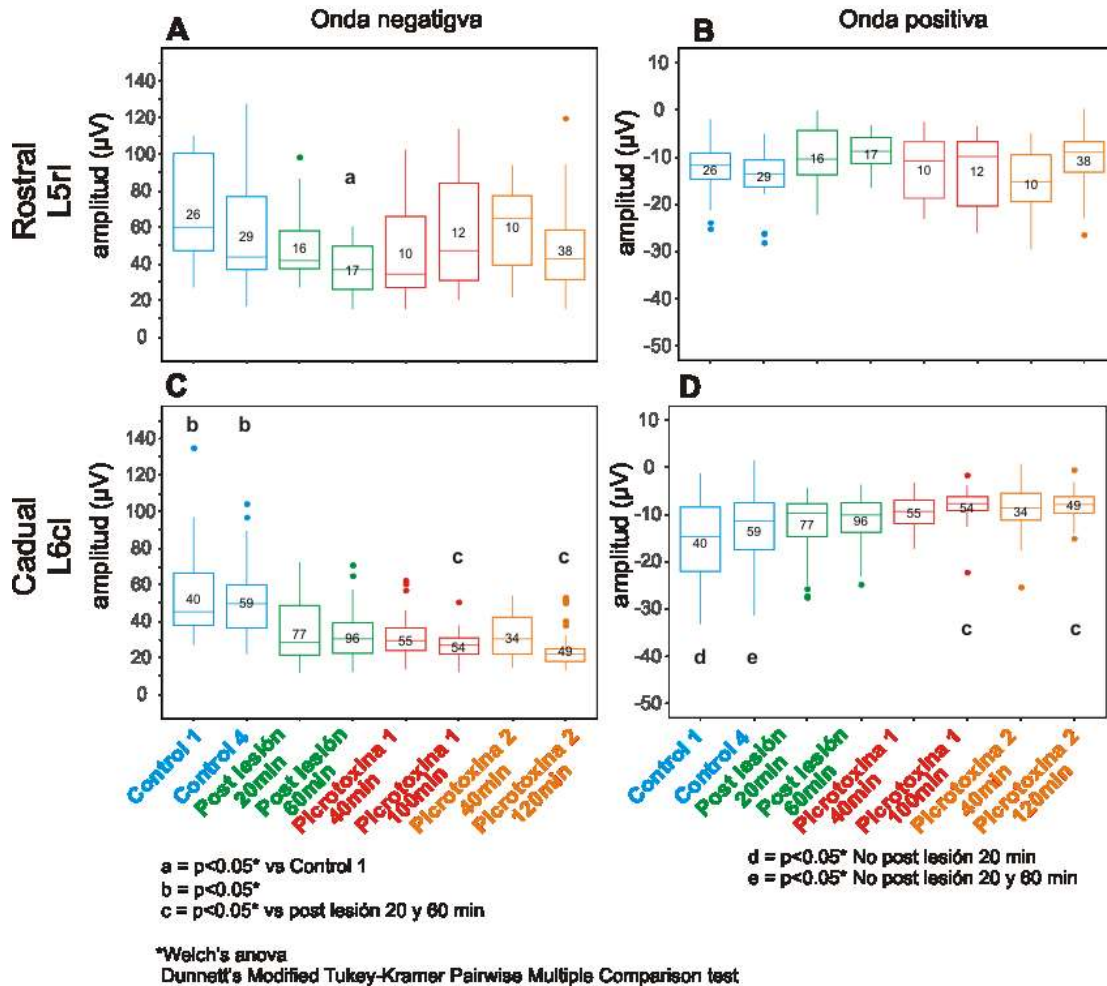


Figura 23. Disminución de la amplitud de npCDPs así como la onda p en la región caudal a la lesión bajo los efectos de picrotoxina. Se graficaron las distribuciones de las amplitudes de la onda n de los potenciales npCDPs seleccionados para cada condición evaluada, para la región rostral **A** y caudal **C**. En los paneles de la derecha se graficó la distribución de las amplitudes de la onda p asociada a los npCDPs seleccionados, se agrupan por cada condición evaluada, se dividen en la región rostral **B** y la caudal **D**. Con letras minúsculas se indica que grupos presentaron diferencia estadísticamente significativa. En cada grupo se indica la cantidad de eventos que componen cada grupo y se colocan en el valor de la media de ese grupo.

potenciales n

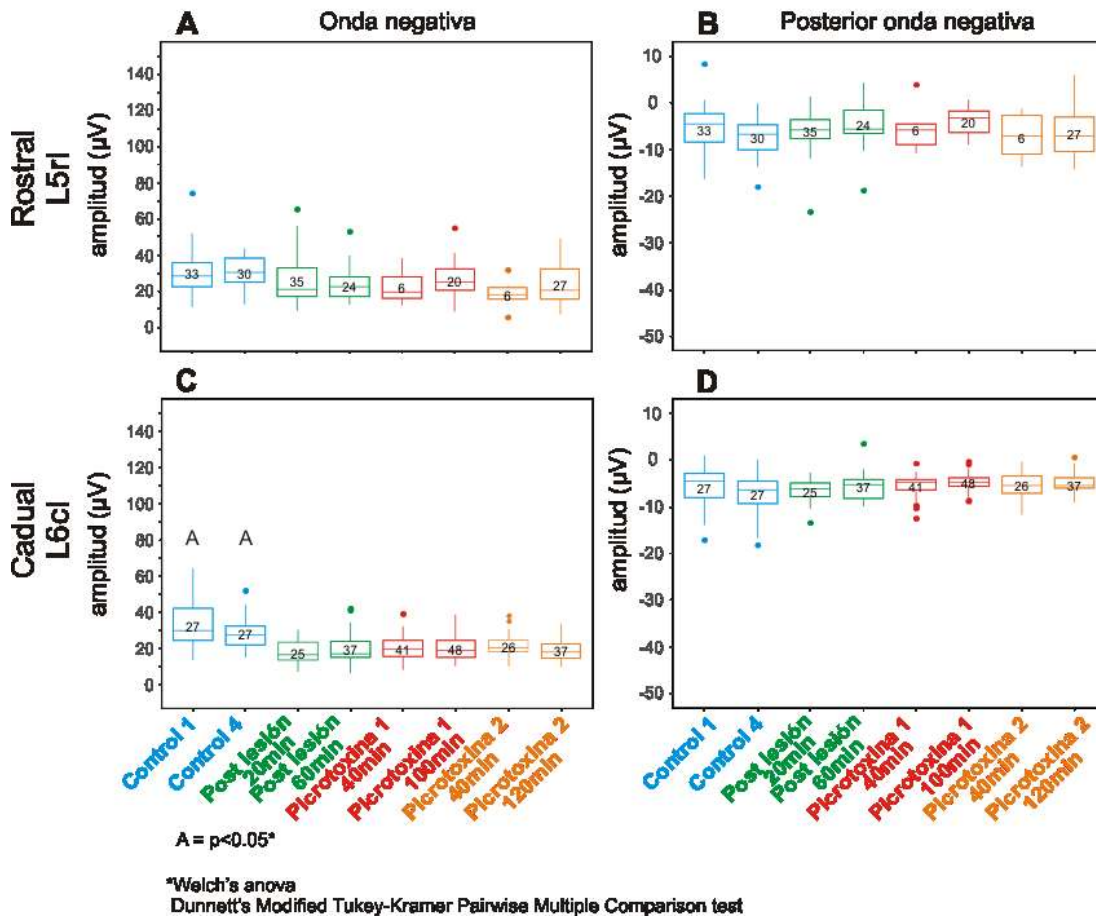


Figura 24. Ausencia de cambios en nCDPs. Se graficaron las distribuciones de las amplitudes de la onda n de los potenciales nCDPs seleccionados para cada condición evaluada, para la región rostral **A** y caudal **C**. En los paneles de la derecha se graficó la distribución de las amplitudes de la onda posterior a la onda n, se agrupan por cada condición evaluada, se dividen en la región rostral **B** y la caudal **D**. Con letras minúsculas se indica que grupos presentaron diferencia estadísticamente significativa. En cada grupo se indica la cantidad de eventos que componen cada grupo y se colocan en el valor de la media de ese grupo.

En el caso de la región caudal el análisis estadístico indicó que la media de las amplitudes de la onda n, fue estadísticamente significativa entre las condiciones control y todas las demás condiciones posteriores a la lesión. Una importante diferencia se presentó por parte de los grupos correspondientes a la primer dosis de picrotoxina a los 100 minutos y la

segunda dosis de picrotoxina a los 120 minutos, los cuales presentaron diferencia estadísticamente significativa contra los grupos correspondientes a la lesión espinal (figura 23C). Este comportamiento fue similar para la onda p, sólo que en este caso el grupo del control 1 no fue estadísticamente distinto al grupo de 20 minutos posteriores a la lesión y para el control 4 no hubo significancia contra ninguno de los grupos correspondientes a la lesión (figura 23D). Sin embargo, los grupos correspondientes a los registros de los 100 minutos posteriores a la primera dosis de picrotoxina y los de 120 minutos después de la segunda dosis, sí presentaron una disminución estadísticamente significativa con respecto a los grupos correspondientes a la lesión. Ésto significó por una parte que la lesión y la falta de comunicación con estructuras supraespinales cambia el estado de la actividad espontánea modificando la ocurrencia de los npCDPs y que con esta metodología sí se pudo observar el efecto de la picrotoxina sobre los mecanismos espinales, ya que la onda p disminuyó bajo los efectos de este bloqueador en la región donde no influían estructuras supraespinales.

En cuanto al análisis de los nCDPs seleccionados, para la región rostral no se encontró diferencia estadísticamente significativa ni para las amplitudes de la onda n ni para las amplitudes de la onda posterior (figura 24A y D). En el caso de los grupos caudales sólo se presentó diferencia significativa entre los grupos control y las demás condiciones evaluadas. La onda posterior no presentó diferencias significativas (figura 24C y D). Para este tipo de potenciales, estadísticamente no se encontraron cambios en la región rostral y los cambios presentados en la región caudal probablemente se justifican por la pérdida de comunicación con estructuras supraespinales, sin embargo la picrotoxina parece no haber modificado la ocurrencia de este tipo de potenciales.

En conjunto los experimentos desarrollados con la picrotoxina para bloquear sinapsis gabaérgicas, indican que por una parte la influencia supraespinal juega un papel muy importante para definir la conectividad en la red neuronal

del asta dorsal de la médula espinal. Por otro lado sugieren que con la dosis de picrotoxina administrada, los mecanismos gabaérgicos bloqueados a nivel espinal, no modificaron los patrones de sincronización de las neuronas responsables de la actividad espontánea, registrada en el dorso de la médula espinal.

Efecto de la estricnina en preparación con neuroeje intacto.

Para evaluar los efectos de un bloqueo glicinérgico, se administró estricnina, la cual al igual que la picrotoxina, se ha utilizado para bloquear sinapsis en este caso glicinérgicas. Con base en los estudios previos (Rudomin *et al.*, 1990), se utilizó estricnina a una dosis inicial de 0.1 mg/Kg administrados en 10 minutos. Al comparar los registros a 40 minutos del inicio de administración de la estricnina (figura 25B), contra los registros control 1 (figura 25A), no se encontraron diferencias evidentes. Por esta razón se administró una segunda dosis de estricnina de 0.2 mg/Kg. Se llegaron a presentar pequeñas ondas que oscilaban por un corto tiempo, no al grado de lo que se observó con la picrotoxina. Posteriormente se bloqueó por temperatura la comunicación entre la médula espinal con vías supraespinales. En el registro se observó un aumento de potenciales de baja frecuencia durante este periodo de tiempo (figura 25D). En este caso el bloqueo por frío se aplicó durante aproximadamente 8 minutos, por lo que probablemente se dañó la médula espinal. Se retiró el bloqueo y se administró una tercera dosis de estricnina de 0.2 mg/Kg. Con esta dosis se presentó un aumento de la actividad espontánea de alta frecuencia (figura 25E), finalmente al bloquear de forma permanente la médula espinal, se observó un mayor aumento en la actividad de alta frecuencia.

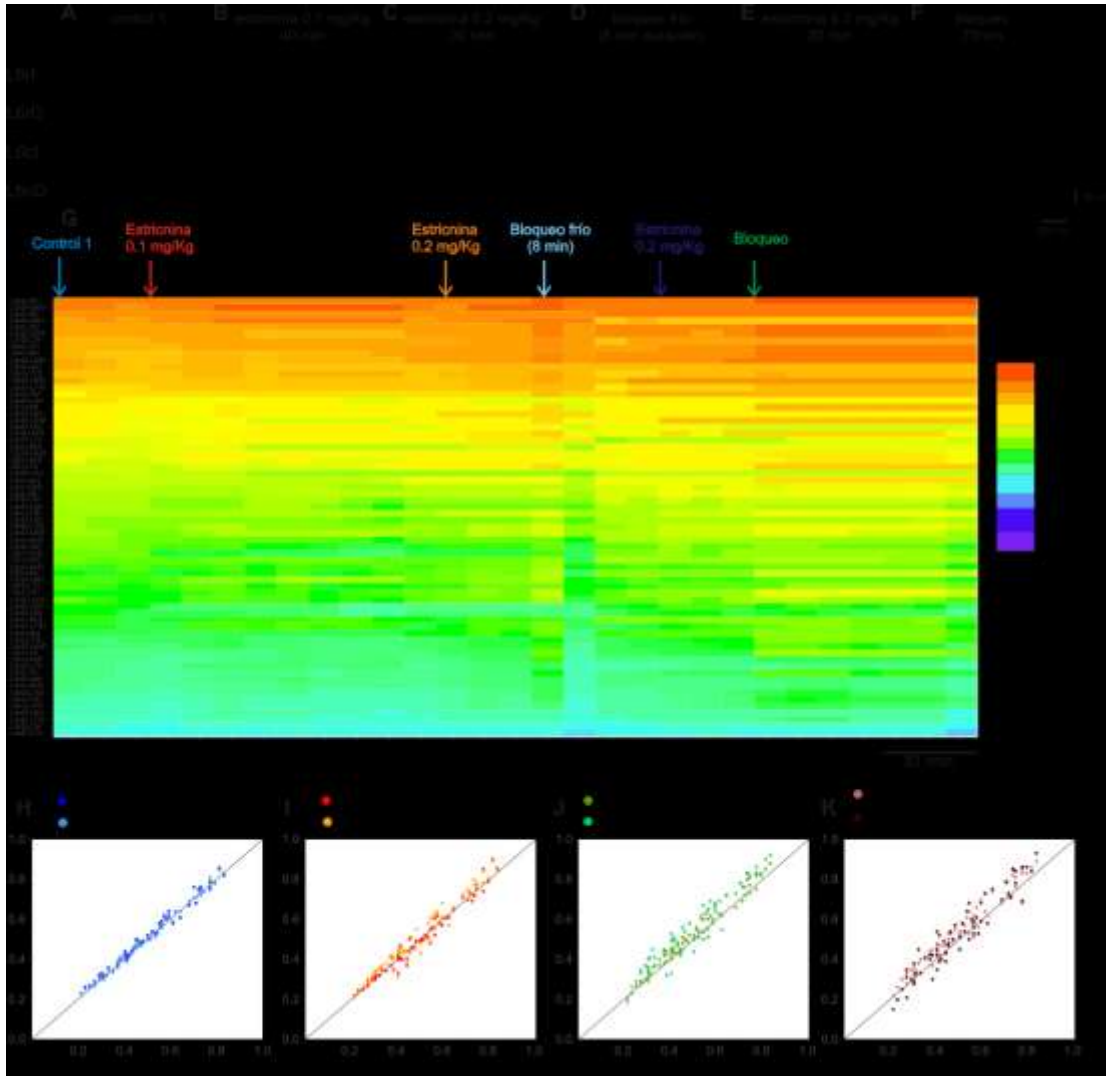


Figura 25. Efecto de la estriknina sobre la conectividad entre distintos segmentos. A, B, C, D, E, F. Registros representativos de las diferentes condiciones evaluadas. **G.** Curso temporal del efecto de estriknina, cada columna corresponde a un registro de 10 minutos (excepto el registro de la baja temperatura el cual consta de 8 minutos), los valores de correlación se ordenan de forma decreciente considerando como referencia el control 3, con flechas se indica en qué momento se realizó cada administración o bloqueo. **H, I, J, K.** Distribución de los valores de correlación de diferentes condiciones (eje ordenadas), al compararlos contra el control 3 (eje abscisas).

Al analizar el curso temporal de los valores de correlación de este experimento (figura 25G), se observó que al principio los registros control son constantes como en experimentos previos (figura 25H). Sin embargo al administrar la estricnina se identifican ligeros cambios sobre el valor de las correlaciones, aumentando ligeramente (figura 25I). En este caso al disminuir la temperatura de la médula, los valores de correlación aumentaron (figura 25J). Posteriormente con la tercera dosis de estricnina nuevamente no se observaron cambios evidentes. Finalmente se aplicó y mantuvo el bloqueo de forma permanente, con lo que se observó un cambio en el orden de los valores de correlación. Este nuevo patrón se mantuvo constante hasta el final del experimento (figura 25K).

Aumento de la actividad espontánea de alta frecuencia.

Para evaluar los cambios en el tipo de actividad que se presentó con la administración de estricnina, se estimaron los espectros de densidad de potencias. Para los registros control se observaron respuestas similares a los experimentos previos (figura 26A y D), en donde la mayor amplitud del espectro se encontró alrededor de los 3 Hz, en los diferentes segmentos registrados. Con la primer dosis de estricnina (0.1 mg/Kg), se presentó un ligero aumento en la amplitud de los componentes espectrales alrededor de 3 Hz (figura 26E). Este comportamiento fue más evidente a los 100 minutos posteriores a la administración de estricnina (figura 26F). Con la segunda dosis de estricnina (0.2 mg/Kg), no se observó un aumento en la amplitud del espectro. Con el bloqueo por temperatura se observó un aumento de los componentes espectrales a distintas frecuencias (figura 26C y H). Este comportamiento disminuyó ligeramente al retirar el bloqueo (figura 26I). Sin embargo, como se mencionó previamente; a partir del bloqueo por frío probablemente la médula espinal se lesionó por el tiempo que se mantuvo la baja temperatura (8 minutos). Finalmente con la tercer dosis de estricnina y con el posterior bloqueo permanente, el comportamiento anterior se repitió, incluso la amplitud del espectro fue mayor (figura 26J y K). En los

experimentos en los que se examinó el efecto de la picrotoxina, se pudo observar que al momento de espinalizar, la actividad espontánea de alta frecuencia también aumentó. En este caso el bloqueo glicinérgico aumenta la actividad espontánea de alta frecuencia y con la pérdida de comunicación con vías supraespinales este tipo de actividad aumenta aún más.

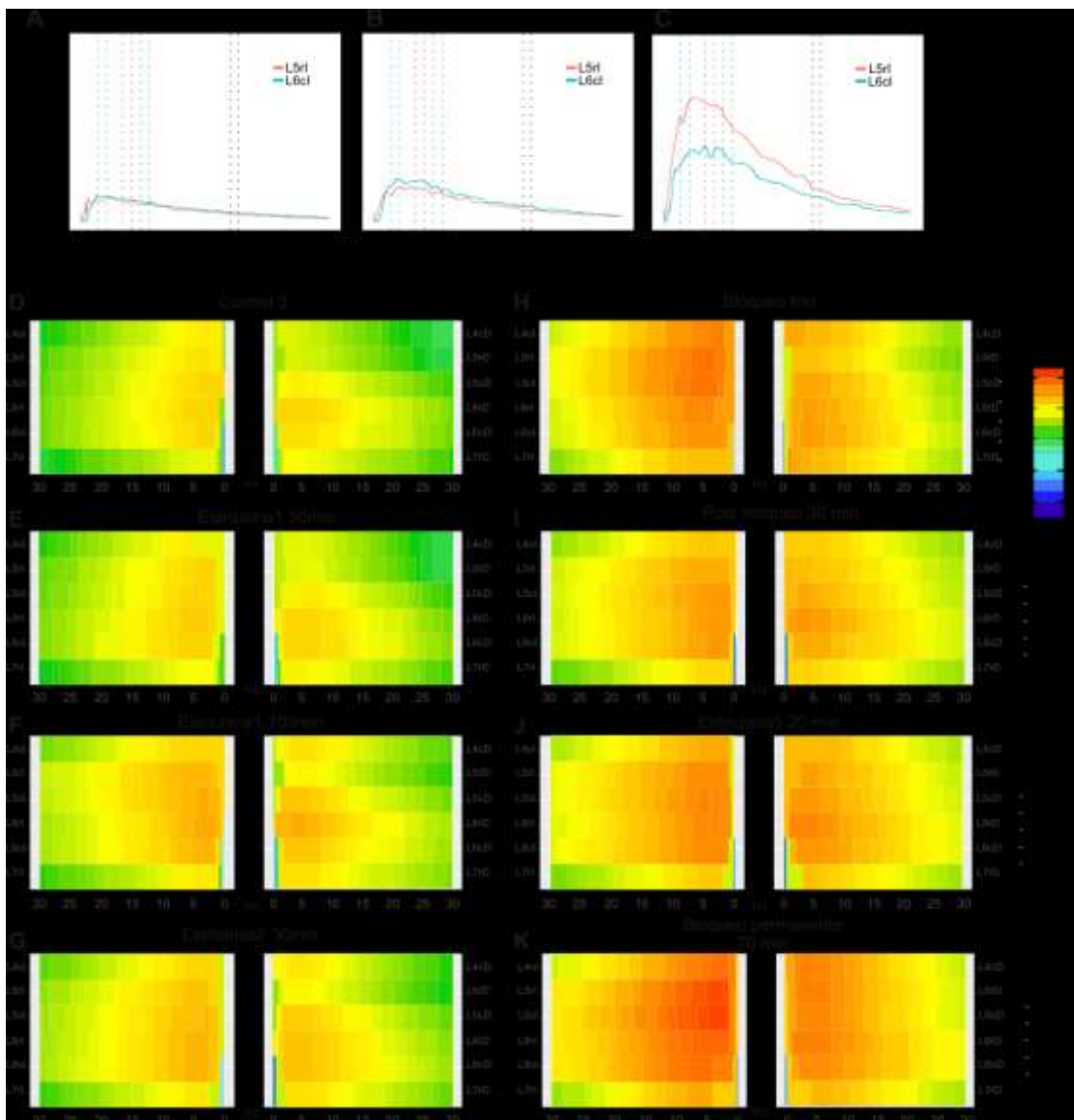


Figura 26. Aumento de la actividad espontánea. A, B, C. Espectros de densidad de potencias individuales de los segmentos L5r1 (espectro rojo) y L6cl (espectro verde), con líneas punteadas se delimitan los intervalos de frecuencia seleccionados para realizar el cálculo de coherencias. D, E, F, G, H. Espectros de densidad de potencias, de cada segmento registrado para cada condición.

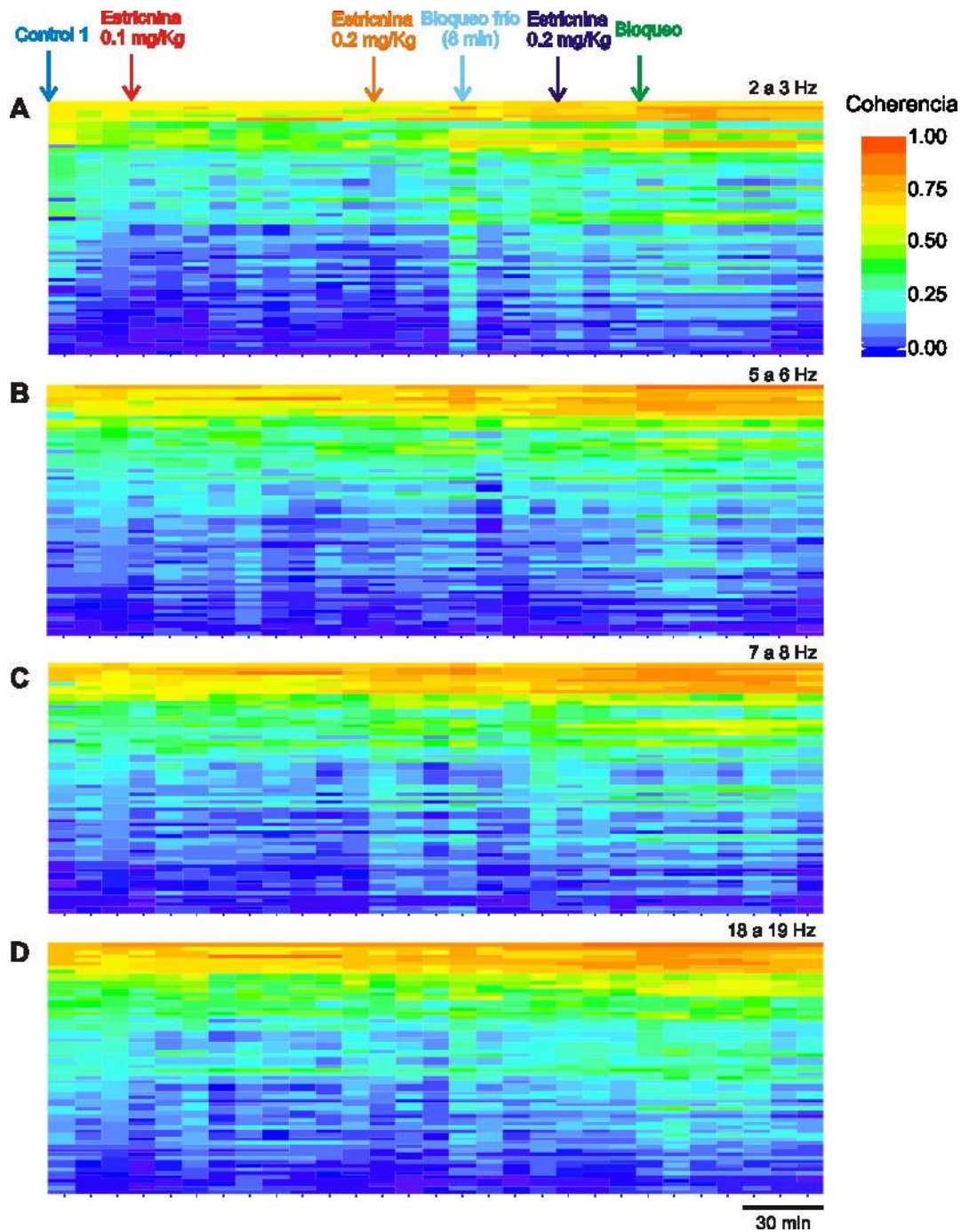


Figura 27. Relación en el aumento de la actividad espontánea a diferentes componentes de frecuencia. A, B, C, D. Valores de coherencia entre las diferentes combinaciones de pares de segmentos, cada columna corresponde a un registro de 10 minutos, los valores se ordenan de mayor a menor tomando como referencia los valores del control 3. Se eligieron 4 diferentes intervalos de frecuencias.

Para examinar que tanta relación hubo en el tipo de actividad espontánea entre los diferentes pares de segmentos registrados, se calculó la coherencia entre cada combinación de segmentos posible. En la figura 26 se ilustran los espectros de tres condiciones diferentes (figura 26A, B y C). Se graficaron 2 segmentos representativos, el espectro del canal L6cl y el L5rl. Con cuatro pares de líneas punteadas se indicaron los intervalos de frecuencia a los cuales se calculó la coherencia. De forma similar a los coeficientes de correlación, no hubo cambios tan evidentes en los valores de coherencia. En intervalos de baja frecuencia (2 a 3 Hz), se identificó un aumento de la coherencia cuando se realizó el bloqueo por frío (figura 27A), sin embargo fue el único registro en el cual se observó un aumento claro. El patrón de los valores de coherencias es muy similar incluso a más altas frecuencias como en el intervalo de 18 a 19 Hz (figura 27D). Aunque se encontraron valores de coherencia mayores en éste último intervalo de frecuencia. Esto puede relacionarse con el incremento de actividad de alta frecuencia que se observó en los registros.

Cambios en la generación de nCDPs.

Con la metodología de selección por forma de onda, se encontraron npCDPs y nCDPs en las diferentes condiciones evaluadas. Estos potenciales se muestran sobrepuestos en la figura 28A y D, respectivamente. Para los npCDPs se observó que en general hubo menor cantidad de estos potenciales de mayor amplitud (mayor a 60 μ V), ésto relacionado con el estado del animal, sin embargo no se puede apreciar una tendencia a aumentar o disminuir su ocurrencia con la estricnina (figura 28B). Para los potenciales de entre 20 y 40 μ V, después de los registros control, se mostró un aumento en la ocurrencia de estos potenciales, sin embargo este comportamiento no se repitió con la segunda dosis de estricnina, sólo disminuyó el número de eventos y esta cantidad se mantuvo relativamente constante hasta el final del experimento. La amplitud de la onda p asociada a estos potenciales presentó una tendencia a aumentar (figura 28C), esto fue

más claro para los npCDPs de mediana a baja amplitud (entre 20 y 40 μV y menores a 20 μV). Los nCDPs seleccionados tampoco presentaron una tendencia clara a modificar su ocurrencia bajo los efectos de la estriquina, similar a los npCDPs, aumentaron su frecuencia de ocurrencia a los 40 minutos después de la primera dosis de estriquina, posteriormente disminuyó el número de eventos y aparentemente no presentaron cambios (figura 28E). Al tratarse de nCDPs como era esperado, no presentaron cambios en la amplitud de la onda posterior a la onda n (figura 28F).

Aumento de la onda positiva inducido por el bloqueo glicinérgico.

Debido a que con los análisis anteriores no se pudo describir de forma clara los efectos de la estriquina sobre la actividad espontánea en el dorso de la médula espinal. Se utilizó la estimulación táctil para producir respuestas que se pudieron analizar en el dorso de la médula espinal. Con esta técnica al comparar la respuesta en un estado control, se observó que con el bloqueo glicinérgico la onda p aumentó su amplitud (figura 29A), posteriormente al disminuir el efecto de la estriquina la onda p disminuyó nuevamente. Después, con la segunda dosis de estriquina, se presentó un mayor aumento de la onda p y con la disminución de la temperatura aumentó aún más la amplitud (figura 29B). Con la tercera dosis de estriquina el aumento en la onda p continuó, con el bloqueo permanente se incrementó aún más la amplitud (figura 29F). Estos resultados sugieren que las vías glicinérgicas se encuentran inhibiendo a las vías gabaérgicas y que probablemente mediante una influencia supraespinal se activan los mecanismos glicinérgicos. Sin embargo no parece que afecten la conectividad entre grupos de neuronas responsables de la actividad espontánea, ya que no se observaron cambios importantes en los valores de correlación, coherencia ni en las probabilidades de ocurrencia de los potenciales seleccionados.

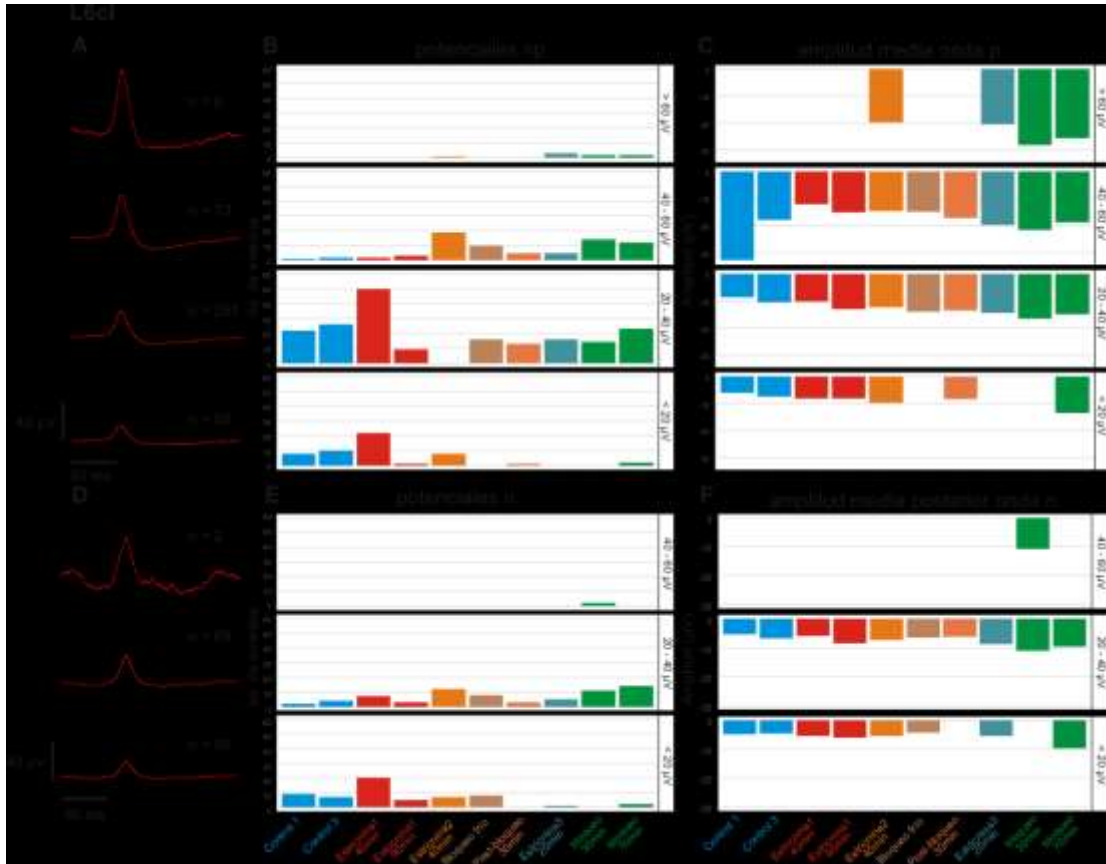


Figura 28. Cambios en las probabilidades de generación de potenciales seleccionados en el segmento L6cl, bajo los efectos de estriquina. A, D. Potenciales sobrepuestos seleccionados tomando como referencia el canal L6cl, se separan en potenciales np (A) y potenciales (n) la línea de color rojo corresponde a la media de los potenciales. Se ordenan por la amplitud de la onda n, de superior a inferior: mayores a 60, entre 40 y 60, entre 20 y 40 y menores a 20 μV . **B, E.** Histogramas que representan el número de eventos de cada clase mostrada en **A** y **D**, por cada 10 minutos de registro. **C.** Cambios en la amplitud media de la onda p de los potenciales np seleccionados en las diferentes condiciones. **F.** media de la amplitud del registro posterior a la onda n equivalente al periodo de la onda p en los npCDPs

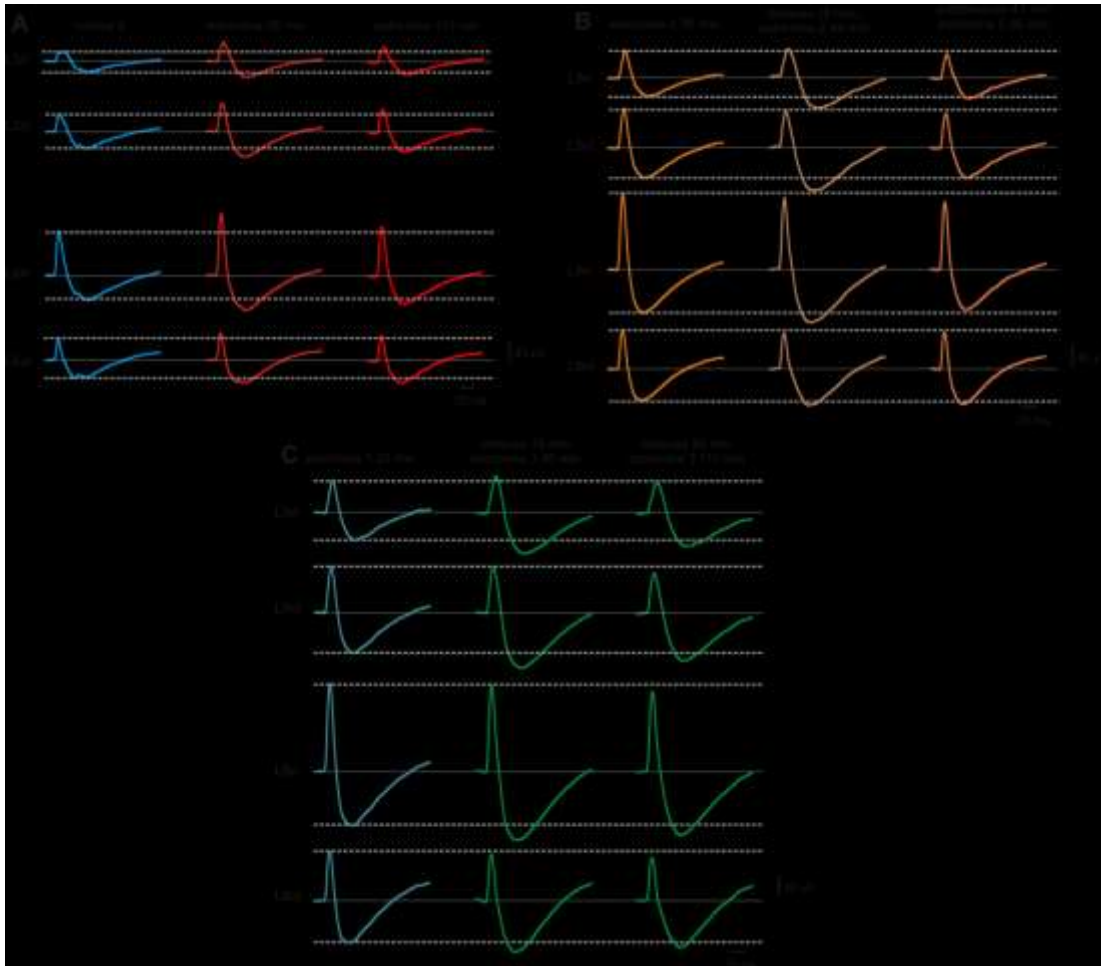


Figura 29. Facilitación de la onda p inducida por la administración de estriknina. **A.** Respuesta registrada en el dorso de la médula espinal, al aplicar un estímulo táctil en el cojinete de la extremidad inferior izquierda. Registro control 2 (trazos azules), 35 y 110 minutos posteriores a la administración de estriknina (trazos rojos). **B.** Respuestas a 30 minutos después de la segunda administración de estriknina (trazos amarillos), durante la disminución de la temperatura sobre la médula espinal (trazos cafés) y 41 minutos después de haber aumentado nuevamente la temperatura (trazos anaranjados). **C.** Respuestas a 20 minutos después de la tercera dosis de estriknina (trazos verde azul), 10 y 80 minutos posteriores al bloqueo permanente por frío (trazos verdes).

Discusión

En la serie de experimentos realizados en este trabajo, se caracterizó la respuesta de los grupos neuronales responsables de la actividad espontánea registrada en el dorso de la médula espinal, ante un bloqueo de vías gabaérgicas y glicinérgicas. El fármaco utilizado para el bloqueo gabaérgico fue la picrotoxina, los efectos máximos de este fármaco se encontraron alrededor de los 40 minutos posteriores a su administración. De forma general en una preparación con el neuroeje intacto, aumentó la sincronización a través de todos los segmentos registrados, debido a la aparición de ondas oscilatorias sincronizadas, este comportamiento se vio altamente influenciado por vías supraespinales. En la preparación con la lesión espinal entre L5 y L6, los segmentos que no tuvieron comunicación con estructuras supraespinales desde el momento en el que se administró la picrotoxina, no presentaron cambios en sus patrones de correlación. Sin embargo, sí se pudo evidenciar el bloqueo gabaérgico, reflejado en la disminución de la onda positiva de los npCDPs seleccionados, así como una disminución en su frecuencia de ocurrencia.

Por otra parte el bloqueo de vías glicinérgicas realizado con la administración de estriquina, no modificó de forma evidente los patrones de sincronización. Tampoco se pudieron correlacionar cambios en las probabilidades de ocurrencia de los CDPs seleccionados con la administración de la estriquina. No obstante, sí se observaron cambios en las respuestas producidas por un estímulo táctil, el bloqueo glicinérgico facilitó la onda positiva relacionada con la activación de mecanismos gabaérgicos. Además al espinalizar esta facilitación aumento aún más, esto sugiere que hay una inhibición tónica glicinérgica sobre las vías gabaérgicas, influenciada por estructuras supraespinales.

Efectos del bloqueo gabaérgico sobre los patrones de correlación.

Para realizar el bloqueo de sinapsis gabaérgicas se utilizó la picrotoxina. Este fármaco ha sido ampliamente utilizado para investigar este tipo de sinapsis (Eccles *et al.*, 1963; Rudomin *et al.*, 1990). Ha sido aplicado para caracterizar los mecanismos de la PAD en diferentes tipos de preparaciones (Eccles *et al.*, 1963; Rudomin *et al.*, 1990; Lidieth, 2006). Se sabe que este fármaco es un antagonista no competitivo del receptor GABA_A, que se une al canal de cloro y lo estabiliza en su estado cerrado. Sin embargo en altas concentraciones puede bloquear también a los receptores glicinérgicos. Por esta razón fue necesario administrar el fármaco en bajas dosis, se tomó como base los trabajos efectuados en 1990 (Rudomin *et al.*, 1990), en los cuales se administró la picrotoxina en dosis entre 0.5 a 1 mg/kg. Además se sabe que al inhibir de forma sistémica los receptores GABA_A, se producen convulsiones por lo que se administraron dosis subconvulsivas. A pesar de las precauciones aplicadas en cuanto a la dosis, fue claro al observar el registro posterior a la administración de picrotoxina (figura 7C), que se presentaron oscilaciones altamente sincronizadas. Este comportamiento se vio reflejado en los altos valores de correlación (figura 7D). Lo cual se confirmó con el cálculo de coherencias, en donde los valores máximos se encontraron en los intervalos de entre 5 y 6 Hz (figura 10C), que corresponde con la frecuencia del componente espectral de mayor amplitud (figura 9C), los resultados indican que las ondas oscilatorias fueron las responsables de este comportamiento.

Las ondas altamente sincronizadas, desaparecieron una vez realizada la espinalización, el patrón de correlación adquirió una nueva configuración estable y constante durante el tiempo que se realizaron los registros. Este cambio repentino en la actividad neuronal, pareció estar relacionado directamente con la influencia supraespinal, sin embargo también se estableció la posibilidad de haberse presentado un shock espinal. El shock espinal está caracterizado por una disminución de la actividad refleja,

posterior a un daño parcial o total de una sección de la médula espinal (Atkinson & Atkinson, 1996). En este caso al comparar los espectros de potencia, que nos dan evidencia del tipo de actividad en la médula espinal, no indicaron que la actividad espontánea se suprimiera, de hecho la amplitud del componente espectral cerca de los 3 Hz de los registros control es muy similar a los registros posteriores a la espinalización (figura 9A y E). Aunque sí se presentó un aumento en la actividad de más alta frecuencia. De igual forma al observar los registros de las respuestas producidas por estimulación eléctrica y táctil, no se observó un decremento en este tipo de respuestas. Al contrario hubo un aumento una vez realizada la espinalización, relacionado con la pérdida de la inhibición tónica ejercida por estructuras supraespinales.

Sin embargo para corroborar la idea de que el comportamiento observado en la médula espinal, dependía de estructuras supraespinales, se desarrolló otro experimento. El cual consistió en disminuir la temperatura de la médula espinal a nivel torácico, y de esta forma interrumpir la comunicación con vías supraespinales. Posteriormente al elevar nuevamente la temperatura se recupera la comunicación con estas estructuras. Lo que se pudo observar con esta técnica, fue que al momento de disminuir la temperatura las ondas oscilatorias sincronas disminuyeron, esto se vio reflejado en los valores de correlación (figura 16F). Posteriormente al quitar el bloqueo las ondas oscilatorias volvieron a predominar en el registro, lo que significó un aumento en los valores de correlación. Finalmente con el bloqueo por temperatura de forma permanente, los valores de correlación disminuyeron y adquirieron una configuración estable que no se modificó incluso después de espinalizar. Esto sugirió que la disminución en la temperatura de la médula espinal tuvo el mismo efecto que una sección completa sobre la misma (espinalización).

Con estos experimentos se observó que el bloqueo gabaérgico de forma sistémica, aumentó la sincronización en la red neuronal, y que este fenómeno fue debido a la generación de ondas oscilatorias sincronas en todos los segmentos registrados. Es importante destacar que este

comportamiento dependió de la comunicación con estructuras supraespinales.

Bloqueo de sinapsis gabaérgicas a nivel espinal.

Con el bloqueo gabaérgico se esperaba que la probabilidad de ocurrencia de los npCDPs disminuyera, así como la amplitud de la onda positiva asociada a estos potenciales, ya que esta onda está ligada a la DAP y la inhibición presináptica la cual utiliza mecanismos gabaérgicos (Rudomin, P. & Schmidt, 1999). Sin embargo con el análisis por forma de onda, en el experimento con el neuroeje intacto, se encontraron resultados contradictorios a lo esperado (figura 12). La amplitud de la onda p aumentó y también aumentó el número de npCDPs de mayor amplitud. Sin embargo este comportamiento fue producto del estado de alta sincronización en el que se encontraba el sistema. Esto se puso en evidencia al observar los potenciales seleccionados en conjunto con la actividad registrada en otros canales (figura 13). Destaca el registro del electrodo intraespinal rostral, que a pesar de no haber presentado relación con el canal de referencia (L7rl) en registros control, incrementó la aparición de potenciales relacionados con este canal (L7rl) bajo los efectos de la picrotoxina. Además el análisis de las respuestas provocadas, mostró que el DRP disminuyó su amplitud tanto para la estimulación eléctrica y más aún para la táctil, lo cual sí concuerda con lo esperado para un bloqueo gabaérgico (figura 11), aunque este análisis se vio afectado por la aparición de una respuesta de mayor latencia, probablemente oligosináptica, con la administración de picrotoxina. En la preparación con neuroeje intacto se puso en evidencia la influencia de las estructuras supraespinales en la ocurrencia de actividad oscilatoria síncrona en la médula espinal. Por lo tanto fue necesario obtener registros de la actividad espontánea sin comunicación con estas estructuras antes de la administración de picrotoxina, para evaluar el efecto del bloqueo gabaérgico sólo a nivel local (espinal).

Para obtener el registro mencionado, se utilizó la preparación que involucra una lesión entre L5 y L6. De esta forma se obtuvieron simultáneamente, segmentos con y sin la influencia de estructuras supraespinales. Con esta preparación fue posible discriminar los cambios ejercidos por el bloqueo gabaérgico a nivel espinal, manteniendo una administración sistémica. En los segmentos rostrales a la lesión se reprodujo el resultado de los experimentos con neuroeje intacto, la aparición de ondas oscilatorias altamente sincronizadas, que fueron las responsables de los aumentos en correlación y coherencia entre distintos segmentos espinales (figura 17E). De manera contrastante, en la región caudal no se presentaron los mismos aumentos en la actividad síncrona, lo cual se reflejó tanto en los valores de correlación (figura 17E), como en los de coherencia (figura 20B, D y F).

Para cuantificar los cambios en los patrones de correlación se compararon los valores de correlación de diferentes condiciones evaluadas, contra los valores del control 4. De esta forma la distribución de los valores cercanos al control 4 se ajustaron a una recta de pendiente 1. Los valores modificados se alejaron de esta distribución y con base a la nueva configuración, el ajuste lineal fue diferente. Para evaluar los cambios se utilizó una prueba de ANCOVA para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de los diferentes ajustes lineales, así como su intercepto en y (ordenada al origen). Con este análisis se corroboró que los segmentos caudales no modificaron sus patrones de correlación con la picrotoxina. El aumento que se observó con la segunda dosis se puede explicar por la extensión de la lesión espinal, la cual no fue completa (figura 18).

Los resultados sugieren que la picrotoxina a nivel espinal no modificó la conectividad de la red neuronal. Sin embargo sí redujo el número de eventos npCDPs, además de disminuir la onda positiva de estos potenciales. Por lo tanto sí hubo un bloqueo de las sinapsis gabaérgicas a nivel espinal. Esto coincide con los estudios realizados sobre los mecanismos de la PAD

(Lidierth, 2006) y su asociación con este tipo de potenciales registrados en el dorso de la médula espinal.

Facilitación de la onda positiva inducida por el bloqueo glicinérgico.

Para inhibir las sinapsis glicinérgicas se utilizó la estriknina. Para elegir la dosis también se tomó como base los estudios realizados previamente con este fármaco. De esta forma se probaron dosis de entre 0.1 y 0.2 mg/Kg. La estriknina también es un fármaco capaz de provocar convulsiones, por lo tanto se esperaba un aumento de la actividad síncrona similar a los resultados obtenidos con la administración de picrotoxina. Sin embargo en el experimento realizado no se observó un aumento en los valores de correlación (figura 25G), ni en los valores de coherencia (figura 27). El análisis de los espectros de potencia mostró que sí hubo un aumento en la actividad de alta frecuencia (figura 26). Pero no se observaron cambios relacionados con la conectividad de la red neuronal. No se pudo identificar alguna relación entre la administración de estriknina y los cambios en la ocurrencia de los CDPs seleccionados (figura 28). No obstante sí se apreciaron cambios relacionados con el bloqueo glicinérgico y las respuestas producidas por estimulación táctil. La onda positiva relacionada a estas respuestas se facilitó, aumentando su amplitud con cada administración realizada, además la interrupción con estructuras supraespinales aumentó aún más la amplitud de esta onda positiva (figura 29).

Estos resultados sugieren en principio que el bloqueo glicinérgico no modificó los patrones de correlación de la actividad espontánea registrada, pero sí se evidenció la facilitación de sinapsis gabaérgicas asociadas a la onda positiva del estímulo táctil aplicado. Además, los cambios observados con la administración de estriknina fueron diferentes a lo obtenido con la picrotoxina, por lo tanto se puede asumir que la dosis de picrotoxina administrada no fue suficiente para bloquear receptores glicinérgicos. Sin embargo es probable que para caracterizar mejor la respuesta de la red neuronal ante un bloqueo tanto gabaérgico como glicinérgico, sea necesario

aumentar la concentración de cada fármaco en el sistema, a su vez se debe evitar el desarrollo de convulsiones.

Estudios de nocicepción relacionados con el bloqueo gabaérgico.

Se han estudiado los cambios presentados en la médula espinal a nivel celular y molecular y su relación con el desarrollo de sensibilización central (Latremoliere & Woolf, 2010). También se ha estudiado la influencia de estructuras supraespinales para el desarrollo de esta condición. Se ha propuesto que cuando hay un descontrol en la regulación de estos mecanismos se puede desarrollar dolor crónico. En trabajos como los realizados por Saadé *et al.* (2012), encontraron que la administración de picrotoxina a nivel espinal y a nivel de la región rostral ventro medial del bulbo raquídeo (RVM), produce respuestas diferenciales. Por un lado la administración local de picrotoxina en la médula espinal facilita la respuesta nociceptiva y por otro lado microinyecciones en la RVM puede inhibir la respuesta nociceptiva.

Los resultados de estos trabajos asociados con lo encontrado en este proyecto, sugiere la necesidad de realizar experimentos administrando los bloqueadores de forma local a nivel de la médula espinal. Esto permitirá aumentar la concentración de cada fármaco en una zona específica, evitando la acción que tienen estos bloqueadores a nivel supraespinal. De esta forma se podrán estudiar mejor los mecanismos inhibidores y su influencia sobre la ocurrencia de distintas clases de CDPs. También implementando una administración local, se podrá estudiar la acción de estos bloqueadores en estructuras supraespinales específicas como la RVM y su acción sobre la conectividad de las neuronas en la región dorsal de la médula espinal. Con los resultados encontrados es evidente que se debe considerar la importancia de las influencias supraespinales. Urban & Gebhart (1999), ya han desarrollado trabajos describiendo la importancia de la comunicación entre la médula espinal con estructuras supraespinales para modificar el

estado de la médula espinal y así responder de forma distinta ante estímulos nociceptivos.

Es importante señalar el trabajo realizado en el laboratorio sobre los cambios en la conectividad de la red neuronal, inducidos por un estímulo nociceptivo (datos no publicados). En este trabajo se caracterizó la respuesta estructurada de la red neuronal ante la administración de capsaicina. También se señaló la importancia de influencias supraespinales para definir el comportamiento de la red neuronal. Además se observaron los cambios en los patrones de sincronización en un estado de nocicepción y analgesia.

Adicionalmente con el trabajo de Contreras-Hernández *et al.* (2015), se ha establecido la posibilidad de que la misma red neuronal cambie sus patrones de sincronización para definir diferentes mecanismos inhibidores que modulan la información sensorial. De esta forma se estableció la posibilidad de que estos mismos mecanismos, puedan modificar la probabilidad de ocurrencia de los CDPs (figura 4). Por esta razón es importante investigar los mecanismos que pueden controlar la configuración que adopta la red neuronal. La posible modulación de la ocurrencia de distintos tipos de CDPs mediante la acción de sinapsis inhibitoras, no queda descartada con los resultados de este trabajo, a pesar de que ambos bloqueos no sugirieron cambios en los patrones de sincronización. Como se mencionó anteriormente es recomendable realizar administración local de los fármacos utilizados, además del uso de otro tipo de antagonistas, para caracterizar el papel de otros neuromoduladores como la serotonina, histamina y noradrenalina. Estos neuromoduladores se han relacionado con la modulación de vías nociceptivas y con una reorganización de circuitos neuronales espinales, como durante la locomoción.

Análisis por forma de onda.

El desarrollo de nuevas técnicas de análisis para la detección y clasificación de CDPs es indispensable para comprender mejor la dinámica de la red

neuronal. Con las metodologías utilizadas es posible caracterizar el comportamiento de la red neuronal en la médula espinal, sin embargo aún tienen diferentes limitaciones, por lo que es necesario continuar aplicando nuevas técnicas que aporten información para describir mejor la estructura organizada adoptada por la dicha red. Con esto se podría relacionar grupos específicos de neuronas con formas de onda particulares y establecer funciones particulares de los cambios en sincronización de la red neuronal activada de forma espontánea.

Conclusiones

El bloqueo gabaérgico inducido por la administración de picrotoxina, incrementa la actividad espontánea sincrónica por la ocurrencia de ondas oscilatorias.

El desarrollo de las ondas oscilatorias altamente sincronizadas depende de estructuras supraespinales.

El bloqueo gabaérgico a nivel espinal sin control supraespinal disminuye la probabilidad de ocurrencia de npCDPs, así como la amplitud de la onda positiva asociada a estos potenciales. Sin embargo no modifica los patrones de sincronización en la red neuronal.

El bloqueo glicinérgico facilita las sinapsis gabaérgicas, sin embargo no afecta los patrones de sincronización ni las probabilidades de ocurrencia de los CDPs.

El control de la probabilidad de ocurrencia de los CDPs involucra mecanismos espinales más complejos y la influencia de estructuras supraespinales.

Perspectivas

Se propone el desarrollo de experimentos aplicando microinyecciones en las zonas de interés (médula espinal, RVM), para la caracterización de la respuesta de la red neuronal en el asta dorsal de la médula espinal. Además utilizar otros antagonistas que permitan estudiar los efectos de otras vías que influyen en el estado de la médula espinal (noradrenérgicas, serotoninérgicas, histaminérgicas y dopaminérgicas).

Implementar junto a otros grupos de trabajo, análisis de detección y clasificación automática de distintas formas de CDPs, para estudiar con más detalle la dinámica de la red neuronal.

Bibliografía

Atkinson PP & Atkinson JL (1996). Spinal shock. *Mayo ClinProc* **71**, 384–389.

Barbour AJ & Parker RL (2014). Psd: Adaptive, sine multitaper power spectral density estimation for R. *Comput Geosci* **63**, 1–8.

Ten Cate J (1950). Spontaneous Electrical Activity Of The Spinal Cord. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **2**, 445–451.

Chávez D, Rodríguez E, Jiménez I & Rudomin P (2012). Changes in correlation between spontaneous activity of dorsal horn neurones lead to differential recruitment of inhibitory pathways in the cat spinal cord. *J Physiol* **590**, 1563–1584.

Contreras-Hernández E, Chávez D & Rudomin P (2015). Dynamic synchronization of ongoing neuronal activity across spinal segments regulates sensory information flow. *J Physiol* **10**, 2343–2363.

Eccles JC, Schmidt R & Willis WD (1963). Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol* **168**, 500–530.

Felten DL, O'Banion MK & Maida MS (2016). Sensory Systems. *Netter's Atlas Neurosci* 353–389.

Gasteiger EL & Ichikawa S (1963). The relation of the spinal electrogram of the cat to intrinsic and extrinsic factors. *Bol Inst Estud Med Biol Univ Nac Auton Mex* **21**, 223–234.

Gerard RW & Young JZ (1937). Electrical Activity of the Central Nervous System of the Frog. *Proc R Soc London Ser B - Biol Sci* **122**, 343 LP-352.

Jänig W (2008). What is the mechanism underlying treatment of pain by systemic application of lidocaine? *Pain* **137**, 5–6.

Latremoliere A & Woolf C (2010). Central Sensitization: a generator of pain

- hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain* **10**, 895–926.
- Leighton AH & Lohmann C (2016). The Wiring of Developing Sensory Circuits—From Patterned Spontaneous Activity to Synaptic Plasticity Mechanisms. *Front Neural Circuits* **10**, 1–13.
- Lidiert M (2006). Local and diffuse mechanisms of primary afferent depolarization and presynaptic inhibition in the rat spinal cord. *J Physiol* **576**, 309–327.
- Manjarrez E, Jiménez I & Rudomin P (2003). Intersegmental synchronization of spontaneous activity of dorsal horn neurons in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* **148**, 401–413.
- Manjarrez E, Rojas-Piloni JG, Jiménez I & Rudomin P (2000). Modulation of synaptic transmission from segmental afferents by spontaneous activity of dorsal horn spinal neurones in the cat. *J Physiol* **529**, 445–460.
- Mark VH & Gasteiger EL (1953). Observations on the role of afferent and descending impulses on the spontaneous potentials of the spinal cord. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **5**, 251–258.
- Martin M, Contreras-Hernández E, Béjar J, Esposito G, Chávez D, Glusman S, Cortés U & Rudomin P (2015). A machine learning methodology for the selection and classification of spontaneous spinal cord dorsum potentials allows disclosure of structured (non-random) changes in neuronal connectivity induced by nociceptive stimulation. *Front Neuroinform* **9**, 1–15.
- R Development Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found Stat Comput Vienna Austria* **0**, {ISBN} 3-900051-07-0.
- Ramwell PW & Shaw JE (1965). the Effect of Picrotoxin on Motor Activity and the Electroencephalogram of Mice. *Br J Pharmacol Chemother* **24**, 651–

658.

Rodríguez EE, Hernández-Lemus E, Itzá-Ortiz BA, Jiménez I & Rudomín P (2011). Multichannel detrended fluctuation analysis reveals synchronized patterns of spontaneous spinal activity in anesthetized cats. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0026449.

Rudomin, P. & Schmidt RF (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. 1–37.

Rudomin P & Dutton H (1967). Effects of presynaptic and postsynaptic inhibition on the variability of the monosynaptic reflex. *Nature* **216**, 292–293.

Rudomin P, Dutton H & Munoz-Martinez J (1969). Changes in correlation between monosynaptic reflexes produced by conditioning afferent volleys. *J Neurophysiol*.

Rudomin P & Hernández E (2008). Changes in synaptic effectiveness of myelinated joint afferents during capsaicin-induced inflammation of the footpad in the anesthetized cat. *Exp Brain Res* **187**, 71–84.

Rudomin P, Jiménez I & Chávez D (2013). Differential presynaptic control of the synaptic effectiveness of cutaneous afferents evidenced by effects produced by acute nerve section. *J Physiol* **591**, 2629–2645.

Rudomin P, Jimenez I, Quevedo J & Solodkin M (1990). Pharmacologic analysis of inhibition produced by last-order intermediate nucleus interneurons mediating nonreciprocal inhibition of motoneurons in cat spinal cord. *J Neurophysiol*.

Rudomin P, Romo R & Mendell LM (1998). *Presynaptic Inhibition and Neural Control*. Oxford University Press.

Rudomin P & Schmidt RF (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* **129**, 1–37.

- Rudomin P, Solodkin M & Jimenez I (1987). Synaptic potentials of primary afferent fibers and motoneurons evoked by single intermediate nucleus interneurons in the cat spinal cord. *J Neurophysiol* **57**, 1288–1313.
- Saadé NE, Al Amin HA, Barchini J, Tchachaghian S, Shamaa F, Jabbur SJ & Atweh SF (2012). Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. *Exp Neurol* **237**, 180–190.
- Sáez VP (2012). Revisión: efecto de la analgesia preventiva en el dolor postoperatorio. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* **59**, 43–50.
- Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A & Arieli A (1999). Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science* **286**, 1943–1946.
- Urban MO & Gebhart GF (1999). Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7687–7692.
- Willis WD & Coggeshall RE (2004). Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. *Kluwer Acad Publ* **3**, Chapter 4.