



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

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Modulación sensorial del generador central del patrón locomotriz
en la médula espinal aislada del ratón”**

T E S I S

Que presenta:

Ing. en Biónica Amaury Salcedo Carrillo

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. Jorge Noel Quevedo Durán

Ciudad de México

agosto 2021

Agradecimientos y dedicatorias

Durante el desarrollo del presente escrito, el autor fue estudiante de maestría del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, **CINVESTAV** en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias; además de recibir apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACyT**, y a los cuales hace patente su agradecimiento.

Al Dr. **Jorge Noel Quevedo Durán**, por ser un excelente tutor en los ojos de este neófito ingeniero, por compartir todo su conocimiento para volver de mí un científico, y estar cada paso del proyecto a mi lado,

A **Jorge Calvo** y todos los **estudiantes del laboratorio**, por su tiempo, apoyo, comentarios y sugerencias en los seminarios de todos los martes; pero sobre todo por su camaradería a pesar del poco tiempo de habernos conocido.

A mis sinodales los Drs. **Ismael Jiménez** y **Adrián Ramírez** por sus excelentes contribuciones y sugerencias al escrito.

A **mis amigos**, por todos los buenos momentos y su apoyo.

Cuando pregunten quien realizó la tesis siempre diré que fue más que sólo uno, aquel que aparece en la portada y los demás que están en mi corazón. Ustedes aportaron al proyecto, sin razón o necesidad. Le agradezco a mi familia toda la ayuda, su expertís y más importante su cariño.

Índice General

I. Resumen	1
Abstract	2
II. Introducción	3
Antecedentes	5
2.1 Propioceptores y mecanorreceptores	6
Clasificación de las fibras aferentes	7
Aferentes primarias	8
Aferentes de huso muscular	9
El sistema eferente γ	12
Aferentes de los órganos tendinosos de Golgi (GTO)	13
Aferentes articulares	15
2.2 Principios de locomoción	16
2.3 Modelos de los CPGs de la locomoción en vertebrados	19
2.4 Reorganización de los reflejos espinales durante la locomoción	21
2.5 Papel del “feed-back” sensorial sobre la temporalidad y amplitud del ritmo locomotriz	22
2.6 Participación del sistema γ durante la locomoción	26
2.7 Control presináptico de la información sensorial durante la locomoción	29
2.8 Estudios sobre el control de la información sensorial del patrón motriz en las preparaciones de roedores	36
2.9 Interneuronas candidatas que conforman al CPG	45
III. Planteamiento del problema	46
Pregunta	49
IV. Hipótesis	49
V. Objetivos.....	50
5.1 Objetivo general	50
5.2 Objetivos específicos	50
VI. Métodos.....	50
VII. Discusión	53
Conclusión	55
VIII. Referencias.....	56

Índice de Figuras

Figura 1. Circuitos neuronales espinales	3
Figura 2. Organización del sistema locomotriz en los vertebrados	5
Figura 3. Clasificación de los axones de las fibras aferentes primarias.....	8
Figura 4. Aferentes de huso muscular.....	10
Figura 5. Inervación de las distintas fibras intrafusales	13
Figura 6. Fibras aferentes del grupo Ib provenientes del órgano tendinoso de Golgi (GTO)	14
Figura 7. El CPG de la locomoción está conformado por una red generadora del ritmo (RG) y una red formadora de patrones (PF) y es capaz de producir patrones motrices más sofisticados que una simple alternancia entre la flexión y la extensión.....	18
Figura 8. Representaciones esquemáticas de los modelos de Generadores Centrales de Patrones (CPGs) basados en la hipótesis de los hemicentros (“half-centres”) de Graham Brown.....	20
Figura 9. La información sensorial proveniente de músculos flexores y extensores regula la temporalidad del ciclo locomotriz.....	23
Figura 10. Reacción de corrección del tropiezo en el gato por la estimulación del dorso de la pata posterior	25
Figura 11. El nivel de actividad del sistema fusimotor γ varía según el tipo de conducta motriz	29
Figura 12. Organización de las vías que median la PAD	32
Figura 13. La delección de las interneuronas GABAérgicas que expresan los receptores huérfanos ROR β , o la inactivación de los receptores TrkB, produce una alteración de la locomoción en ratones transgénicos.....	35
Figura 14. La estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio Cuadriceps produce una prolongación de la flexión en ratas P1 y un “resetting” hacia la extensión en ratas P5	37
Figura 15. La contracción del músculo Cuadriceps (Q) produce una prolongación de la flexión en ratas P1 y un “resetting” hacia la extensión en ratas P5.....	38
Figura 16. La estimulación de aferentes musculares extensoras de bajo umbral en el nervio GLS durante la fase de flexión produce un acortamiento abrupto de la descarga	

flexora ipsilateral y un adelanto de la descarga extensora ipsilateral subsiguiente	39
Figura 17. La estimulación de aferentes musculares flexores de bajo umbral en el nervio DP durante la fase de extensión produce un acortamiento abrupto de la descarga extensora ipsilateral y un adelanto de la descarga flexora ipsilateral subsiguiente	40
Figura 18. Acoplamiento de la actividad locomotriz evocada por la estimulación del nervio flexor Peroneo Profundo (DP) a una intensidad 2 xU	41
Figura 19. El patrón locomotriz se degrada gradualmente con la eliminación de la retroalimentación propioceptiva	43
Figura 20. La información propioceptiva local dirige la recuperación de la función después de una lesión espinal	44
Figura 21. Posibles conexiones de las fibras de bajo umbral (LTA) con el CPG de la locomoción	47
Figura 22. Representación esquemática de la modulación del CPG de la locomoción en la rata neonata	48
Figura 23. Preparación bulbo-espinal in vitro del ratón neonato, con raíces espinales y nervios periféricos en continuidad.....	51
Figura 24. La preparación se fija a una cámara con silgard y se perfunde con líquido cefalorraquídeo artificial gaseado con una mezcla de 95 O ₂ /5 CO ₂	52
Figura 25. Organización de los circuitos neuronales implicados en la generación del patrón motriz (CPG) en roedores.....	54

Abreviaturas

5-HT	serotonina
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
b, b ₁ , b ₂	<i>nuclear bag fibers</i> - fibras de bolsa nuclear
BF	bifuncional
BP	<i>biceps posterior</i>
c	<i>nuclear chain fibers</i> - fibras de cadena nuclear
coFRA	aferentes del reflejo flexor contralaterales
CPGs	<i>central pattern generators</i> - generadores centrales de patrones
Cx	corteza cerebral
DA	dopamina
DP	<i>peroneo profundo</i>
DRP	<i>dorsal root potential</i> - potenciales de raíz dorsal
E	extensor
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>
EMG	electromiograma
ENG	electroneurograma
EPSPs	<i>excitatory postsynaptic potentials</i> - potenciales postsinápticos excitadores
F	flexor
FRA	<i>flexor reflex afferents</i> - aferentes de reflejo flexor
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GAD	<i>glutamic acid decarboxylase</i> - descarboxilasa de ácido glutámico
GL	<i>gastrocnemio lateral</i>
GLS	<i>gastrocnemio lateral - sóleo</i>
GM	<i>gastrocnemio medial</i>
GTO	órgano tendinoso de Golgi
i.p.	inyección intraperitoneal
iFRA	aferentes del reflejo flexor ipsilaterales
IP	<i>Iliacus - Psoas</i>

L_VR	raíz ventral lumbar_
LCRA	líquido cefalorraquídeo artificial
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LTA	<i>low threshold afferents</i> – aferentes de bajo umbral
MLR	<i>mesencephalic locomotor region</i> - región locomotriz mesencefálica
Mn	motoneurona
MSR	reflejo monosináptico
NA	noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAD	<i>Primary Afferent Depolarization</i> - despolarización de aferentes primarias
PBSt	<i>biceps posterior - semitendinoso</i>
PF	<i>pattern formation network</i> - red formadora de patrones
PI	<i>plantaris</i>
Q	<i>quadriceps</i>
RbS	vía rubroespinal
RF	reticular formation - formación reticular
RG	<i>rhythmic generator</i> - generador del ritmo
RN	núcleo rojo
RtS	vía reticuloespinal
<i>Sart</i>	<i>sartorio</i>
SCRC	<i>Spinal Cord Research Centre</i> (Universidad de Manitoba, Canadá)
<i>SmAB</i>	<i>semimembranoso - bíceps anterior</i>
SNC	sistema nervioso central
SP	<i>peroneo superficial</i>
St	<i>semitendinoso</i>
SU	<i>sural</i>
TA	<i>tibial anterior</i>
VS	vía vestibuloespinal
xU	veces por umbral

I. Resumen

La información sensorial de las extremidades en movimiento tiene una función fundamental en la regulación de la temporalidad, amplitud y duración de las fases del ciclo locomotriz para adaptar los movimientos al ambiente, y a la presencia de obstáculos inesperados. Asimismo, durante la locomoción hay una reorganización de los reflejos producida por la estimulación de aferentes sensoriales, e.g., la inhibición no-recíproca producida por la activación de aferentes Ib extensoras se suprime y surgen vías disinápticas y polisinápticas excitadoras.

El objetivo del presente proyecto de tesis es investigar si la estimulación selectiva de vías aferentes es capaz de regular los circuitos generadores del patrón de la locomoción (CPGs) desde estadios tempranos del desarrollo.

Los experimentos se realizan en la preparación bulboespinal aislada del ratón neonato (P0-P5), manteniendo ambas extremidades posteriores *in situ*. La actividad rítmica se induce mediante la aplicación de NMDA y 5-HT al medio de perfusión. Los nervios periféricos disecados se estimulan con trenes de pulsos eléctricos con intensidades ≤ 2 veces el umbral de las fibras más excitables.

En experimentos preliminares del laboratorio desarrollados en la rata neonata, se ha observado que la estimulación de fibras extensoras de bajo umbral durante la flexión produce una terminación abrupta de la descarga flexora en curso acompañada de una anticipación de la descarga extensora subsiguiente (fenómeno conocido como "resetting" hacia la extensión). La estimulación de nervios flexores durante la fase de extensión induce un inicio anticipado de la descarga flexora ipsilateral (conocido como "resetting" hacia la flexión). La estimulación de nervios cutáneos produce efectos variables dependiendo del nervio estimulado (*Razgado et al., 2004*).

Similarmente a lo que ocurre en mamíferos adultos, los efectos producidos sobre los patrones de locomoción, parecen ser específicos para cada tipo de fibras aferentes, ya que la estimulación selectiva de nervios modifica de manera distinta la temporalidad del ciclo locomotriz. Ello implica que desde estadios tempranos del desarrollo existen vías específicas a través de las cuales la información propioceptiva y cutánea de las extremidades posteriores tiene acceso a los CPGs de la locomoción.

Abstract

During locomotion sensory information from moving limbs regulates timing, amplitude and duration of the step cycle phases to adjust walking to the environment and unexpected obstacles. Moreover, during locomotion there is a reorganization of reflexes evoked by the stimulation of sensory afferents, e.g., the non-reciprocal inhibition evoked by the activation of extensor group Ib afferents is suppressed and replaced by an emergence of disynaptic and polysynaptic excitatory pathways.

This thesis project investigates whether selective stimulation of afferent fibers is able to regulate the central pattern generators (CPGs) circuitry for locomotion from early stages of development.

Experiments are performed in the isolated bulbospinal preparation of neonatal mice (P0-P5), with hindlimbs attached. Fictive locomotion is induced by bath application of NMDA and 5-HT. Dissected peripheral nerves are stimulated with trains of electrical pulses with strengths ≤ 2 times threshold of the most excitable fibers.

Preliminary laboratory experiments performed in neonatal rat, showed that the stimulation of low threshold extensor afferents during flexion shortened abruptly the ongoing flexor activity, and evoked an early onset of the subsequent extension (resetting to extension). Stimulation of flexor nerves during extension evokes an anticipation of the ipsilateral flexor burst (resetting to flexion). Stimulation of cutaneous nerves evokes variable effects according to the stimulated nerve (*Razgado et al., 2004*).

In a similar manner as in adult mammals, the effects seem to be specific for each type of afferent fibers, since the selective nerve stimulation modifies differently the timing of the locomotor cycle. This suggests the existence of specific pathways through which hindlimb's proprioceptive and cutaneous sensory information have access to the locomotor CPGs from early stages of development.

II. Introducción

En la naturaleza, el desplazamiento corresponde a uno de los actos más importantes que realizan algunos seres vivos. Curiosamente, uno pensaría que esta característica fundamental representa una conducta conservada evolutivamente. No obstante, gracias a la selección natural, la diversificación de organismos ha permitido que no todos se desplacen de la misma manera; por ejemplo, algunos vuelan, otros nadan, caminan o reptan. Sin embargo, al observar con cuidado sin considerar los detalles anatómicos de cada organismo, nos podemos dar cuenta que todas las formas de desplazamiento, o locomoción, si bien distintas, tienen algo en común: un conjunto de movimientos estereotipados, rítmicos y alternados de las extremidades, cuerpo o apéndices (Rossignol, 1996).

La locomoción es, entonces, un comportamiento emergente que resulta de múltiples interacciones neuronales y neuromusculares, aparentemente caóticas, pero que, al estar reguladas por un algoritmo metaheurístico natural, dan como resultado el desplazamiento fino y preciso característico del “andar” (Figura 1).

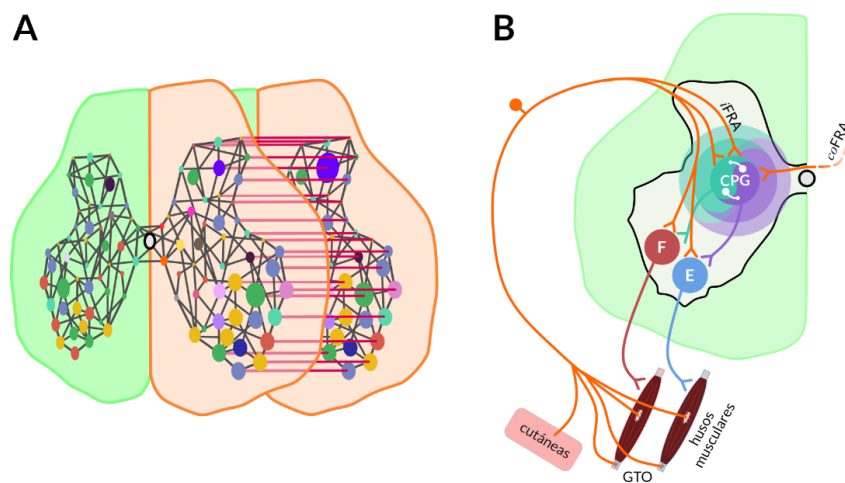


Figura 1. Circuitos neuronales espinales. **(A)** Representación esquemática de un sistema distribuido de interconexiones neuronales en un segmento de la médula espinal. **(B)** Generador Central de Patrones (CPG; *Central Pattern Generator*) conformado por un hemicentro flexor (en verde) y un hemicentro extensor (en morado) inhibidos mutuamente (interneuronas en blanco), los cuales establecen contactos sinápticos con las motoneuronas flexoras (F) y extensoras (E), respectivamente. Las aferentes propioceptivas provenientes de husos musculares y órganos tendinosos de Golgi (GTO), y cutáneas tienen acceso al CPG. El hemicentro flexor del CPG es activado por las aferentes de reflejo flexor ipsilaterales (iFRA) y el hemicentro extensor por las contralaterales (coFRA) (B, modificado de Jankowska et al, 1967).

Los circuitos neuronales espinales implicados en la locomoción, conforman una red distribuida con múltiples entradas y salidas, asemejando, pues, un sistema de caja negra. Considerando lo anterior surge la siguiente pregunta ¿cuáles son las entradas y salidas de este sistema en la médula espinal?

Para responder a esta incógnita, se hace necesario observar las estructuras anatómicas implicadas en la locomoción y su organización jerárquica (de manera simplificada; ver *Figura 2A y C*); la primera entrada al sistema corresponde a la información de estructuras supraespinales como la corteza motriz, el tálamo, los ganglios basales, la región locomotriz mesencefálica (MLR; *mesencephalic locomotor region*), el cerebelo, las vías reticuloespinal (RtS), vestibuloespinal (VS) y rubroespinal (RbS) (del puente y bulbo raquídeo), y que cumplen diferentes funciones como corrección, precisión, adaptación, modulación y ejecución de la locomoción (*Figura 2B*); la otra entrada de este sistema es la información sensorial propioceptiva que cumple la función de adaptación de la locomoción. La información proveniente de ambas entradas es integrada en la médula espinal y tiene como salida o vía final las motoneuronas α que transmiten la información a todos los músculos (*Figura 2A*).

Pero, a pesar de conocer estas estructuras se mantiene la interrogante: ¿qué se sabe de esta red locomotriz espinal? ¿qué elementos la integran? y ¿cómo está organizada?

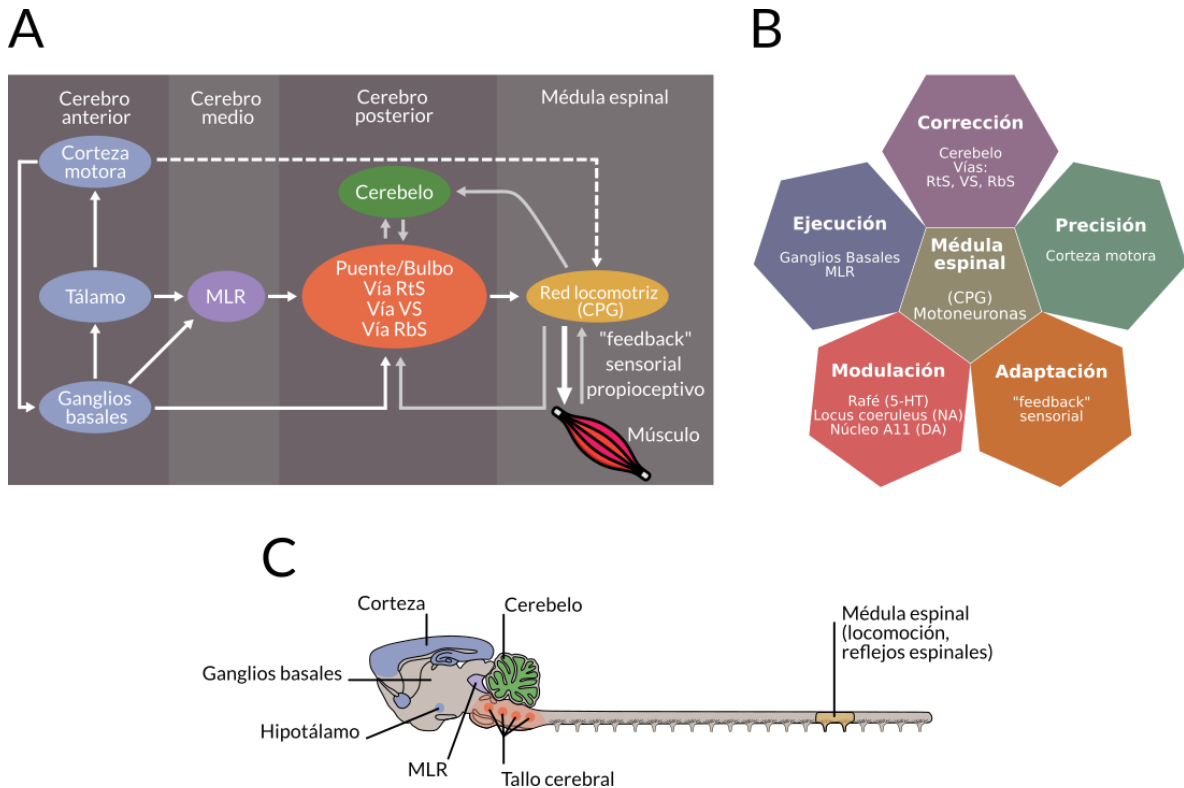


Figura 2. Organización del sistema locomotriz en los vertebrados. **(A)** Las vías motrices de los vertebrados acuáticos y terrestres comparten una estructura neuroanatómica similar. El control local de los movimientos musculares lo realizan grupos de neuronas motrices en la médula espinal que forman parte de una red locomotriz distribuida, o CPG. El patrón motriz es modulado por la retroalimentación sensorial propioceptiva a través de aferentes sensoriales. Las vías reticuloespinal (RtS), rubroespinal (RbS) y vestibuloespinal (VS) descendentes controlan la red locomotriz en la médula espinal, aunque la RtS es la principal para el inicio de la locomoción. La RtS es activada por la región locomotora mesencefálica (MLR), que recibe aferencias de los ganglios basales y el tálamo. El cerebelo coordina las conductas motrices integrando la retroalimentación sensorial y central, y optimizando el patrón motriz del movimiento. También coordina las acciones motrices espinales con las vías motrices supraespinales. Las conexiones de la corteza motriz refinan e inician las acciones motrices. Las líneas blancas indican las vías de comando directo, las líneas grises indican las vías de retroalimentación. **(B)** Funciones de las distintas estructuras relacionadas con la locomoción. **(C)** Esquema del sistema nervioso central de los roedores que muestra las estructuras neuronales que forman parte del sistema motriz que controla conductas estereotipadas como la masticación, la respiración y la locomoción. (A y C modificados de Goulding, 2009).

Antecedentes

Para entender la organización de esta red locomotriz espinal, a continuación, se describen las estructuras y los elementos que la conforman, así como sus funciones específicas.

2.1 Propioceptores y mecanorreceptores

Hablando de manera muy general, los propioceptores, como su nombre lo indica, son receptores que tiene la función de detectar los cambios de posición en el espacio (de las extremidades o de los segmentos corporales) y los cambios de velocidad angular de las articulaciones, y enviar la información al sistema nervioso central (SNC).

Los mecanorreceptores, por su parte, son receptores sensoriales sensibles a estímulos mecánicos (distorsiones físicas como la flexión o el estiramiento de la piel) y conforman la mayoría de los receptores sensoriales del cuerpo. En general, estos receptores detectan el contacto de objetos y superficies con la piel, y la distensión de las distintas estructuras viscerales que conforman al organismo. Otra función que cumplen los mecanorreceptores es la detección de cambios de temperatura y presión (un caso especial son las células pilosas del oído interno implicadas en la audición y el equilibrio).

Los mecanorreceptores cutáneos se clasifican de acuerdo a la función del receptor sensorial, por ejemplo:

- Corpúsculos de Meissner: responden ante el tacto suave.
- Corpúsculos de Krause: detectan las sensaciones de pérdida de calor.
- Corpúsculos de Ruffini: reaccionan ante el estiramiento y el calor.
- Corpúsculos de Pacini: responden ante la presión y a las vibraciones.
- Corpúsculos de Merkel: detectan los cambios de presión y las diferentes texturas.

A través de estos receptores se genera de manera preponderante la información sensorial en el cuerpo (sin considerar la información de los sentidos especiales) (*Bear et al., 2013*).

Clasificación de las fibras aferentes

Con lo descrito en el apartado anterior, se obtiene una visión panorámica de la información sensorial que recibe el SNC, sin embargo, para que esta información pueda llegar a un lugar donde sea verdaderamente útil, requiere pasar por un medio, asemejando a lo que hace el sonido, si bien uno puede generar una perturbación a una frecuencia audible, es indispensable la existencia del aire para que de forma rítmica puedan conducirse las ondas sonoras a los receptores del oído interno. En el organismo, este medio de transporte resultan ser los axones, cuyas características biofísicas les permiten conducir corriente mediante potenciales de acción propagados, por lo que, de forma muy burda podrían considerarse como los cables de un circuito, aunque es necesario remarcar que su naturaleza es mucho más compleja de lo que la frase puede dar a entender. Manteniendo la analogía con los cables, es necesario enfatizar que no todos los cables son iguales, se puede pensar que todos están hechos de un metal conductor -así pues, todos los axones están conformados de una membrana celular con soluciones electrolíticas intra y extracelulares como conductores de volumen-, pero su función debido a la forma en la que conducen es variable, e.g., no se puede utilizar un cable USB para transmitir corriente de alta tensión, o un cable de internet para enviar un mensaje que no corresponda a datos electrónicos. Es pues un hecho, que todo el cableado de conexiones entre los receptores y la médula espinal está compuesto de axones aferentes con distintas características estructurales y funcionales, las cuales son exclusivas para el manejo de información de manera altamente específica, como son los diferentes diámetros, grados de mielinización y velocidades de conducción, así como el tipo de patrones de disparo que terminan codificando los datos, es decir, el tipo, origen e intensidad de los estímulos, así como la adaptación a los mismos (*Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013*).

Aferentes primarias

Los axones de las fibras aferentes primarias parten de los receptores y llegan a la médula espinal a través de las raíces dorsales. Los cuerpos celulares (o somas) residen en los ganglios de raíz dorsal. El diámetro de los axones es variable y existe una correlación entre el tipo de receptor sensorial de origen con el diámetro de los mismos.

Existen dos clasificaciones para los axones de las fibras aferentes con base a los receptores de origen, el diámetro y el grado de mielinización (*Figura 3*). Los axones de los receptores sensoriales de la piel se designan como grupos $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C; y los receptores musculares como grupos I (a, b), II, III y IV. Los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi (GTO) son inervados por las fibras de los grupos Ia y Ib, respectivamente.

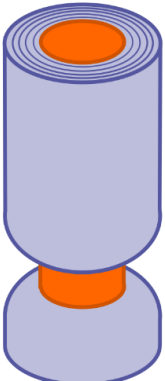



Axones cutáneos	$A\alpha$	$A\beta$	$A\delta$	C
Axones musculares	Grupo Ia y Ib	II	III	IV
				
Diámetro (μm)	13-20	6-12	1-5	0.2-1.5
Velocidad de conducción (m/seg)	80-120	35-75	5-30	0.5-2
Receptores sensoriales	Propioceptores del músculo esquelético	Mecanoreceptores cutáneos	Dolor, temperatura	Temperatura, dolor, picazón

Figura 3. Clasificación de los axones de las fibras aferentes primarias. Los axones están dibujados a escala, pero se muestran ~2000 veces más grandes que el tamaño natural (el axón se encuentra de color naranja y la mielina de color lila). El diámetro de un axón está relacionado con su velocidad de conducción y con el tipo de receptor sensorial al que está conectado. (*Modificado de Bear et al., 2007*).

La velocidad de conducción del potencial de acción depende del diámetro del axón y su grado de mielinización. Por ejemplo, las fibras C (que son las únicas amielínicas) se encuentran involucradas en las sensaciones de dolor y térmica, y corresponden a los axones de conducción más lenta. Mientras que, las sensaciones táctiles, mediadas por los mecanorreceptores cutáneos, son transmitidas por los axones A β , de diámetro más grande y con una velocidad de conducción mayor, razón por la cual los reflejos de flexión espinales, en los que participan axones de conducción relativamente rápida, ocurren antes de que percibamos el dolor, lo que permite ejecutar movimientos que eviten un daño irreparable. (*Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013*).

Una vez, teniendo en cuenta estas características básicas de los axones de las fibras aferentes primarias, es importante considerar con más detalle sus receptores de origen y el tipo de información que transmiten.

Aferentes de huso muscular

Los husos musculares son estructuras encapsuladas que tienen forma de huso (pleonásticamente) o fusiforme, ubicados en paralelo a las fibras musculares extrafusales, y son un ejemplo de receptores propioceptivos.

Dentro de los husos musculares se encuentran fibras musculares intrafusales que son inervadas por las terminales anuloespirales de las fibras aferentes (receptores de huso muscular) y eferentes (axones de las motoneuronas γ). La función principal de los receptores de huso muscular es detectar los cambios de longitud del músculo, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con los cambios angulares de las articulaciones de tal forma que se puede crear una representación holográfica de las posiciones relativas de los distintos segmentos del cuerpo.

Los husos musculares están conformados de la siguiente manera: un grupo de fibras musculares intrafusales especializadas, con regiones centrales no contráctiles;

fibras sensoriales que terminan en las regiones centrales; y axones motores que terminan en las regiones polares contráctiles de las fibras intrafusales (*Figura 4*).

Existen dos tipos de fibras musculares intrafusales: las fibras de bolsa nuclear ("*bag*"; *b*) y las fibras de cadena nuclear ("*chain*"; *c*). Las fibras de bolsa nuclear pueden dividirse en dos grupos, dinámicas (*b*₁) y estáticas (*b*₂). Un huso muscular típico tiene dos o tres fibras de bolsa nuclear y un número variable de fibras de cadena nuclear (~5). Estas fibras, además, presentan diferentes configuraciones de inervación como se puede ver a continuación, y la función de esta inervación será discutida en detalle más adelante.

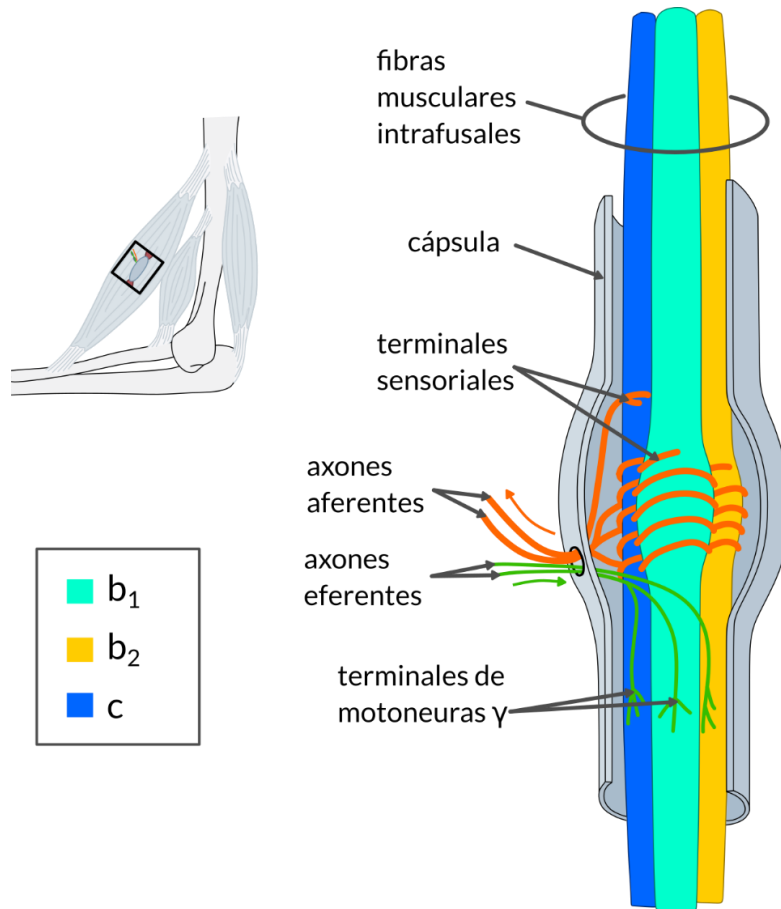


Figura 4. Aferentes de huso muscular. Del lado izquierdo se muestra una representación gráfica de una extremidad superior. Del lado derecho se muestra una magnificación del recuadro negro de la figura de la izquierda. Los principales componentes del huso muscular son las fibras musculares intrafusales ("*nuclear bag 1*" -*b*₁- en color verde claro, "*nuclear bag 2*" -*b*₂- en color amarillo, "*nuclear chain*" -*c*- en color azul), las terminales sensoriales aferentes (color naranja) y las terminales motrices eferentes (verde oscuro). (*Adaptado y modificado de Kandel et al., 2013*).

Por lo que surge la pregunta ¿cómo funcionan las fibras intrafusales y sus receptores para transducir y enviar la información sobre el estiramiento muscular?

Cuando el músculo se estira de manera artificial o por una carga, las fibras intrafusales se estiran, activando las terminales anuloespirales sensoriales y, por tanto, se produce un aumento en el disparo de las terminales. En caso contrario, cuando el músculo se acorta, el huso muscular se descarga y da como resultado una disminución de dicha actividad.

Las fibras musculares extrafusales están inervadas por motoneuronas α , con axones mielinizados de diámetro grande, mientras que las fibras musculares intrafusales están inervadas por motoneuronas γ , que tienen axones mielinizados de un diámetro más pequeño. La activación de las motoneuronas γ provoca el acortamiento de las regiones polares de las fibras intrafusales; y a su vez se produce un estiramiento de la región ecuatorial de la fibra intrafusil, el cual es detectado por las terminaciones sensoriales (grupos Ia y II). El estiramiento de estas terminales activa receptores sensibles a la deformación de la membrana generando potenciales de acción, los cuales se propagan a los blancos sinápticos de la médula espinal, entre ellos las motoneuronas α . El circuito, fibra aferente Ia \rightarrow motoneurona α \rightarrow placa neuromuscular constituye el arco reflejo simple (reflejo miotático), conformando un sistema de retroalimentación positiva. Sin embargo, la contracción del músculo hace que el huso muscular quede laxo y las fibras aferentes dejen de ser sensibles a los cambios de longitud del músculo. La activación del sistema γ se encarga, entonces de mantener al huso muscular tenso en todo momento, y sensible a distintas longitudes musculares, por lo que se puede concluir que las motoneuronas γ trabajan permanentemente ajustando la sensibilidad de los husos musculares (*ver adelante*). (Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013).

El sistema eferente γ

Resumiendo, una forma para distinguir las fibras musculares intrafusales, de las fibras musculares extrafusales, o de trabajo es la siguiente: las fibras extrafusales, además de ubicarse fuera del huso, encontrarse en mayor proporción y formar el grueso del músculo, están inervadas por las motoneuronas α ; mientras que las fibras intrafusales reciben su inervación motriz por otro tipo de motoneuronas, las motoneuronas γ .

Las motoneuronas α contraen las fibras extrafusales provocando un acortamiento del músculo, cuando esto sucede los husos musculares quedan laxos y no pueden aportar más información del cambio en longitud del músculo, ya que hay un silenciamiento de las fibras aferentes. Para contrarrestar este efecto, las motoneuronas γ que se encuentran inervando las fibras intrafusales activan las zonas polares contráctiles, lo que acorta los polos del huso muscular y se produce un estiramiento en la zona ecuatorial no contráctil. Ello conduce a que los axones Ia que inervan las fibras intrafusales se mantengan activos -disparando potenciales de acción- (*Figura 5*). De esta forma el sistema se mantiene informando continuamente los cambios de longitud del músculo. La coactivación α - γ estabiliza la sensibilidad de los husos musculares y es muy relevante en diversos movimientos voluntarios. (*Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013*).

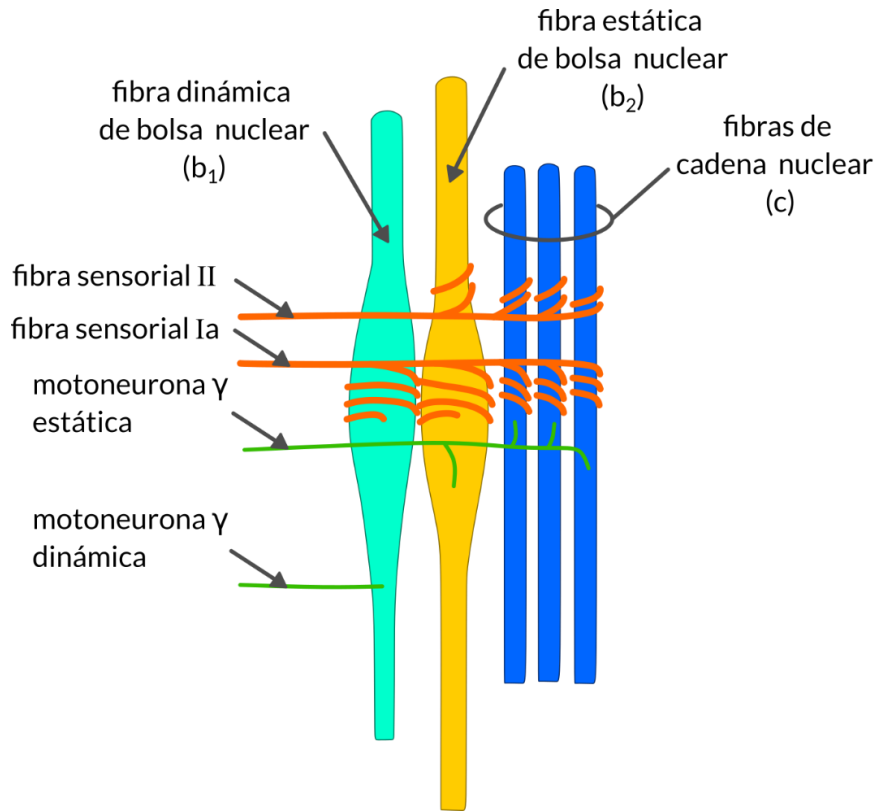


Figura 5. Inervación de las distintas fibras intrafusales. Fibra de bolsa nuclear dinámica (b_1 , color verde claro), fibra de bolsa nuclear estática (b_2 , color amarillo) y fibras de cadena nuclear (c , color azul). Un axón sensorial Ia único puede inervar los tres tipos de fibras. Los axones sensoriales de tipo II inervan las fibras b_2 y c . Dos tipos de motoneuronas inervan diferentes fibras intrafusales. Las motoneuronas γ dinámicas inervan sólo las fibras b_1 ; las motoneuronas γ estáticas inervan varias combinaciones de fibras b_2 y c . (Adaptado y modificado de Kandel et al., 2013).

Aferentes de los órganos tendinosos de Golgi (GTO)

En un sistema tan complejo como es un organismo, debe existir más de un sistema para detectar la propiocepción. En efecto, los husos musculares informan el grado de estiramiento del músculo y el órgano tendinoso de Golgi (GTO), se encarga de detectar la tensión muscular o la fuerza de contracción. Los GTOs están situados en la unión del músculo y el tendón, en serie con las fibras musculares extrafusales (a diferencia de los husos musculares que se encuentran situados en paralelo a las fibras musculares extrafusales), y se encuentran inervados por fibras aferentes del grupo Ib, que tienen un diámetro ligeramente más pequeño que las fibras Ia que inervan los husos musculares (*Figura 6*).

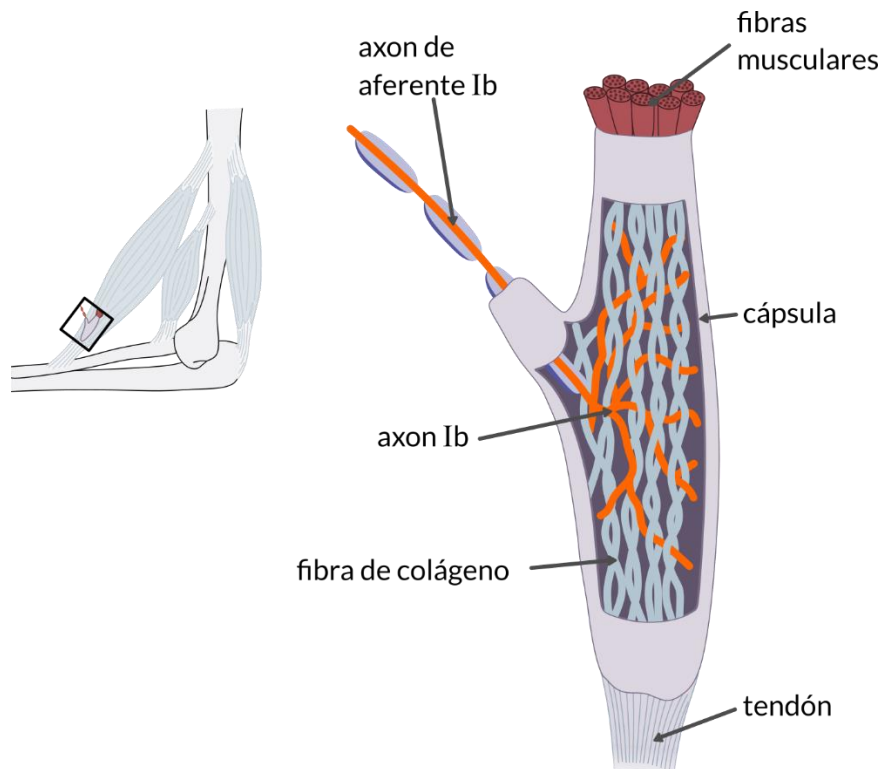


Figura 6. Fibras aferentes del grupo Ib provenientes del órgano tendinoso de Golgi (GTO). Del lado izquierdo se muestra una representación gráfica de una extremidad superior. Del lado derecho se muestra una magnificación del recuadro negro. Axón Ib (color naranja), mielina (color lila), fibras de colágeno (color gris). (Adaptado y modificado de Kandel et al., 2013).

Los axones Ib llegan a la médula espinal, se ramifican repetidamente y hacen sinapsis con interneuronas en el núcleo intermedio. Algunas de estas interneuronas forman conexiones inhibitoras (inhibición no recíproca) con las motoneuronas α que inervan el mismo músculo. Esta es la base de otro reflejo espinal llamado reflejo miotático inverso. La función de este reflejo es regular la tensión muscular dentro de un rango óptimo. En la literatura clásica se menciona que, en circunstancias extremas, la inhibición no recíproca, subyacente al reflejo miotático inverso, funciona como un mecanismo de seguridad que protege al músculo de una sobrecarga, es decir, cuando la tensión muscular aumenta, la inhibición de la motoneurona α frena la contracción muscular; y de manera opuesta cuando la tensión muscular disminuye, la inhibición no recíproca de la motoneurona α se reduce y la contracción muscular aumenta. De tal forma que este tipo de retroalimentación propioceptiva sería esencial para la correcta ejecución de actos de motricidad fina, como la manipulación de objetos frágiles con las

manos, que requieren un agarre firme, pero no demasiado potente. (*Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013*).

Sin embargo, durante la postura y la locomoción la inhibición no recíproca se reduce y emerge una excitación que conforma un sistema de retroalimentación positiva de fuerza para sostener el peso corporal en contra de la fuerza de gravedad (*ver más adelante, Whelan y Pearson, 1997*).

Aferentes articulares

Otro tipo de fibras aferentes con una función relevante corresponde a las aferentes de las articulaciones, ya que, además de los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi, existe una variedad de receptores propioceptivos en los tejidos conectivos de las articulaciones, especialmente dentro del tejido fibroso que rodea las articulaciones (cápsula articular) y los ligamentos. Estos mecanorreceptores detectan los cambios en el ángulo, la dirección y la velocidad de movimiento de una articulación. Los receptores articulares se caracterizan por ser de adaptación rápida, lo que implica que la información sensorial sobre una articulación en movimiento es abundante, pero las aferentes sensoriales articulares que codifican la posición de reposo de una articulación son menos numerosas. Sin embargo, dado que es posible conocer la posición de una articulación, aun sin la participación de la visión, esto nos indica que la información de los receptores articulares se combina con la de los husos musculares y los GTO, y probablemente con los receptores de la piel, para estimar el ángulo articular. En resumen, la posición del cuerpo en el espacio, o propiocepción, es detectada por los receptores de huso muscular, los GTO, los receptores articulares y los mecanorreceptores de la piel. (*Bear et al., 2007; Kandel et al., 2013*).

2.2 Principios de locomoción

Puesto que la conducta de locomoción es ubicua, es probable que, al comenzar a aventurarse en este campo, se cometa el error de considerarla como un acto sencillo, pero la realidad es que hasta la fecha sabemos poco sobre la complejidad de esta conducta motriz. Para darnos una idea de cómo es que poco a poco se ha ido desentrañado el misterio de esta conducta, debemos partir de las aportaciones de Sherrington, quien en sus experimentos en preparaciones de animales descerebrados y espinalizados, observó la presencia de reflejos espinales que lo llevó a proponer la existencia de una inhibición recíproca entre músculos flexores y extensores de las extremidades, concluyendo que la locomoción era un acto reflejo (*Sherrington, 1910*). Tiempo después – a comienzos del siglo XX – Graham Brown, de igual manera, al efectuar experimentos en animales descerebrados y desaferentados, propuso la hipótesis de que los músculos de las extremidades eran controlados de manera diferencial por dos sistemas neuronales especializados, uno que se encargaba exclusivamente del control de los músculos flexores, y otro de los extensores – los llamados “half-centres”, o hemicentros – (*Brown TG., 1911*). Un elemento clave de esta hipótesis era la inhibición mutua entre ambos sistemas, de tal forma que cuando uno de ellos se encontraba “activo”, el otro estaba “apagado”. Adicionalmente, Graham Brown describió que la transición entre los estados “activo/apagado” estaba mediada por la fatiga de las conexiones inhibitorias, cualidad de los sistemas que resulta en una alternancia entre la flexión y la extensión. Transcurrieron varias décadas para que la hipótesis propuesta por Graham Brown fuera retomada por Jankowska y Lundberg (*1967*), quienes en la preparación del gato espinalizado y con locomoción “ficticia” inducida por *L-metil-dihidroxifenilalanina* (L-DOPA), demostraron la existencia de dos grupos de interneuronas inhibidos recíprocamente, i.e. los hemicentros de Graham Brown, concepto que prevalece en la actualidad (*Figura 1B*). Asimismo, observaron que algunas interneuronas de la lámina VII de Rexed del segmento lumbar de la médula espinal descargaban de manera espontánea durante las fases de flexión o extensión, además de ser activadas por la estimulación de aferentes del reflejo flexor (FRA).

De manera resumida, en la conducta locomotriz son importantes varios aspectos: **1)** es el resultado de las interacciones entre los elementos de un sistema complejo; **2)** no es necesaria la participación de estructuras supraespinales, ni de la información sensorial; **3)** los elementos necesarios para realizar este acto motriz se encuentran en la médula espinal distribuidos rostrocaudalmente, acorde a las extremidades que controlan; y **4)** consiste de un sistema básico que se encarga de la generación del ritmo flexión/extensión (*Figura 1B*), si bien Perret y Cabalguen (1980) mostraron que la locomoción consistía de un repertorio de patrones motrices más complejo que una simple alternancia entre la flexión y la extensión (*Figura 7*).

Aunque la médula espinal *per se* es capaz de generar el ritmo básico de flexión y extensión de la locomoción, es importante resaltar que la información sensorial y otras estructuras supraespinales del sistema motriz, son capaces de modular los circuitos neuronales espinales implicados en la locomoción. Como sabemos, el acto de desplazarse parte de una necesidad, como el forrajeo, la supervivencia, las relaciones sociales, la motivación, etc.; indicando la participación de diversas estructuras supraespinales como: la corteza motriz primaria, los ganglios basales, los núcleos del tallo cerebral, en especial la región locomotriz mesencefálica (MLR, *mesencephalic locomotor region*), así como los núcleos de la formación reticular (*Shik et al., 1966a, b; Rossignol, 1996*). Estas estructuras cumplen un papel fundamental para iniciar y modular la actividad locomotriz. Como se mencionó, la generación del ritmo locomotriz se produce a nivel espinal gracias a unos circuitos neuronales denominados “generadores centrales de patrones” (o CPGs; *Central Pattern Generators*) (*Brown, 1911, 1912, 1914; Grillner, 1973*). Estos CPGs, a su vez, son modulados por la información sensorial proveniente de los músculos en movimiento modificando el patrón motriz y la temporalidad de los ciclos locomotrices acorde a las condiciones ambientales (*Forssberg y Grillner, 1973; Rossignol, 1996*) (*Figura 7*). La información sensorial propioceptiva de los músculos en movimiento (movimiento ejecutado o “copia aferente del patrón motriz”) proyecta a estructuras supraespinales, de manera importante al cerebelo a través del tracto espinocerebeloso dorsal. El patrón motriz comandado por las estructuras supraespinales sobre los CPGs (movimiento planeado o “copia eferente

del patrón motriz”) es transmitido a su vez al cerebelo a través del tracto espinocerebeloso ventral. El cerebelo, entonces, se encarga de comparar los movimientos planeados y los que se han ejecutado funcionando como un sistema muy preciso de corrección (Kiehn y Dougherty, 2013).

En conjunto, se establece una interacción dinámica entre la información supraespinal, las neuronas espinales del CPG y la información proveniente de las aferentes propioceptivas y cutáneas (Rossignol et al., 2006; Pearson, 2008; Côté et al., 2018), generando los movimientos precisos y refinados que se requirieren para efectuar una tarea motriz tan especializada como la locomoción (Figura 7).

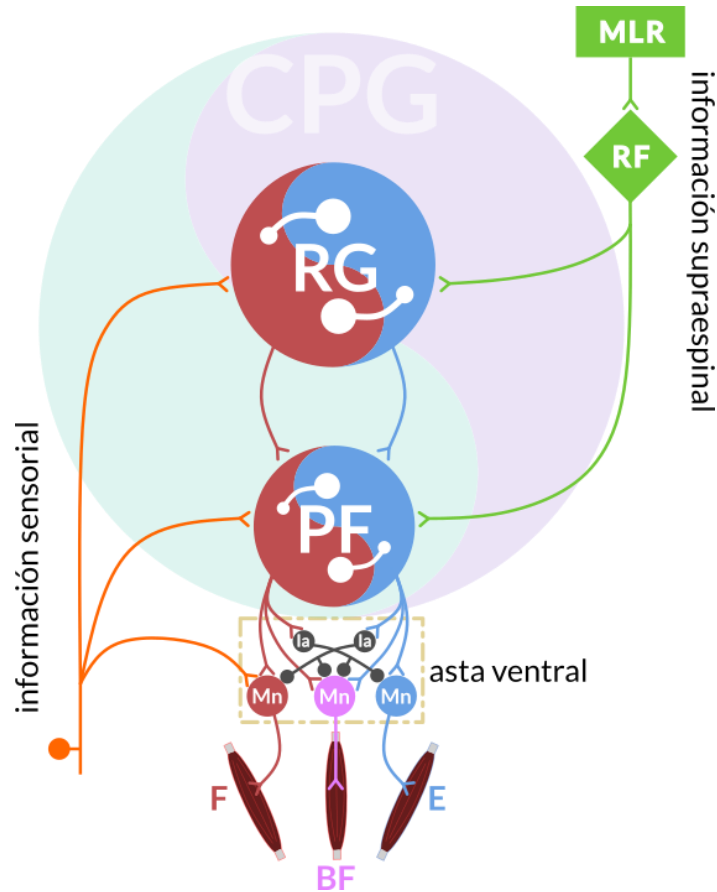


Figura 7. El CPG de la locomoción está conformado por una red generadora del ritmo (RG) y una red formadora de patrones (PF) y es capaz de producir patrones motrices más sofisticados que una simple alternancia entre la flexión y la extensión. *RG*, generador del ritmo; *PF*, red formadora de patrones; *Ia*, interneurona de la inhibición recíproca; *MLR*, región locomotriz mesencefálica; *RF*, formación reticular; *Mn*, motoneurona; *F*, flexor; *E*, extensor; *BF*, bifuncional (Modificado de McCrea y Rybak, 2008; Perret y Cabalguen, 1980).

2.3 Modelos de los CPGs de la locomoción en vertebrados

A partir de la hipótesis de los hemicentros de Graham Brown y de los trabajos que la apoyaban (*Jankowska et al., 1967a; Lundberg, 1981*), surgieron toda una serie de aportaciones que dieron lugar al concepto del “CPG conformado por dos hemicentros” (un hemicentro flexor y un hemicentro extensor); pero como era de esperarse, el surgimiento de nueva información fue sofisticando el concepto original. En la actualidad existen múltiples modelos, cada uno aportando algo novedoso. De manera general se han descrito diferentes modelos de los CPGs, los cuales comparten un “núcleo común”, que son los hemicentros flexor y extensor, inhibidos recíprocamente entre sí (modelo de un solo nivel; *Figura 8A-C*). Con base en diferentes evidencias experimentales, se ha propuesto que entre el núcleo común (nivel 1) y las motoneuronas existen uno o más niveles interpuestos e interconectados entre sí (*Figura 8D-F*). La existencia de varios niveles brinda más grados de libertad al sistema, que se traduce en patrones motrices tan finos y sofisticados como sea necesario. Dentro de los modelos de 1, 2 y 3 niveles, uno de los más populares a la fecha, es el modelo de 2 niveles de Rybak y McCrea (*2008*), el cual explica no sólo la alternancia entre la flexión y la extensión, sino también la generación de diferentes patrones motrices y los subtipos de locomoción (marcha, trote, galope, etc.) (*Figura 8E*). La característica principal de los modelos de 2 niveles es la dicotomía entre el generador del ritmo (RG) y la red formadora de patrones (PF), pero además toma en consideración la participación de otro tipo de interneuronas – como las interneuronas la que median la inhibición recíproca – y la modulación sensorial por fibras aferentes (*Rybak et al., 2006 a, b; McCrea y Rybak, 2008*). Hasta la fecha existen muchas incógnitas sobre la arquitectura de las redes neuronales implicadas en la generación de la locomoción. Se desconoce en detalle la modulación de estas redes por la información sensorial proveniente del cuerpo en movimiento, el control diferencial ejercido por diferentes tipos de fibras aferentes (grupos Ia y Ib, grupo II, flexoras, extensoras, cutáneas y articulares) y sus proyecciones a los elementos neuronales de los CPGs, así como la identidad de las interneuronas excitadoras e inhibidoras que conforman el RG y la PF de los CPGs. Recientemente, en mamíferos se han hecho aportaciones importantes

acerca de las posibles interneuronas candidatas a formar parte del RG y de la PF de la locomoción (ver adelante) (Wilson et al., 2005; Dougherty et al., 2013; Domínguez-Rodríguez et al., 2020).

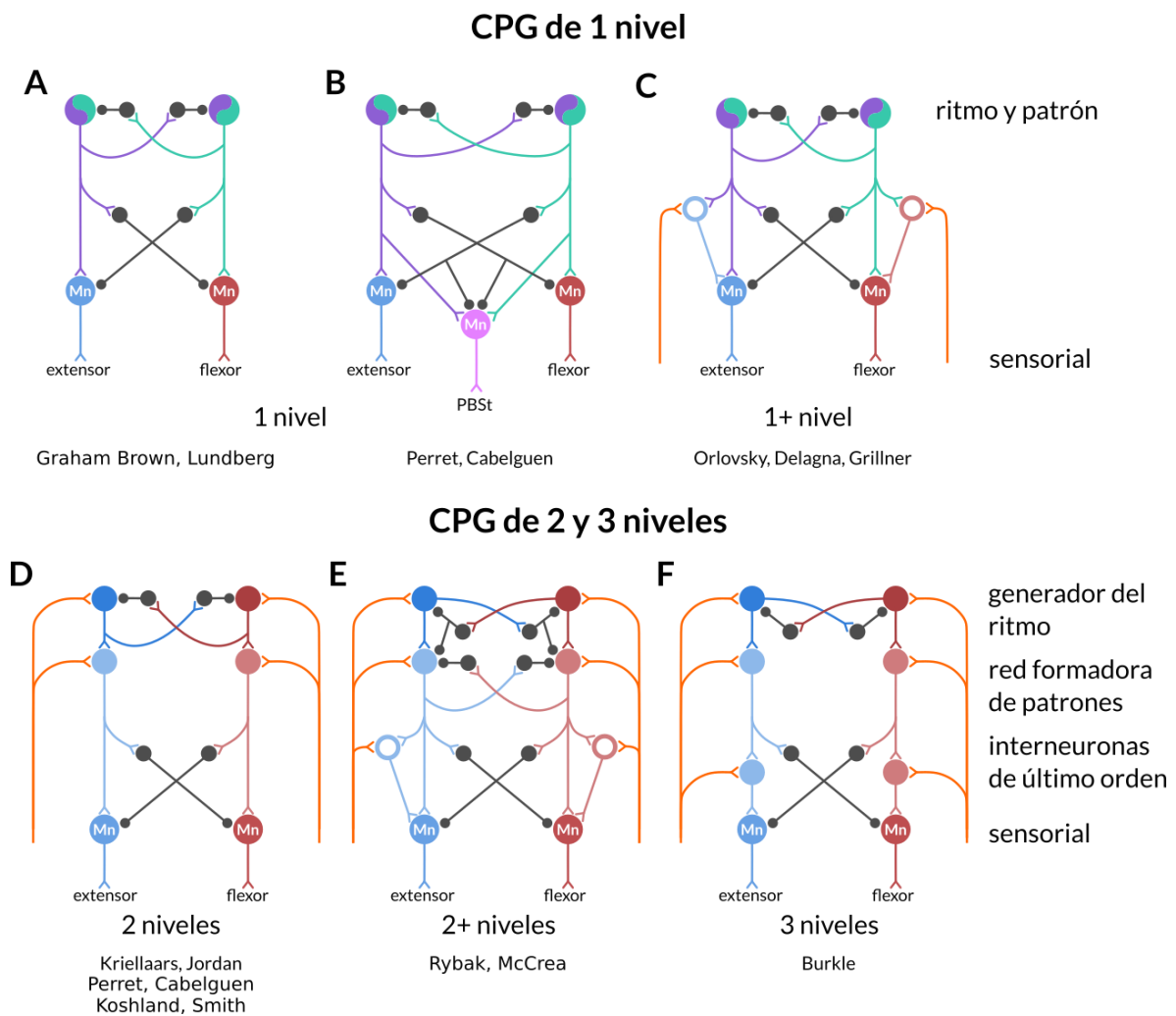


Figura 8. Representaciones esquemáticas de los modelos de Generadores Centrales de Patrones (CPGs) basados en la hipótesis de los hemicentros (“half-centres”) de Graham Brown. Los modelos pueden consistir de 1, 2 y 3 niveles. Entre el generador del ritmo o “Rhythm Generator” (nivel 1) y las motoneuronas existe una red formadora de patrones o “Pattern Formation” (nivel 2 y 3) (modificado de McCrea y Rybak, 2008).

2.4 Reorganización de los reflejos espinales durante la locomoción

En el estado de reposo, las fibras aferentes extensoras del grupo Ib de los GTO generan una inhibición no-recíproca en las motoneuronas de músculos sinergistas (*Jankowska, 1992*). Las acciones no-recíprocas inhibitorias funcionan como un sistema de retroalimentación negativa de tensión (*Jami, 1992*) que reduce la excitabilidad de las motoneuronas extensoras durante el reposo, aunque también ocurre una reducción de la inhibición presináptica autogénica sobre las fibras Ib homónimas (*Zytnicki et al., 1990*). Sin embargo, durante la locomoción ficticia (*Guertin et al., 1995*) y real (*Whelan y Pearson, 1997; Hiebert y Pearson, 1999; Figura 9A, B*) la activación de aferentes extensoras del grupo I produce una excitación que predomina sobre la inhibición, i.e. se produce una reorganización del sistema hacia una retroalimentación positiva (*Gossard et al., 1994; Brownstone et al., 1994; McCrea et al., 1995; Angel et al., 1996*). En otras palabras, existe una “inversión” de las vías reflejas (“*reflex reversal*”) activadas por las aferentes musculares extensoras del grupo I. Estas vías neuronales excitadoras que emergen durante la locomoción se encuentran inhibidas tónicamente durante el reposo. Se ha descrito una vía disináptica que proyecta a las motoneuronas extensoras (*Figura 8E*), y se cree estaría involucrada en la modulación de la amplitud de las descargas durante la fase de extensión (*McCrea, et al 1995*); mientras que las vías polisinápticas (de latencia prolongada) proyectan a las motoneuronas extensoras a través del CPG, controlando la temporalidad del ritmo locomotriz (*Pearson et al., 1993; Domínguez-Rodríguez et al., 2020*).

Sin embargo, la reorganización de los reflejos durante la locomoción no se encuentra restringida a las vías neuronales encargadas de la extensión, pues se ha demostrado que las motoneuronas que inervan los músculos flexores y/o bifuncionales – que no están sujetas a una inhibición no-recíproca en reposo – también exhiben una excitación disináptica durante la locomoción ficticia (*Figura 8E; Quevedo et al., 1998, 2000; Degtyarenko et al., 1998; Quevedo et al., 2000*). Las vías neuronales involucradas en los reflejos producidos por la activación de aferentes del grupo II provenientes de músculos flexores (*Perreault et al., 1995*) y las que median la inhibición presináptica

(Gosgnach et al., 2000; Gossard et al., 1990) también son moduladas rítmicamente durante la locomoción (ver apartado 2.7).

2.5 Papel del “feed-back” sensorial sobre la temporalidad y amplitud del ritmo locomotriz

Si bien las redes espinales implicadas en la generación del patrón locomotriz no dependen de las aferencias sensoriales para producir una actividad rítmica, la información propioceptiva tiene un papel importante en el control del patrón motriz, ajustándolo a las demandas biomecánicas y finalmente permitiendo que el “andar” pueda ser adaptado al tipo de terreno y a la presencia de obstáculos inesperados, haciendo que las trayectorias sean más eficientes y el movimiento más estable y preciso, evitando así una apariencia rígida o “robótica”. El papel que tiene la información sensorial en la modulación del patrón locomotriz comenzó a estudiarse hace relativamente poco tiempo.

Pearson y Whelan (1995) demostraron en la preparación del gato descerebrado caminando en una banda sin fin, que la estimulación de aferentes del grupo I provenientes de músculos extensores del tobillo durante la fase de flexión, produce una terminación abrupta de la misma y un inicio anticipado de la extensión, modificando la temporalidad del ciclo locomotriz (“resetting” hacia la extensión) (Figura 9A). Además, la estimulación de estas mismas fibras prolonga la fase de extensión (“*extensor enhancement*”) y a su vez retrasa el inicio de la fase de flexión, sin afectar el ritmo contralateral (Figura 9B). Por su parte, en la preparación de la locomoción ficticia del gato, McCrea y Guertin (1995) obtuvieron resultados similares al estimular el mismo tipo de fibras aferentes; sin embargo, además de producirse un incremento importante en la actividad extensora en los músculos homónimos de la articulación del tobillo, también se producía un incremento en la actividad de los músculos extensores que operan en las articulaciones de la rodilla y de la cadera de la extremidad *ipsilateral*. Estas evidencias llevaron a proponer que la excitación de las motoneuronas extensoras durante la locomoción ocurre a través de vías excitadoras di- y polisinápticas (Pearson,

1995), y que funciona como un sistema de retroalimentación positiva que asiste a la fase de apoyo de la locomoción.

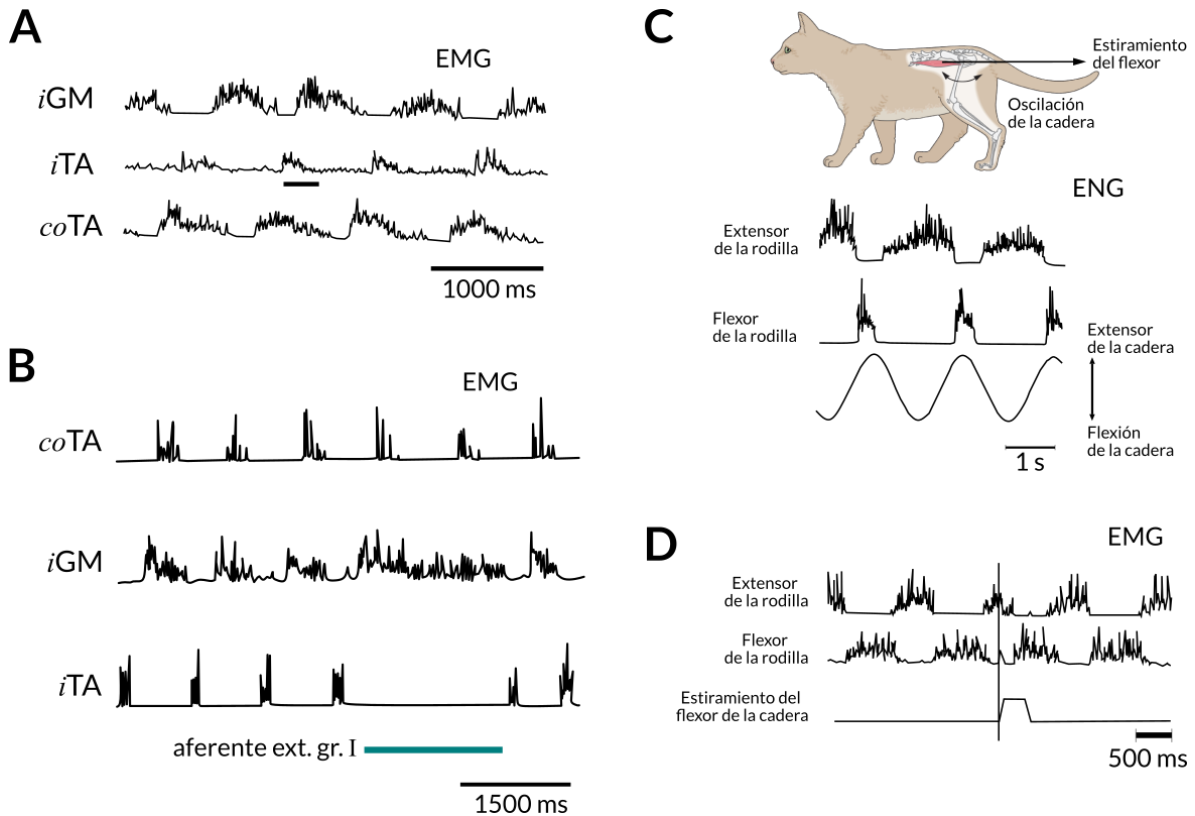


Figura 9. La información sensorial proveniente de músculos flexores y extensores regula la temporalidad del ciclo locomotriz. **(A)** Registros EMG rectificadas e integradas del Gastrocnemio Medial (GM ipsilateral) y del Tibial Anterior (TA ipsi y contralateral). La estimulación eléctrica de aferentes extensoras del grupo Ia (barra negra) durante la fase de flexión, produce una reducción de la flexión en curso y un adelanto de la extensión subsiguiente (“resetting” hacia la extensión) (Whelan y Pearson, 1997). **(B)** Registros EMG rectificadas e integradas del Gastrocnemio Medial (GM ipsilateral) y del Tibial Anterior (TA ipsi y contralateral). En la preparación del gato con locomoción real, la estimulación eléctrica de aferentes extensoras del grupo I de manera prolongada durante la extensión, produce un silenciamiento de la flexión ipsilateral y una prolongación de la extensión en turno hasta la terminación del estímulo (lo que ocurre cuando el músculo se encuentra cargando el peso del cuerpo). Las fibras del grupo I regulan la transición entre las fases de flexión y extensión (Hiebert y Pearson, 1999). **(C)** Registros ENG rectificadas e integradas de un músculo flexor y un extensor de la rodilla (en la preparación de gato descerebrado con locomoción inducida por la estimulación de la MLR). La oscilación de la articulación de la cadera de manera sinusoidal, provocando un estiramiento del *Iliacus* y *Psoas* (IP; flexor) genera un acoplamiento del ritmo de la locomoción a la frecuencia de oscilación; la flexión se inicia cuando la articulación de la cadera alcanzaba un ángulo cercano de 90°. La información propioceptiva de los músculos flexores tiene acceso al generador del ritmo (Kriellaars et al., 1994). **(D)** Registros EMG rectificadas e integradas de un músculo flexor y un extensor de la rodilla. El estiramiento del músculo flexor IP de la cadera de manera mecánica (en una preparación de locomoción ficticia) durante la fase de extensión produce un acortamiento de la extensión en curso, y un adelanto de la flexión subsiguiente (“resetting” hacia la flexión) (Hiebert et al., 1996).

Por su parte, las respuestas a la estimulación de los nervios flexores son más complejas de lo que se podría esperar. Investigaciones realizadas en el gato descerebrado caminando sobre la banda sin fin, revelaron que la oscilación sinusoidal del fémur producía un acoplamiento o “*entrainment*” del ritmo locomotriz, debido al estiramiento de los músculos flexores (*Iliacus y Psoas*, o *Iliopsoas*) de la cadera (*Figura 9C*) (*Kriellaars et al., 1994*). Asimismo, la activación de aferentes del grupo I y II por el estiramiento de músculos flexores (*Iliopsoas*) – durante la fase de extensión – produjo un acortamiento de la descarga extensora y un adelanto de la descarga flexora subsiguiente, es decir, un “*resetting*” hacia la flexión (*Figura 9D*) (*Whelan, 1996; Lam, 2001*). Sin embargo, en la locomoción ficticia en el gato, la estimulación del nervio *Tibial anterior* (TA; flexor del tobillo) durante la fase de extensión no produce cambios en el ritmo locomotriz (*Perreault, 1995*), mientras que la estimulación del nervio *Sartorio* (Sart; flexor de la cadera) produce un incremento de la descarga extensora y, a su vez, un retardo en el inicio de la descarga flexora subsiguiente.

Durante la locomoción real en el gato, la estimulación eléctrica del nervio *Extensor digitorum longus* (EDL; flexor del tobillo) durante la fase de flexión, produce una prolongación de la actividad flexora y, por lo tanto, un retraso de la fase de extensión (*Pearson, 1995*). No obstante, durante la locomoción ficticia la estimulación del nervio TA durante la flexión produce una terminación anticipada de la actividad flexora y, con ello, el inicio de la descarga extensora (*Perreault, 1995*). Los efectos opuestos producidos por la estimulación de los nervios flexores pueden ser explicados en función de las diferencias inherentes a las preparaciones empleadas. Se ha propuesto que las aferentes flexoras del grupo II acceden paralelamente a dos grupos de interneuronas – excitadoras e inhibitoras – y que los efectos observados dependen del balance entre estas dos vías, probablemente regulado por estructuras supraespinales (*Stecina et al., 2000; Lam et al., 2002*).

Por otro lado, la estimulación de las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral del nervio *Peroneo superficial* (SP) durante la fase de extensión de la locomoción ficticia, produce un aumento de la amplitud en la actividad extensora, además de un incremento

en la descarga flexora subsiguiente (Perreault, 1995); mientras que la estimulación de este mismo nervio durante la fase de flexión resulta en un patrón característico de la reacción del tropiezo, a decir: una disminución de la actividad en flexores del tobillo, un incremento en la actividad de extensores de la misma articulación y un incremento en la actividad flexora de la rodilla y de la cadera (Wand et al., 1980; Quevedo et al., 2004) (Figura 10). La estimulación del nervio cutáneo Sural (SU) durante la flexión, produce un patrón complejo: una secuencia de excitación e inhibición, seguida por una excitación (Perreault, 1995).

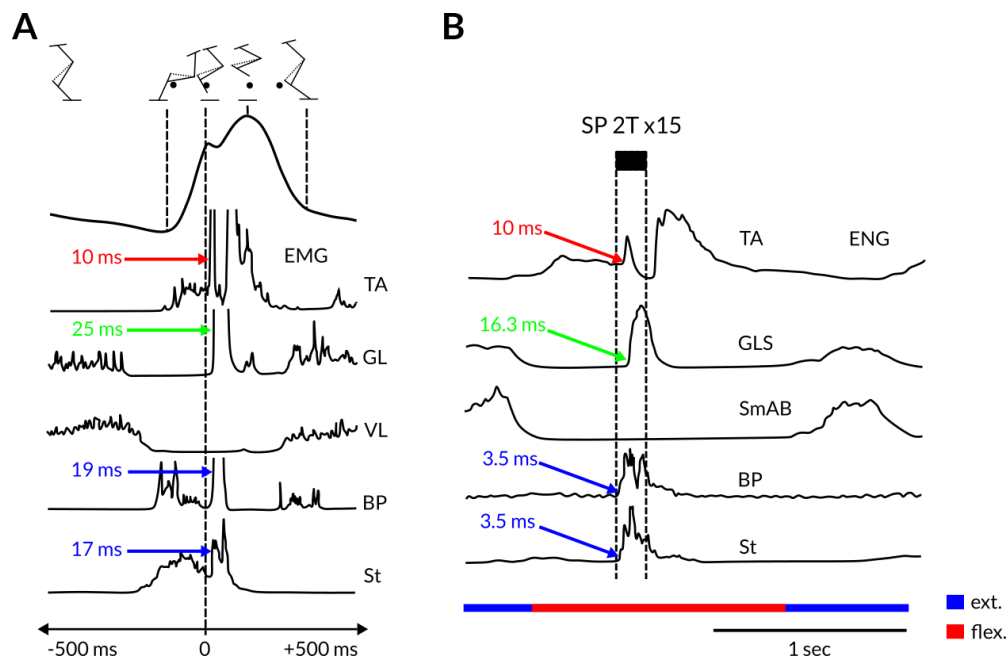


Figura 10. Reacción de corrección del tropiezo en el gato por la estimulación del dorso de la pata posterior. **(A)** Patrón electromiográfico de la corrección del tropiezo en el gato en libre movimiento. Respuestas promedio de los ciclos obstruidos con un obstáculo durante la fase de balanceo de la locomoción real. Las flechas indican un incremento en la actividad EMG en el *Gastrocnemio lateral* (GL), *Bíceps posterior* (BP) y *Semitendinoso* (St), con las latencias indicadas. Nótese que durante la fase de flexión se presenta un incremento de la actividad extensora en LG mientras que en TA se observa una inhibición transitoria seguida de un incremento y prolongación de la excitación. La coincidencia de la inhibición en TA y la excitación en GL permiten la evitación del obstáculo a nivel de la articulación del tobillo en conjunto con la hiperflexión de la articulación de la rodilla (PB y St). **(B)** Respuestas características de la reacción de corrección del tropiezo producidas por la estimulación eléctrica de aferentes del nervio *Peroneo Superficial* (SP) durante la fase de flexión de la locomoción ficticia inducida por la MLR. Los ENG's fueron rectificadas e integradas. El nervio SP se estimuló con un tren de 15 pulsos, 2 xU a 200 Hz. Las líneas verticales discontinuas indican el inicio y la finalización del tren de estímulos. Se indican las latencias de la actividad del *Gastrocnemio lateral* y *Sóleo* (GLS), *Bíceps posterior* (BP), *Semitendinoso* (St), *Tibial Anterior* (TA) y *Semimembranoso y Bíceps Anterior* (SmAB). Nótese que el patrón es muy similar durante la locomoción real y ficticia. (Modificado de Wand et al., 1980; Quevedo et al., 2004, respectivamente).

2.6 Participación del sistema γ durante la locomoción

Si bien la contracción muscular es ejecutada por las motoneuronas α , la vía final común del sistema motriz, el tono muscular en estado de reposo, los movimientos voluntarios y las conductas motrices estereotipadas son controlados de una manera muy fina y exquisita mediante la interacción de las motoneuronas α y γ . Ambos tipos de motoneuronas forman parte de un sistema de control complejo para lograr el control fino y preciso del cuerpo.

Recapitulando, dentro del huso muscular se encuentran las fibras intrafusales, las cuales se clasifican con base en la forma que tienen y en la disposición de los núcleos: fibra de bolsa nuclear (“nuclear bag”) b_1 o b_2 (los núcleos se encuentran en la zona ecuatorial y generan un ensanchamiento de la fibra en forma de bolsa) y fibras de cadena nuclear (“chain”) c (los núcleos se encuentran en un arreglo similar a una cadena). Sin embargo, en un inicio solo se conocían 2 tipos: de bolsa nuclear b y de cadena nuclear c (Matthews, 1962; Crowe and Matthews, 1964), y 2 tipos de motoneuronas γ : estáticas y dinámicas, de tal manera que los efectos γ dinámicos se asociaron a las fibras b mientras que los estáticos a las fibras c . Y no fue hasta que se identificaron 2 subtipos de fibras b (b_1 y b_2) y que en realidad las motoneuronas γ dinámicas inervaban a las fibras intrafusales b_1 , mientras que las motoneuronas γ estáticas inervaban tanto a las b_2 como a las c (ver Figura 5; Boyd, 1981; Taylor, 1999).

Posteriormente, al estudiar las propiedades de las fibras intrafusales de los husos musculares en el cuello del gato y de su contracción selectiva mediante la administración de succinilcolina, se pudo discernir diferentes respuestas de las fibras aferentes y que no hay efectos puramente dinámicos o estáticos, sino que es una mezcla de ambos y la respuesta de una fibra aferente depende de la combinación de tipos de fibras intrafusales (“influencias”) inervadas por las terminales anuloespirales de la fibra aferente. Es así como se identificaron las diferentes combinaciones de “influencias” de fibras intrafusales sobre las fibras aferentes:

- **b_1** : fibras del grupo Ia con influencia de motoneuronas γ dinámicas
- **b_1b_2c** : fibras del grupo Ia con influencia de motoneuronas γ dinámicas y estáticas
- **b_2c** : fibras del grupo II con influencia de motoneuronas γ estáticas
- **c** : fibras del grupo II con influencia de motoneuronas γ estáticas

Las diferentes funciones de las fibras aferentes provenientes de los husos musculares, así como de las motoneuronas γ se han investigado en la preparación del gato descerebrado durante la locomoción por el grupo de Taylor (*Taylor et al., 2000 a, b*). Estos autores estudiaron los patrones de actividad fusimotora durante la locomoción a partir del registro de fibras aferentes de huso muscular en filamentos de raíz dorsal, así como los patrones de actividad de las motoneuronas γ estáticas y dinámicas en filamentos de la raíz ventral. Observaron que tanto los husos musculares de músculos extensores y flexores (GM y TA, respectivamente) presentaban patrones similares de actividad fusimotora estática y dinámica durante la locomoción. De manera sorprendente, encontraron que las motoneuronas γ estáticas se modulan diferencialmente durante el ciclo locomotriz, lo cual permitió dividir las en dos subpoblaciones:

- **Tipo 1**: motoneuronas γ estáticas que disparan con un patrón de modulación discreta, que se asemeja mucho al curso temporal de la diferencia del disparo activo (locomoción real), menos el disparo pasivo (movimiento oscilatorio impuesto) de las fibras aferentes secundarias (grupo II) del huso muscular. Este patrón está estrechamente acoplado con la extensión (GM).
- **Tipo 2**: motoneuronas γ estáticas que exhiben un patrón de disparo con una frecuencia máxima más acoplada con la flexión (TA).

Se propuso que los axones de las motoneuronas γ estáticas de tipo 1 inervan preferentemente a las fibras c y b_2c , mientras que los axones de las motoneuronas γ estáticas de tipo 2 inervan las fibras b_2 .

Durante la locomoción, la función de las motoneuronas γ dinámicas es la sensibilización de las aferentes primarias al componente inicial rápido de la fase de flexión. El disparo de las motoneuronas γ dinámicas durante la fase de acortamiento del músculo permite, además, que las aferentes primarias del huso muscular sean sensibles a cualquier estiramiento muscular inesperado que pudiera resultar en una obstrucción de la trayectoria de la extremidad durante la fase de balanceo.

Aunque la coactivación del sistema $\alpha - \gamma$ permite un acoplamiento o “sincronía” de la contracción de las fibras musculares extrafusales e intrafusales -algunos músculos son inervados por las motoneuronas β , que inervan ambos tipos de fibras musculares-, en realidad el sistema extrafusar α e intrafusar γ pueden funcionar de manera independiente, permitiendo una mayor flexibilidad en el control de la sensibilidad del huso muscular en diferentes tipos de tareas motrices. Esta conclusión se apoya en los registros de aferentes de huso muscular durante una variedad de movimientos naturales en gatos (*Prochazka et al., 1988*). La magnitud y tipo de actividad de las motoneuronas γ se establece en diferentes niveles, que varían de acuerdo a las tareas específicas o el contexto. En general, los niveles de actividad tanto de las motoneuronas γ dinámicas como estáticas (*Figura 11*), se establecen a niveles progresivamente más altos en relación al incremento de la velocidad y la dificultad del movimiento. Cuando un animal ejecuta una tarea motriz difícil, como la caminata sobre una viga estrecha, tanto la actividad γ dinámica como la estática muestran un nivel de actividad alto, comparado con la caminata lenta en terreno plano en donde la actividad γ dinámica es mínima. Es así como el SNC utiliza el sistema fusimotor para refinar la actividad de los husos musculares de tal manera que la actividad global de los mismos provea una información sensorial más apropiada para la ejecución de una determinada tarea motriz.

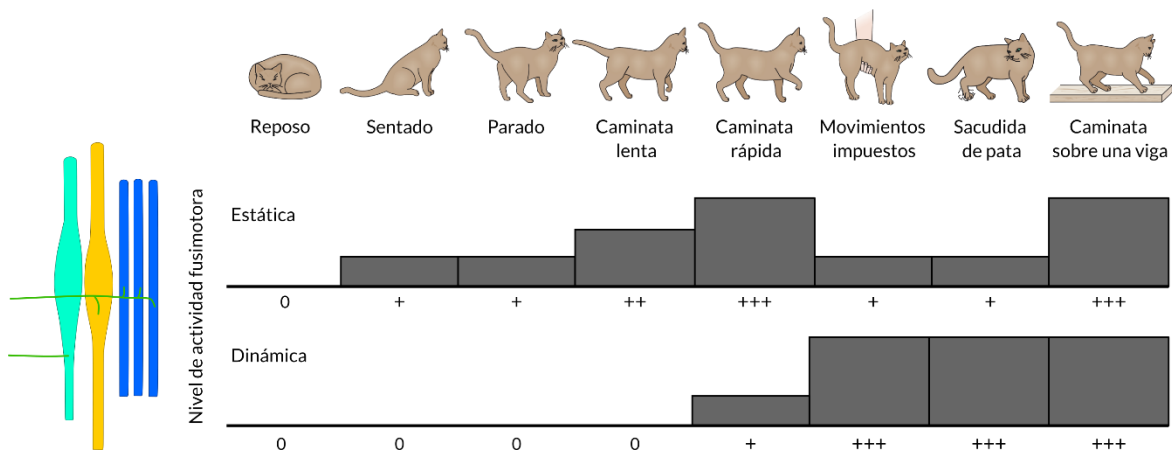


Figura 11. El nivel de actividad del sistema fusimotor y varía según el tipo de conducta motriz. Solamente las motoneuronas y estáticas se mantienen activas durante las actividades en las que la longitud del músculo cambia lenta y previsiblemente. Las motoneuronas y dinámicas se activan durante las conductas motrices en las que la longitud del músculo cambia rápida e imprevisiblemente. (Modificado de Kandel et al., 2013).

2.7 Control presináptico de la información sensorial durante la locomoción

Un tema muy relevante a considerar al investigar la modulación sensorial de redes neuronales implicadas en la locomoción es la modulación presináptica de la información sensorial que llega a la médula espinal. La inhibición presináptica clásica, que se ha asociado a la despolarización de aferentes primarias (PAD; *Primary Afferent Depolarization*) se ha considerado que funciona como una forma de filtrado selectivo de la información sensorial de los músculos en movimiento, que incluye la información transmitida por las fibras aferentes musculares, cutáneas y articulares (Rudomin y Schmidt, 1999). Actualmente se sabe que el control presináptico de las fibras aferentes implica un sistema muy complejo de vías neuronales y de diversos sistemas de neuromodulación (ver adelante).

El concepto de inhibición presináptica se comenzó a acuñar desde el año 1933 aproximadamente (Gasser y Graham., 1933), sin embargo, en 1957, Frank y Fourtes observaron que la estimulación de nervios flexores producía una depresión de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) monosinápticos, la cual ocurría en ausencia de cambios en la conductancia de membrana de la motoneurona, es decir, sin

cambios a nivel postsináptico, por lo que se estableció que la inhibición era de origen presináptico. Posteriormente, Eccles y colaboradores (1961) observaron que la estimulación de nervios flexores producía una despolarización en las fibras aferentes, que denominaron PAD, y asociaron por primera vez la inhibición presináptica con la PAD ya que ambos fenómenos tenían aproximadamente el mismo curso temporal y se inhibían con antagonistas de los receptores GABA_A. En efecto, se demostró que las fibras aferentes recibían conexiones axoaxónicas GABAérgicas (Gray, 1962). La activación de receptores GABA_A produce una despolarización en las fibras aferentes, en lugar de una hiperpolarización, porque el E_{Cl⁻} se encuentra a un potencial más despolarizado (~ -40 mV) debido a la presencia del cotransportador de Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC1) (Alvarez-Leefmans et al., 1998). Se postuló, entonces, que la PAD era la responsable de la depresión de los EPSPs, al producir una reducción en la amplitud del impulso presináptico, conduciendo a la inhibición de conductancias de Na⁺ y Ca²⁺ y con ello a una reducción en la liberación del neurotransmisor (Miledi y Slater, 1966; Zhang y Jackson, 1993; Graham y Redman, 1994). En pocas palabras la inhibición presináptica regulaba la información que llega a las motoneuronas, y a la médula espinal en general.

Sin embargo, en la actualidad se han propuesto diversos mecanismos que producen inhibición presináptica, asociados y no asociados a la PAD, que se resumen a continuación:

Inhibición presináptica **asociada a la PAD:**

- Receptores GABA_A o GABA_A-like (Ej. Taurina, b-alanina) (Eccles et al., 1963; Evans, 1978)
- Acumulación de iones K⁺ (Krnjević y Morris, 1975; Nicoll y Alger, 1979; Jiménez et al., 1984)
- Receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA y AMPA/Kainato (Abraira et al., 2017)
- Receptores TRPV1 (Carbone, 2017; Chakraborty et al., 2017)
- Receptor ionotrópico 5-HT₃ (López-García y King, 1996; Millan, 2002)

Inhibición presináptica **no asociada a la PAD:**

- Receptores GABA_B (*Rudomin y Schmidt, 1999*)
- Receptores a canabinoides, adenosina y ATP (*Santicioli et al., 1993; Hugel y Schlichter, 2000*)
- Receptores a opioides δ y μ (*Wrigley et al., 2010; Heinke et al., 2011; Bardoni et al., 2014*)
- Receptores a GDNF (GFR α 1) (*Salio et al., 2014*)
- Depresión homosináptica (*Lev-Tov y Pinco, 1992*)
- Receptores a 5-HT, DA y NA (*García Ramírez et al., 2014*)

Es importante mencionar que la PAD es un mecanismo muy selectivo, es decir, no todas las fibras aferentes producen PAD indiscriminadamente sobre todas las fibras aferentes, ni todas son despolarizadas de igual manera por el mismo tipo de fibras. Existe una organización compleja de las vías neuronales implicadas en la PAD de las fibras aferentes propioceptivas de los grupos Ia y Ib (*Rudomin et al., 1986*), del grupo II (*Harrison y Jankowska et al., 1989*) y cutáneas (*Schmidt 1971; Jiménez et al., 1987*). Además, la magnitud de la PAD no parece ser uniforme en todas las colaterales de las fibras aferentes (*Lomelí et al., 1998*), de tal forma que se genera un filtrado selectivo de la información sensorial y un direccionamiento específico de la misma -como si de cerrar o abrir válvulas en una tubería para que el agua fluya en una u otra dirección-.

Mediante el registro intraaxonal de las fibras aferentes musculares del grupo I, o de los cambios en su excitabilidad por medio de la técnica de Wall (*Wall, 1958*) se ha observado que las aferentes del grupo Ia provenientes de los músculos flexores y extensores son despolarizadas principalmente por fibras aferentes flexoras (grupos Ia y Ib), mientras que las aferentes del grupo Ib -sin importar su origen-, son despolarizadas por fibras flexoras y extensoras (únicamente grupo Ib) (*Eccles et al. 1962; Schmidt, 1971; Lundberg, 1964, 1982; Brink et al. 1984*). Además, Rudomin et al. (*1983 y 1986*), demostraron que la estimulación de aferentes del grupo I y del núcleo vestibular (VS) produce PAD en las aferentes del grupo Ia, mientras que la estimulación

de nervios cutáneos, formación reticular bulbar (RF), núcleo rojo (RN) y corteza cerebral (Cx) no producían PAD, pero inhibían la PAD producida por aferentes del grupo I y el VS. En contraste, la mayoría de las terminales intraespinales de los GTOs (fibras Ib), son despolarizadas por fibras del grupo Ia y por la estimulación de fibras del RN, RF y Cx (*Figura 12*).

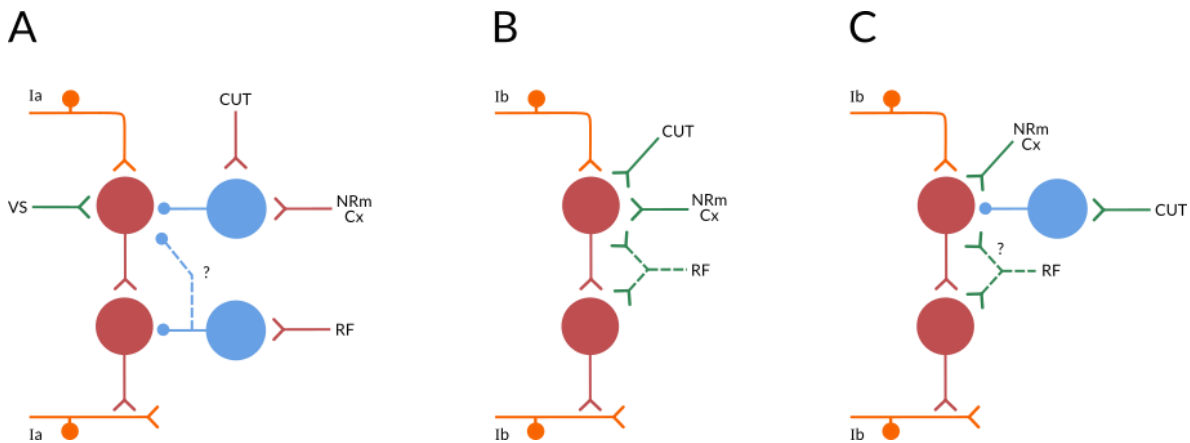


Figura 12. Organización de las vías que median la PAD. **(A)**, **(B)** y **(C)** Organización de las vías que producen la Despolarización de las Aferentes Primarias (PAD) en las fibras Ia (A) y Ib (C). La vía trisináptica que media la PAD consiste de dos interneuronas, la de primer orden glutamatergica y la de último orden GABAérgica. Las interneuronas de último orden establecen conexiones axoaxónicas con las fibras aferentes. Ambas interneuronas pueden ser activadas (conexiones sinápticas en naranja y verde) o inhibidas (interneuronas y conexiones sinápticas en azul) por diferentes fibras aferentes o estructuras supraespinales. (*Modificado de Rudomin et al., 1986*).

La información descrita hasta ahora fue obtenida en la preparación del gato anestesiado, en condiciones de reposo, pero, ¿cómo se modula la PAD durante la locomoción?. Hasta hace poco se desconocía cuál era el papel funcional de la PAD, y de la modulación presináptica en general, durante la locomoción. Se ha descrito la presencia de cambios fásicos en la amplitud del reflejo monosináptico (MSR) durante los ciclos de la locomoción ficticia, atribuidos en parte a una modulación presináptica (*Schomburg y Behrends, 1978; Perret y Cabalguen, 1980; Baev, 1981*). Posteriormente, Dueñas y Rudomin (*1988*) reportaron una despolarización sostenida, o tónica, en poblaciones de fibras aferentes y en fibras individuales del grupo Ia y Ib durante un episodio de locomoción ficticia en el gato; además, observaron la presencia de cambios cíclicos en el umbral intraespinal de las fibras Ia que proyectan en el núcleo motor y de

fibras Ia y Ib que terminan en el núcleo intermedio, es decir una PAD fásica. Un efecto interesante fue que durante la fase de flexión se presentaba el umbral más bajo de las fibras (una PAD mayor), sugiriendo que las interneuronas que median la PAD tanto de fibras aferentes del grupo Ia como Ib reciben aferencias excitatorias comunes con actividad máxima durante la fase de flexión, y aferencias inhibitorias comunes con actividad máxima durante la fase de extensión. Estas acciones estarían siendo ejercidas por el CPG de la locomoción.

Por su parte, Gossard et al. (1990, 1991) observaron una modulación fásica de los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de nervios periféricos durante la locomoción ficticia, sugiriendo que las vías que median la PAD de origen sensorial son también moduladas por la actividad del CPG. Es decir, el CPG regula cíclicamente la eficacia de la transmisión sináptica de las fibras aferentes cutáneas y musculares a nivel presináptico, como parte del programa locomotriz. Sin embargo, la modulación fásica de los DRPs provocados por la estimulación de fibras aferentes no tenía una relación clara con las fluctuaciones espontáneas de los DRPs que se producen durante la locomoción ficticia (PAD generada por el CPG), lo cual sugiere que la PAD generada por el CPG y la generada por la estimulación de fibras aferentes (o descendentes) podrían ser producidas por diferentes vías interneuronales o mecanismos. Además, se observó que la PAD de las fibras aferentes musculares y cutáneas es, en general, significativamente mayor durante la fase de flexión, que la fase de extensión.

Durante una contracción voluntaria en el humano se ha descrito que la inhibición presináptica de las fibras aferentes Ia de los músculos involucrados en la contracción es reducida, mientras que la inhibición presináptica de las fibras aferentes Ia de aquellos músculos que no participan en la contracción aumenta. Ello pone de manifiesto el control diferencial de la eficacia sináptica, posiblemente a través de PAD, de las fibras aferentes Ia por la corteza cerebral (Hultborn et al., 1987).

En resumen, la PAD puede ser producida por la estimulación de fibras aferentes (cutáneas, musculares y articulares), estructuras supraespinales y por el CPG. A su vez, el CPG produce una PAD cíclica en las fibras aferentes de mayor amplitud sobre la fase de flexión.

¿La PAD está en realidad correlacionada con la inhibición presináptica? Clásicamente la PAD se ha asociado a una inhibición presináptica (*Rudomin y Schmidt, 1999*). Sin embargo, recientemente (*Lucas Osma et al., 2018; Li et al., 2020*) se han reportado resultados intrigantes, aunque bien sustentados, que demuestran que la PAD reduce la probabilidad de bloqueos en la conducción de potenciales de acción en las ramificaciones de las fibras aferentes, lo cual conduce a una **facilitación presináptica**, al menos en las terminales Ia en el núcleo motor. Además, se demostró que las terminales aferentes en el núcleo motor no exhiben PAD, lo cual está asociado a la ausencia de receptores GABA_A en las sinapsis axoaxónicas. En estas sinapsis axoaxónicas sólo se demostró la presencia de receptores GABA_B. Por consiguiente, es necesaria una reinterpretación del papel de la PAD en las aferentes musculares del grupo Ia en el núcleo motor. Es posible que a nivel del núcleo intermedio la situación sea diferente, ya que en las sinapsis axoaxónicas sí se encuentran los receptores GABA_A, tanto de tipo tónico (α_5) como fásico ($\alpha_2\beta$). Estas investigaciones obligan a una reinterpretación de lo que se conoce hasta el momento en relación a la PAD, y aún queda mucho por descubrir acerca de su función en general.

Investigaciones más recientes en ratones transgénicos han demostrado que las interneuronas que expresan la enzima GAD2 (o GAD65) son las interneuronas que establecen contactos axoaxónicos con las fibras aferentes (*Betley et al., 2009*) y son responsables de la generación de la PAD (*Fink et al., 2014*). La delección de estas interneuronas en el segmento cervical de ratones con técnicas de biología molecular produce una oscilación en los movimientos de alcance, sugiriendo que juegan un papel fundamental en el amortiguamiento del movimiento durante su ejecución.

Existe un grupo de interneuronas que coexpresan la enzima GAD2 y los receptores huérfanos ROR β (Koch et al., 2017). Durante el desarrollo, estas interneuronas establecen conexiones axoaxónicas con aferentes propioceptivas que expresan el factor neurotrófico BDNF. La Figura 13A y D muestra la locomoción normal característica en ratones silvestres. Los animales con una delección de las neuronas que expresan ROR β exhiben una marcha similar a la de un pato con una hiperflexión de la extremidad posterior (Figura 13B), comparada con el control. Dado que el desarrollo de las sinapsis axoaxónicas entre las interneuronas ROR β y las fibras aferentes propioceptivas depende de la presencia del receptor TrkB (Figura 13B), la inactivación de este factor también recapitula el fenotipo en el animal con la mutación ROR β (Figura 13E), comparado con el control.

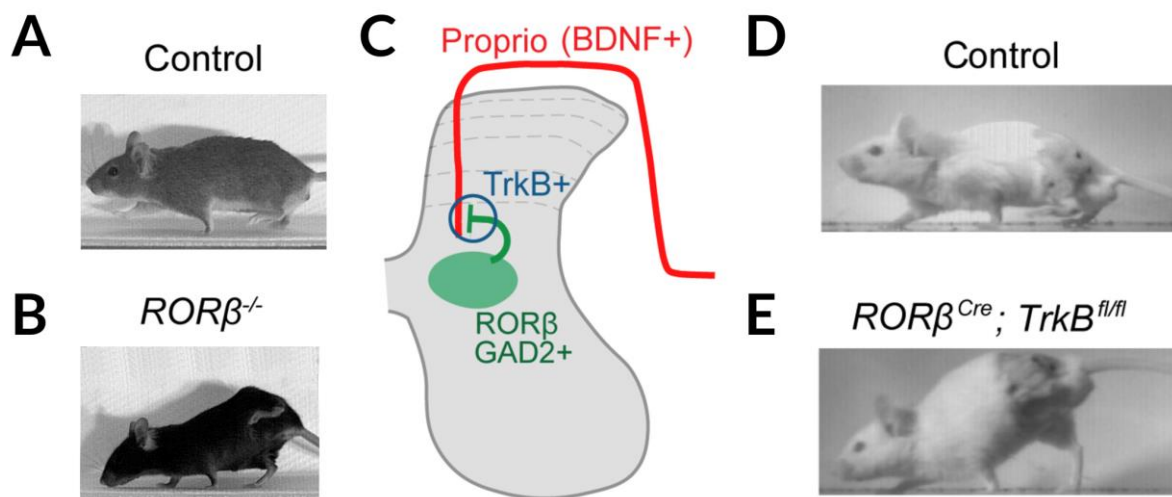


Figura 13. La delección de las interneuronas GABAérgicas que expresan los receptores huérfanos ROR β , o la inactivación de los receptores TrkB, produce una alteración de la locomoción en ratones transgénicos. **(A y B)** Imágenes fijas de vídeos cinemáticos de alta velocidad que muestran la posición de la extremidad posterior izquierda durante la fase de balanceo en la condición control (A) y después de la delección de las interneuronas que expresan ROR β (B). **(C)** Esquema que ilustra las conexiones axoaxónicas de las interneuronas ROR β (en verde) con las aferentes propioceptivas que expresan el BDNF (en rojo). La formación de la sinapsis depende del receptor TrkB $^{+}$. **(D y E)** Imágenes fijas de vídeos cinemáticos de alta velocidad que muestran la posición de la extremidad posterior izquierda durante la fase de balanceo en la condición control (A) y después de la supresión selectiva del receptor al BDNF, TrkB en las interneuronas ROR β utilizando ratones ROR $\beta^{Cre}; TrkB^{fl/fl}$. (Modificado de Koch et al., 2017).

Esta es la primera evidencia de una modulación directa del CPG de la locomoción sobre interneuronas GABAérgicas que median la PAD. Llama la atención que solamente

las fibras aferentes musculares flexoras sean moduladas; queda por determinar si la PAD produce una inhibición o una facilitación en virtud de los reportes del grupo de David Bennett (*Lucas Osma et al., 2018; Li et al., 2020*).

2.8 Estudios sobre el control de la información sensorial del patrón motriz en las preparaciones de roedores

Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayor cantidad de trabajos publicados sobre locomoción en mamíferos habían sido realizados en preparaciones de gatos u otros animales de “gran tamaño” incluyendo el humano. Aunque estas preparaciones siguen siendo útiles para obtener información relevante sobre el control neural de la locomoción, tienen sus limitaciones; e.g., estudios farmacológicos precisos, identificación de canales iónicos específicos en neuronas, silenciamiento selectivo de poblaciones neuronales con técnicas optogenéticas, delección de poblaciones de fibras aferentes en cepas de ratones “*knock out*”. Sin embargo, más recientemente se han comenzado a emplear preparaciones de roedores (rata y ratón), tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde se han podido recrear los experimentos y resultados observados en otras preparaciones. La preparación de la médula espinal *in vitro* de la rata neonata ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para estudiar los circuitos generadores de la locomoción en la médula espinal de mamíferos. Se ha demostrado que, en la presencia de varias sustancias, incluyendo N-metil-D-aspartato (NMDA), serotonina (5-HT) o acetilcolina en la solución de perfusión, esta preparación puede exhibir patrones motrices rítmicos y alternados de descargas en las raíces ventrales izquierdas y derechas de un segmento dado, presumiblemente asociados con la locomoción. De hecho, se ha demostrado que las preparaciones *in vitro* de ratas neonatas poseen circuitos funcionales de los componentes neurales implicados en la respiración y la locomoción (*Smith y Feldman 1987; Kudo y Yamada, 1987; Kudo y Nishimaru 1998*), además de ser muy resistentes a la hipoxia y fácilmente perfundidas, por lo que actualmente son utilizadas para la investigación de diversos aspectos de estos sistemas. Además, estas preparaciones permiten efectuar registros intracelulares con electrodos

finos o en la modalidad “whole cell clamp” de motoneuronas e interneuronas, ya sea en bloques o en rebanadas de la médula espinal o del tallo cerebral.

Los trabajos pioneros sobre el control de la información sensorial de las redes neuronales locomotrices en la preparación de la médula aislada de la rata fueron publicados por el grupo de Norio Kudo en el Japón. En esta preparación, con locomoción ficticia inducida por NMDA y 5-HT, se ha demostrado que la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral en las raíces dorsales L3, o en el nervio extensor *Quadriceps*, prolonga la fase de flexión en animales P1 (1 día postnatal) y un “resetting” hacia la extensión en animales P5; i.e. un cambio de fase en el ritmo locomotriz, indicando una modulación del RG del CPG (*Figura 14*).

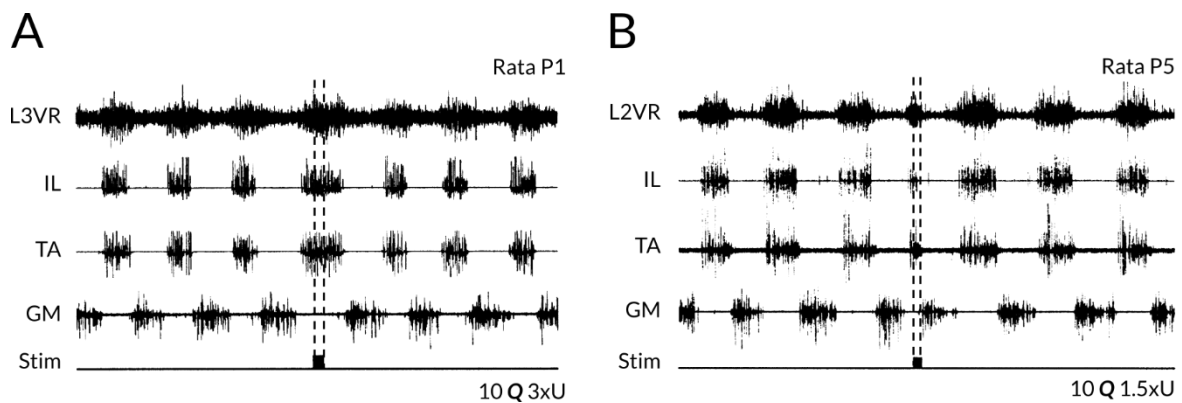


Figura 14. La estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio *Quadriceps* produce una prolongación de la flexión en ratas P1 y un “resetting” hacia la extensión en ratas P5. **(A)** de arriba hacia abajo, ENG en la raíz ventral L3 (L3VR), EMG en los músculos *Iliacus* (IL), *Tibial anterior* (TA) y *Gastrocnemio medial* (GM), en una rata P1. El nervio *Quadriceps* (Q) fue estimulado con 10 pulsos a una intensidad 3 xU, a 20Hz. La locomoción fue inducida por NMDA (5-7.5 μ M) y 5-HT (7.5-40 μ M). **(B)** Mismo formato que en A, en una rata P5 (*modificado de Iizuka et al., 1997*).

Efectos similares fueron producidos por la activación de aferentes del grupo Ib mediante la contracción muscular, por lo que se concluyó que los efectos se debían a la activación de los GTO (*Kudo et al., 1992; Iizuka et al., 1997*) (*Figura 15*).

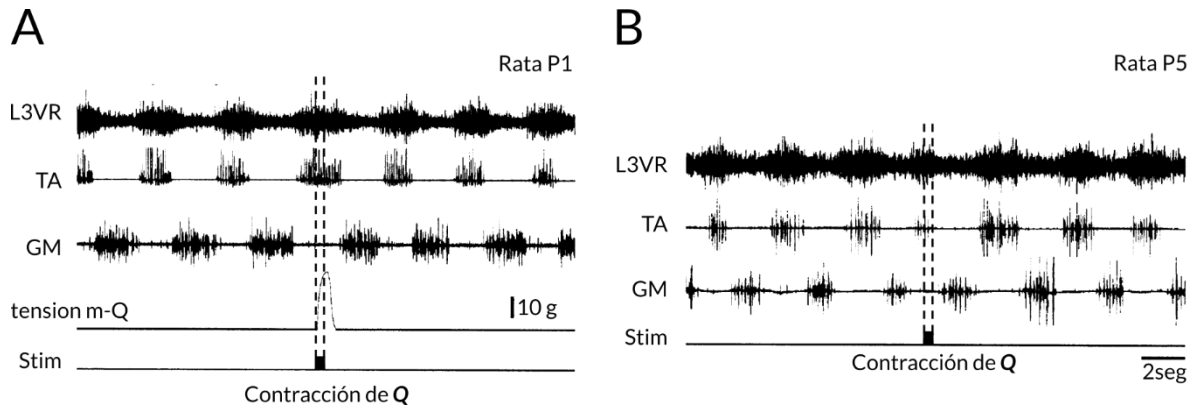


Figura 15. La contracción del músculo *Quadriceps* (Q) produce una prolongación de la flexión en ratas P1 y un “resetting” hacia la extensión en ratas P5. **(A, B)** Datos de ratas individuales P1 y P5, respectivamente. Los trazos muestran los registros obtenidos de la parte proximal de la raíz ventral L3 (L3VR), los músculos TA y GM, y la tensión en el músculo Q (Q-m) (A). Las barras gruesas en los trazos más bajos (Stim) indican el período durante el cual se administró la estimulación (20 Hz) al extremo distal de la L3VR. La contracción isométrica del músculo Q durante la fase de flexión restablece el ritmo a través de una prolongación de la ráfaga de flexión en la rata P1 (A), pero se restablece a través de un truncamiento de la ráfaga de flexión en la rata P5 (B). (*modificado de Iizuka et al., 1997*).

En experimentos preliminares de nuestro laboratorio, hemos observado en la preparación de locomoción ficticia de la rata neonata (P0-2), que la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (2 xU) en los nervios *Gastrocnemio lateral* y *Sóleo* (GLS) durante la fase de flexión, produjo un “resetting” hacia la extensión con un patrón muy similar al que se observa en el gato adulto (*Figura 16*).

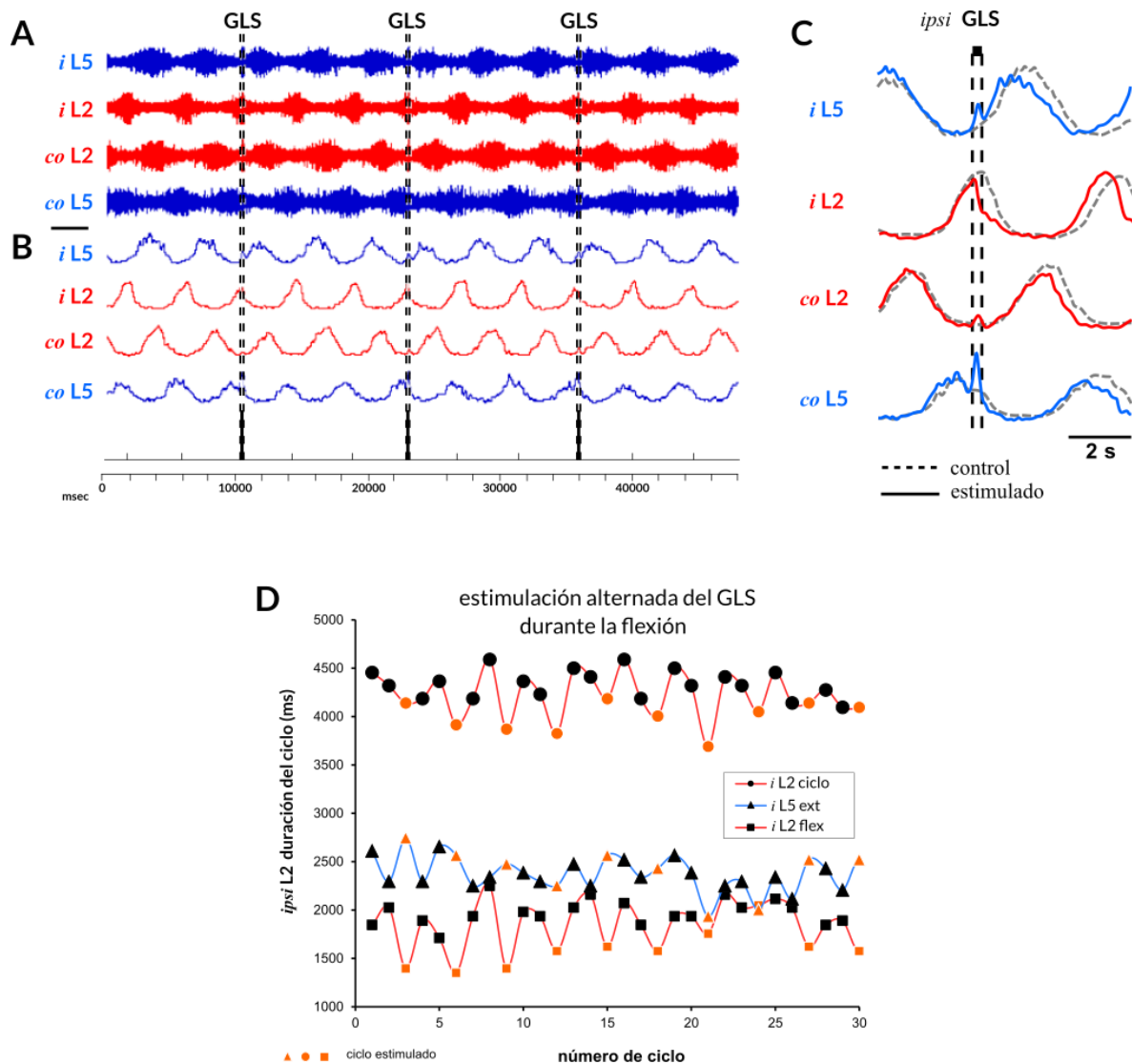


Figura 16. La estimulación de aferentes musculares extensoras de bajo umbral en el nervio GLS durante la fase de flexión produce un acortamiento abrupto de la descarga flexora ipsilateral y un adelanto de la descarga extensora ipsilateral subsiguiente. **(A)** Registros crudos de la actividad ENG en las raíces L2 y L5 ipsi y contralaterales. El nervio muscular *Gastrocnemio lateral* y *Sóleo* (GLS) se estimuló con trenes de 30 pulsos, con una intensidad 1.7 xU a 200 Hz, durante la descarga flexora ipsilateral L2 (líneas verticales discontinuas). **(B)** Mismos registros que en A, pero filtrados, rectificados e integrados. **(C)** Promedio de 22 ciclos de los ENG's rectificados, filtrados e integrados. La estimulación de las aferentes primarias del nervio GLS produce una terminación abrupta de la descarga flexora ipsilateral y una anticipación de la extensión. **(D)** Gráfica de la duración del ciclo locomotriz en *iL2* (círculos), así como de la duración de la fase de extensión (triángulos) en L5 y de flexión (cuadros) en L2 ipsilaterales. Las figuras negras corresponden a los ciclos control y las de color naranja a los ciclos estimulados; la duración del ciclo locomotriz se ve reducida debido a una reducción o acortamiento de la fase de flexión durante la estimulación del GLS durante la flexión.

Por otra parte, la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (2 xU) en el nervio *Peroneo profundo* (DP, fundamentalmente flexor) durante la fase de extensión,

produjo un “resetting” hacia la flexión, así como un incremento en la amplitud de la flexión subsiguiente, con un patrón muy similar al que se observa en el gato adulto (Figura 17).

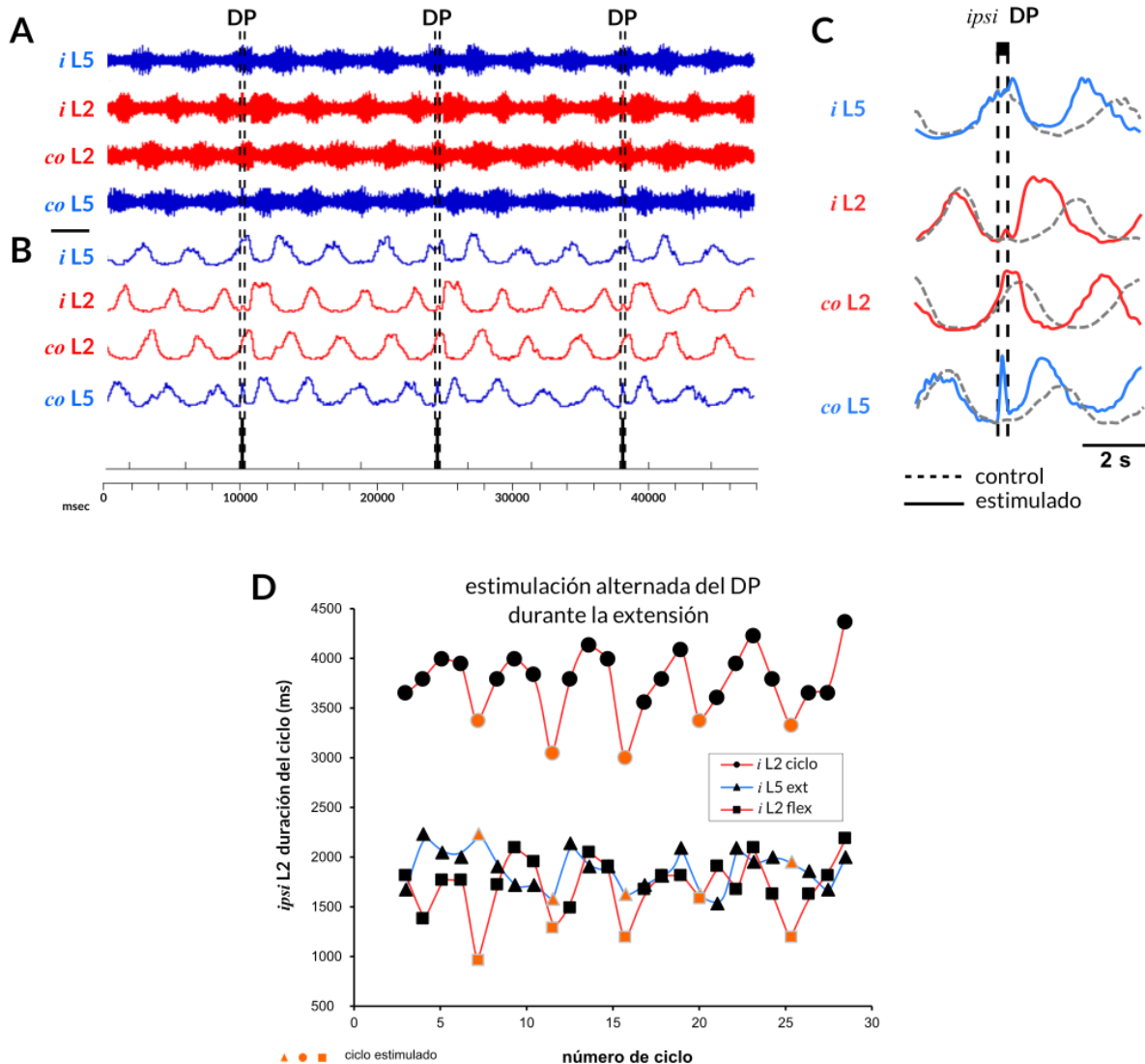


Figura 17. La estimulación de aferentes musculares flexores de bajo umbral en el nervio DP durante la fase de extensión produce un acortamiento abrupto de la descarga extensora ipsilateral y un adelanto de la descarga flexora ipsilateral subsiguiente. **(A)** Registros crudos de la actividad ENG en las raíces L2 y L5 ipsi y contralaterales. El nervio muscular *Peroneo Profundo* (DP) se estimuló con trenes de 30 pulsos, con una intensidad 1.7 xU a 200 Hz, durante la descarga extensora ipsilateral L5 (líneas verticales discontinuas). **(B)** Mismos registros que en A, pero filtrados, rectificados e integrados. **(C)** Promedio de 22 ciclos de los ENG rectificados, filtrados e integrados. La estimulación de las aferentes primarias del nervio DP produce una terminación abrupta de la descarga extensora ipsilateral y una anticipación de la flexión. **(D)** Gráfica de la duración del ciclo locomotriz en iL2 (círculos), así como de la fase de extensión medida tanto en L5 (triángulos) como en L2 (cuadros) ipsilaterales. La fase de extensión en L2 fue medida como la fase inactiva (ausencia de flexión). Las figuras negras corresponden a los ciclos control y las de color naranja a los ciclos estimulados; la duración del ciclo locomotriz se ve reducida a expensas de un acortamiento de la fase de extensión durante la estimulación del DP durante la extensión.

Puede notarse que en las raíces L2 y L5 contralaterales hay cambios compatibles con una organización recíproca, es decir, una alternancia entre la hemimédula ipsi y contralateral.

Asimismo, la estimulación de los nervios cutáneos SU (Sural) y SP (Peroneo superficial) produjeron efectos mixtos muy parecidos a los observados en la locomoción del gato (no ilustrado).

La estimulación de fibras aferentes flexoras en el nervio DP con trenes breves de estímulos aplicados con frecuencias crecientes, produjo un acoplamiento o “*entrainment*” del ritmo locomotriz a la frecuencia de estimulación, como se puede observar en la *Figura 18*. Este acoplamiento y el “*resetting*” hacia la extensión demuestra que las fibras aferentes flexoras tienen acceso al RG del CPG (*ver Figura 9C con resultados de Kriellaars et al., 1994*) en estadios neonatales de los roedores.

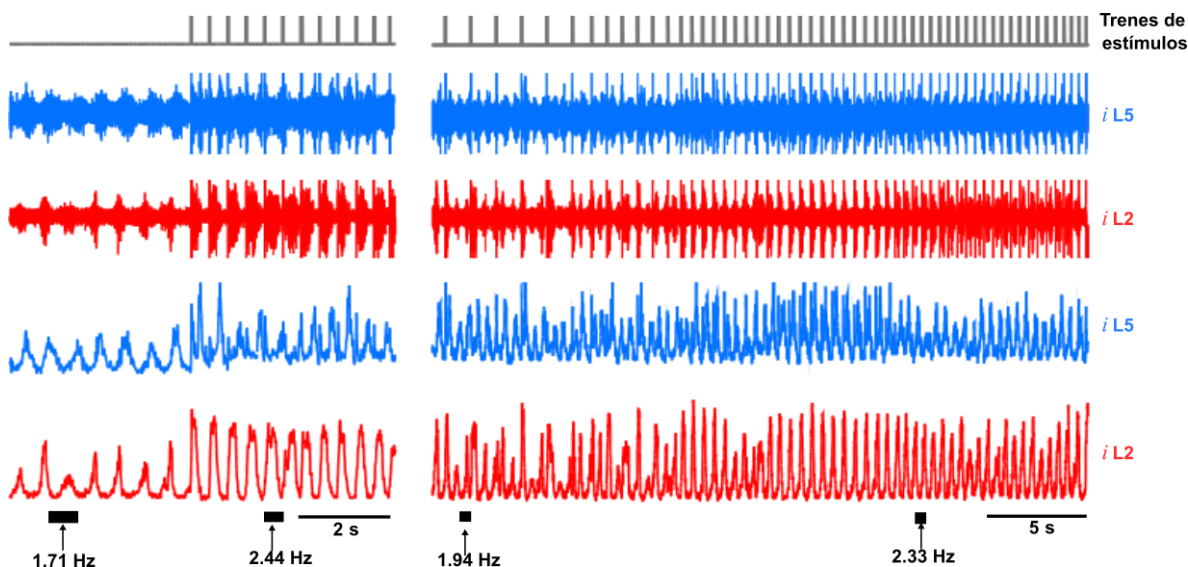


Figura 18. Acoplamiento de la actividad locomotriz evocada por la estimulación del nervio flexor Peroneo Profundo (DP) a una intensidad 2 xU. Registro superior, marcador de los trenes de estimulación aplicados con frecuencias crecientes en el panel de la derecha (1.94 - 2.33 Hz). Los dos registros subsiguientes corresponden a electroneurogramas (ENG) crudos de una raíz flexora L2 (en rojo) y una raíz extensora L5 (en azul), los dos registros inferiores corresponden a los mismos ENG, pero rectificadas e integradas. El acoplamiento a los trenes de estimulación indica que las fibras flexoras del DP tienen acceso al generador del ritmo (RG).

En resumen, en la rata neonata la información sensorial propioceptiva es capaz de modular los circuitos neuronales espinales que generan la locomoción de manera similar a lo que ocurre en el animal adulto (*Razgado et al., 2004; Razgado, 2005*).

Muy recientemente, en una cepa de ratones “*knock out*” para el factor de transcripción *Egr3* (*early growth response 3*), *Egr3*^{-/-}, que se expresa selectivamente en fibras aferentes provenientes de huso muscular y GTO, se observó un deterioro del patrón locomotriz (*Akay et al., 2014*). Es decir, la ausencia de la retroalimentación sensorial propioceptiva proveniente de los husos musculares a través de las fibras del grupo Ia/II y de las aferentes Ib provenientes del GTO, conduce a este deterioro del patrón locomotriz (*Figura 19*). Podemos concluir que los CPG pueden generar el patrón motriz básico, pero la información propioceptiva es fundamental para una locomoción apropiada a cambios al terreno y al tipo de tarea motriz (marcha, trote, galope, nado, etc.). Estos autores observaron que la ausencia de retroalimentación propioceptiva de los husos musculares deteriora el patrón locomotor al perturbar la sincronización precisa de la actividad de los músculos flexores del tobillo durante la fase de balanceo (*Figura 19A - C; páneles izquierdos*). Además, la retroalimentación de los husos musculares desempeña un papel más crítico en la generación del patrón motriz cuando la retroalimentación de los GTOs está reducida, como ocurre durante el nado (*Figura 19A - C, páneles derechos*).

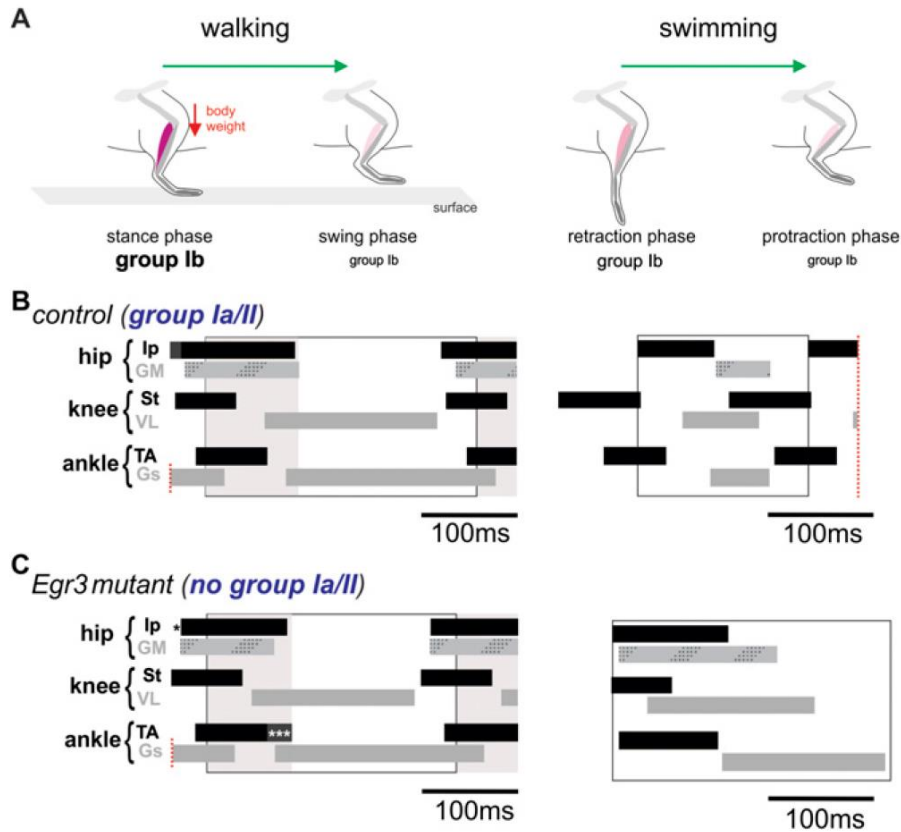


Figura 19. El patrón locomotor se degrada gradualmente con la eliminación de la retroalimentación propioceptiva. **(A)** Durante la marcha, la señalización de las fibras del grupo Ib predomina durante la fase de apoyo debido al peso del cuerpo, mientras que se reduce durante la fase de balanceo, cuando la extremidad no soporta ese peso. En cambio, durante el nado, la señalización de las fibras del grupo Ib se reduce debido a la menor influencia gravitacional, y es similar independientemente de si la pata del ratón se mueve hacia adelante o hacia atrás. **(B)** Diagrama de barras que ilustra la actividad EMG de músculos flexores (negro) y extensores (gris) que mueven las tres articulaciones de la extremidad posterior en un ciclo motor (rectángulo) durante la marcha (izquierda) y el nado (derecha) en el ratón silvestre. El área sombreada de la izquierda indica la fase de balanceo. **(C)** Igual que en A, pero los gráficos ilustran los datos de los ratones mutantes *Egr3*^{-/-}. Los asteriscos en las barras negras durante la marcha de los mutantes indican que la diferencia de este parámetro es estadísticamente significativa en comparación con la marcha en el ratón silvestre tras la prueba *t* de Student (**P* < 0,05 y ****P* < 0,001). La ausencia de asteriscos significa que las diferencias no son estadísticamente significativas. (Akay *et al.*, 2014).

En otra serie de experimentos (Mayer *et al.*, 2018) en ratones *Egr3*^{-/-} se pudo elucidar que la retroalimentación sensorial propioceptiva de los husos musculares es importante para la regulación de la fuerza muscular y para modular la amplitud dependiente de la velocidad de la locomoción, siendo la retroalimentación propioceptiva de los husos musculares, principalmente de músculos extensores del tobillo, la más importante para regular la fuerza y la modulación dependiente de la velocidad.

La información sensorial tiene un papel esencial en la recuperación del movimiento después de una lesión espinal. El grupo de Silvia Arber en Suiza, observó en el ratón transgénico con una ablación selectiva de las neuronas que expresan parvalbúmina (PV^{cre::Advillin^{iDTR}}), que después de una lesión espinal incompleta, la eliminación de las fibras aferentes propioceptivas caudalmente, pero no rostralmente a la lesión espinal, restringe severamente la recuperación locomotriz y la reorganización de los circuitos de las vías supraespinal que ocurren normalmente después de una lesión incompleta (Figura 20).

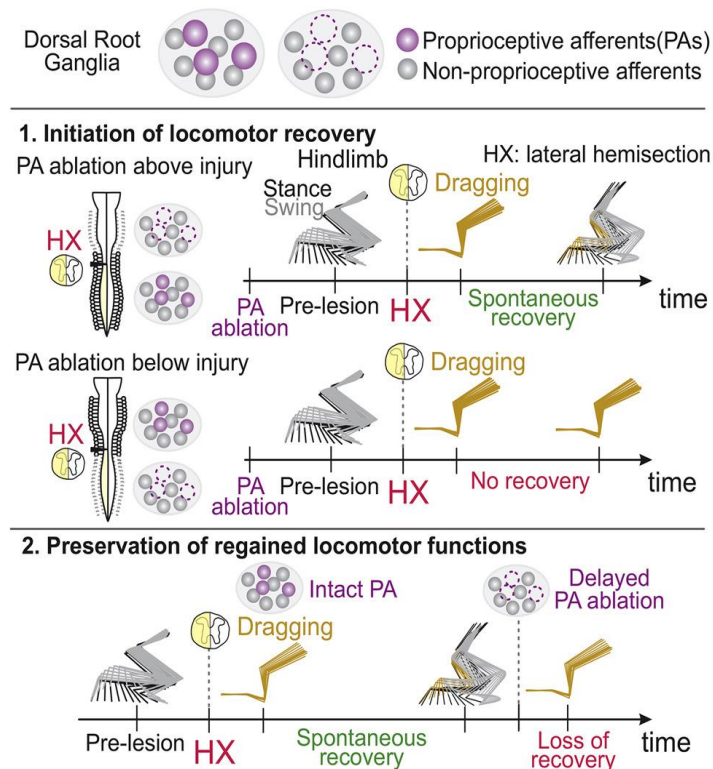


Figura 20. La información propioceptiva local dirige la recuperación de la función después de una lesión espinal. **Panel superior**, ablación selectiva de las neuronas aferentes propioceptivas del ganglio de raíz dorsal que expresan parvalbúmina (PV). **1.** Cuando la ablación de las neuronas propioceptivas se produce rostralmente a una hemisección espinal (HX) lateral, ocurre una recuperación espontánea. Si la ablación de las neuronas propioceptivas se produce caudalmente a la HX, no hay recuperación de la locomoción. **2.** Si la ablación se produce después de una recuperación después de la lesión, esta se pierde, lo cual sugiere que la retroalimentación propioceptiva es esencial para iniciar y mantener la recuperación de la función después de una lesión. (Takeoka et al., 2014).

Además, la ablación de las aferentes propioceptivas una vez ocurrida la recuperación, revierte el restablecimiento funcional normal, demostrando que su papel es esencial para mantener la mejoría de la función locomotriz a pesar de la reorganización de los circuitos de las vías supraespinales. Estos resultados ponen de

manifiesto que las aferentes propioceptivas interactúan de manera continua con circuitos espinales locales que inician y mantienen la locomoción, es decir, con los CPGs (*Takeoka et al., 2014*).

2.9 Interneuronas candidatas que conforman al CPG

Con el advenimiento de las cepas transgénicas del ratón, ha sido posible identificar fenotipos específicos de neuronas espinales por medio del marcaje de factores de transcripción expresados diferencialmente en poblaciones de estas neuronas (*Goulding, 2009*). Además, se han desarrollado cepas “*knock-out*” con deleciones constitutivas específicas de genes o factores de transcripción que se expresan en determinadas poblaciones de interneuronas (*Kiehn, 2016*). Actualmente es posible activar o inhibir selectivamente poblaciones específicas de interneuronas al expresar la canalrodopsina o halorodopsina, respectivamente. El transgén de estas proteínas se regula por el promotor de un factor de transcripción específico que se expresa exclusivamente en una población de interneuronas. La canalrodopsina y la halorodopsina son proteínas sensibles a la luz y funcionan como un canal catiónico o aniónico, respectivamente, produciendo una excitación o una inhibición. Por ejemplo, se ha insertado el gen de la halorodopsina en interneuronas que expresan el factor de transcripción *Shox2*, que al ser inhibidas con luz conduce a una reducción en la frecuencia del ritmo locomotriz con un cambio de fase, por lo que se han considerado como candidatas a formar parte del RG de los CPGs de la locomoción (*Dougherty et al., 2013; ver en Discusión*). No obstante, existen otras neuronas que expresan el factor de transcripción *Hb9* y que también reúnen ciertos criterios para ser candidatas a participar en la generación del ritmo locomotriz (*Wilson et al., 2005*). Sin embargo, el factor de transcripción *Hb9* se expresa de manera más ubicua lo cual dificulta la activación o inhibición selectivas durante la locomoción.

III. Planteamiento del problema

Hasta ahora, aun cuando se han podido dilucidar algunos elementos que conforman los CPGs de la locomoción en el ratón, existe muy poca información acerca de la modulación sensorial de los circuitos neuronales implicados, así como su control por vías supraespinales.

Con respecto a la modulación del CPG de la locomoción en roedores por la información sensorial, el grupo de Norio Kudo, en el Japón (1987, 1997, 1998), demostró en la preparación de la médula espinal aislada de la rata neonata, con locomoción ficticia inducida por NMDA y 5-HT, que la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (LTA; *low threshold afferents*) en las raíces dorsales L3 o en el nervio extensor *Quadriceps*, prolonga la fase de flexión en animales P1 (Figura 21A) y un “resetting” hacia la extensión en animales P5 (Figura 21B); i.e. un cambio de fase en el ritmo locomotriz indicando una modulación diferencial del RG del CPG en diferentes fases del desarrollo.

La activación de aferentes del grupo Ib mediante la contracción muscular en ratones P5 produjo un acortamiento de la descarga flexora y un adelanto de la descarga extensora subsiguiente (Figura 15 B), efectos similares a los reportados en el gato adulto (Figura 21C), por lo que se concluyó que los efectos se debían a la activación de los GTO (Kudo et al., 1992; Iizuka et al., 1997).

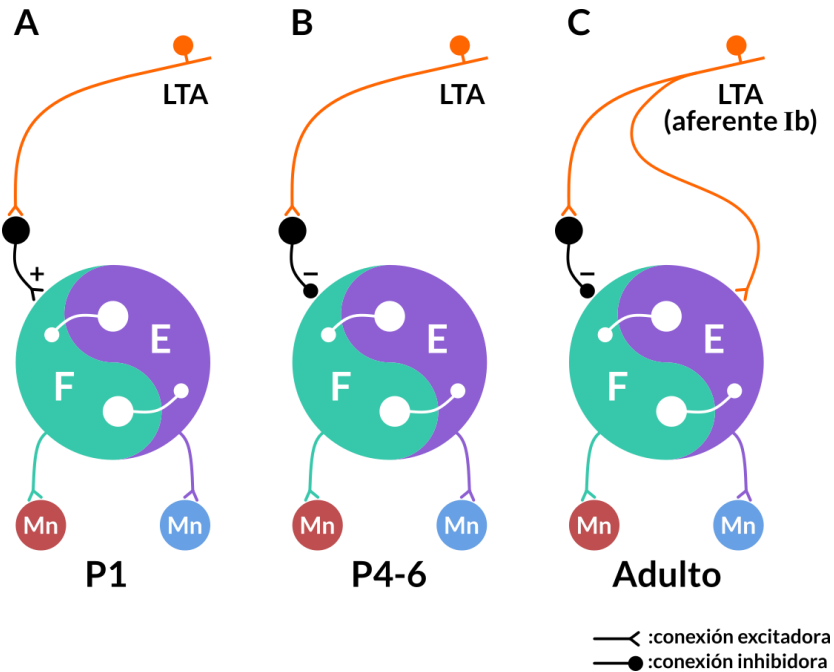


Figura 21. Posibles conexiones de las fibras de bajo umbral (LTA) con el CPG de la locomoción. **(A)** En la rata neonata P1, la estimulación de las LTA en la raíz L3 o en el nervio *Quadriceps (Q)*, produce un incremento en la actividad flexora. **(B)** La estimulación de las mismas fibras en estadios P4-6 produce una inhibición de la actividad flexora. **(C)** En la etapa adulta la estimulación de las fibras aferentes Ib produce un incremento en la actividad extensora y una disminución de la flexora, así como un “resetting” hacia la extensión (*Modificado de Iizuka et al., 1997*).

Los efectos opuestos en ambas las edades P1 y P5 fueron atribuidos a modificaciones inherentes al desarrollo. Sin embargo, debe notarse que en las raíces dorsales L3 viajan también fibras aferentes cutáneas, articulares y autonómicas. Además, el nervio *Quadriceps* no es puramente extensor, ya que inerva también al músculo *Recto femoral*, que es un músculo bifuncional y durante la locomoción se comporta como flexor. Es importante mencionar que la 5-HT a las concentraciones empleadas en estos trabajos produce una reducción considerable de la transmisión sináptica en las fibras aferentes estimuladas (*García-Ramírez et al., 2014*), lo que podría afectar tanto el umbral de activación como los efectos sobre los CPGs.

Por otra parte, en experimentos preliminares, en nuestro laboratorio hemos observado en la preparación de locomoción ficticia de la rata neonata (P0-2), que la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (2 xU) en los nervios *Gastrocnemio lateral* y *Sóleo* (GLS; *Figura 16*), del nervio flexor *Peroneo profundo* (DP; *Figura 17*), y el

nervio cutáneo *Sural* (SU) produjeron efectos muy parecidos a los observados en el del gato adulto (*Figura 22 y ver apartado 2.5*).

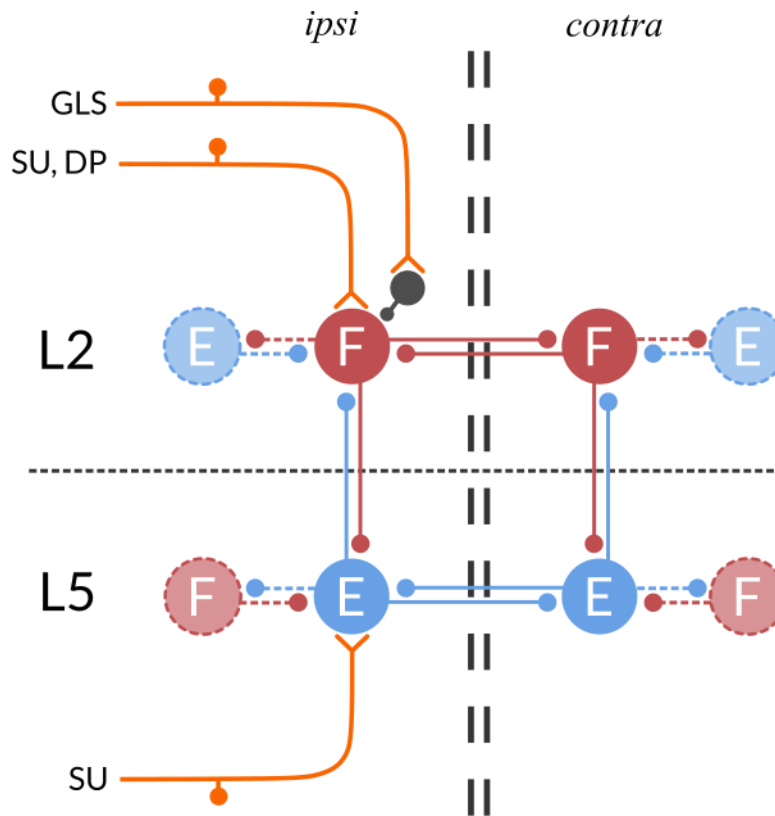


Figura 22. Representación esquemática de la modulación del CPG de la locomoción en la rata neonata. La estimulación del nervio *Gastrocnemio lateral* y *Sóleo* (GLS) produce una supresión de la flexión registrada en la raíz dorsal L2. La estimulación del nervio *Peroneo profundo* (DP) produce un incremento de la fase flexora registrada en L5. El nervio *Sural* (SU) produce efectos mixtos, i.e. una facilitación de la flexión en L2 y de la extensión en L5. Durante la locomoción ficticia inducida por NMDA y 5-HT en la rata neonata, hay un predominio de la actividad flexora en el segmento lumbar L2 y de la extensora en L5. Se ilustran las conexiones recíprocas entre los hemicentros flexores y extensores, y entre los CPGs ipsi y contralaterales.

Concluimos que en estadios neonatales (P0-2) de la rata, las vías neuronales activadas por la información propioceptiva y cutánea modulan los circuitos neuronales espinales que generan la locomoción como en el animal adulto (*Razgado et al., 2004; Razgado, 2005*). De hecho, las ratas neonatas exhiben movimientos similares a la locomoción en el aire de los animales adultos (*“air stepping”*). Sin embargo, las vías descendentes que controlan la postura y los movimientos voluntarios no están bien

desarrolladas en estadios neonatales, razón por la cual no se pueden sostener el peso del cuerpo, mantener el equilibrio y ejecutar movimientos voluntarios.

Debido a la mielinización incompleta de las fibras aferentes en los estadios neonatos de los roedores, para activar selectivamente las fibras aferentes de huso muscular (grupos Ia y II) y GTO (grupo Ib) mediante la estimulación eléctrica, es fundamental registrar los diferentes componentes de la salva aferente y activar funcionalmente las fibras de huso muscular y GTO mediante el estiramiento y la contracción musculares, respectivamente. Además, es importante investigar los efectos de la estimulación de aferentes propioceptivas de músculos que operen en las distintas articulaciones de las extremidades posteriores (tobillo, rodilla y cadera), y cutáneas de diferentes campos sensoriales (sural, peroneo superficial, tibial y safeno).

Pregunta

¿Cómo se modula la actividad locomotriz en la médula espinal aislada del ratón neonato por la estimulación eléctrica y funcional de fibras aferentes musculares y cutáneas de bajo umbral?

IV. Hipótesis

Durante la locomoción ficticia en el ratón neonato, la estimulación de fibras aferentes musculares y cutáneas de bajo umbral, produce efectos similares a los descritos en animales adultos. A decir, la estimulación de aferentes musculares extensoras produce un “*resetting*” hacia la extensión, la estimulación de aferentes musculares flexores produce un “*resetting*” hacia la flexión. La estimulación de nervios cutáneos produce efectos variables dependiendo del nervio estimulado.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general.

Estudiar el efecto de la estimulación eléctrica y funcional de aferentes musculares y cutáneas en la temporalidad del ritmo locomotriz y en la amplitud de las fases de flexión y extensión en la médula espinal aislada del ratón neonato.

5.2 Objetivos específicos.

1. Desarrollar la preparación bulbo-espinal aislada del ratón neonato, con raíces espinales lumbares y nervios periféricos en continuidad.
2. Inducir la locomoción ficticia mediante la aplicación de NMDA y 5-HT al medio de perfusión, o por la estimulación eléctrica del tallo cerebral.
3. Determinar los efectos de la información sensorial sobre la temporalidad y amplitud del ritmo locomotriz al estimular aferentes de bajo umbral en:
 - raíces dorsales L2 y L5
 - nervios de músculos extensores y flexores de las 3 articulaciones
 - nervios cutáneos de distintos campos receptivos
4. Examinar el efecto de la estimulación del tallo cerebral sobre la temporalidad y amplitud de las fases de flexión y extensión de la locomoción inducida farmacológicamente.

VI. Métodos

Se utilizan ratones de la cepa C57BL/6 neonatos (P0-5), los cuales son anestesiados con uretano al 10% (2 mg/kg, i.p.), descerebrados a nivel *lambda* y eviscerados. Se siguen los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana y del CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Cinvestav). Posteriormente se transfieren a una cámara de disección conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial

(LCRA) frío (~ 3 °C) que contiene (en mM): sacarosa 250, NaCl 12, KCl 2.5, D-glucosa 25, MgSO₄ 3.0, CaCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 1.25 y NaHCO₃ 26, gaseado con una mezcla de 95% O₂/5% CO₂. La médula espinal se extrae mediante una laminectomía dorsal y una vertebractomía ventral y se expone al medio de perfusión lo más rápidamente posible. El neuroeje espinal se aísla completamente y las raíces lumbosacras dorsales se mantienen intactas y en continuidad con los nervios periféricos, mientras que las raíces ventrales se seccionan distalmente. Se exponen nervios musculares flexores y extensores *ipsilaterales* y se mantienen en continuidad con los músculos. Los nervios cutáneos se disecan y se seccionan distalmente. Ambas extremidades posteriores y la pelvis permanecen *in situ* (Figura 23).

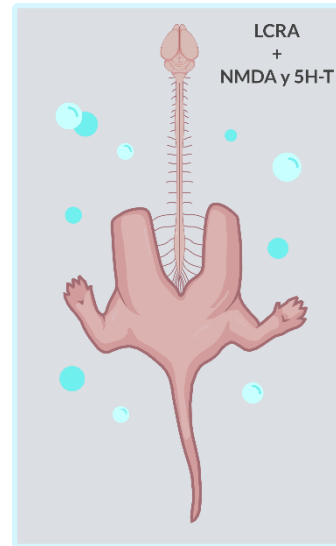


Figura 23. Preparación bulbo-espinal *in vitro* del ratón neonato, con raíces espinales y nervios periféricos en continuidad.

Los nervios periféricos son estimulados con trenes de pulsos eléctricos (20 o 30 pulsos con una frecuencia de 200 Hz) cuya intensidad se expresa en función del umbral de las fibras aferentes más excitables (xU), tomando como referencia la salva aferente registrada en el dorso de la médula o en nervio ciático. Se considera que la intensidad de estimulación $2 xU$ activa fibras aferentes musculares de bajo umbral del grupo I y fibras aferentes cutáneas del grupo A β . Las salvas aferentes producidas por la estimulación de los nervios expuestos se registran con electrodos de succión en el nervio ciático y/o en la porción proximal de las raíces dorsales.

Una vez terminada la disección, la preparación se perfunde con LCRA de registro que contiene (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, D-glucosa 25, MgSO₄ 1.0, CaCl₂ 2.4, NaH₂PO₄ 1.25, y NaHCO₃ 26, gaseado con una mezcla de 95% O₂/5% CO₂. La locomoción ficticia se induce por medio de la aplicación de los fármacos NMDA (5.0-7.5 μM) y 5-HT (1-5 μM) (Cowley, 1994). La actividad rítmica durante la locomoción ficticia se registra con electrodos de succión en las raíces ventrales L2 y L5 *ipsi* y *contralaterales*. Se ha demostrado (Kjaeruff y Kiehn, 1996) que las raíces ventrales L1-L3 exhiben actividad

electroneurográfica (ENG) principalmente durante la fase de flexión, mientras que las raíces ventrales L5-L6 durante la fase de extensión. En algunos experimentos la actividad locomotriz será registrada electromiográficamente (EMG) en músculos flexores y extensores específicos.

La actividad ENG *ipsi* y *contralateral* registrada durante la locomoción ficticia es amplificada y filtrada (ganancia: x 10,000; con un ancho de banda de 0.1 Hz - 30 KHz), antes de ser rectificadas e integradas con un seguidor de forma con una constante de tiempo de ~30 ms. Los ENGs son digitalizados con una frecuencia de muestreo de 5-10 KHz (Figura 24).

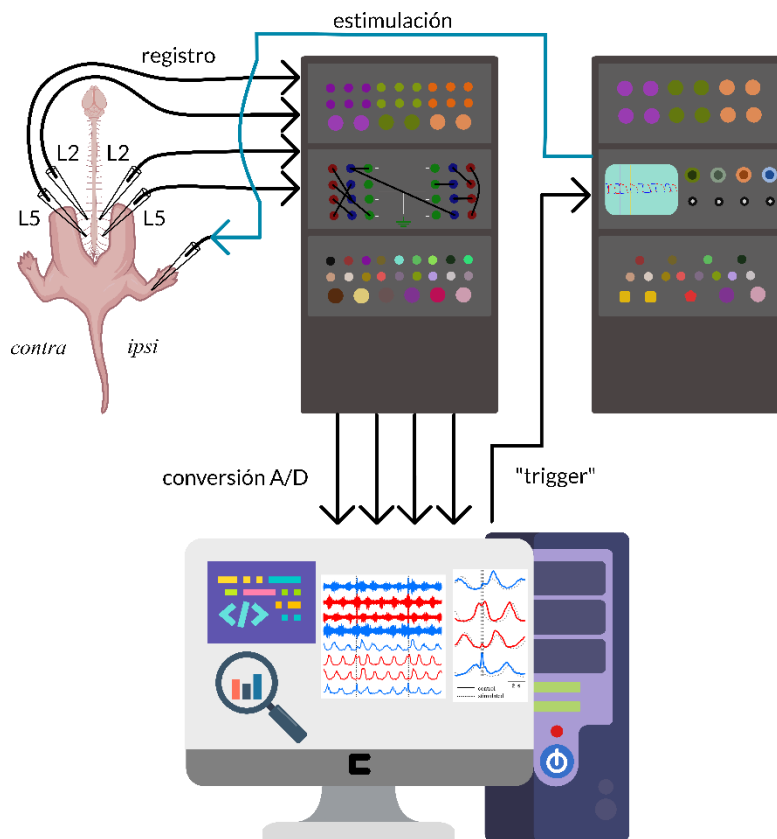


Figura 24. La preparación se fija a una cámara con silgard y se perfunde con líquido cefalorraquídeo artificial gaseado con una mezcla de 95 O₂/5 CO₂. Se colocan electrodos de succión en las raíces ventrales L2 y L5 *ipsi* y *contralaterales*. Los ENGs crudos se registran mediante amplificadores diferenciales, y en algunos casos son rectificadas e integradas (analógica o digitalmente). La información registrada por los canales de los amplificadores diferenciales es capturada automáticamente en línea a través de una interfase A/D (DigiData 1322A; Axon Instruments, USA) conectada a una computadora PC. Una de las señales se rectifica y se integra analógicamente y se direcciona hacia otra computadora que controla el retardo y los intervalos de los estímulos eléctricos aplicados a un nervio periférico por medio de un algoritmo. Los estímulos se aplican de manera alternada cada 3-4 ciclos durante la fase de flexión o extensión con los retardos elegidos.

El análisis fuera de línea consiste en seleccionar episodios de locomoción estables con el mayor número posible de ciclos estimulados. Los ENGs de los ciclos estimulados y de los ciclos control son promediados separadamente. En ambas condiciones se mide la duración del ciclo locomotriz y de las fases de flexión y extensión, así como la amplitud de las descargas flexora y extensora. Para la captura de datos se utiliza el “software” pClamp 10 (v.10, Molecular Devices, USA) y para el análisis de datos se utiliza el “software” Neuron desarrollado en el “*Spinal Cord Research Centre*” de la Universidad de Manitoba, Canadá.

VII. Discusión

Ante la imposibilidad de efectuar la fase experimental del proyecto de tesis de maestría debido a las restricciones impuestas por la pandemia del virus SARS-CoV-2, se realizó una revisión exhaustiva sobre la modulación sensorial del patrón locomotriz en mamíferos, que se pretende publicar en una revista de circulación internacional. Esta revisión incluiría información clásica y actualizada presentada de manera concisa y comprensible como primer acercamiento para comprender el “andar” o la locomoción en vertebrados.

Con todo el marco teórico de la revisión, se planteó, además, el proyecto dirigido a investigar la modulación sensorial de los CPGs locomotrices en el ratón neonato estimulando una variedad de nervios flexores y extensores, que inervan las extremidades posteriores del ratón, y de diversos nervios cutáneos, complementando la información preliminar en la rata neonata de datos obtenidos en el laboratorio (*Figuras 16, 17, 18, 22 y 25A; Razgado et al., 2004; Razgado, 2005*), por lo que consideramos que el proyecto es altamente viable.

Una de las interrogantes que surgió para la propuesta del proyecto fue ¿cuál fue la motivación para la utilización de la preparación de la médula espinal *in vitro* del ratón?. De manera resumida, existe una vasta cantidad de información relacionada con la modulación sensorial de los CPGs de la locomoción en preparaciones del gato y de la

rata adultos, *in vivo*. Sin embargo, estas preparaciones tienen algunas limitaciones: **i)** sólo es posible realizar una cantidad limitada de experimentos, **ii)** los estudios farmacológicos no se pueden efectuar con precisión, ya que se desconoce las concentraciones que alcanzan los fármacos a nivel plasmático y extracelular, y los efectos que pudieran tener a nivel cardiovascular o central, y **iii)** el registro intracelular de interneuronas se dificulta. Además, una razón de mucho peso es el desarrollo de cepas transgénicas de ratones, en las cuales se han podido caracterizar los fenotipos de interneuronas que expresan los factores de transcripción Shox2 o Hb9 de algunas neuronas candidatas a formar parte del RG del CPG (*Dougherty et al., 2013; Wilson et al., 2005*), lo que ha contribuido a complementar los conocimientos previos acerca de las redes neuronales en la médula espinal. No obstante, hasta la fecha, todavía se desconocen las aferencias sensoriales con estos grupos neuronales (*Figura 25B*). Por lo que además de validar la preparación del ratón neonato para la investigación del CPG se abre la puerta a perspectivas interesantes ya que se podría estudiar la modulación sensorial de los CPGs en estas cepas transgénicas, conjuntando los abordajes electrofisiológicos clásicos con las técnicas de biología molecular.

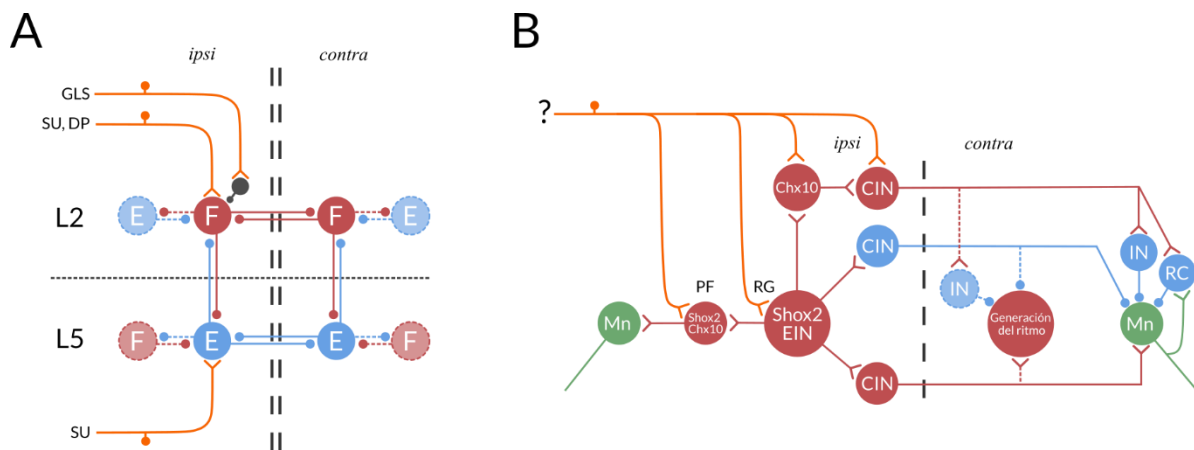


Figura 25. Organización de los circuitos neuronales implicados en la generación del patrón motriz (CPG) en roedores. **(A)** Modulación del CPG por la información sensorial propioceptiva y cutánea en la rata neonata. **(B)** Identificación de interneuronas excitadoras (EIN) posiblemente implicadas en la generación del ritmo locomotriz (RG) que expresan el factor de transcripción Shox2, y de las interneuronas excitadoras implicadas en la formación de patrones (PF) que expresan los factores de transcripción Shox2 y Chox10 (modificado de Dougherty et al., 2013). Se ilustran además las interneuronas comisurales excitadoras (CIN en rojo) e inhibitoras (CIN, en azul). Mn, motoneurona (verde).

De hecho, el proyecto plantea el desarrollo de la fase experimental en ratones de la cepa C57BL/6, ya que los ratones transgénicos se han desarrollado fundamentalmente en esta cepa, y en fases posteriores del proyecto se pretende utilizar ratones transgénicos.

Cabe mencionar que en algunas cepas de ratones transgénicos también ha sido posible efectuar una deleción de las fibras aferentes propioceptivas -aunque todavía no de manera selectiva- y estudiar los efectos de esas aferentes sobre los patrones motrices de la caminata y el nado (*Figura 19, de Akay et al., 2014*), o sobre la recuperación de la locomoción después de una lesión espinal (*Figura 20, de Takeoka et al., 2014*). No dudamos que en un futuro sea posible hacer una deleción más selectiva de fibras aferentes musculares de los grupos Ia, Ib, y II, y de fibras aferentes cutáneas de bajo umbral, o estimular estas fibras selectivamente con técnicas optogenéticas, en ratones transgénicos.

Conclusión

La información obtenida del presente proyecto será fundamental para investigar cómo la información sensorial modula las interneuronas candidatas a formar parte del RG (Shox2⁺ y Hb9⁺), así como las que forman parte de la PF (Shox2⁺/Chox10⁺) de los CPGs (*Figura 25B*). La modulación de interneuronas espinales por la información sensorial y supraespinal es muy relevante para la identificación de interneuronas implicadas en la generación del ritmo y poder desentrañar con más detalle la arquitectura de los CPGs (*Dougherty et al., 2013; Domínguez-Rodríguez et al., 2020*). Se conoce muy poco acerca de la modulación sensorial del generador central del patrón locomotriz (CPG) en roedores.

El conocimiento del papel funcional de las fibras aferentes en la regulación de la locomoción contribuirá a esclarecer la organización del CPG y de los elementos que lo conforman. Los resultados de este proyecto nos permitirán conocer un poco más cómo nos desplazamos y brindarán una base más sólida para investigar mecanismos plásticos

después de lesiones espinales, y establecer terapias de rehabilitación mediante el uso de fármacos, el entrenamiento y la estimulación eléctrica funcional.

VIII. Referencias

- Abraira, V. E., Kuehn, E. D., Chirila, A. M., Springel, M. W., Toliver, A. A., Zimmerman, A. L., ... Ginty, D. D. (2017). *The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn*. *Cell*, 168(1-2), 295–310.e19. doi:10.1016/j.cell.2016.12.010
- Akay, T., Tourtellotte, W. G., Arber, S., & Jessell, T. M. (2014). *Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16877–16882. doi:10.1073/pnas.1419045111
- Alvarez-Leefmans, F.J., Nani A., Marquez S. (1998). *Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition*. In: Rudomin P., Romo R., Mendell L. (eds) *Presynaptic inhibition and neural control*. Oxford University Press, New York, pp 50–79.
- Angel, M. J., Guertin, P., Jiménez, T., & McCreia, D. A. (1996). *Group I extensor afferents evoke disynaptic EPSPs in cat hindlimb extensor motoneurons during fictive locomotion*. *The Journal of Physiology*, 494(3), 851–861. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021538
- Baev, K.V. (1981). *Reorganization of segmental reactions to peripheral stimulation during fictive scratching in the cat*. *Neirofiziologia*. 13(2):196-203.
- Bardoni, R. (2004). *Presynaptic NMDA Receptors Modulate Glutamate Release from Primary Sensory Neurons in Rat Spinal Cord Dorsal Horn*. *Journal of Neuroscience*, 24(11), 2774–2781. doi:10.1523/jneurosci.4637-03.2004
- Bear, Mark F., Barry W. Connors, Michael A. Paradiso. *Neuroscience: exploring the brain, 3th Ed, 2007. Part II: 387-478*
- Betley, J. N., Wright, C. V. E., Kawaguchi, Y., Erdélyi, F., Szabó, G., Jessell, T. M., & Kaltschmidt, J. A. (2009). *Stringent Specificity in the Construction of a GABAergic Presynaptic Inhibitory Circuit*. *Cell*, 139(1), 161–174. doi:10.1016/j.cell.2009.08.027
- Boyd, I. A. (1981). *The action of the three types of intrafusal fibre in isolated cat muscle spindles on the dynamic length sensitivities of primary and secondary sensory endings*. In *Muscle Receptors and Movement*, ed. TAYLOR, A. & PROCHAZKA, A., pp. 17-32. Macmillan, London. Doi: 10.1007/978-1-349-06022-1_3
- Brink, E., Jankowska, E., & Skoog, B. (1984). *Convergence onto interneurons subserving primary afferent depolarization of group I afferents*. *Journal of Neurophysiology*, 51(3), 432–449. doi:10.1152/jn.1984.51.3.432
- Brown, T. G. (1911). *The Intrinsic Factors in the Act of Progression in the Mammal*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 84(572), 308–319. doi:10.1098/rspb.1911.0077
- Brown, T. G. (1912). *Rhythmic movements: a contribution in the study of the central nervous system*. Thesis University of Edinburgh Edinburgh

- Brown, T. G. (1914). *On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system.* *The Journal of Physiology*, 48(1), 18–46. doi:10.1113/jphysiol.1914.sp001646
- Brownstone, R. M., Gossard, J.-P., & Hultborn, H. (1994). *Voltage-dependent excitation of motoneurons from spinal locomotor centres in the cat.* *Experimental Brain Research*, 102(1). doi:10.1007/bf00232436
- Carbone, E. (2017). *Noradrenergic inhibition of presynaptic TRPV1 channels: a new pathway of pain control.* *The Journal of Physiology*, 595(8), 2413–2414. doi:10.1113/jp274103
- Chakraborty, S., Elvezio, V., Kaczocha, M., Rebecchi, M., & Puopolo, M. (2017). *Presynaptic inhibition of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptors by noradrenaline in nociceptive neurons.* *The Journal of Physiology*, 595(8), 2639–2660. doi:10.1113/jp273455
- Côté, M.-P., Murray, L. M., & Knikou, M. (2018). *Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions.* *Frontiers in Physiology*, 9. doi:10.3389/fphys.2018.00784
- Cowley, K. C., & Schmidt, B. J. (1994). *A comparison of motor patterns induced by, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord.* *Neuroscience Letters*, 171(1-2), 147–150. doi:10.1016/0304-3940(94)90626-2
- Cowley, K. C., & Schmidt, B. J. (1994). *Some limitations of ventral root recordings for monitoring locomotion in the in vitro neonatal rat spinal cord preparation.* *Neuroscience Letters*, 171(1-2), 142–146. doi:10.1016/0304-3940(94)90625-4
- Crowe, A., & Matthews, P. B. C. (1964). *The effects of stimulation of static and dynamic fusimotor fibres on the response to stretching of the primary endings of muscle spindles.* *The Journal of Physiology*, 174(1), 109–131. doi:10.1113/jphysiol.1964.sp007476
- Degtyarenko, A. M., Simon, E. S., Norden-Krichmar, T., & Burke, R. E. (1998). *Modulation of Oligosynaptic Cutaneous and Muscle Afferent Reflex Pathways During Fictive Locomotion and Scratching in the Cat.* *Journal of Neurophysiology*, 79(1), 447–463. doi:10.1152/jn.1998.79.1.447
- Domínguez-Rodríguez, L. E., Stecina, K., García-Ramírez, D. L., Mena-Avila, E., Milla-Cruz, J. J., Martínez-Silva, L., ... Quevedo, J. N. (2020). *Candidate interneurons mediating the resetting of the locomotor rhythm by extensor group I afferents in the cat.* *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.09.017
- Dougherty, K. J., Zagoraiou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., ... Kiehn, O. (2013). *Locomotor Rhythm Generation Linked to the Output of Spinal Shox2 Excitatory Interneurons.* *Neuron*, 80(4), 920–933. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.015
- Dueñas, S.H., Rudomin, P. (1988). *Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat.* *Experimental Brain Research*. 70(1):15-25.
- Eccles, J. C. (1961). *Membrane time constants of cat motoneurons and time courses of synaptic action.* *Experimental Neurology*, 4(1), 1–22. doi:10.1016/0014-4886(61)90074-7

- Eccles, J. C., Kostyuk, P. G., & Schmidt, R. F. (1962). *Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres. The Journal of Physiology*, 161(2), 237–257. doi:10.1113/jphysiol.1962.sp006884
- Eccles, J. C., Schmidt, R., & Willis, W. D. (1963). *Pharmacological studies on presynaptic inhibition. The Journal of Physiology*, 168(3), 500–530. doi:10.1113/jphysiol.1963.sp007205
- Evans, R. H. (1978). *The effects of amino acids and antagonists on the isolated hemisectioned spinal cord of the immature rat. British Journal of Pharmacology*, 62(2), 171–176. doi:10.1111/j.1476-5381.1978.tb08442.x
- Fink, A. J. P., Croce, K. R., Huang, Z. J., Abbott, L. F., Jessell, T. M., & Azim, E. (2014). *Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. Nature*, 509(7498), 43–48. doi:10.1038/nature13276
- Forsberg, H., & Grillner, S. (1973). *The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. Brain Research*, 50(1), 184–186. doi:10.1016/0006-8993(73)90606-9
- Frank, K., Fuortes, M.G.F. (1957). *Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. Fed. Proc.* 16, 39–40.
- García-Ramírez, D. L., Calvo, J. R., Hochman, S., & Quevedo, J. N. (2014). *Serotonin, Dopamine and Noradrenaline Adjust Actions of Myelinated Afferents via Modulation of Presynaptic Inhibition in the Mouse Spinal Cord. PLoS ONE*, 9(2), e89999. doi:10.1371/journal.pone.0089999
- Gasser, H. and Graham, H.T. (1933). *Potentials produced in the spinal cord by stimulation of the dorsal roots. American Journal of Physiology* 103:303-320 DOI. 10.1152/AJPLEGACY.1933.103.2.303
- Gosgnach, S., Quevedo, J., Fedirchuk, B., and McCrea, D. (2000). *Tonic presynaptic reduction of monosynaptic Ia EPSPs during fictive locomotion. Journal of Physiology-London* 526:639-652.
- Gossard, J. P., Cabelguen, J. M., & Rossignol, S. (1989). *Intra-axonal recordings of cutaneous primary afferents during fictive locomotion in the cat. Journal of Neurophysiology*, 62(5), 1177–1188. doi:10.1152/jn.1989.62.5.1177
- Gossard, J. P., Cabelguen, J. M., & Rossignol, S. (1991). *An intracellular study of muscle primary afferents during fictive locomotion in the cat. Journal of Neurophysiology*, 65(4), 914–926. doi:10.1152/jn.1991.65.4.914
- Gossard, J.-P., & Rossignol, S. (1990). *Phase-dependent modulation of dorsal root potentials evoked by peripheral nerve stimulation during fictive locomotion in the cat. Brain Research*, 537(1-2), 1–13. doi:10.1016/0006-8993(90)90333-7
- Gossard, J.-P., Brownstone, R. M., Barajon, I., & Hultborn, H. (1994). *Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. Experimental Brain Research*, 98(2). doi:10.1007/bf00228410
- Goulding, M. (2009). *Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. Nature Reviews Neuroscience*, 10(7), 507–518. doi:10.1038/nrn2608
- Graham, B., & Redman, S. (1994). *A simulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. Journal of Neurophysiology*, 71(2), 538–549. doi:10.1152/jn.1994.71.2.538

- Gray, E. G. (1962). *A Morphological Basis for Pre-synaptic Inhibition?* *Nature*, 193(4810), 82–83. doi:10.1038/193082a0
- Grillner, S., & Shik, M. L. (1973). *On the Descending Control of the Lumbosacral Spinal Cord from the "Mesencephalic Locomotor Region."* *Acta Physiologica Scandinavica*, 87(3), 320–333. doi:10.1111/j.1748-1716.1973.tb05396.x
- Guertin, P., Angel, M. J., Perreault, M. C., & McCrear, D. A. (1995). *Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat.* *The Journal of Physiology*, 487(1), 197–209. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020871
- Harrison, P. J., & Jankowska, E. (1989). *Primary afferent depolarization of central terminals of group II muscle afferents in the cat spinal cord.* *The Journal of Physiology*, 411(1), 71–83. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017561
- Heinke, B., Gingl, E., & Sandkuhler, J. (2011). *Multiple Targets of -Opioid Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition at Primary Afferent A- and C-Fibers.* *Journal of Neuroscience*, 31(4), 1313–1322. doi:10.1523/jneurosci.4060-10.2011
- Hiebert, G. W., & Pearson, K. G. (1999). *Contribution of Sensory Feedback to the Generation of Extensor Activity During Walking in the Decerebrate Cat.* *Journal of Neurophysiology*, 81(2), 758–770. doi:10.1152/jn.1999.81.2.758
- Hiebert, G. W., Whelan, P. J., Prochazka, A., & Pearson, K. G. (1996). *Contribution of hind limb flexor muscle afferents to the timing of phase transitions in the cat step cycle.* *Journal of Neurophysiology*, 75(3), 1126–1137. doi:10.1152/jn.1996.75.3.1126
- Hugel S, Schlichter R. J Neurosci. (2000). *Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons.* Mar 15;20(6):2121-30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-06-02121.2000.
- Hultborn, H., Meunier, S., Pierrot-Deseilligny, E., & Shindo, M. (1987). *Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man.* *The Journal of Physiology*, 389(1), 757–772. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016681
- Iizuka, M., Kiehn, O., & Kudo, N. (1997). *Development in neonatal rats of the sensory resetting of the locomotor rhythm induced by NMDA and 5-HT.* *Experimental Brain Research*, 114(2), 193–204. doi:10.1007/pl00005628
- Jami, L. (1992). *Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions.* *Physiological Reviews*, 72(3), 623–666. doi:10.1152/physrev.1992.72.3.623
- Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., & Lundberg, A. (1967a). *The Effect of DOPA on the Spinal Cord 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors.* *Acta Physiologica Scandinavica*, 70(3-4), 369–388. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03636.x
- Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., & Lundberg, A. (1967b). *The Effect of DOPA on the Spinal Cord 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents.* *Acta Physiologica Scandinavica*, 70(3-4), 389–402. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03637.x

- Jiménez, I., Rudomin, P., & Solodkin, M. (1987). *Mechanisms involved in the depolarization of cutaneous afferents produced by segmental and descending inputs in the cat spinal cord. Experimental Brain Research, 69(1)*. doi:10.1007/bf00247042
- Jiménez, I., Rudomin, P., Solodkin, M., & Vyklicky, L. (1984). *Specific and nonspecific mechanisms involved in generation of PAD of group Ia afferents in cat spinal cord. Journal of Neurophysiology, 52(5), 921–940*. doi:10.1152/jn.1984.52.5.921
- Jiménez, I., Rudomin, P., Solodkin, M., & Vyklicky, L. (1984). *Specific and nonspecific mechanisms involved in generation of PAD of group Ia afferents in cat spinal cord. Journal of Neurophysiology, 52(5), 921–940*. doi:10.1152/jn.1984.52.5.921
- Kandel, Schwartz & Jessell. *Principles of Neural Science, 5th Ed, 2013. Part VI: 739-1014*
- Kiehn, O. (2016). *Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. Nature Reviews Neuroscience, 17(4), 224–238*. doi:10.1038/nrn.2016.9
- Kiehn, O., & Dougherty, K. (2013). *Locomotion: Circuits and Physiology. Neuroscience in the 21st Century, 1209–1236*. doi:10.1007/978-1-4614-1997-6_42
- Kiehn, O., Iizuka, M., & Kudo, N. (1992). *Resetting from low threshold afferents of locomotor rhythm in the isolated spinal cord-hindlimb preparation from newborn rats. Neuroscience Letters, 148(1-2), 43–46*. doi:10.1016/0304-3940(92)90800-m
- Kjaerulff, O., & Kiehn, O. (1996). *Distribution of Networks Generating and Coordinating Locomotor Activity in the Neonatal Rat Spinal Cord In Vitro: A Lesion Study. The Journal of Neuroscience, 16(18), 5777–5794*. doi:10.1523/jneurosci.16-18-05777.1996
- Kriellaars, D. J., Brownstone, R. M., Noga, B. R., & Jordan, L. M. (1994). *Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. Journal of Neurophysiology, 71(6), 2074–2086*. doi:10.1152/jn.1994.71.6.2074
- Krnjević, K., & Morris, M. E. (1975). *Correlation Between Extracellular Focal Potentials and K⁺ Potentials Evoked by Primary Afferent Activity. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 53(5), 912–922*. doi:10.1139/y75-125
- Kudo, N., & Nishimaru, H. (1998). *Reorganization of Locomotor Activity during Development in the Prenatal Rat^a. Annals of the New York Academy of Sciences, 860(1 NEURONAL MECH), 306–317*. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09058.x
- Kudo, N., & Yamada, T. (1987). *N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. Neuroscience Letters, 75(1), 43–48*. doi:10.1016/0304-3940(87)90072-3
- Lam, T., & Pearson, K. (2002). *Sartorius muscle afferents influence the amplitude and timing of flexor activity in walking decerebrate cats. Experimental Brain Research, 147(2), 175–185*. doi:10.1007/s00221-002-1236-0
- Lam, T., & Pearson, K. G. (2001). *Proprioceptive Modulation of Hip Flexor Activity During the Swing Phase of Locomotion in Decerebrate Cats. Journal of Neurophysiology, 86(3), 1321–1332*. doi:10.1152/jn.2001.86.3.1321

- Lev-Tov, A., & Pinco, M. (1992). *In vitro studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. The Journal of Physiology*, 447(1), 149–169. doi:10.1113/jphysiol.1992.sp018996
- Li, Y., Hari, K., Lucas-Osma, A. M., Fenrich, K. K., Bennett, D. J., Hammar, I., & Jankowska, E. (2020). *Branching points of primary afferent fibres are vital for the modulation of fibre excitability by epidural DC polarization and by GABA in the rat spinal cord. Journal of Neurophysiology*. doi:10.1152/jn.00161.2020
- Lomelí, J., Quevedo, J., Linares, P., & Rudomin, P. (1998). *Local control of information flow in segmental and ascending collaterals of single afferents. Nature*, 395(6702), 600–604. doi:10.1038/26975
- Lopez-Garcia, J. A., & King, A. E. (1996). *A novel methodology for simultaneous assessment of the effects of 5-hydroxytryptamine on primary afferent polarisation and synaptic transmission in rat dorsal horn neurones in vitro. Journal of Neuroscience Methods*, 68(1), 1–6. doi:10.1016/0165-0270(96)00037-4
- Lucas-Osma, A. M., Li, Y., Lin, S., Black, S., Singla, R., Fouad, K., ... Bennett, D. J. (2018). *Extrasynaptic α 5GABAA receptors on proprioceptive afferents produce a tonic depolarization that modulates sodium channel function in the rat spinal cord. Journal of Neurophysiology*. doi:10.1152/jn.00499.2018
- Lundberg, A. (1964). *Supraspinal Control of Transmission in Reflex Paths to Motoneurons and Primary Afferents. Progress in Brain Research*, 197–221. doi:10.1016/s0079-6123(08)60624-x
- Matthews, P. B. C. (1962). *The differentiation of two types of fusimotor fibre by their effects on the dynamic response of muscle spindle primary endings. Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognitive Medical Sciences*, 47(4), 324–333. doi:10.1113/expphysiol.1962.sp001616
- Mayer, W. P., Murray, A. J., Brenner-Morton, S., Jessell, T. M., Tourtellotte, W. G., & Akay, T. (2018). *Role of muscle spindle feedback in regulating muscle activity strength during walking at different speed in mice. Journal of Neurophysiology*. doi:10.1152/jn.00250.2018
- McCrea, D. A., & Rybak, I. A. (2008). *Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. Brain Research Reviews*, 57(1), 134–146. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.006
- Miledi, R., & Slater, C. R. (1966). *The action of calcium on neuronal synapses in the squid. The Journal of Physiology*, 184(2), 473–498. doi:10.1113/jphysiol.1966.sp007927
- Millan, M. J. (2002). *Descending control of pain. Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474. doi:10.1016/s0301-0082(02)00009-6
- Nicoll, R. A., & Alger, B. E. (1979). *Presynaptic Inhibition: Transmitter and Ionic Mechanisms. International Review of Neurobiology Volume 21*, 217–258. doi:10.1016/s0074-7742(08)60639-x
- Nishimaru, H., & Kudo, N. (2000). *Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. Brain Research Bulletin*, 53(5), 661–669. doi:10.1016/s0361-9230(00)00399-3
- Pearson, 1999. *From Kandel, Schwartz & Jessell. Principles of Neural Science 4th Ed. Chapter 37: 737-754*
- Pearson, K. G. (1995). *Proprioceptive regulation of locomotion. Current Opinion in Neurobiology*, 5(6), 786–791. doi:10.1016/0959-4388(95)80107-3

- Pearson, K. G. (2000). *Neural Adaptation in the Generation of Rhythmic Behavior*. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 723–753. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.723
- Pearson, K. G., & Collins, D. F. (1993). *Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity*. *Journal of Neurophysiology*, 70(3), 1009–1017. doi:10.1152/jn.1993.70.3.1009
- Perreault, M. C., Angel, M. J., Guertin, P., & McCrea, D. A. (1995). *Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat*. *The Journal of Physiology*, 487(1), 211–220. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020872
- Perret, C., & Cabelguen, J.-M. (1980). *Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles*. *Brain Research*, 187(2), 333–352. doi:10.1016/0006-8993(80)90207-3
- Price, R. F., & Dutia, M. B. (1987). *Properties of cat neck muscle spindles and their excitation by succinylcholine*. *Experimental Brain Research*, 68(3). doi:10.1007/bf00249805
- Prochazka A, Hulliger M, Trend P, Dürmüller N. 1988. *Dynamic and static fusimotor set in various behavioural contexts*. In: P Hnik, T Soukup, R Vejsada, J Zelena (eds). *Mechanoreceptors: Development, Structure and Function*, pp. 417–430. New York: Plenum
- Prochazka, A., & Gorassini, M. (1998). *Ensemble firing of muscle afferents recorded during normal locomotion in cats*. *The Journal of Physiology*, 507(1), 293–304. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.293bu.x
- Quevedo, J., Fedirchuk, B., Gosgnach, S., and McCrea, D. (2000). *Group I disynaptic excitation of cat hindlimb flexor and bifunctional motoneurons during fictive locomotion*. *Journal of Physiology* 525:549-564.
- Quevedo, J., Stecina, K., & McCrea, DA. (2005b) *Intracellular analysis of reflex pathways underlying the stumbling corrective reaction during fictive locomotion in the cat*. *J Neurophysiol* 94:2053-2062. doi: 10.1152/jn.00176.2005
- Quevedo, J., Stecina, K., Gosgnach, S. and McCrea, D. (2004). *The stumbling corrective reflex during fictive locomotion in the cat*. Submitted to *Journal of Neurophysiology*
- Quevedo, J., Stecina, K., Gosgnach, S., & McCrea, DA. (2005a). *Stumbling corrective reaction during fictive locomotion in the cat*. *J Neurophysiol* 94:2045-2052. doi: 10.1152/jn.00175.2005
- Razgado, L. F. (2005). *Papel de la información sensorial durante la locomoción ficticia en la rata Neonata, in vitro*. Tesis de Maestría. Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Cinvestav
- Razgado, L. F. and Quevedo, J. (2004). *Modulation of locomotor circuitry by stimulation of sensory afferents in the neonatal rat*. *Society for Neuroscience Abstr* 30:656-11
- Rossignol S. (1996). *Neuronal control of stereotypic limb movements*. Rowell LB, Shepherd JT (eds) *Handbook of Physiology, section 12. Chapter 5*. (pp. 173-216) American Physiological Society, Oxford
- Rossignol, S., Dubuc, R., & Gossard, J.-P. (2006). *Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion*. *Physiological Reviews*, 86(1), 89–154. doi:10.1152/physrev.00028.2005

- Rudomin, P., & Schmidt, R. F. (1999). *Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. Experimental Brain Research*, 129(1), 1–37. doi:10.1007/s002210050933
- Rudomin, P., Solodkin, M., & Jimenez, I. (1986). *PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. Journal of Neurophysiology*, 56(4), 987–1006. doi:10.1152/jn.1986.56.4.987
- Rudomin, P., Solodkin, M., & Jimenez, I. (1986). *PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. Journal of Neurophysiology*, 56(4), 987–1006. doi:10.1152/jn.1986.56.4.987
- Rudomin, P., Solodkin, M., & Jimenez, I. (1986). *PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. Journal of Neurophysiology*, 56(4), 987–1006. doi:10.1152/jn.1986.56.4.987
- Salio, C., Ferrini, F., Muthuraju, S., & Merighi, A. (2014). *Presynaptic Modulation of Spinal Nociceptive Transmission by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF). The Journal of Neuroscience*, 34(41), 13819–13833. doi:10.1523/jneurosci.0808-14.2014
- Santicioli, P., Del Bianco, E., & Maggi, C. A. (1993). *Adenosine A1 receptors mediate the presynaptic inhibition of calcitonin gene-related peptide release by adenosine in the rat spinal cord. European Journal of Pharmacology*, 231(1), 139–142. doi:10.1016/0014-2999(93)90695-e
- Schmidt, B. J., & Jordan, L. M. (2000). *The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. Brain Research Bulletin*, 53(5), 689–710. doi:10.1016/s0361-9230(00)00402-0
- Schmidt, R. F. (1971). *Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system. Ergebnisse der Physiologie Reviews of Physiology*, Volume 63, 20–101. doi:10.1007/bfb0047741
- Schomburg, E. D., & Behrends, H. B. (1978). *The possibility of phase-dependent monosynaptic and polysynaptic Ia excitation to homonymous motoneurons during fictive locomotion. Brain Research*, 143(3), 533–537. doi:10.1016/0006-8993(78)90363-3
- Sherrington, C. S. (1910). *Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. The Journal of Physiology*, 40(1-2), 28–121. doi:10.1113/jphysiol.1910.sp001362
- Shik, M. L., Orlovskii, G. N., Severin, F. V. (1966a). *Organization of locomotor synergism. Biophysics (Oxf)* 11:879-886.
- Shik, M. L., Severin, F. V., Orlovskii, G. N. (1966b). *Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. Biophysics (Oxf)* 11: 659-666.
- Smith, J. C., & Feldman, J. L. (1987). *In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. Journal of Neuroscience Methods*, 21(2-4), 321–333. doi:10.1016/0165-0270(87)90126-9
- Stecina K, McCrea DA, Quevedo J and Gosgnach S (2000). Flexor group II muscle afferents can enhance flexor activity during fictive locomotion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26:1233.

- Stecina, K., Quevedo, J., & McCrea, DA. (2005). *Parallel reflex pathways from flexor muscle afferents evoking resetting and flexion enhancement during fictive locomotion and scratch in the cat. J Physiol* 569:275-290. doi: 10.1113/jphysiol.2005.095505
- Takeoka, A., Vollenweider, I., Courtine, G., & Arber, S. (2014). *Muscle Spindle Feedback Directs Locomotor Recovery and Circuit Reorganization after Spinal Cord Injury. Cell*, 159(7), 1626–1639. doi:10.1016/j.cell.2014.11.019
- Taylor, A., Durbaba, R., Ellaway, P. H., & Rawlinson, S. (2000a). *Patterns of fusimotor activity during locomotion in the decerebrate cat deduced from recordings from hindlimb muscle spindles. The Journal of Physiology*, 522(3), 515–532. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00515.x
- Taylor, A., Ellaway, P. H., & Durbaba, R. (1999). *Chapter 10 Why are there Three Types of Intrafusal Muscle Fibers? Peripheral and Spinal Mechanisms in the Neural Control of Movement*, 121–131. doi:10.1016/s0079-6123(08)62849-6
- Taylor, A., Ellaway, P. H., Durbaba, R., & Rawlinson, S. (2000b). *Distinctive patterns of static and dynamic gamma motor activity during locomotion in the decerebrate cat. The Journal of Physiology*, 529(3), 825–836. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00825.x
- Wall P. D. (1958). Excitability changes in afferent fibre terminations and their relation to slow potentials. *The Journal of physiology*, 142(1), i3–i21. PMID: 16992026; PMCID: PMC1356692.
- Wand, P., Prochazka, A., & Sontag, K.-H. (1980). *Neuromuscular responses to gait perturbations in freely moving cats. Experimental Brain Research*, 38(1). doi:10.1007/bf00237937
- Whelan, P. (1996). *Control of locomotion in the decerebrate cat. Progress in Neurobiology*, 49(5), 481–515. doi:10.1016/0301-0082(96)00028-7
- Whelan, P. J. (2003). *Developmental Aspects of Spinal Locomotor Function: Insights from Using their vitro Mouse Spinal Cord Preparation. The Journal of Physiology*, 553(3), 695–706. doi:10.1113/jphysiol.2003.046219
- Whelan, P. J., & Pearson, K. G. (1997). *Plasticity in Reflex Pathways Controlling Stepping in the Cat. Journal of Neurophysiology*, 78(3), 1643–1650. doi:10.1152/jn.1997.78.3.1643
- Whelan, P. J., & Pearson, K. G. (1997). *Comparison of the effects of stimulating extensor group I afferents on cycle period during walking in conscious and decerebrate cats. Experimental Brain Research*, 117(3), 444–452. doi:10.1007/s002210050239
- Whelan, P. J., Hiebert, G. W., & Pearson, K. G. (1995). *Stimulation of the group I extensor afferents prolongs the stance phase in walking cats. Experimental Brain Research*, 103(1). doi:10.1007/bf00241961
- Wilson, J. M. (2005). *Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. Journal of Neuroscience*, 25(24), 5710719. doi:10.1523/jneurosci.0274-05.2005
- Wrigley, P. J., Jeong, H.-J., & Vaughan, C. W. (2010). *Dissociation of μ - and δ -opioid Inhibition of Glutamatergic Synaptic Transmission in Superficial Dorsal Horn. Molecular Pain*, 6, 1744–8069–6–71. doi:10.1186/1744-8069-6-71

Zhang, S., & Jackson, M. (1993). *GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings*. *Science*, 259(5094), 531–534. doi:10.1126/science.8380942

Zytnicki, D., Lafleur, J., Horcholle-Bossavit, G., Lamy, F., & Jami, L. (1990). *Reduction of Ib autogenetic inhibition in motoneurons during contractions of an ankle extensor muscle in the cat*. *Journal of Neurophysiology*, 64(5), 1380–1389. doi:10.1152/jn.1990.64.5.1380