

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

*Modulación sensorial de las interneuronas implicadas en el control
del ritmo de la locomoción en el gato*

Tesis que presenta:

Lucía Esther Domínguez Rodríguez

para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

en la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. Jorge Noel Quevedo Durán

Dr. Hans Rurik Albert Hultborn

Ciudad de México

Diciembre 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACyT**, por el apoyo económico otorgado durante este proyecto de doctorado

Al Dr. **Jorge Noel Quevedo Durán** y al Dr. **Hans Hultborn**, por ser unos excelentes tutores y compartir este maravilloso proyecto conmigo

A la Dra. **Katinka Stecina**, por sus invaluable aportaciones intelectuales a este proyecto y por su gran apoyo

A Jorge Calvo y Alejandro Carapia por el soporte técnico y su buen compañerismo

A mis sinodales los Drs. Ismael Jiménez, Rodolfo Delgado, Ranier Gutiérrez y Gerardo Rojas por sus excelentes comentarios y sugerencias

A mis compañeros de laboratorio, por el trabajo en equipo durante los experimentos de este proyecto

A **mis amigos**, por los grandes momentos y todo su cariño

*A mi gran inspiración y fortaleza,
mi amada familia. Gracias por todo*

NDICE

I. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1.1. Hipótesis de los hemicentros de Thomas Graham Brown	5
2.1.2. Demostración de la hipótesis de los hemicentros de T. Graham Brown: Modelo de un nivel	8
2.1.3. Modelo de las unidades generadoras de ráfagas, UBG (<i>unit burst generators</i>)	11
2.1.4. Modelo de dos niveles	14
2.2.1. Modulación del ritmo y del patrón locomotrices por las fibras aferentes propioceptivas de bajo umbral	17
2.2.2. Modulación del ritmo y del patrón locomotrices por las FRA y las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral	24
2.3. Control descendente de la locomoción	26
2.3.3. Neuromodulación de la locomoción	32
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
3.1. Relevancia del proyecto	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVOS	40
5.1. Objetivo general	40
5.2. Objetivos particulares	40
VI. MÉTODOS	41
6.1. Animales	42
6.2. Preparación	42
6.3. Estimulación y registro	45
6.4. Generación de la locomoción ficticia	46
6.5. Registro intracelular de motoneuronas	47
6.6. Registro extracelular de interneuronas	47
6.7. Técnica de promediación disparada por espigas (<i>spike trigger averaging, STA</i>)	48
VII. RESULTADOS	49
7.1. Registro intracelular de motoneuronas extensoras	49
7.1.1. La estimulación de aferentes extensoras del grupo I promueve la expresión de EPSPs	

oligosinápticos durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA	49
7.1.2. Expresión de EPSPs disinápticos durante la extensión, producidos por aferentes extensoras del grupo	la estimulación de 53
7.2. Interneuronas candidatas para mediar los EPSPs oligosinápticos asociadas al <i>resetting</i> hacia la extensión	55
7.2.1. Interneurona activada monosinápticamente por las aferentes extensoras del grupo I y rítmicamente durante la extensión	56
7.2.2. Interneurona activada durante la extensión, disinápticamente por las aferentes extensoras del grupo I y asociada al <i>resetting</i> extensor	58
7.2.3. Interneurona de segundo y de último orden activada rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor	61
7.2.4. Interneurona de último orden activada rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor	64
7.2.5. Localización de las interneuronas candidatas a formar parte de la vía que media los EPSPs oligosinápticos	66
VIII. DISCUSIÓN	70
8.1. La activación de las aferentes del grupo I de músculos extensores durante la locomoción facilita la excitación de motoneuronas extensoras	71
8.2. La vía interneuronal que genera los EPSPs oligosinápticos durante la locomoción está asociada al " <i>resetting</i> " hacia la extensión	72
8.3. Las interneuronas candidatas de la vía excitadora oligosináptica implicadas en el <i>resetting</i> hacia la extensión forman parte del hemicentro extensor	75
IX. CONCLUSIÓN	81
9.1. Hallazgos relevantes	81
X. PERSPECTIVAS A FUTURO	82
XI. REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo hipotético de T. Graham Brown. Hemicentros espinales de la marcha.....	7
Figura 2.	Modelo de un solo nivel basado en la arquitectura de los hemicentros y considerando las vías reflejas de las FRA en presencia de L-DOPA.....	10
Figura 3.	Modelo de las unidades generadoras de ráfagas (UBG), basado en el movimiento de las articulaciones durante la marcha.....	12
Figura 4.	Modelo del doble nivel conformado por un generador del ritmo y una red formadora de patrones.....	15
Figura 5.	La información sensorial propioceptiva regula la transición de las fases de la locomoción.....	18
Figura 6.	La estimulación de las fibras extensoras del grupo I durante la flexión de la locomoción ficticia, produce un <i>resetting</i> extensor.....	20
Figura 7.	Durante la locomoción ficticia, la estimulación de las fibras extensoras del grupo I facilita la expresión de una vía oligosináptica excitadora.....	22
Figura 8.	Vías descendentes que controlan la locomoción.....	27
Figura 9.	Arreglo experimental de la preparación del gato descerebrado y espinalizado con locomoción ficticia inducida por la administración i.v. de L-DOPA.....	44
Figura 10.	EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes del grupo I de nervios extensores durante la locomoción ficticia.....	51
Figura 11.	Expresión de EPSPs disinápticos durante la fase de extensión de la locomoción ficticia inducida por L-DOPA, producidos por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I.....	54
Figura 12.	Interneurona de primer orden que recibe conexiones monosinápticas de las aferentes extensoras del grupo I, y se activa rítmicamente durante la extensión	57
Figura 13.	Interneurona activada disinápticamente por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión, polisinápticamente por las <i>co</i> FRA y con el mismo patrón que el <i>resetting</i> extensor.....	59
Figura 14.	Interneurona activada di- y trisinápticamente por las fibras extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor	62

Figura 15.	Interneurona activada polisinápticamente por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor.....	65
Figura 16.	Localización de las interneuronas candidatas que forman parte de la vía excitadora oligosináptica, activada por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I.....	67
Figura 17	Localización y representación de algunos elementos neuronales de la vía oligosináptica excitadora asociada al <i>resetting</i> extensor.....	69
Figura 18.	Hipótesis de la vía excitadora oligosináptica activada por las aferentes extensoras del grupo I, asociada al <i>resetting</i> extensor, y que forma parte del hemicentro extensor.....	74
Figura 19.	Modelo hipotético del CPG de la locomoción con un arreglo de tres niveles en el hemicentro extensor.....	80

ABREVIATURAS

5HT	serotonina
AC	<i>alternating current</i> - corriente alterna
AMPA	ácido -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
CDP	<i>cord dorsum potential</i> – potenciales del dorso de la médula
ChR2	canalrodopsina 2
coFRA	aferentes del reflejo flexor contralaterales
CPGs	<i>central pattern generators</i> - generadores centrales de patrones
CuN	núcleo cuneiforme
DA	dopamina
DC	<i>direct current</i> - corriente directa
DLF	<i>dorsolateral funiculus</i> – funículo dorsolateral
DTF	<i>dorsal tegmental field</i> - área tegmental dorsal
E, e	extensión
E1	primera fase de la extensión
E2	segunda fase de la extensión
E3	tercera fase de la extensión
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>

EFPs	<i>extracellular field potentials</i> – potenciales extracelulares de campo
EMG	electromiograma
ENG	electroneurograma
EPSPs	<i>excitatory postsynaptic potentials</i> - potenciales postsinápticos excitadores
F, f	flexión
FDHL	<i>flexor digitorum</i> y <i>flexor hallucis longus</i>
FRA	<i>flexor reflex afferents</i> - aferentes de reflejo flexor
GB	ganglios basales
Gi	núcleo <i>gigantocellularis</i>
GPe	globo pálido externo
GPi	globo pálido interno
GS	gastrocnemio-sóleo (gastrocnemio lateral, medial y sóleo)
HM	husos musculares
HRP	peroxidasa de rábano
i.v.	inyección intravenosa
IPSP	<i>inhibitory postsynaptic potentials</i> - potenciales postsinápticos inhibidores
LC	<i>locus coeruleus</i>
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina

LDPs	<i>locomotor drive potentials</i> - oscilaciones rítmicas locomotrices
LPGi	núcleo <i>paragigantocellularis</i> lateral
MAO	oxidasa de mono aminas
MLR	<i>mesencephalic locomotor region</i> - región locomotriz mesencefálica
MRF	formación reticular bulbar
NA	noradrenalina
NEM	neuronas espinosas medianas del estriado
NEMd	neuronas espinosas medianas de la vía directa
NEMi	neuronas espinosas medianas de la vía indirecta
NLH	núcleo lateral del hipotálamo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	núcleo subtalámico
NVMH	núcleo ventromedial del hipotálamo
OTG	órgano tendinoso de Golgi
PBSt	bíceps posterior y semitendinoso
PF	<i>pattern formation network</i> - red formadora de patrones
PI	<i>plantaris</i>
PPN	núcleo pedunculopontino
Pv	núcleo <i>parvocellularis</i>

Qx314	N - etil bromuro de lidocaína
RF	formación reticular
RG	<i>rhythmic generator</i> - generador del ritmo
RSN	neuronas retículoespinales
SC	núcleo <i>subcoeruleus</i>
SCRC	<i>Spinal Cord Research Center</i> (Universidad de Manitoba, Canadá)
SmAB	semimembranoso y bíceps anterior
SNC	substancia negra compacta
SNr	substancia negra reticulada
SP	peroneo superficial
SRL	<i>subthalamic locomotor region</i> - región locomotriz subtalámica
STA	<i>spike trigger averaging</i> - promediación disparada por espiga
Sur	sural
TA	tibial anterior
UBG	<i>unit burst generators</i> - unidades generadoras de ráfagas
VLF	funículo ventrolateral
VTF	<i>ventral tegmental field</i> - área tegmental ventral
xT	<i>times threshold</i> - veces por umbral
ZI	zona incierta

I. RESUMEN

En la médula espinal existen circuitos neuronales, denominados generadores centrales de patrones (CPGs), con la capacidad de producir el patrón estereotipado de la locomoción. Los CPGs espinales reciben información supraespinal y de los músculos en movimiento para adaptar el ritmo y el patrón locomotriz a las condiciones del entorno. Durante la locomoción ficticia en el gato descerebrado, la activación de fibras extensoras del grupo I facilita la expresión de una vía polisináptica excitadora en motoneuronas extensoras, en lugar de la inhibición no recíproca en condiciones de reposo. La latencia de estos EPSPs oligosinápticos (3.5 - 4 ms), sugiere que dicha vía está conformada por 3 interneuronas interpuestas. Asimismo, la estimulación de fibras aferentes extensoras del grupo I durante la flexión genera un cambio en el ritmo locomotriz, caracterizado por la supresión de la flexión en curso y un adelanto de la extensión (resetting hacia la extensión).

Esta tesis estuvo enfocada en identificar aquellas interneuronas que forman parte de la vía excitadora polisináptica y que están asociadas al *resetting* extensor. Para ello, se indujo locomoción con la inyección (i.v.) de L-DOPA en gatos paralizados y pretratados con nialamida, previa espinalización (nivel C1) y descerebración.

Durante la locomoción ficticia, en 39 motoneuronas extensoras la estimulación de aferentes musculares extensores del grupo I, produjo EPSPs oligosinápticos con una latencia de ~ 3.5 ms, compatible con tres interneuronas interpuestas entre las fibras aferentes y las motoneuronas.

Se registraron 62 interneuronas candidatas de la vía excitadora polisináptica, con base a los siguientes criterios: *i*) Activación mono-, di- o polisináptica por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I y *ii*) actividad rítmica durante la fase de extensión. Además, algunas de las interneuronas registradas se activaron polisinápticamente por la estimulación de las *coFRA* (22/62) y presentaron el mismo patrón de disparo que el *resetting* extensor (9/62). Lo que sugiere que las interneuronas registradas median la vía de los EPSPs oligosinápticos, producidos por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I, y están asociadas al *resetting* hacia la extensión. Por ende, se sugiere que estas interneuronas pertenecen al CPG de la locomoción.

ABSTRACT

Central pattern generators (CPGs) in the spinal cord generate the basic locomotor pattern. Locomotor CPGs integrate descending commands and sensory information arising from limb movements to modulate the rhythm and to adapt the motor pattern to demands of the environment. Stimulation of extensor group I afferents during L-DOPA locomotion in decerebrate cats, instead of the classical Ib non-reciprocal inhibition, produces a polysynaptic excitation in extensor motoneurons whose latency (3.5 - 4 ms) is compatible with 3 interneurons interposed. Furthermore, stimulation of extensor group I afferents during the flexor phase produces a suppression of the ongoing flexion with an initiation of the subsequent extension (*resetting to extension*).

This work was aimed to identify the interneurons mediating the polysynaptic group I excitation and causing the resetting to extension. Fictive locomotion was induced by injection of nialamide followed by L-DOPA (i.v.) in paralyzed cats following decerebration and spinalization at C1 level. In some experiments, we study the expression of polysynaptic EPSPs from extensor gr I afferents to ankle extensor motoneurons (n = 39) during fictive locomotion.

We recorded candidate interneurons (n = 62) mediating group I evoked polysynaptic EPSPs based on the following criteria: *i*) short-latency excitation (mono-, di- or polysynaptic) from extensor nerves, *ii*) rhythmic activation during the extensor phase. Some of the recorded interneurons were also polysynaptically activated by the stimulation of *co*FRAs (22/62) and exhibited the same pattern as the “*resetting to extension*” (9/62). We propose that the interneurons recorded in the present work fulfill the characteristics to belong to the neuronal pathway activated by extensor group I afferents during locomotion, and may contribute to the ‘resetting to extension’ as being part of the locomotor CPG.

II. INTRODUCCIÓN

Thomas Graham Brown, pionero en los estudios de la marcha, definió la locomoción o “*progression*” como el conjunto de movimientos alternados de las extremidades del cuerpo, que se llevan a cabo de manera secuencial, obedeciendo un ritmo determinado, con el fin de desplazarse de un lugar a otro (Brown, 1912).

Aunque la locomoción es considerada una tarea motriz simple. Para que se genere el patrón motriz estereotipado y rítmico que la caracteriza, se requiere de la participación de distintas estructuras del sistema nervioso: la corteza motora primaria, los ganglios basales, así como núcleos del tallo cerebral, principalmente la región locomotriz mesencefálica (MLR, por sus siglas en inglés; *Mesencephalic Locomotor Region*) y algunos núcleos de la formación reticular (Shik et al., 1966 a; 1966b; Rossignol, 1996), cuyo papel es dar inicio a la actividad locomotriz. Por otro lado, la generación del ritmo locomotriz ocurre a nivel de la médula espinal, a través de unos circuitos neuronales denominados generadores centrales de patrones (o CPGs; *Central Pattern Generators*) (Brown, 1911; 1914; Grillner, 1973). Esta red neuronal, a su vez, recibe información sensorial proveniente de los músculos en movimiento para adaptar el patrón motriz y la temporalidad de los ciclos locomotrices a las condiciones del entorno (Forsberg y Grillner, 1973; Rossignol, 1996). Asimismo, existe un sistema de corrección a nivel del cerebelo, que compara entre los movimientos planeados y los ejecutados (Kiehn y Dougherty, 2013).

De esta manera se establece una interacción dinámica entre la información proveniente de las aferentes propioceptivas y cutáneas, la información supraespinal y las neuronas espinales del CPG (Rossignol et al., 2006; Pearson, 2008; Côté et al., 2018). Ello determina la precisión de los movimientos que se requieren para realizar una tarea motriz tan especializada como la locomoción.

2.1. Circuitos neuronales espinales de la locomoción: Generadores centrales de patrones, CPGs.

Como se mencionó con anterioridad, los CPGs en la médula espinal, *per se*, tienen la capacidad de generar el ritmo y el patrón locomotrices. Es decir, sin la intervención de vías descendentes ni la participación de información sensorial propioceptiva o cutánea (Brown, 1911). Esto se debe a que los CPGs consisten en un arreglo de múltiples poblaciones de interneuronas con propiedades intrínsecas que les permiten, ya sea, promover el ritmo o el patrón de movimientos de la locomoción. Estas interneuronas, también tienen la capacidad de integrar y modular la información supraespinal y sensorial para adaptar la actividad locomotriz, de acuerdo con las necesidades del individuo que la ejecuta (Kiehn., 2016; Kim et al., 2017; Dougherty y Ha, 2019). Dichos circuitos neuronales fueron descritos por primera vez por T. Graham Brown, hace más de un siglo, quién determinó que las redes neuronales de la locomoción están conformadas por dos módulos independientes uno del otro, los cuales se inhiben mutuamente a través de un “sistema de fatiga” que permite la alternancia entre los movimientos de músculos flexores y músculos extensores (Brown, 1911; 1912; 1914; Figura 1).

Posteriormente, han surgido varios modelos experimentales de los CPGs, que conservan la organización propuesta por T. Graham Brown (McCrea y Rybak, 2008; Dougherty y Ha, 2019). Incluso, se ha planteado la *inexistencia* de éstos. Esta controversial hipótesis propone que la locomoción se debe a un balance entre la excitación y la inhibición, es decir, a un cambio en paralelo de las conductancias sinápticas de las motoneuronas flexoras y extensoras (Berg et al., 2007). No obstante, existe una amplia gama de evidencias que descartan fuertemente la idea del balance excitador - inhibitor a nivel de las motoneuronas. Por ejemplo, en el mismo estudio, Berg y colegas (2007) sólo llevaron a cabo registros de motoneuronas flexoras, faltando la contraparte extensora. Más tarde, Endo y Kiehn (2008) observaron que en efecto existen cambios en las conductancias inhibitoras y excitadoras de la motoneuronas flexoras y extensoras durante la locomoción, pero dichas variaciones ocurren de manera alternada y dependen del ciclo

locomotriz. En otras palabras, durante la flexión (fase activa) una motoneurona flexora exhibe conductancias excitadoras e inhibitoras, pero con un predominio de las excitadoras; mientras que una motoneurona extensora presenta también ambas conductancias, pero con un predominio de las inhibitoras. Lo que confirma la existencia de los hemicentros de T. Graham Brown.

En las siguientes secciones se abordarán los distintos modelos experimentales que explican la organización de los CPGs espinales de la locomoción.

2.1.1. Hipótesis de los hemicentros de Thomas Graham Brown

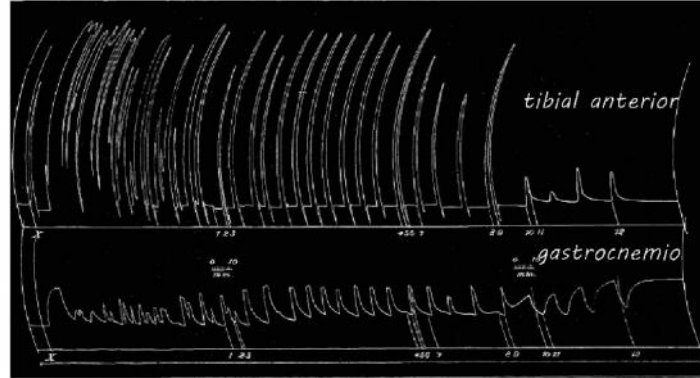
Durante años, se pensó que los movimientos rítmicos de los músculos flexores y extensores de la locomoción, eran el resultado de una serie de reflejos espinales generados por la estimulación de las fibras sensoriales (*Sherrington, 1910*). En sus estudios, Sir Charles Sherrington observó que, en efecto, había reflejos espinales que estaban relacionados con el patrón alternado de la marcha en animales descerebrados y espinalizados. A partir de ello, propuso la existencia de una inhibición mutua entre músculos flexores y extensores, la cual consistía en un reflejo unilateral flexor y un reflejo extensor cruzado, lo que sugería que la locomoción tenía un origen periférico; es decir, se generaba a partir de la información de los músculos y las articulaciones activos durante estos reflejos (*Sherrington, 1910*). Si bien, actualmente, se considera que los reflejos: flexor unilateral y extensor cruzado, son precursores de los movimientos alternados de la locomoción (*Hultborn et al., 1998*). En aquella época, T. Graham Brown planteó que los patrones motrices de la marcha tenían un origen distinto a lo propuesto por Sherrington. Para T. Graham Brown la locomoción se debía a una interacción de vías neuronales complejas en el sistema nervioso central, por lo tanto, descartaba que se tratara de una simple serie de respuestas reflejas (*Brown, 1911*).

Con base a sus observaciones, T. Graham Brown determinó que durante la locomoción una extremidad entra en contacto con el terreno, por lo que todas sus articulaciones se extienden para soportar el peso e impulsar el cuerpo hacia

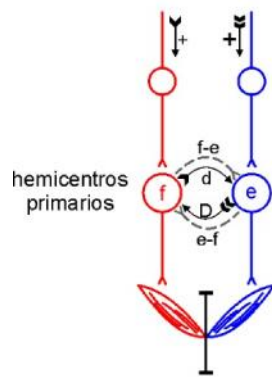
delante, mientras que la extremidad contralateral está totalmente flexionada, preparándose para dar el siguiente paso. Gradualmente la extremidad extendida comienza a flexionarse y a su vez, la extremidad flexionada se extiende poco a poco, generando así el patrón alternado característico de la marcha, el cual es modulado por la información sensorial proveniente de los músculos en movimiento y de esta manera ajustado a los cambios del terreno (*Brown, 1911*). Entonces, T. Graham Brown propuso que la ejecución precisa de los movimientos de la marcha requiere de una integración y una modulación *finas o especializadas* de los mecanismos neuronales que promueven la locomoción a nivel central, localizados en la médula espinal (*Brown, 1911; 1912*).

Con el fin de comprobar esta hipótesis, T. Graham Brown llevó a cabo estudios en animales espinalizados a nivel torácico bajo y con las raíces dorsales seccionadas, es decir, excluyendo la información supraespinal y sensorial. Observó que en estos animales se generaba una actividad alternada entre los músculos flexores y extensores, como se puede apreciar en los registros de la *Figura 1A*. Por lo que concluyó que, efectivamente, la serie de movimientos alternados y rítmicos de la marcha es un proceso llevado a cabo por redes neuronales intrínsecas de la médula espinal, cuya actividad es independiente de la información supraespinal y sensorial (*Brown, 1911; 1912*). Posteriormente, T. Graham Brown demostró que los animales que se encuentran en un estado de anestesia profunda presentan una especie de marcha refleja, a la cual denominó *narcosis progression*, que ocurría de manera espontánea después de la espinalización. Una característica de la *narcosis progression* es la supresión de los reflejos espinales. No obstante, T. Graham Brown logró registrar los reflejos flexores unilaterales al estirar un músculo flexor, pero no así reflejos extensores contralaterales. Esto lo llevó a concluir que existen dos redes neuronales independientes: una que controla la flexión y otra que domina la extensión, a las cuales denominó “hemicentros” o *Half-Centres* (*Brown, 1914; Figura 1B*).

A



Bi



Bii

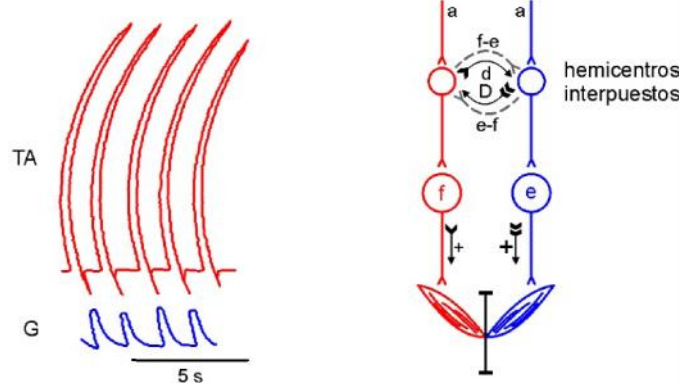


Figura 1. Modelo hipotético de T. Graham Brown: Hemicentros espinales de la marcha.
A. Registros quimográficos de la contracción del músculo flexor Tibial Anterior (TA) y del músculo extensor Gastrocnemio (G), en un gato espinalizado a nivel torácico bajo y desaferentado. Se puede notar claramente la alternancia entre la actividad del TA y del G. Con base en estos experimentos, T. Graham Brown propuso su hipótesis de los hemicentros, como dos módulos independientes: uno que controla la flexión y otro la extensión. Estos centros están comunicados por medio de un *mecanismo de fatiga*, el cual permite el patrón alternado de la marcha (*Brown, 1911*). **B.** Registros quimográficos del TA (rojo, flexión) y del G (azul, extensión), con una mayor velocidad de barrido. **Bi.** Modelo de los hemicentros primarios de T. Graham Brown, a nivel de las motoneuronas. **Bii.** Modelo de los hemicentros que contempla un hemicentro a nivel premotoneuronal, interpuesto entre las fibras aferentes propioceptivas (a) y las motoneuronas (*Brown, 1912; 1914; 1924*). En ambos bosquejos se ilustra el mecanismo de fatiga (D; d). Las flechas con doble cola indican al hemicentro activo. Mientras que el inactivo se señala con las flechas de una cola.

Con base a lo anterior y a sus estudios previos sobre la alternancia entre la actividad de los músculos flexores y extensores (*Figura 1*), T. Graham Brown postuló la siguiente hipótesis: “El patrón estereotipado y rítmico de la marcha, o *progression*, es un proceso central producido propiamente por redes neuronales de

la médula espinal, sin la intervención de la información sensorial, por lo que dista de ser un simple reflejo espinal. Asimismo, la capacidad de estos circuitos espinales para producir los patrones de la marcha, es independiente del control de centros superiores” (Brown, 1912; 1914).

Es así, que estas redes neuronales espinales de la locomoción se constituyen principalmente de dos grupos independientes de motoneuronas: uno que inerva los músculos flexores y otro que activa a los músculos extensores, denominados “*hemicentros primarios*” (Figura 1Bi), cuya inhibición mutua permite la alternancia entre la flexión y la extensión durante la marcha (Brown, 1911; 1912; 1914). A su vez, la actividad de los “*hemicentros primarios*” depende de la activación de dos grupos de interneuronas o “*hemicentros interpuestos*”, que reciben información de las aferentes musculares flexoras o extensoras. Al igual que los “*hemicentros primarios*”, los “*hemicentros interpuestos*” consisten en dos módulos independientes de interneuronas asociadas a la flexión y a la extensión, inhibiéndose el uno al otro, por medio de un sistema de *fatiga* (Brown, 1912; 1924; Figura 1 Bii).

2.1.2. Demostración de la hipótesis de los hemicentros de T. Graham Brown: Modelo de un nivel

50 años después de que T. Graham Brown propusiera su modelo de los hemicentros flexor y extensor de la locomoción, Anders Lundberg y colegas descubrieron que tras la aplicación de L-DOPA en gatos espinalizados, se deprimían los reflejos de latencia corta producidos por la estimulación de fibras aferentes del reflejo flexor (FRA) y se facilitaba una vía neuronal asociada a la aparición de reflejos de latencia larga y duración prolongadas (Andén et al., 1966 a, b). Posteriormente, a finales de los 70's Jankowska y colegas demostraron que efectivamente, la administración i.v. de L-DOPA en gatos espinalizados permitía la expresión de un circuito neuronal compatible con la hipótesis de los hemicentros (Figura 2). Observaron que la estimulación de las FRA ipsilaterales (iFRA), en presencia de L-DOPA, producía una descarga prolongada en las motoneuronas

flexoras ipsilaterales. Mientras que la estimulación de las FRA contralaterales (*coFRA*) generaba una descarga de las mismas características, pero en motoneuronas extensoras ipsilaterales (respectivamente). Asimismo, por medio de registros intracelulares de motoneuronas flexoras y extensoras, Jankowska y colegas corroboraron que la estimulación condicionante de las *coFRA* producía una inhibición en los EPSPs de latencia larga producidos por la estimulación de las *iFRA*, y viceversa. Por la latencia entre la estimulación condicionante y los EPSPs se concluyó que se generaba una inhibición recíproca a nivel premotoneuronal, en los circuitos neuronales de la locomoción (*Jankowska et al., 1967 a; Figura 2 A; C*).

Además, Jankowska y colegas, observaron que la L-DOPA producía un patrón de alternancia (flexión-extensión) característico de la locomoción, minutos después de haber sido inyectada. Ello los llevó a proponer que las vías reflejas activadas por las FRA forman parte de los hemicentros de la marcha (*Jankowska et al., 1967a; Lundberg, 1981*). De hecho, estos autores también registraron extracelularmente interneuronas en la lámina VII de Rexed, las cuales disparaban rítmicamente con las fases de flexión o extensión, y eran activadas por la estimulación de las FRA ipsi o contralaterales, respectivamente. (*Jankowska et al., 1967b; Lundberg, 198; Figura 2B*).

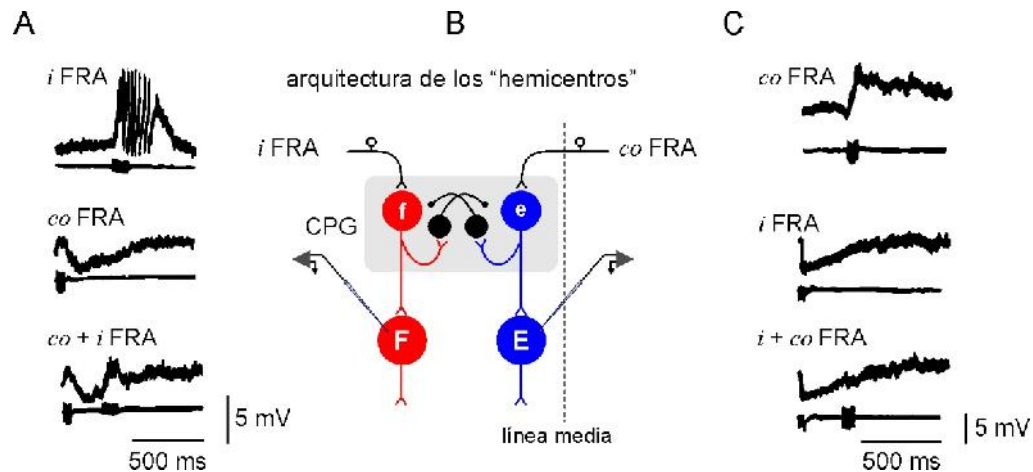


Figura 2. Modelo de un solo nivel basado en la arquitectura de los hemicentros y considerando las vías refleja de las FRA en presencia de L-DOPA. **A** Trazo superior, registro intracelular de una motoneurona flexora al estimular aferentes del reflejo flexor ipsilaterales (*i*FRA) con un tren de pulsos (estímulo de prueba). Trazo intermedio, registro de la misma motoneurona al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes del reflejo flexor contralaterales (*co*FRA). Trazo inferior, aplicación del estímulo de prueba precedido por el estímulo condicionante un intervalo de ~ 250 ms. Nótese la inhibición de los EPSPs producidos por la estimulación de las *co*FRA. **C.** Mismo formato que en A, pero con el registro de una motoneurona extensora ipsilateral. En este caso, el estímulo de prueba fue aplicado a las *co*FRA y el estímulo condicionante a las *i*FRA. Nótese la inhibición de los EPSPs producidos por la estimulación de *i*FRA. Es importante enfatizar que la inhibición de los reflejos FRA ocurre después de la inhibición registrada en las motoneuronas, es decir, a nivel premotoneuronal. Con base en estos datos se confirmó el modelo de los CPGs, basado en la organización de los hemicentros, los cuales se inhiben de manera recíproca a nivel premotoneuronal (Jankowska *et al.*, 1967 *a, b*. Modificada de Lundberg, 1981), como se ilustra en el esquema en **B**. En rojo está representado el hemicentro flexor (f; F) y en azul el hemicentro extensor (e; E)

Gracias a los trabajos de Lundberg y colegas, descritos anteriormente, fue posible demostrar la hipótesis de T. Graham Brown. Ello permitió que se plantearan varios modelos experimentales de los CPGs de la locomoción, cuya arquitectura obedece la hipótesis de los hemicentros flexor y extensor. El primero fue propuesto por Lundberg en 1981, basado en los estudios de *Jankowska et al.*, 1967 *a, b*. Este se conoce como “*modelo de un solo nivel*”, cuyas características son: *i*) conformación por dos grupos de interneuronas excitadoras (hemicentros): un grupo proyectando a las motoneuronas flexoras y otro a las extensoras, respectivamente (*Figura 2B*). *ii*) Interconexión inhibitoria mutua entre el hemicentro flexor y el extensor que permite la alternancia del patrón locomotriz. *iii*) Un mecanismo de “fatiga” que reduce la excitación del centro activo, permitiendo una reducción en la inhibición del hemicentro inactivo. *iv*) La inhibición de los músculos

antagonistas debe estar acoplada a la excitación de los agonistas (*Lundberg, 1981; McCrea y Rybak, 2008*).

Entonces, el modelo de un solo nivel establece que la alternancia flexión-extensión de la actividad locomotriz, es el resultado de la organización intrínseca de las interneuronas en cada hemicentro de la médula espinal, tal y como lo postuló T. Graham Brown. Sin embargo, también considera que el patrón locomotriz debe ser modulado por la información sensorial proveniente de las FRA, directamente sobre los CPGs y no sobre las motoneuronas. (*Lundberg 1981; Figura 2B*).

2.1.3. Modelo de las unidades generadoras de ráfagas, UBG (*unit burst generators*)

El modelo de un solo nivel puede explicar que los CPGs sean capaces de generar un patrón locomotriz estereotipado. No obstante, la locomoción comprende movimientos más sofisticados que la simple alternancia entre la flexión y la extensión. De hecho, en su estudio sobre la marcha real de gatos en libre movimiento, *Engberg y Lundberg (1969)* describieron dos fases importantes y que son la base de la marcha: el balanceo y el apoyo. Con base a los registros de electromiogramas (EMGs) de los músculos en movimiento, estos autores establecieron que las fases de la locomoción se subdividen en 4 etapas: flexión (F), primera, segunda y tercera extensión (E1, E2 y E3) (*Figura 3A*). La fase de balanceo comienza con la flexión de las articulaciones de la cadera, rodilla y tobillo. En seguida, de manera gradual, se exhibe una ligera extensión de la rodilla y el tobillo (E1); lo que permite que la extremidad se mueva hacia adelante para soportar el peso del cuerpo e iniciar la fase de apoyo. Posteriormente, las articulaciones de la rodilla y tobillo se flexionan levemente, aun cuando los músculos correspondientes se encuentran en extensión. Ello se debe al “muelleo” que ocurre al soportar el peso del cuerpo en las extremidades. Al mismo tiempo, la articulación de la cadera empieza a extenderse (E2), lo cual contribuye al equilibrio

y soporte del cuerpo. Finalmente, durante la tercera extensión, E3, la fuerza de contracción de los músculos extensores de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) se incrementa; es decir, la extremidad se encuentra totalmente extendida para impulsar el peso del cuerpo y dar el siguiente paso (propulsión de la zancada), (Engberg y Lundberg, 1969; Rossignol, 1996).

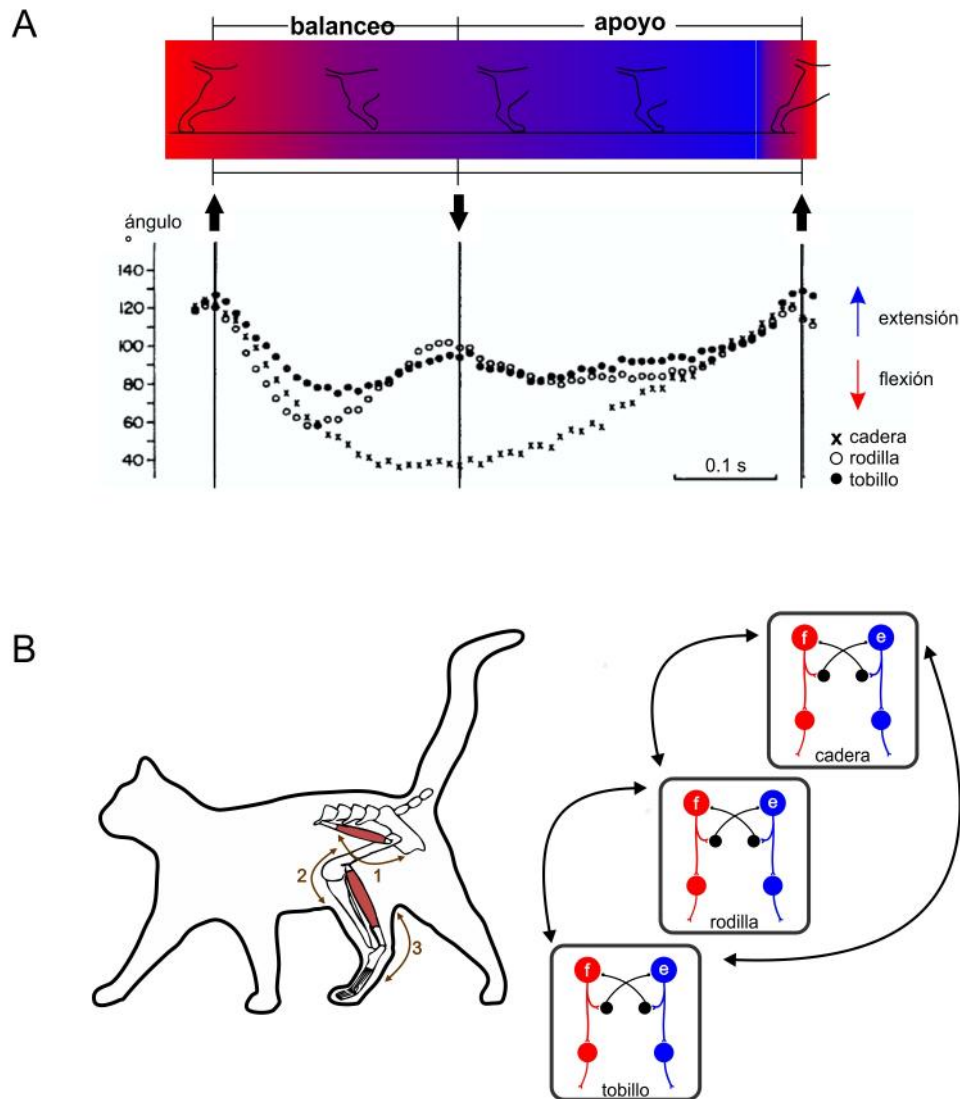


Figura 3. Modelo de las unidades generadoras de ráfagas (UBG), basado en el movimiento de las articulaciones durante la marcha. A. El esquema superior representa los movimientos de la extremidad posterior del gato durante la marcha. Mientras que la gráfica inferior muestra los cambios en el ángulo de las tres articulaciones (cadera, rodilla y tobillo) durante las fases de

balanceo y apoyo. La flecha azul hacia arriba, indica los movimientos durante la extensión. La flecha roja hacia abajo, los movimientos durante la flexión. Modificada de: *Principles of Neural Science 5a Ed; Engberg y Lundberg, 1969*. **B.** Modelo de la unidad generadora de ráfagas (UBG) propuesta por *Grillner y Zangger (1979)*. El esquema del gato, ilustra los movimientos de cada articulación (cadera 1, rodilla 2 y tobillo 3), durante la marcha. Así como la interacción entre ellas. Para que esto ocurra, debe existir un CPG correspondiente para cada articulación; los cuales se encuentran comunicados entre sí a través de conexiones excitadoras, como se indica en el esquema (flechas negras). En este modelo aún prevalece la propuesta de un solo nivel en la estructura del CPG, con un hemicentro flexor y otro extensor.

Más tarde, *Grillner y Zangger (1979)* confirmaron que es posible inducir locomoción ficticia por la administración de L-DOPA en gatos espinalizados. Aun en ausencia de la información sensorial, ya sea por la sección de las raíces dorsales o tras la administración de curare. Asimismo, encontraron que los grupos de músculos (flexores o extensores) presentan un patrón motriz de acuerdo con la articulación en movimiento (cadera, rodilla o tobillo). Por lo que, concluyeron que la actividad de cada articulación era independiente, produciéndose un movimiento secuencial y preciso en cada extremidad. En consecuencia, debe existir un CPG en cada lado para lograr, así, la alternancia ipsilateral-contralateral durante la marcha y la sincronía de las extremidades en el galope. Entonces, los CPGs no sólo producen una alternancia entre la flexión y la extensión, sino que, además, pueden generar patrones motrices más especializados. Por lo que *Grillner y Zangger (1979)* propusieron que la arquitectura de los CPGs está constituida por unidades generadoras de ráfagas (UBG, *unit burst generators*), que controlan subgrupos de motoneuronas para los músculos de cada articulación (cadera, rodilla y tobillo) de una sola extremidad (*Figura 3B*). Lo que implica que la UBG ipsilateral debe estar comunicada con la UBG de la extremidad contralateral. De tal manera, que se generen adecuadamente los movimientos de la marcha o de cualquier otro subtipo de locomoción (galope, *v.gr.*) (*Grillner y Zangger, 1979*).

Es importante enfatizar que el modelo de las UBG conserva la organización de los hemicentros de T. Graham Brown. Dicho de otra manera, cada UBG está constituida por un CPG de un solo nivel, que a su vez, establece conexiones excitadoras recíprocas con las UBG de otras articulaciones de la misma extremidad, como se ilustra en la *Figura 3B* (*Grillner y Zangger, 1975; Grillner, 1981*).

Lo anterior, corrobora que la locomoción es un conjunto de movimientos complejos que se pueden adaptar gracias a la información sensorial de los

músculos de cada articulación de la extremidad en movimiento (*Engberg y Lundberg 1969; Grillner y Zangger, 1975, 1979*).

2.1.4. Modelo de dos niveles

Si bien, el modelo de las UBG contempla la participación de la información sensorial proveniente de cada articulación, para la generación de distintos subtipos de locomoción (marcha, galope, *v.gr.*). Existen músculos que participan en el movimiento de una o más articulaciones, por lo que exhiben un patrón motriz dual. Es decir, pueden activarse durante la flexión y la extensión, dependiendo de la fase locomotriz (balanceo o apoyo) (*Perret y Cabalguen, 1976*).

En sus trabajos sobre la marcha, Perret y Cabelguen observaron, en el gato talámico y con locomoción espontánea, que además de los músculos puramente flexores o extensores, hay músculos que exhiben un patrón de activación más complejo durante ambas fases. Por lo que, se denominan músculos bifuncionales. Esto los llevó a suponer que la locomoción consta de una fase flexora, una extensora y dos fases de transición (*Perret y Cabelguen, 1980*). Con base en las observaciones de registros intracelulares de motoneuronas durante la marcha, estos autores propusieron un modelo en el cual las motoneuronas flexoras y extensoras reciben conexiones excitadoras de los hemicentros flexor y extensor, respectivamente. Mientras que las motoneuronas bifuncionales reciben conexiones de ambos hemicentros, por medio de un subgrupo de interneuronas premotoneuronales (*Figura 4Ai*), sobre todo durante las fases de transición del ciclo locomotriz. Asimismo, en su modelo consideraron que los hemicentros controlaban la temporalidad de los ciclos locomotrices y que operaban de forma independiente a la red premotoneuronal formadora de patrones. Por lo tanto, el ritmo locomotriz y los patrones de disparo de las motoneuronas eran hasta cierto punto independientes (*Perret y Cabelguen, 1980, Figura 4A*).

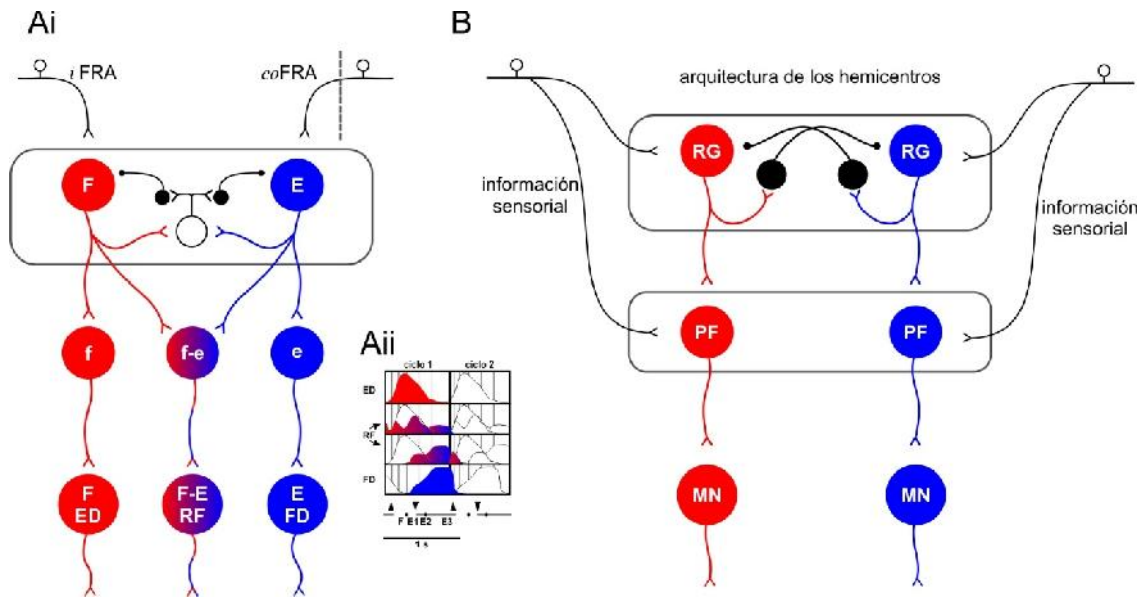


Figura 4. Modelo de doble nivel conformado por un generador del ritmo y una red formadora de patrones. Ai. Modelo Propuesto por Perret y Cabelguen (1980), el cual consiste en un primer nivel encargado de generar el ritmo de la locomoción, con base en la arquitectura de los hemicentros flexor (F, rojo) y extensor (E, azul), con una inhibición mutua mediada por una neurona excitadora interpuesta (círculo blanco). Este generador del ritmo (marcado por el rectángulo) a su vez, envía información a un segundo nivel integrado de subpoblaciones de interneuronas: flexoras (f), extensoras (e) o bifuncionales (f-e, que reciben información de ambos hemicentros), a fin de determinar el patrón de disparo de las motoneuronas. Aii. EMGs de músculos flexor del tobillo (ED, *extensor digitorum*), extensor del tobillo (FD, *flexor digitorum*) y bifuncional extensor de la rodilla y flexor de la cadera (RF, *rectus femoris*), durante las fases de la marcha (F; E1; E2 y E3). Adaptada de Perret y Cabelguen, (1980). **B.** Modelo de doble nivel propuesto por el grupo de McCrea (basado en las *resetting deletions*). El cual consiste en un nivel regulador del ritmo (RG) y una red formadora de patrones (PF) interpuesta entre el RG y las motoneuronas. Ambos niveles reciben información sensorial y conservan el arreglo de los hemicentros flexor (rojo) y extensor (azul). Basada en McCrea y Rybak, (2008).

Otro hallazgo importante que sentó las bases para el modelo actual de un CPG de dos niveles, son las “*deletions*” o ausencias espontaneas de la actividad flexora o extensora durante la locomoción ficticia (McCrea y Rybak, 2008). Estas *deletions* se manifiestan como periodos silentes en la actividad de un grupo de motoneuronas durante la locomoción ficticia. Por ejemplo, la flexión puede estar

ausente en uno o varios ciclos de la locomoción, mientras que la extensión prosigue con su ritmo normal, o viceversa (Rybak et al., 2006a).

El grupo de McCrea observó que existen dos tipos de *deletions* durante la locomoción ficticia. *i)* Aquellas asociadas a un desfaseamiento o interrupción de los ciclos de la locomoción, produciendo un cambio de la temporalidad de estos. Por lo que se les denominó: *resetting deletions*, las cuales deben ocurrir en una población de interneuronas encargadas de generar y controlar el ritmo de la locomoción. Este primer nivel se conoce como generador del ritmo (RG, *rhythm generator*). *ii)* Las *non-resetting deletions*, que están asociadas con la ausencia de actividad en las motoneuronas flexoras o extensoras, modificando el patrón motriz de la locomoción, sin alterar el ritmo de esta (Rybak et al. 2006 a, b). Debido a ello, las *non-resetting deletions* deben generarse mediante otra población de interneuronas, denominada red formadora de patrones (PF, *pattern formation*), que constituyen el segundo nivel y que se encuentran interpuestas entre el RG y las motoneuronas (Rybak et al., 2006b; Figura 4B).

Es así, como la separación de los CPGs en dos niveles, un RG y una PF, permite explicar el control independiente de la generación del ritmo locomotriz y de los patrones motrices que se manifiestan en la actividad de las motoneuronas durante la locomoción. Al mismo tiempo, este modelo explica la influencia de las vías aferentes propioceptivas y cutáneas sobre el RG, sin afectar los patrones de activación de las motoneuronas; o sobre la PF, sin cambiar la temporalidad de los ciclos de la locomoción (Rybak et al., 2006 b; McCrea y Rybak, 2008; Figura 4B).

2.2. El papel de la información sensorial en el control de la locomoción

Se ha establecido que los CPGs espinales, *per se*, tienen la capacidad de generar el patrón alternado de la locomoción (*Brown 1911; 1914*). Sin embargo, debido a que esta se desarrolla en distintos ambientes con características muy variadas entre sí; se requiere de un control especializado que permita la adaptación de los movimientos que la componen. Dicha modulación es llevada a cabo, principalmente, por la información sensorial propioceptiva y cutánea. Sin descartar la influencia de vías y comandos motrices descendentes que determinan el tipo de actividad locomotriz a ejecutar (*Rossignol et al., 2006; Kim et al., 2017; Côté et al., 2018*). En cuanto al control sensorial de la locomoción, se refiere, se ha descrito que la información propioceptiva y cutánea pueden modular la actividad de los CPGs espinales. Ya sea, modificando el ritmo y temporalidad de los ciclos locomotrices; o bien, alterando el patrón de disparo de las motoneuronas. En otras palabras, las fibras aferentes de los músculos y articulaciones en movimiento tienen acceso tanto al generador del ritmo como a la red formadora de patrones (*McCrea 2001; Rybak et al., 2006 a, b; McCrea y Rybak, 2008*).

2.2.1. Modulación del ritmo y del patrón locomotrices por las fibras aferentes propioceptivas de bajo umbral

La principal función que se ha atribuido a las aferentes musculares del grupo I, es la regulación de la transición entre las fases de apoyo y balanceo. Así como, la adaptación de los movimientos de acuerdo con las demandas del entorno que surjan. *Forsberg y Grillner (1973)* propusieron que la información propioceptiva de las extremidades activas durante la marcha de gatos espinalizados, en una banda sin fin, puede modificar los patrones motrices y adaptar el ritmo locomotriz a los cambios de velocidad en la banda. Posteriormente, *Grillner y Rossignol (1978)* observaron que al mantener flexionada la articulación de la cadera de la extremidad ipsilateral posterior de gatos descerebrados con locomoción real (en una banda sin fin), se interrumpía la marcha en dicha extremidad, pero continuaba en el lado contralateral. En cambio, al extender la misma articulación con un

ángulo mayor a 95° , se reanudaba la marcha en el lado ipsilateral (*Figura 5A*), por lo que concluyeron que la información propioceptiva de la cadera es crucial para iniciar la fase de balanceo, permitiendo el comienzo de la locomoción.

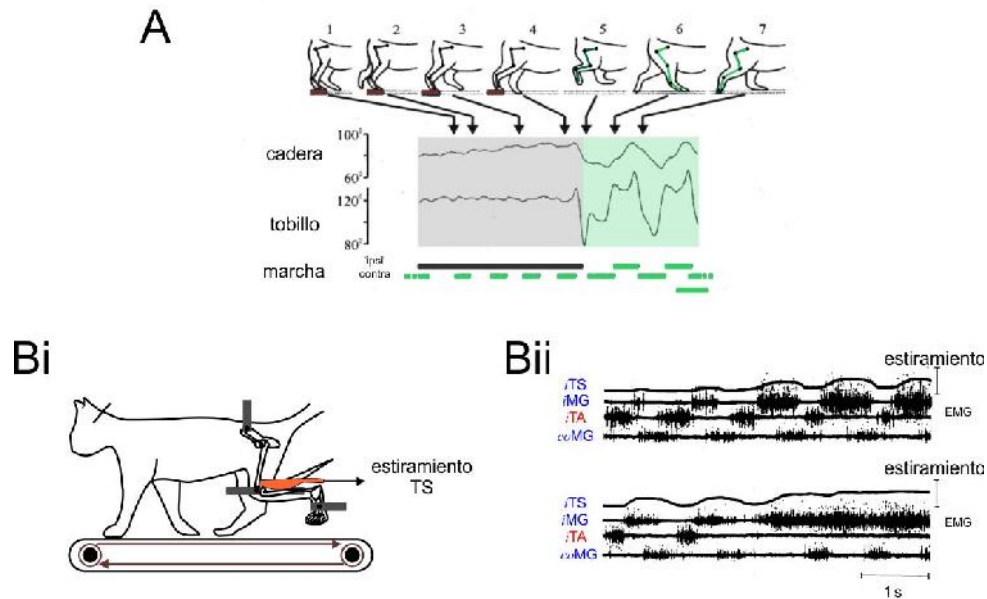


Figura 5. La información sensorial propioceptiva regula la transición de las fases de la locomoción. **A.** El esquema ilustra que al fijar manualmente (barras marrones) la articulación de la cadera, con un ángulo menor de 90° se suprime la marcha en la extremidad ipsilateral (indicado por el color gris). No obstante, cuando se extiende la cadera a un ángulo de 95° (silueta 5) se reanuda la marcha en la extremidad ipsilateral (indicado por el color verde). Asimismo, se observa que el movimiento en la extremidad contralateral se mantiene (*Modificada de Grillner y Rossignol, 1978*). **Bi.** Diagrama experimental de un gato descerebrado (línea inclinada) con locomoción real en una banda sin fin. Se ilustran el estiramiento (estimulación) en los músculos extensores del tríceps surae (TS) y la extremidad ipsilateral extendida con un ángulo de la cadera mayor a 90° . **Bii.** Panel superior: se observa que el estiramiento del TS tiene la capacidad de sincronizarse con la actividad de los músculos extensores ipsilaterales (iMG: gastrocnemio medial ipsilateral). Panel inferior: Cuando se estira el musculo del TS de manera sostenida se suprime totalmente la flexión ipsilateral (iTA) y se produce una actividad tónica y prolongada en los músculos extensores ipsilaterales (iMG; *Modificada de Duysens y Pearson 1980*).

Por su parte, *Duysens y Pearson (1980)* observaron en el gato descerebrado con locomoción espontánea, que la extensión manual de los músculos extensores del talón de Aquiles suprimía la marcha en la extremidad ipsilateral al estímulo. Lo anterior los llevó a proponer que el inicio de la fase de balanceo, no sólo depende del ángulo de extensión de la cadera, sino que también requiere una disminución

en la fuerza de contracción de los músculos extensores del tobillo. Asimismo, encontraron que al estirar brevemente los músculos extensores del tobillo durante la locomoción, se producía un acortamiento de la fase flexora. Mientras que un estímulo más prolongado generaba una supresión total de la flexión (*Figura 5B*). Con base a ello, determinaron que el incremento en la fuerza de contracción de muslos extensores del tobillo inhibe la flexión durante la fase de balanceo, previniendo el inicio de la marcha. Es decir, la información proveniente de fibras propioceptivas extensoras regula el ciclo locomotriz, y por ende la transición entre las fases de apoyo y balanceo.

Efectivamente, la estimulación eléctrica de aferentes del grupo I de nervios extensores, durante la fase de flexión de la locomoción inducida por L-DOPA en gatos descerebraos, interrumpe la flexión en curso y anticipa la fase de extensión. Este cambio en el ritmo locomotriz se denomina *resetting extensor* (*Conway et al., 1987; Figura 6A*), el cual, posiblemente, está asociado a la expresión de EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, durante la locomoción ficticia (*Schomburg y Behrends, 1978; Gossard et al., 1994; Figura 7*). Asimismo, se ha descrito que una estimulación más fisiológica, por medio del estiramiento de los músculos extensores, para activar a las fibras del grupo Ib provenientes de los órganos tendinosos de Golgi (OTG), genera el *resetting extensor*. Mientras que la aplicación de vibración en el tendón de Aquiles (activación específica de las fibras Ia de los husos musculares (HM)) no produce cambios en el ritmo locomotriz. (*Conway et al., 1987; Pearson y Collins, 1993*). Por consiguiente, el *resetting* hacia la extensión, se debe, principalmente, a la acción de las fibras Ib. Ello sugiere que dichas fibras acceden al generador del ritmo de los CPGs espinales (*Figura 7B*) y, por lo tanto, tienen un papel fundamental en la modulación de la temporalidad de los ciclos de la locomoción.

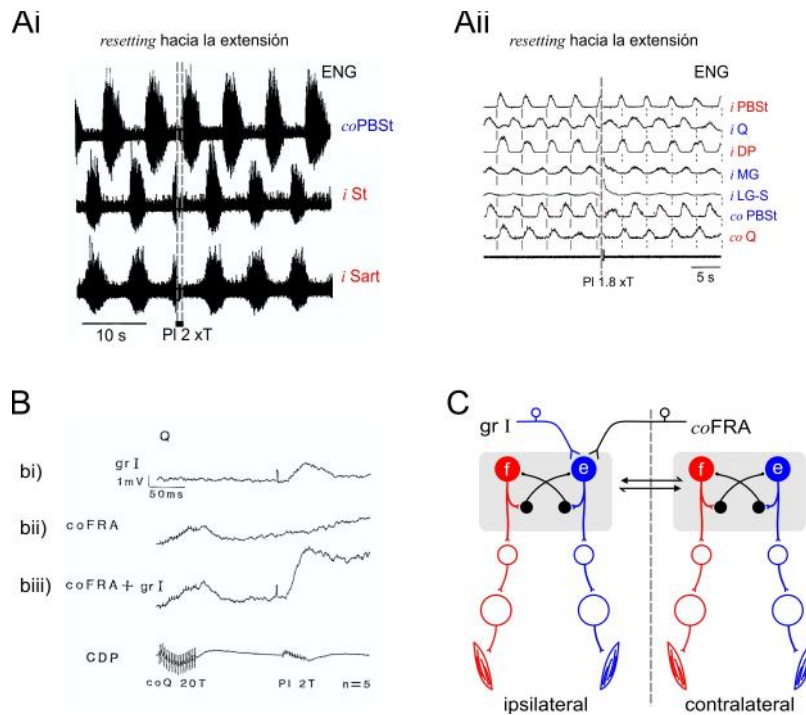


Figura 6. La estimulación de las fibras extensoras del grupo I durante la flexión de la locomoción ficticia, produce un *resetting* hacia la extensión. **Ai.** De arriba abajo, electroneurogramas (ENG) de los nervios bíceps posterior y semitendinoso contralaterales (*coPBSt*), semitendinoso ipsilateral (*iSt*) y sartorio ipsilateral (*iSart*). La estimulación del nervio plantaris (PI) con una intensidad 2 xT durante la fase de flexión, interrumpe de manera abrupta la flexión en curso y adelanta la extensión subsiguiente (líneas punteadas), es decir, produce un “*resetting*” hacia la extensión (Conway *et al.*, 1987). **Aii.** Episodio de locomoción con los ENG rectificadas de los nervios ipsilaterales: *iPBSt*; *iQ* (cuádriceps), *iDP* (peroneo profundo); *iMG* (gastrocnemio medial); *iLG-S* (gastrocnemio lateral y soleo); y de los contralaterales *coPBSt* y *coQ*. La activación de las fibras extensoras del grupo I (PI 1.8 xT) produce un desfaseamiento de la flexión (líneas punteadas) y un adelanto de la extensión (Schomburg *et al.*, 1998). Las líneas continuas marcan el inicio de la flexión, previo al estímulo. Los nervios en rojo exhibieron una actividad flexora y los marcados en azul extensora. **B.** Registro intracelular de una motoneurona extensora del nervio cuádriceps (Q) al estimular: bi) las fibras del grupo I (trazo superior, PI 2 xT); bii) las FRA contralaterales (*coFRA*, *coQ* 20 xT). biii) Al estimular el nervio PI, precedido de la estimulación condicionante en las *coFRA*. En este caso es evidente que se produce una facilitación de los EPSPs en la motoneurona registrada (Gossard *et al.*, 1994). Sugiriendo que hay una convergencia entre las fibras extensoras del grupo I y las *coFRA* a nivel del CPG en el hemicentro extensor, como se ilustra en **C**, donde se representan los CPGs ipsi y contralaterales; con un arreglo basado en el modelo del doble nivel (el RG está indicado por el rectángulo gris y la PF, como la red de neuronas interpuesta).

Es evidente que la información propioceptiva proveniente de los músculos extensores ejerce un control positivo sobre el ritmo locomotriz, favoreciendo la fase de extensión. Por lo que es importante dilucidar qué vías interneuronales de los CPGs integran la información sensorial de músculos extensores. *Gossard y colegas (1994)* registraron extracelularmente interneuronas en el núcleo intermedio de la médula espinal, y observaron que eran activadas por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I. Además, estas interneuronas disparaban repetitivamente durante la fase de extensión y en respuesta a la estimulación de las *coFRA*, como lo habían reportado previamente *Jankowska et al., 1967 a, b*. Estos hallazgos indican que existe una vía interneuronal que es modulada por la información sensorial transmitida por las aferentes Ib y por las FRA contralaterales. Por lo que las interneuronas de esta vía deben formar parte del RG del hemicentro extensor de la locomoción (*Gossard et al., 1994; Figura 6 B y C*).

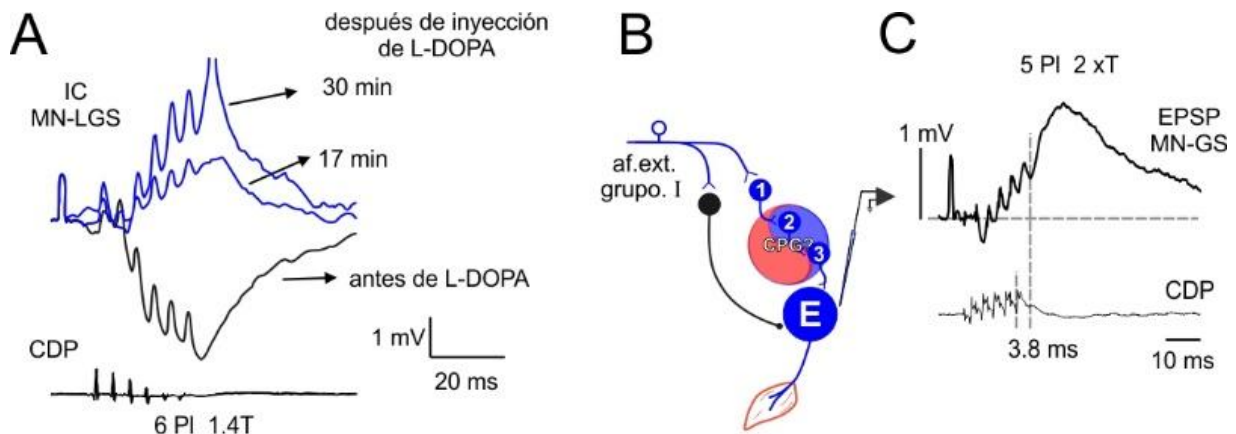


Figura 7. Durante la locomoción ficticia, la estimulación de las fibras extensoras del grupo I facilita la expresión de una vía oligosináptica excitadora. **A.** Registro intracelular (IC) de una motoneurona extensora del gastrocnemio lateral y sóleo (MN-LGS). Trazo en gris, IPSPs (correspondientes a la inhibición no recíproca), producidos por un tren de 6 pulsos al nervio PI con una intensidad 1.4 xT, antes de la administración de L-DOPA (en reposo). Trazos en azul, EPSPs generados por el mismo estímulo 17 y 30 min después de la administración de L-DOPA. Trazo inferior, salva aferente registrada en el dorso de la médula espinal (CDP) (Adaptada de *Gossard et al. 1994*). **B.** Representación esquemática de la facilitación de una vía interneuronal excitadora, integrada por 3 interneuronas interpuestas entre las fibras extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras; la cual posiblemente forma parte del CPG (hemicentro extensor, parte azul del yin-yang). También se ilustra la inhibición no recíproca (interneurona en negro) que es reducida durante la locomoción. **C.** Registro intracelular de una motoneurona del GS (MN-GS). Al estimular las fibras del grupo I de PI (5 pulsos. 2 xT), se observa la expresión de EPSPs oligosinápticos con una latencia de 3.8 ms. Lo que sugiere una vía de 3 interneuronas interpuestas (registro original).

Aunque se ha descartado la participación de las fibras Ia de los HM, en la generación del *resetting* extensor, estas fibras también tienen la capacidad de regular el patrón motriz de la locomoción. *Guertin et al., (1995)* encontraron que la activación selectiva de las aferentes extensoras Ia, a través de estiramientos breves en los músculos del tobillo, durante la fase de extensión de la locomoción ficticia (inducida por estimulación de la MLR) produce un incremento en la amplitud de la actividad extensora y una prolongación en la duración de esta, sin alterar la temporalidad de los ciclos locomotrices. A este fenómeno se le conoce como “*extension enhancement*”. A su vez, se ha demostrado que las fibras Ia de músculos extensores también participan en la facilitación de una vía excitadora disináptica, expresada únicamente durante la fase de extensión de locomoción ficticia. Al igual que la vía excitadora polisináptica descrita por *Gossard et al. (1994)*, la manifestación de esta vía disináptica implica un incremento en la fuerza de

contracción de los músculos extensores, a fin de dar mayor soporte al cuerpo durante la fase de apoyo (McCrea et al., 1995; Angel et al., 1996). No obstante, la expresión de estos EPSPs disinápticos (propios de la extensión) se observa en algunas preparaciones de locomoción ficticia, mientras que en otras no. Por ello, se ha propuesto que la vía excitadora disináptica recibe información desde el hemicentro extensor, es decir, se trata de una vía seguidora del CPG de la locomoción (Angel et al., 2005; Figuras 18A y 19B)

En cuanto a la información sensorial de músculos flexores, existe evidencia de que las aferentes flexoras del grupo II provenientes de los HM pueden modular los ciclos locomotrices. Por ejemplo, durante la locomoción ficticia (inducida por la activación eléctrica de la MLR) en gatos descerebrados, se ha descrito una vía interneuronal relacionada con un cambio en la temporalidad de los ciclos locomotrices. Estas interneuronas se localizan en el núcleo intermedio; reciben conexiones desde las fibras del grupo II y proyectan directamente hacia los núcleos motrices (Perreault et al., 1995). Efectivamente, la estimulación de las aferentes del grupo II de nervios flexores durante la fase flexión, genera un *resetting* extensor, similar a las fibras Ib de músculos extensores (Conway et al., 1987; Figura 6A). Mientras que la activación de las mismas fibras durante la fase de extensión no produce cambios en el ritmo locomotriz. Lo anterior sugiere que la información proveniente de las aferentes flexoras del grupo II tiene acceso al RG del hemicentro extensor (Perreault et al., 1995)

Por otro lado, Hiebert et al. (1996) investigaron la participación de las aferentes flexoras del grupo I en la modulación del ritmo locomotriz. Observaron que la estimulación de las aferentes del grupo I de nervios flexores de la articulación de la cadera promueve la fase de balanceo del animal descerebrado con locomoción espontánea. Además, encontraron que la activación de aferentes flexoras del grupo Ia durante la fase de apoyo, interrumpe la extensión en curso y adelanta la flexión, generando un *resetting* hacia la flexión en la extremidad ipsilateral, y un acortamiento de la flexión contralateral, con el correspondiente adelanto de la extensión. En cambio, la estimulación eléctrica de las fibras flexoras de los grupos I y II, durante la extensión, produce un cambio del ritmo de la

locomoción favoreciendo la flexión. Por consiguiente, las aferentes de los grupos Ia y II provenientes de músculos flexores promueven la activación del hemicentro flexor con la consecuente inhibición del hemicentro extensor (*Hiebert et al., 1996*).

Posteriormente, *Stecina et al., (2005)* observaron en el gato con locomoción ficticia inducida por estimulación de la MLR que, efectivamente, la activación de las aferentes flexoras de bajo umbral genera un *resetting* hacia la flexión, pero además puede producir un incremento en la duración y amplitud de la extensión (*extensor enhancement*). Entonces, la estimulación de las fibras de los grupos I y II de nervios flexores de la articulación del tobillo, durante la flexión, produce dos fenómenos: *i)* un adelanto del inicio de la flexión, una prolongación de ésta y por ende un retraso de la extensión, o bien, *ii)* un *resetting* extensor. Lo anterior depende del nervio estimulado (*Stecina et al., 2005*), es decir, de las fibras aferentes activadas. Estas observaciones sugieren un control sensorial bastante especializado y específico de los CPGs de la locomoción.

2.2.2. Modulación del ritmo y del patrón locomotrices por las FRA y las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral

Del mismo modo que las fibras propioceptivas de bajo umbral, las aferentes cutáneas, articulares y musculares de alto umbral (agrupadas como FRA) desempeñan un control sobre la actividad de los CPGs. De hecho, *Schomburg et al. (1998)* reportaron que las FRA son capaces de modificar el ritmo locomotriz, y que esta regulación depende de la fase en la cual se hayan activado. Observaron que la estimulación de las FRA al inicio de la flexión acorta la duración de esta y se produce un adelanto de la extensión (*resetting extensor; Conway et al., 1987; Figura 6A*), mientras que al activar las FRA a mitad de la flexión, se produce una interrupción transitoria de la misma, con un adelanto de la extensión. Por último, si la estimulación de las FRA ocurre al final de la flexión, ésta se suprime por completo. Con base en estos resultados, se ha propuesto que las FRA deben tener acceso al generador del ritmo de la locomoción, es decir, a los hemicentros,

tal y como se había propuesto anteriormente (*Jankowska et al., 1967 a y b; Lundberg, 1979*).

Finalmente, se sabe que la información proveniente de las aferentes cutáneas de bajo umbral es crucial para adaptar los movimientos en respuesta a un obstáculo y así evitar un tropiezo durante la locomoción (*Forssberg, 1979; Quevedo et al., 2005 a, b*). Estos reflejos compensatorios son de suma importancia para mantener el equilibrio del cuerpo durante la marcha y se les conoce como “*reacción correctiva del tropiezo o stumbling correction response*”, la cual se caracteriza por: *i)* Una descarga de latencia corta en los músculos flexores al presentarse un obstáculo durante la fase de balanceo, evitando así el tropiezo. *ii)* Una supresión de la actividad locomotriz, seguida de una descarga en los músculos extensores y un incremento de la actividad flexora durante la fase de balanceo (*Forssberg, 1979*). Para que se produzca esta compensación del patrón motriz y de las fases de la locomoción, es necesario que la información de aferentes cutáneas tenga acceso a los CPGs.

A fin de corroborar lo anterior, McCrea y su grupo (*Quevedo et al., 2005b*) estudiaron los mecanismos involucrados en la “*reacción correctiva al tropiezo*” en el gato descerebrado con locomoción ficticia inducida por la estimulación de la MLR. Observaron que al estimular las fibras de bajo umbral del nervio peroneo superficial (SP, que inerva la superficie dorsal de la pata) durante la fase de flexión, se produce una excitación breve registrada en los nervios flexores de la articulación del tobillo, seguida de una inhibición. No obstante, los nervios flexores de la rodilla se activan en fase con los nervios extensores del tobillo. Posterior a la estimulación eléctrica del SP, se observa una descarga prolongada en los nervios flexores del tobillo. Por otro lado, si el nervio SP se estimula durante la fase de extensión, se genera una descarga más prolongada en los nervios extensores de la articulación del tobillo, con un incremento en la actividad de los nervios flexores. Esto sugiere que las aferentes cutáneas del nervio SP tienen acceso al hemicentro flexor (*Quevedo et al., 2005a*). No obstante, puesto que la activación de las fibras aferentes cutáneas del nervio SP producen una facilitación de la extensión, pero

no un cambio del ritmo, se propuso que estas fibras no tienen acceso al hemicentro extensor del CPG (*Quevedo et al., 2005a, b*).

Si bien, aún no se ha dilucidado con certeza cuáles son las vías neuronales encargadas del control sensorial del CPG. Hasta el momento, podemos decir que la información sensorial cutánea y propioceptiva de fibras de bajo umbral, así como la información transmitida por las FRA, pueden modular el patrón y el ritmo de la locomoción. De tal manera que su principal función es el control de la transición entre las fases de apoyo y balanceo, además de adaptar los movimientos al entorno en el que se lleva a cabo la locomoción.

2.3. Control descendente de la locomoción

En secciones anteriores se ha establecido que la locomoción se puede definir como el conjunto de movimientos “estereotipados”, que siguen un patrón básico y rítmico. Sin embargo, se trata de una actividad motriz que depende del entorno y las condiciones donde se desarrolle. Es por eso que los circuitos espinales que la generan requieren del control de la información sensorial y descendente para ser adaptada de acuerdo con las necesidades intrínsecas y externas del individuo que la ejecuta (*Kim et al., 2017*). Por lo tanto, el inicio de la locomoción depende de factores muy diversos, tales como: la exploración del medio ambiente, huir de un depredador o la búsqueda de alimento. Esto involucra la participación de los sistemas: olfativo, auditivo, visual y motriz; en conjunto con la activación de estructuras subcorticales como los ganglios basales (GB) o los núcleos lateral y medial del hipotálamo (*Rossignol, 1996; Whelan, 1996; Kim et al., 2017*). Entonces, se puede decir que la locomoción es una actividad motriz ampliamente dinámica, en la que interactúan diversas áreas del sistema nervioso.

En esta sección se abordarán únicamente aquellos centros superiores relacionados directamente en el control descendente de los CPGs espinales (*Figura 8*).

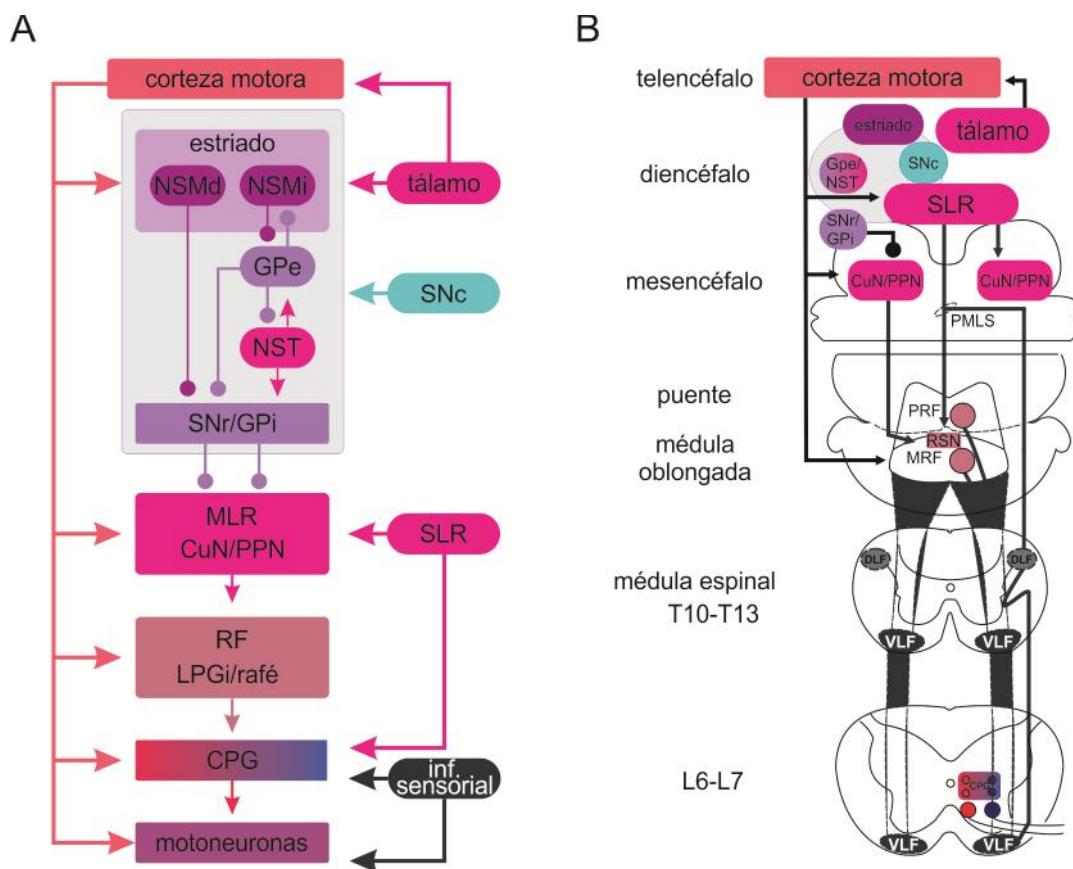


Figura 8. Vías descendentes que controlan la locomoción. **A.** Diagrama que muestra las distintas estructuras involucradas en el control descendente de la locomoción, desde la corteza motriz hasta los CPGs espinales. Mientras que la vía directa de los ganglios basales (NSMd→SNr/GPi) permite el inicio de la locomoción (MLR); la vía indirecta inhibe el movimiento (NSMi→GPe→NST). La entrada dopaminérgica desde la SNc, es clave para determinar cuál de las dos vías, directa o indirecta, se activa. Los GB también reciben información del tálamo. Una vez que la MLR se activa, se echa a andar la locomoción por medio del circuito MLR→RF→CPG→motoneuronas (Modificada de Grillner y El Manira, 2020). **B.** Esquema con una apreciación fisiológica de las vías descendentes que controlan la locomoción. Aquí se ilustra como la SLR tiene conexiones directas hacia la médula espinal, por medio del PMLS (*pontomedullary locomotor strip* - fibras locomotoras pontomedulares), con un primer relevo en las RSN de la formación reticular del puente (PRF) y de la *medulla oblongata* (MRF). Asimismo, se puede observar que el PMLS cruza por detrás de los DLF y desciende a través de los VLFs para enviar información al CPG espinal a nivel L6-L7 (Modificada de Rossignol, 1996).

2.3.1. Planeación y selección de los comandos motrices de la marcha

El proceso de selección y planeación de cualquier tipo de movimiento se lleva a cabo a nivel del telencéfalo y está determinado principalmente por los

ganglios basales (GB) (*Figura 8; Rossignol, 1996; Whelan, 1996*). Las estructuras que conforman a los GB son: el estriado, el globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST) (núcleos de entrada); sustancia negra reticulada (SNr) y el globo pálido interno (GPi) (núcleos de salida), los cuales juegan un papel importante en el inicio de la locomoción. Finalmente, la sustancia negra compacta (SNc) que libera dopamina, y cuya función es modular la actividad de los GB (específicamente, las vías directa e indirecta) (*ver revisión: Grillner y El Manira, 2020*). La información proveniente de la corteza y el tálamo es integrada por el estriado, cuyas neuronas envían proyecciones a los núcleos de salida de los GB: GPi y SNr. A su vez, estas estructuras proyectan a los núcleos cuneiforme (CuN) y pedunculopontino (PPN), los cuales constituyen la región locomotriz mesencefálica (MLR), que iniciará la locomoción (*García-Rill et al., 1986; Shik et al., 1966 a, b; Figura 8*).

Debido a que las neuronas de los núcleos de salida de los GB son gabaérgicas, ejercen una inhibición tónica sobre la MLR en condiciones de reposo. Sin embargo, por medio de un proceso de desinhibición se liberan los comandos motrices que iniciarán la locomoción (*García-Rill et al., 1985; Kim et al., 2017; Grillner y El Manira, 2020*). Lo anterior ocurre gracias a la modulación dopaminérgica proveniente de la SNc sobre las neuronas espinosas medianas (NEM) del estriado, las cuales además de ser gabaérgicas, envían proyecciones a los núcleos de salida de los GB. Estas NEM se dividen en dos subgrupos: las neuronas espinosas medianas de la vía directa (NEMd) y las de la vía indirecta (NEMi). Entonces, ya que las NEMd expresan receptores a dopamina del tipo D1 (acoplados a proteínas G_s, de efecto excitador), los cuales, al activarse permiten la inhibición directa de las neuronas gabaérgicas del GPi y de la SNr. Esta desinhibición conlleva a la activación de la MLR, iniciando así la locomoción. Por otro lado, las NEMi expresan receptores a dopamina del tipo D2 (acoplados a proteínas G_{i/o}, de efecto inhibitor) y envía sus proyecciones al GPe; el cual a su vez tiene conexiones hacia el GPi y a las neuronas glutamatérgicas del NST, cuyas proyecciones van al mismo GPe y los núcleos de salida de los GB, manteniendo la inhibición tónica sobre la MLR (*Figura 8*). Es decir, mientras que el

efecto de la vía indirecta es suprimir la locomoción, esta se inicia por medio de la desinhibición de la MLR, a través de la vía directa de los GB (*Takakusaki et al., 2004; Grillner et al., 2005; Ménard et al., 2008; Roseberry et al., 2016; Kim et al., 2017; Grillner y El Manira, 2020*)

Además de los GB, existen estructuras del tallo cerebral que son igualmente esenciales para la selección de los comandos motrices y el arranque de la locomoción. Tal es el caso de la región locomotriz subtalámica (SLR, *subthalamic locomotor region*) (*Rossignol, 1996; Whelan, 1996; Figura 8*). A finales de los sesenta, Orlovsky describió una región en el diencéfalo, caudal al tálamo, localizada en los núcleos del *campo H de Forel*, o núcleo subtalámico (NST), la cual, tras la estimulación eléctrica, es capaz de iniciar la actividad locomotriz en gatos con una descerebración precolicular postmamilar (*Orlovsky, 1969; Whelan 1996; Rossignol; 1996*). Actualmente se sabe que la SLR está compuesta por los núcleos: lateral y ventromedial del hipotálamo (NLH y NVMH) y la zona incierta (ZI) del subtálamo en mamíferos (*Kim et al., 2017*). Su activación está relacionada con la conducta exploratoria y la búsqueda de alimento; siendo ésto un disparador para desarrollar un tipo de locomoción en específico, con un patrón motriz determinado (*Mori et al., 1989; Kim et al., 2017*). Es decir, en condiciones normales, la actividad locomotriz inducida por la activación de la SLR está asociada a los comportamientos de exploración y no al tipo de locomoción “*espontanea*”, es decir, la marcha (*Kim et al., 2017; Whelan, 1996*). Se puede decir, entonces, que la SLR es un sistema de comandos paralelos al circuito GB-MLR (*Figura 8*), que permite la selección de patrones motrices que promueven el tipo de locomoción adecuado a las necesidades del individuo bajo ciertas circunstancias del entorno.

Por otro lado, *Mori y colegas (1989)* describieron dos regiones del tronco encefálico cuya actividad determina el inicio o la terminación de la locomoción. Observaron que al estimular el área tegmental dorsal (DTF, *dorsal tegmental field*), se disminuía el tono muscular y por ende se inhibía la actividad locomotriz, aun si se estimulaba la MLR en gatos en libre movimiento. En contraste, la activación del área tegmental ventral (VTF, *ventral tegmental field*) incrementaba el tono muscular, facilitando así el inicio de la locomoción en respuesta a la estimulación de la MLR

(Mori et al., 1989). Además, en sus estudios Mori y colegas lograron dilucidar las estructuras que establecen conexiones con el DTF o el VTF, por medio del trazado anterógrado y retrógrado de la peroxidasa de rábano (HRP). Demostraron que ambas áreas reciben proyecciones de la MLR y del área dorsal posterolateral del hipotálamo, que corresponde a la SLR. Particularmente, el DTF recibe conexiones de los núcleos *locus coeruleus* (LC) y *subcoeruleus* (SC) y proyecta al núcleo reticular *pontis oralis*. A su vez, la técnica de trazado con HRP reveló la tinción de algunas de las neuronas del núcleo reticular *caudalis* y algunas otras del núcleo *rafé magnus*, así como de los núcleos reticulares *parvocellularis* (Pv) y *gigantocellularis* (Gi) en el bulbo raquídeo. Por su parte, la VTF recibe proyecciones de NST y del LC, hace conexión con el núcleo *rafé magnus*, y los núcleos reticulares *oralis*, *caudalis* y *parvocellularis* (Ohta et al., 1988; Mori et al., 1989).

De acuerdo con esta información y a lo descrito previamente por Shik et al. (1966) es evidente que el inicio de la locomoción implica una neuromodulación especializada, que requiere de la participación de las estructuras del tallo cerebral, antes mencionadas; lo que sugiere una conexión indirecta de la MLR con los CPGs espinales (Figura 8). En el siguiente apartado se ahondará más sobre cómo se establece esta comunicación entre la MLR y los CPGs de la locomoción.

2.3.2. Circuitos neuronales implicados en el inicio de la locomoción

De manera general, la MLR se ha considerado como un centro de integración de la información motriz proveniente de los GB y del hipotálamo posterior (la SLR, específicamente) (Shik et al., 1966; Arber y Costa, 2018; Figura 8), así como el centro principal del control descendente de la locomoción (García-Rill, 1986; Noga et al., 2017). Está conformada por los núcleos cuneiforme (CuN) y pedunculopontino (PPN); que a su vez consisten en una población heterogénea de neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas y acetilcolinérgicas (Roseberry et al., 2016; Shik y Orlovsky, 1967; Jordan et al., 1979). Dichos subgrupos neuronales envían sus proyecciones a vías monoaminérgicas localizadas en la formación reticular (RF), las cuales descienden a través del funículo ventrolateral (VLF) de la médula espinal, permitiendo que los comandos motrices procedentes de la MLR lleguen a

los CPGs para ejecutar la serie de movimientos que producen la locomoción (Whelan, 1996; Rossignol, 1996; Noga et al., 2003; Figura 8).

Es importante señalar que dependiendo del núcleo de la MLR (el CuN o el PPN) que se active; así como de la subpoblación de neuronas (glutamatérgicas, acetilcolinérgicas o gabaérgicas) se iniciará un tipo determinado de locomoción. Por ejemplo, se sabe que la estimulación optogenética, por medio de la expresión de la canalrodopsina 2 (ChR2) en neuronas glutamatérgicas del CuN, induce el patrón motriz de galope o una locomoción rápida asociada a la conducta de huida. Mientras que la activación optogenética (mediante la ChR2) de neuronas acetilcolinérgicas del PPN dispara el patrón motriz de marcha, o una locomoción lenta del tipo exploratorio (Caggiano, et al, 2018; Josset et al., 2018). Confirmando que la MLR, no sólo recibe e integra los programas motrices de estructuras superiores, sino que, además, ejerce un control especializado de los mismos. Con la finalidad de iniciar una conducta locomotriz en específico, adecuada a las necesidades del individuo.

La información proveniente de la MLR no es enviada directamente a los CPGs espinales (Sharma et al., 2019; Rossignol, 1996). Lo que indica que existe un filtro más, a nivel del bulbo raquídeo, en el control descendente de la locomoción. De hecho, se ha descrito que las neuronas glutamatérgicas del CuN tienen proyecciones hacia el núcleo *para-gigantocellularis* lateral (LPGi) de la formación reticular bulbar (MRF). Siendo este circuito: MLR-LPGi responsable de efectuar una modulación excitadora sobre el desarrollo de la locomoción rápida (Capelli et al., 2017). Asimismo, las neuronas glutamatérgicas del CuN envían conexiones al núcleo *gigantocellularis*. Por su parte, el PPN también envía proyecciones tanto al Gi, así como al LPGi (Caggiano et al., 2018; Brownstone y Chopek, 2018; Figura 8).

Lo anterior sugiere que los núcleos en la RF son clave en el procesamiento de los distintos comandos motrices para iniciar la locomoción. Estos núcleos están compuestos de diversas poblaciones neuronales, denominadas neuronas retículoespinales (RSN), las cuales pueden ser de distinta naturaleza: glutamatérgica, acetilcolinérgica, monoaminérgica (que liberan dopamina (DA), noradrenalina (NA) o serotonina (5HT), glicinérgica o gabaérgica. Todas ellas

constituyen las vías descendentes más relevantes para la ejecución y modulación de cualquier tipo de movimiento, incluyendo la locomoción (*Brownstone y Chopek, 2018*). Ya que, no sólo integran información proveniente de la MLR, sino que también reciben proyecciones de estructuras telencefálicas (corteza motriz, por ejemplo), y del diencéfalo (la SLR). A su vez, las RSN de la MRF procesan una retroalimentación importante desde la médula espinal (*Brownstone y Chopek, 2018; Rossignol, 1996*).

Por otro lado, hay evidencia que sugiere que algunas RSN están involucradas en la terminación de la locomoción. Tal es el caso de las neuronas glutamatérgicas que expresan el factor de transcripción Chx10, o neuronas V2a de la MRF; las cuales se localizan en el núcleo Gi. Estas neuronas V2a proyectan hacia un grupo de neuronas glicinérgicas en la lámina VII, que a su vez envían conexiones a los CPGs espinales (*Bouvier et al., 2015*). Asimismo, en el núcleo LPGi reside un grupo de neuronas gabaérgicas capaz de interrumpir la locomoción en curso, produciendo un estado de atonía muscular (*Capelli et al., 2017*).

2.3.3. Neuromodulación de la locomoción

El control descendente de los CPGs de la locomoción es bastante complejo, puesto que involucra la participación de distintas estructuras del encéfalo, tales como: la corteza motriz, los ganglios basales, la región locomotriz subtalámica, la región locomotriz mesencefálica y la formación reticular (*Figura 8*). El procesamiento de toda esta información requiere, a su vez, de una modulación monoaminérgica, que actúa como una “*llave maestra*” que permite, o no, la activación de los circuitos que seleccionan los comandos motrices que desencadenan el arranque de la locomoción.

Adicionalmente, se sabe que las vías monoaminérgicas (DA, NA, 5HT) inervan a la médula espinal a nivel lumbar L6-L7 en las láminas VI y VII, *v.gr*; donde se encuentran los CPGs espinales (*Noga et al., 2017*). Incluso, es posible iniciar la locomoción ficticia, ya sea por medio de la aplicación de un coctel de monoaminas (5HT, DA, NA) y NMDA en la preparación *in vitro* de la médula

espinal de roedores neonatos (*Kienh, 2006*); o por la administración intravenosa (i.v.) de L-DOPA en el gato descerebrado y espinalizado (*Jankowska et al., 1967 a, b; Lundberg, 1981*). Incluso se ha descrito que la estimulación de las FRA, después de la administración de L-DOPA, suprime los reflejos de flexión ipsilateral y de extensión cruzada de latencia corta, promoviéndose una vía polisináptica que genera descargas alternadas de latencia y duración prolongadas en las motoneuronas flexoras y extensoras (*Andén et al., 1966 a; Jankowska et al., 1967 a; Figura 2*). Este efecto fue atribuido a la producción de dopamina (DA) y noradrenalina (NA), a partir del metabolismo de la L-DOPA, mediante una vía noradrenérgica, en la cual se activan los adrenoreceptores . De hecho, se ha observado que los bloqueadores fenoxibenzoamina y clorpromazina de estos adrenoreceptores reducen la acción de L-DOPA, con la consecuente disminución de las descargas alternadas en las motoneuronas flexoras y extensoras (*Andén et al., 1966 b; Lundberg, 1981*).

Posteriormente, *Grillner y Shik (1973)*, encontraron que tras la estimulación subumbral de la MLR, se generaban los reflejos de latencia y duración prolongadas y se deprimían los reflejos de latencia corta producidos por la estimulación de las aferentes cutáneas y musculares de alto umbral. Similar a lo que ocurría al estimular las FRA en presencia de L-DOPA. A su vez, *Barbeau y Rossignol (1991)* reportaron que tanto la administración de clonidina (agonista de los adrenoreceptores α_2) como la inyección i.v. de L-DOPA en gatos espinalizados, producía una actividad alternada en músculos flexores y extensores, similar a los patrones de la locomoción en animales intactos. Más tarde, *Kiehn y colaboradores (1992)* observaron que la inyección intratecal de NA en gatos espinalizados y paralizados produce los mismos efectos que la administración de L-DOPA o la estimulación subumbral de la MLR en los reflejos flexor ipsilateral y extensor cruzado. Además, minutos después de la inyección intratecal de NA, se genera la alternancia entre la flexión y extensión, es decir, locomoción ficticia. Actualmente se sabe que la MLR tiene proyecciones al LC, un núcleo noradrenérgico por excelencia (*revisar: Grillner y El Manira, 2020*). Esto no sólo apoya la hipótesis de *Andén y colegas (1966 a, b)*. Además, sugiere que la liberación de monoaminas,

como la NA, durante el inicio de la locomoción enciende vías neuronales que se encontraban silentes en condiciones de reposo.

En el caso de la DA, se sabe que también juega un papel muy importante en el control descendente de la locomoción. Incluso, se ha demostrado que esta monoamina tiene la capacidad de reconfigurar redes neuronales, para así lograr la adaptación de los distintos patrones motrices que forman parte de la locomoción u otra conducta motriz (*Puhl y Mesce, 2008; Puhl et al., 2012*). Del mismo modo, se ha encontrado que la DA puede regular el ritmo de la locomoción y que esto ocurre de manera dependiente al nivel de excitabilidad del sistema; es decir, qué tan robusta es la actividad locomotriz expresada (*Sharpley et al., 2017*).

Al igual que la NA o la L-DOPA, se ha descrito que la administración exógena de DA en el animal intacto tiene la capacidad de promover locomoción real (*Barbeau y Rossignol, 1991*). Sin embargo, ello no ocurre en la preparación de la médula espinal aislada de roedores neonatos. Ya que, se ha observado que la DA no es tan eficiente para inducir actividad locomotriz, pues se requiere de la aplicación previa de otras drogas, como la serotonina o el NMDA (un agonista de los receptores ionotrópicos a glutamato), a fin de generar un patrón alternado robusto y definido (flexión-extensión, izquierdo-derecho) (*revisar: Cowley y Schmidt, 1994*).

No obstante, se ha descrito que ambas catecolaminas: DA y NA, tienen la capacidad de modificar el ritmo locomotriz. Por ejemplo, se ha observado que durante la locomoción ficticia inducida por la aplicación de serotonina (5HT) o NMDA (en la preparación *in vitro*), la administración subsecuente de DA y NA reduce la frecuencia de los ciclos locomotrices e incrementa la amplitud de las descargas de las raíces ventrales. Lo que da como resultado una actividad locomotriz más estable (*Kiehn y Kjaerulff, 1996; Sqalli-Houssaini y Cazalets, 2000*). Asimismo, se ha propuesto que tanto la NA como la DA modulan las propiedades intrínsecas de las motoneuronas y de algunas neuronas candidatas a pertenecer a los CPGs espinales (interneuronas Hb9 o Shox2, *v.gr.*).

Tal es el caso, del incremento en la excitabilidad de las motoneuronas durante la locomoción debido a la inhibición de los canales de potasio de

rectificación entrante (K_{IR}), por medio de una vía de señalización noradrenérgica asociada a la activación de los adrenoreceptores α_2 (Tartas et al. 2010). Por otro lado, la activación de los receptores a dopamina D1 puede modular la entrada de corrientes glutamatérgicas a través de los receptores AMPA-Kainato, lo que produce un aumento en la excitabilidad de las motoneuronas; además de regular las corrientes de potasio I_A y SK_{Ca} (canales de potasio dependientes de calcio). Lo que incrementa la frecuencia de disparo de las interneuronas ritmogénicas Hb9 durante la actividad locomotriz (Han et al. 2007; Han y Whelan 2009).

Lo anterior es posible ya que los principales centros catecolaminérgicos relacionados con la neuromodulación locomotriz proyectan a la médula espinal y por ende a los CPGs (Noga et al. 2003; Noga et al., 2017). Estos son: los núcleos dopaminérgicos A10 y A11, localizados en el núcleo posterior del hipotálamo (que forma parte de la SLR) y el A13 en el hipotálamo dorsal (revisar Sharples et al., 2014); así como los núcleos noradrenérgicos A5, A6 (LC) y el A7 (núcleo Kölliker-Fuse) en el tallo cerebral (consultar: Sharples et al., 2014). Todos ellos descienden a través del funículo ventrolateral (VLF) de la médula espinal (Figura 8B).

Si bien, se ha explicado que tanto la DA como la NA modulan la actividad locomotriz (ya sea el ritmo o el patrón motriz). El sistema serotoninérgico es clave en el inicio de ésta. Incluso, a lo largo de esta sección se ha destacado la capacidad de la 5HT para inducir actividad locomotriz ficticia: tanto en la preparación de la médula espinal aislada (*in vitro*) de roedores neonatos, como en el animal adulto (*in vivo*, gato espinalizado o descerebrado)

Se han definido dos sistemas serotoninérgicos principales en mamíferos. Uno relacionado con la transmisión del dolor, cuyas proyecciones descienden por el funículo dorsolateral hasta el cuerno dorsal de la médula espinal. Y otro sistema serotoninérgico asociado al control motriz, es decir, que inerva al cuerno ventral de la médula espinal a través del VLF (Grillner y El Manira, 2020; Cullheim y Arvidsson, 1995). Se trata de los núcleos del rafé: *magnus, reticularis pontis oralis* (PnO), *reticularis pontis caudalis* (PnC), localizados en la protuberancia y los núcleos del rafé *pallidus* y *obscurus*, en la médula oblongada (Azmitia, 1999; Ghosh y Pearse, 2015; Brownstone y Chopect, 2018).

Aunque, se ha relacionado únicamente a la 5HT con el inicio de la locomoción, está demostrado que la administración de 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor de serotonina; así como, la inyección de quipazina (agonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃) producen un incremento en la amplitud y duración de la actividad extensora y flexora (respectivamente), en gatos espinalizados con locomoción espontánea (*Barbeau y Rossignol, 1991*). A su vez, se ha documentado que la liberación de la 5-HT desde el rafé *magnus* está asociada al control del ritmo locomotriz, por medio de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ (*Cabaj et al., 2017; Noga et al., 2017*). Lo que sugiere que la serotonina también desempeña un papel neuromodulador durante la actividad locomotriz.

Al igual que las catecolaminas (NA y DA), la serotonina también puede modular las propiedades intrínsecas de las neuronas espinales (motoneuronas y algunas interneuronas candidatas a los CPGs). De hecho, se ha demostrado en la lamprea, que la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₂ durante la locomoción, reduce la entrada de calcio extracelular, generando, a su vez, una disminución en la frecuencia de disparo de motoneuronas e interneuronas espinales (vinculadas a los CPGs). Lo anterior se debe a que esta reducción en el calcio intracelular inactiva a los canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}), responsables de modular la hiperpolarización postpotencial. En consecuencia, se producen cambios en el ritmo y en la frecuencia de los ciclos locomotrices, lo que a la vez genera una locomoción más estable y robusta (*Buchanan et al., 1989; El Manira et al., 1997; Wällén et al., 1989; Schwartz et al., 2005*).

En conclusión, todas estas observaciones confirman la existencia de una modulación supraespinal muy *fin*a y específica sobre la actividad de los CPGs. Además de que el inicio y el control de la locomoción involucran la participación de vías monoaminérgicas y de vías glutamatérgicas (que residen en la formación reticular). Mismas que son encendidas por circuitos superiores, como los ganglios basales, lo que implica una *selección precisa* de los comandos motrices de la locomoción. Se ha reportado también la participación del hipocampo en el control de la velocidad de la locomoción (*López Ruíz et al., 2015*).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de los trabajos de T. Graham Brown en los que estableció la hipótesis de los hemicentros de la locomoción, se conoce que en la médula espinal existen los circuitos neuronales necesarios para generar el patrón estereotipado y alternado entre las fases de flexión y extensión de las extremidades durante marcha, en ausencia de la información supraespinal y sensorial (*Brown, 1911, 1914, 1924*). No obstante, se ha demostrado que debe existir una interacción dinámica entre el CPG de la locomoción, las vías descendentes y la información sensorial, a fin de producir el patrón motriz adecuado a la postura del cuerpo y a las condiciones del entorno donde ésta se desarrolle (*Rossignol et al., 2006; Kiehn 2016; Côté et al., 2018*).

De hecho, se ha demostrado que la información sensorial proveniente de los músculos en movimiento es esencial para regular la transición de los ciclos de la locomoción. Tal es el caso de las aferentes propioceptivas del grupo I. *Duysens y Pearson* (1980) observaron que, al estirar brevemente los músculos extensores del tobillo del gato descerebrado, durante la locomoción real en una banda sin fin, se producía un acortamiento en la actividad de los músculos flexores, incrementándose la amplitud de la actividad de los músculos extensores. Lo anterior los llevó a suponer que la información transmitida por las aferentes musculares extensoras modula la transición de la fase de balanceo y apoyo, facilitando la extensión (*Figura 5B*). Posteriormente, *Conway et al.* (1987), demostraron que la estimulación eléctrica de las fibras Ib de nervios extensores durante la fase de flexión de la locomoción ficticia inducida por L- DOPA produce un cambio en el ritmo locomotriz. Es decir, una supresión de la flexión en curso y un adelanto de la extensión: *resetting extensor (Figura 6A)*.

Sin embargo, en condiciones de reposo la activación de las fibras Ib provenientes de los órganos tendinosos de Golgi de músculos extensores produce una inhibición no recíproca en las motoneuronas extensoras (*Eccles et al., 1957*). Posteriormente, se daría a conocer que este sistema de retroalimentación

negativa también involucra la activación de fibras Ia de los husos musculares (*Jankowska et al., 1981; Fetz et al., 1979*).

Por otro lado, se ha descrito que la estimulación eléctrica de las aferentes del grupo I (incluyendo fibras Ia y Ib) de músculos extensores durante la locomoción ficticia (producida por la estimulación de la MLR o a la administración de L-DOPA), facilita la expresión de una vía excitadora de al menos tres interneuronas interpuestas entre las fibras extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras (*Gossard et al., 1994; Figura 7B y C*). Se ha propuesto que esta vía constituye un sistema de retroalimentación positivo de fuerza, que es fundamental para mantener el equilibrio y soportar el peso del cuerpo durante la fase de apoyo. Asimismo, la excitación oligosináptica facilitada durante la locomoción, está relacionada con el control de la temporalidad de los ciclos de la locomoción. De modo que, debe participar en la generación del “*resetting*” hacia la extensión.

Con base en estos antecedentes, en este trabajo de investigación se ha propuesto que la vía interneuronal que media los EPSPs oligosinápticos comparte elementos neuronales con el generador del ritmo del hemicentro extensor. De ser así, la identificación de las interneuronas de esta vía es de suma relevancia fisiológica, y constituye la base para los trabajos con animales transgénicos enfocados en descifrar las redes neuronales que conforman los CPGs de la locomoción.

Por consiguiente, el presente proyecto estuvo dirigido a identificar y caracterizar electrofisiológicamente a las interneuronas candidatas de la vía excitadora oligosináptica expresada en motoneuronas extensoras, al estimular las aferentes del grupo I de nervios extensores durante la locomoción ficticia en el gato.

3.1. Relevancia del proyecto

El estudio de la modulación sensorial de los CPGs de la locomoción, es una herramienta que permite dilucidar las interneuronas del generador del ritmo y de la red formadora de patrones que integran la información proveniente de los músculos en movimiento y de las vías descendentes implicadas en la inducción de locomoción, para así ajustar el patrón motriz de la locomoción al entorno. En el caso particular del *resetting* hacia la extensión, dilucidar la vía interneuronal que lo genera, implica la identificación de elementos neuronales que pertenecen al generador del ritmo del hemicentro extensor.

La identificación de las interneuronas que conforman los CPGs espinales de la locomoción tiene implicaciones clínicas importantes. Por ejemplo, se sabe que una de las consecuencias de las lesiones espinales son la espasticidad y la hiperreflexia (*Biering-Sørensen et al., 2006*). No obstante, el entrenamiento de los músculos de las extremidades posteriores mediante la caminata en una banda sin fin; así como la estimulación eléctrica funcional de los mismos, reducen la hiperreflexia y espasticidad generadas después de una lesión espinal completa. En pacientes con una lesión espinal incompleta, hay evidencia de que la retroalimentación sensorial favorece la recuperación parcial de los movimientos voluntarios y de la marcha (*Hultborn, 2003; Rossignol et al., 2015*).

Lo anterior sugiere que las vías interneuronales que conforman los CPGs, específicamente aquellas interneuronas con la capacidad de integrar la información sensorial propioceptiva, están sujetas a cambios plásticos importantes. Aunque, en primera instancia, estos cambios se producen por la misma lesión espinal (*Frigon y Rossignol, 2006; Lin et al., 2019*), el entrenamiento muscular favorece modificaciones en los circuitos neuronales espinales que resultan ser muy propicios para la recuperación de la marcha (*Takeoka et al., 2014; Takeoka y Arber, 2019*).

IV. HIPÓTESIS

La activación de interneuronas por la estimulación de las aferentes musculares extensoras del grupo I con latencias mono-, di- y oligosinápticas, durante la locomoción ficticia en el gato, está asociada a un cambio en la temporalidad del ritmo locomotriz, o *resetting* hacia la extensión. Por lo tanto, estas interneuronas forman parte del generador central de patrones, o CPG.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar mediante criterios electrofisiológicos a las interneuronas asociadas al “*resetting*” extensor durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA en el gato descerebrado

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar si la estimulación de las aferentes musculares extensoras del grupo I produce EPSPs oligosinápticos en motoneuronas extensoras de la articulación del tobillo (GS, PI, y FDHL) durante la locomoción ficticia
2. Registrar la actividad extracelular de interneuronas activadas rítmicamente durante la locomoción ficticia, que cumplan con los siguientes criterios:
 - a) Activación mono-, di- o polisináptica por la estimulación de aferentes musculares extensoras del grupo I
 - b) Actividad rítmica durante la fase de extensión de la locomoción
 - c) Activación polisináptica producida por la estimulación de aferentes del reflejo flexor contralaterales (*coFRA*)

- d) Activación de las interneuronas por la estimulación de las fibras aferentes musculares extensoras del grupo I con el mismo patrón que el “*resetting*” hacia la extensión”
 - e) Ausencia de activación antidrómica por la estimulación de los funículos dorsolaterales bilaterales (DLF-L1, DLF-L4 y DLF-L5), para descartar interneuronas de proyección hacia la médula espinal rostral y estructuras supraespinales
 - f) Ausencia de activación antidrómica al estimular el núcleo intermedio contralateral, para descartar interneuronas comisurales
3. Identificar interneuronas de último orden mediante la activación antidrómica desde los núcleos motores extensores para determinar proyecciones monosinápticas con las motoneuronas extensoras
- a) Registrar los EFPs en el núcleo motor producidos por interneuronas de último orden con la técnica de promediación disparada por espigas (“*spike triggered averaging*”, o STA)
 - b) Registrar la actividad sináptica en los ENGs rectificadas de nervios extensores producida por interneuronas de último orden mediante la técnica de STA

VI. MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales descritos a continuación, fueron llevados a cabo bajo los lineamientos aprobados por la norma oficial mexicana - OM-062-zOO-1999 (técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) y por el Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Protocolo UPEAL 0132-15.

Se debe mencionar que algunos experimentos se efectuaron en el Instituto Panum de la Facultad de Salud y Ciencias Médicas de la Universidad de Copenhague, Dinamarca. Los cuales, fueron aprobados por “*The Danish Animal Experimental Inspectorate*” y por “*The National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (USA)*”.

6.1. Animales

Se utilizaron 42 gatos adultos (machos o hembras), con un peso aproximado de 2.5 - 5.0 kg. Se empleó un animal por procedimiento experimental, de los cuales 38 experimentos se llevaron a cabo en México y 4 en Dinamarca.

6.2. Preparación

Durante la primera etapa del procedimiento quirúrgico, cada animal fue inducido a un estado de anestesia profunda con una mezcla de isoflurano (1.0 – 1.5 %) en oxígeno, la cual fue suministrada por medio de una mascarilla para inhalación de gases. El nivel de anestesia fue monitoreado mediante la verificación de la ausencia de reflejos nociceptivos y del tono muscular. Con la finalidad de medir la presión arterial, se disecó la arteria carótida derecha y se colocó una cánula después de ligar el extremo distal. Posteriormente, se disecaron las venas yugulares (ipsilateral y contralateral) y se insertó una cánula en cada una de ellas para la inyección (i.v) de las siguientes soluciones y fármacos: dexamentasona (1.0 mg/ml), vitamina K (10 ml), 30 ml de solución salina (NaCl 0.9 %), y atropina (0.1 mg/kg, vía subcutánea). Para mantener un equilibrio ácido-base y un aporte calórico adecuados se perfundió una solución de bicarbonato de sodio (100 mM) en solución glucosada al 5 %, a razón de 7 ml/h. Finalmente, se aplicó nialamida (50 mg/kg, i.v.) en un periodo aproximado de 4 h, a través de una bomba de infusión continua, con el objetivo de inhibir a la enzima oxidasa de monoaminas

(MAO). Asimismo, se efectuó una traqueostomía para colocar una cánula en T, por la cual se mantuvo la administración de la anestesia (isoflurano/O₂).

Esta primera parte de la preparación concluyó con la disección de algunos nervios periféricos de la extremidad posterior ipsilateral (*i*, izquierda). Entre ellos, los nervios de músculos extensores: *Semimembranoso y Bíceps Anterior* (SmAB), *Gastrocnemio-Sóleo* (GS; gastrocnemio lateral, medial y sóleo), *Plantaris* (PI), *Flexor Digitorium y Flexor Hallucis Longus* (FDHL). Los nervios flexores: *Tibial Anterior* (TA), y el *Extensor Digitorum longus* (EDL). El nervio bifuncional: *Bíceps Posterior y Semitendinoso* (PBSt) y los nervios cutáneos: *Sural* (Sur) y *Peroneo Superficial* (SP). También se disecaron algunos nervios de la extremidad posterior contralateral (*co*, derecha): GS, TA, Sur y SP. Por último, se efectuó una laminectomía a nivel de los segmentos espinales torácico bajo y lumbosacros (T12-L7).

En la segunda etapa de la preparación el animal fue colocado cuidadosamente en un estereotáxico. Para ello, la columna vertebral fue sujeta firmemente por medio de pinzas espinales colocadas sobre las vértebras expuestas a nivel lumbar L1-L2 y mediante la fijación de la pelvis. La cabeza se inmovilizó con ayuda de barras metálicas insertadas en los conductos auditivos, y con sujetadores del maxilar superior y las órbitas oculares. Posteriormente, se procedió a formar pozas con la piel de las extremidades posteriores y del dorso, las cuales fueron llenadas con aceite mineral ~ a 37 °C para evitar la desecación de los nervios disecados y de la médula espinal (*Figura 9*).

Se expuso la médula espinal cervical alta (C1-C2) y se efectuó una craneotomía, con el fin de llevar a cabo una descerebración a nivel precolicular-postmamar, removiendo el tálamo y la corteza cerebral. Posterior a ello, se prescindió de la anestesia con isoflurano y el animal se conectó a un respirador artificial, previa paralización con bromuro de pancuronio (0.04 mg / h). Se monitoreó la concentración de CO₂ al final de la espiración; la cual osciló entre un 3.0 - 3.5 %. La temperatura corporal y de las pozas se controló mediante un termistor colocado en el esófago y otro en el interior de la poza del dorso. Ésta se mantuvo en un rango de 36-37 °C, por medio de un sistema de irradiación de luz

infrarroja. Al finalizar cada experimento se realizó la eutanasia del animal por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico.

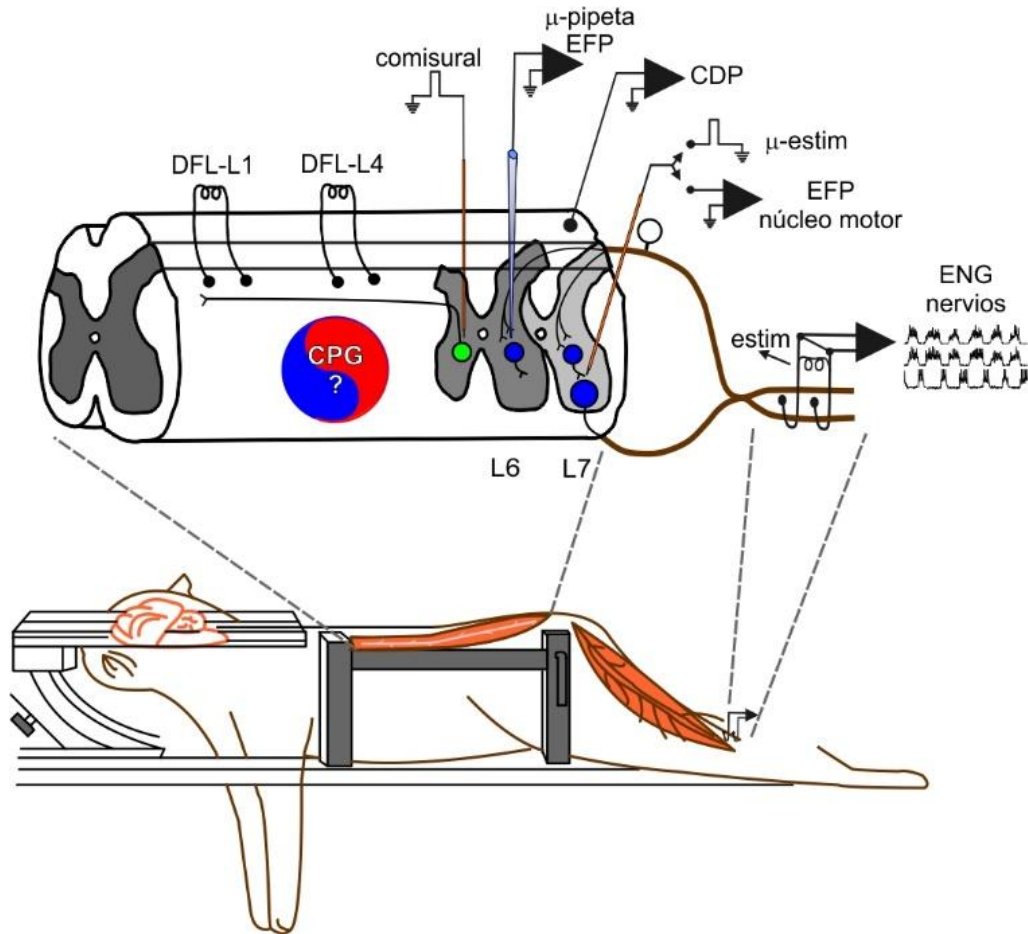


Figura 9. Arreglo experimental de la preparación del gato descerebrado y espinalizado con locomoción ficticia inducida por la administración i.v. de L-DOPA. En la parte inferior se muestra un esquema del montaje de la preparación en el estereotáxico. Con la finalidad de llevar a cabo la segunda etapa quirúrgica (*ver métodos*); así como los registros intracelulares de motoneuronas o extracelulares de interneuronas. En la parte superior (de izquierda a derecha), se ilustran los electrodos de estimulación de los funículos dorsolaterales (DLF-L1 y DLF-L4); el electrodo de tungsteno contralateral para la estimulación antidrómica de las interneuronas comisurales; la micropipeta de vidrio (μ -pipeta) para registrar los EFPs o la actividad extracelular de las interneuronas; el electrodo de plata en forma de esfera para registrar las salvas aferentes en el dorso de la médula (CDP); el electrodo de tungsteno colocado en el núcleo motor ipsilateral para registrar los EFPs ortodrómicos (y antidrómicos) al estimular los nervios periféricos o los EFPs producidos por la actividad de una sola interneurona, así como para estimular antidrómicamente las interneuronas de último orden (μ -estim); los electrodos que registran la actividad ENG en los nervios periféricos durante la locomoción ficticia inducida por la inyección i.v. de L-DOPA.

6.3. Estimulación y registro

Se removió la duramadre de la médula espinal lumbosacra y se efectuaron pequeñas ventanas (parches) en la piamadre; a fin de insertar las micropipetas de registro (3-7 M Ω de resistencia) y los electrodos finos de tungsteno (0.1 M Ω de impedancia) colocados en los núcleos motores para la estimulación y el registro.

Los potenciales del dorso de la médula (CDPs, *cord dorsum potentials*) generados por la estimulación de los nervios periféricos se registraron mediante un electrodo de plata en forma de esfera colocado sobre la columna dorsal ipsilateral a nivel L7 (*Figura 9*) y el electrodo de referencia en los músculos de la espalda. Los nervios periféricos se montaron sobre un par de electrodos de plata en forma de gancho para su estimulación o registro. La intensidad de estimulación se determinó en múltiplos del umbral de las fibras más excitables (xT , “*times threshold*”, o veces por umbral). Se utilizaron pulsos únicos de 200 μ s de duración, o trenes de pulsos a una frecuencia de 300 Hz para la estimulación de los nervios.

Para localizar los núcleos motores de los músculos extensores de la articulación del tobillo se insertó un electrodo de tungsteno a nivel L6 caudal, o L7 rostral, a través del funículo dorsolateral con un ángulo $\sim 20^\circ$. Primero se registraron los potenciales extracelulares de campo (EFPs, *extracellular field potentials*) antidrómicos producidos por la estimulación de los nervios extensores. A través del mismo electrodo se aplicaron pulsos de microestimulación en el núcleo motor con intensidades de 5 – 20 μ A, y se registraron los electroneurogramas (ENG) en los nervios extensores (*Figura 9*). El umbral de activación de los axones motores fue 5 μ A.

Con el propósito de localizar las proyecciones intraespinales de las fibras aferentes musculares extensoras, se registraron los EFPs ortodrómicos producidos por la estimulación de los nervios extensores de la articulación del tobillo (PI, GS y FDHL), a una intensidad de 2 xT , con la cual se reclutan las aferentes musculares del grupo I. Para ello, se utilizaron micropipetas de vidrio (3 – 7 M Ω), llenas con una solución de glutamato de sodio 3M. En caso de que fuese

necesario incrementar la actividad espontánea de las interneuronas, se inyectó corriente negativa para liberar glutamato de la pipeta (*Figura 9*).

Se colocó un electrodo de tungsteno (0.1 M) en la médula espinal contralateral a nivel L6-L7 para activar antidrómicamente interneuronas comisurales con proyecciones contralaterales. Mismas que fueron descartadas. Para corroborar que las interneuronas registradas poseían proyecciones locales y no ascendentes, se colocaron bilateralmente 4 pares de electrodos de plata en los funículos dorsolaterales (DLF, *dorsolateral funiculus*): *iDLF-L1*, *iDLF-L4*, *coDLF-L4* y *coDLF-L5*, los cuales fueron estimulados con pulsos únicos a una intensidad < 40 μ A (*Figura 9*).

6.4. Generación de la locomoción ficticia

Se efectuó una espinalización a nivel cervical alto (C1 - C2; previa aplicación intraespinal de lidocaína), con la finalidad de suprimir la información tónica de vías descendentes en la médula espinal. Posteriormente, la locomoción ficticia se indujo con la aplicación de dos dosis individuales (c/u de 50 mg/kg) de metiléster de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (*Jankowska et al., 1967 a, b; Grillner y Zangger, 1979*). En caso necesario se aplicaron dosis subsecuentes de este fármaco; o bien, naloxona (1 mg/kg), o 4-aminopiridina (0.5 mg/kg).

La locomoción ficticia se monitoreó a partir de los ENGs registrados en los nervios disecados, con un par de electrodos de plata en forma de gancho (*Figura 9*). Se utilizaron amplificadores diferenciales AC con un ancho de banda de 30 Hz – 3 kHz. Los ENGs crudos fueron capturados en modo continuo o *gap-free*, por medio de la tarjeta A/D Digidata 1440A y el programa AxoClamp v.10 (Molecular Devices). Mientras que la rectificación e integración de estos se efectuó fuera de línea con el programa *Analysis* del *Spinal Cord Research Center* (SCRC) de la Universidad de Manitoba, Canadá.

6.5. Registro intracelular de motoneuronas

En la primera serie de experimentos ($n = 12$) se registraron motoneuronas extensoras con micropipetas de vidrio llenas con acetato de potasio (2 M) y QX314 (100 mM), para bloquear los canales rápidos de sodio. Las micropipetas se insertaron sobre el funículo dorsolateral a nivel L6-L7 con un ángulo de 20° en dirección medial. Las motoneuronas se identificaron antidrómicamente al estimular los nervios musculares extensores. Se registraron los EPSPs ortodrómicos evocados por la estimulación de las fibras del grupo I de nervios extensores, durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA. Los EPSPs fueron separados y promediados, con base a la fase del ciclo locomotriz en el cual ocurrieron. Para ello se empleó el programa *Analysis* del SCRC de la Universidad de Manitoba, Canadá.

6.6. Registro extracelular de interneuronas

En la segunda serie de experimentos ($n = 30$); se llevó a cabo el registro extracelular de interneuronas activadas rítmicamente durante la fase de extensión de la locomoción ficticia. Se registraron los EFPs ortodrómicos y las espigas extracelulares de cada interneurona, por medio de una micropipeta de vidrio (3 – 7 M) que contenía glutamato de sodio (3 M). La micropipeta se introdujo a través de la columna dorsal izquierda (ipsilateral) a nivel L6 caudal o L7 rostral, con un ángulo de $0-10^\circ$ en dirección medial (*Figura 9*).

Se investigó si las interneuronas eran activadas por la estimulación de las aferentes del grupo I de nervios extensores (GS, PI o FDHL). Asimismo, se exploró si algunas de las interneuronas registradas establecían conexiones monosinápticas con las motoneuronas extensoras. Para lo cual, se estimuló el núcleo motor con el electrodo fino de tungsteno, aplicando un pulso único con intensidades de 10 - 20 μA , y se registraron las espigas antidrómicas producidas por dicho estímulo. Aquellas interneuronas activadas antidrómicamente desde el

núcleo motor extensor fueron consideradas como interneuronas candidatas de último orden.

Para el registro de las motoneuronas e interneuronas se utilizó el amplificador Axoclamp-2B (Molecular Devices) en modo de puente (*bridge*) con un ancho de banda de DC-10 kHz y una frecuencia de muestreo de 30 kHz. Para la captura y el análisis de datos se utilizó una tarjeta Digidata 1322A y el programa pClamp10 (Molecular Devices), respectivamente.

6.7. Técnica de promediación disparada por espigas (*spike trigger averaging, STA*)

Con la finalidad de establecer si las interneuronas consideradas de último orden eran de naturaleza excitadora, se registraron los EFPs en el núcleo motor. Así como los incrementos en la amplitud de los ENGs rectificadas de los nervios extensores, que reflejan las respuestas sinápticas en las motoneuronas producidas por la actividad extracelular espontánea de una sola interneurona.

La presencia EFPs de signo negativo en el núcleo motor o la expresión de un incremento en la amplitud de los ENG rectificadas, ambos asociados a la espiga extracelular de la interneurona; indican una acción excitadora monosináptica de la interneurona en alguna población de motoneuronas extensoras (*Fetz et al., 1996; Figura 14D*). Se midió la latencia desde el inicio de la espiga extracelular de la interneurona al inicio del incremento en la actividad electroneurográfica promediada de los nervios extensores. Para comprobar que se trataba de conexiones monosinápticas, a la latencia al pico en el promedio de los ENGs se le sustrajo el tiempo de conducción de la médula espinal al nervio registrado, considerando la velocidad de conducción de los axones motores. El análisis del STA y la medición de las latencias al pico de los ENGs se efectuaron fuera de línea, usando los programas *Analysis* y *Quick-Measure* del SCRC, de la Universidad de Manitoba, Canadá.

VII. RESULTADOS

7.1. Registro intracelular de motoneuronas extensoras

En la primera etapa de este trabajo se efectuaron registros intracelulares de motoneuronas extensoras de la articulación del tobillo, con la finalidad de estudiar la expresión de EPSPs oligosinápticos generados por la activación de fibras aferentes del grupo I de nervios extensores durante la locomoción ficticia.

A continuación, se describirán a detalle los hallazgos obtenidos en esta primera serie experimental.

7.1.1. La estimulación de aferentes extensoras del grupo I promueve la expresión de EPSPs oligosinápticos durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA

Posterior a la aplicación de L-DOPA en el gato descerebrado, y antes de la inducción de locomoción ficticia, *Gossard y colegas (1994)* descubrieron que al estimular eléctricamente con un tren de pulsos las fibras extensoras del grupo I, se producen EPSPs oligosinápticos de gran amplitud en motoneuronas homónimas. Esta excitación *aparentemente* suprimía o enmascaraba a la inhibición no recíproca (expresada durante el reposo). Durante la locomoción ficticia (inducida por L-DOPA o por la estimulación de la MLR), observaron que los EPSPs oligosinápticos eran modulados en una manera dependiente de la fase, siendo de mayor amplitud durante la flexión.

En la *Figura 10* se puede observar efectivamente la expresión de estos EPSPs oligosinápticos en una motoneurona del GS. La *Figura 10A* ilustra el registro intracelular de la motoneurona y la actividad locomotriz simultánea de los ENG de un nervio extensor (SmAB, azul) y otro flexor (TA, rojo). Debido a que el microelectrodo contenía QX314, un bloqueador de los canales rápidos de sodio, la motoneurona no generó potenciales de acción. Sin embargo, se pueden observar las oscilaciones rítmicas en el potencial de membrana (LDPs, *locomotor drive*

potentials), correspondientes a la locomoción. Al ser esta una motoneurona extensora, la despolarización de los LDPs ocurrió durante la fase activa, es decir durante la extensión.

Al aplicar un tren de 5 pulsos en el nervio extensor PI con una intensidad de 2 xT, para reclutar las aferentes de bajo umbral (grupo I), la motoneurona del GS expresó EPSPs, los cuales ocurrieron tanto en la fase de flexión como de extensión, como se ilustra en la parte superior de la *Figura 10A*. Para una mejor apreciación, los EPSPs fueron desplegados de manera vertical y con una mayor velocidad de barrido. Es evidente que aquellos generados durante la extensión (indicados en azul) fueron de menor amplitud, que los EPSPs expresados durante la flexión (en rojo). Con el propósito de confirmar lo anterior, estos EPSPs fueron separados y promediados en función de la fase de ocurrencia (*Figura 10B*). Indudablemente, se encontró que los EPSPs generados durante la fase de extensión (azul) tienen una amplitud menor que los EPSPs que ocurrieron en la fase de flexión (rojo). Lo anterior se puede explicar por una posible oclusión sináptica a nivel de las interneuronas durante la extensión, es decir, a nivel del CPG, puesto que durante la extensión las interneuronas del hemicentro extensor se encuentran activas. Lo que implica, entonces, que las aferentes del grupo I del PI tienen acceso al hemicentro extensor. Por lo tanto, al ser estimuladas durante la extensión, su efecto sobre la motoneurona del GS es atenuado u ocluido por la actividad intensa del hemicentro extensor del CPG.

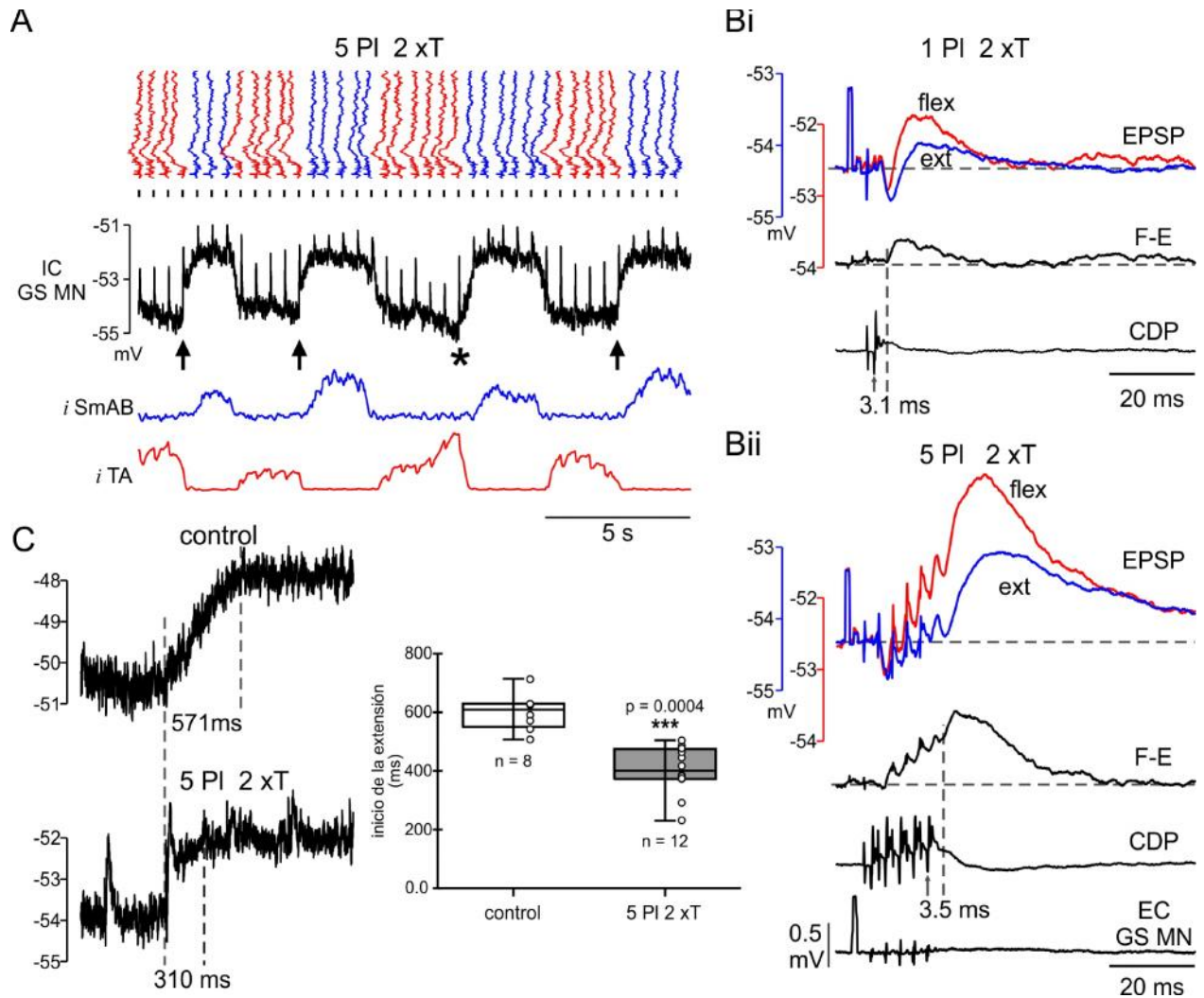


Figura 10. EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de aferentes del grupo I de nervios extensores durante la locomoción ficticia. **A.** Trazos superiores: registro intracelular (desplegado vertical y horizontalmente) de una motoneurona extensora del GS. Los registros verticales se muestran con una velocidad de barrido mayor. Las líneas verticales indican el marcador del estímulo aplicado al nervio PI con una intensidad 2 xT y una frecuencia de 2 Hz. Trazos inferiores: ENG's registrados en los nervios indicados durante un episodio de locomoción ficticia inducida por L-DOPA. **B.** Los EPSPs oligosinápticos son modulados en una manera dependiente de la fase del ciclo locomotriz. **Bi.** De arriba hacia abajo: promedio de los EPSPs al estimular con un pulso el nervio PI (2 xT, 2 Hz); diferencia entre flexión y extensión (F-E); salva aferente registrada en el dorso de la médula (CDP). La latencia medida desde el pico del primer componente positivo de la salva aferente al inicio de los EPSPs fue de 3.1 ms (líneas punteadas). **Bii.** Mismo formato que Bi, pero la estimulación fue con un tren de 5 pulsos al nervio extensor PI 2 xT. Además, se ilustra el registro extracelular (EC). Nótese la facilitación temporal en la amplitud de los EPSPs al incrementar el número de pulsos. **C.** registro intracelular en DC de la motoneurona del GS, antes (control, trazo superior) y después de la estimulación de PI (2 xT, 5 pulsos, trazo inferior). Al medir la latencia al pico del LDP en condiciones control y después de estimular las fibras extensoras del grupo I, se observa que el tren de pulsos promueve la fase de extensión como lo indican las flechas en A. Véase también la prueba estadística *t* de Student pareada ($p = 0.0004$)

Cuando la estimulación de las fibras del grupo I de PI coincidió con la transición espontánea de los ciclos locomotrices de la flexión a la extensión, hubo una facilitación de los EPSPs. Además, es claro que la activación de las aferentes extensoras del grupo I, por medio un tren breve de pulsos, fue capaz de promover, o adelantar, el inicio de la extensión (*Figura 10A; flechas*). Por otro lado, cuando el mismo estímulo ocurrió poco antes de la transición espontánea de flexión a extensión (*Figura 10A; asterisco*) el inicio de la extensión fue paulatino; debido a la hiperpolarización en el potencial de membrana de la motoneurona durante la fase inactiva (flexión). Aun así, este tren breve de pulsos en las aferentes extensoras del grupo I fue suficiente para inducir el inicio de la extensión.

Asimismo, se puede apreciar que la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I facilitó la despolarización del potencial de membrana de la motoneurona del GS durante la extensión. Es decir, la latencia al pico del LDP fue menor, en comparación con el control (*Figura 10C*). Para saber si este cambio en la latencia de los LDP era significativo, se realizó una prueba *t* de Student pareada; comparándose 8 ciclos en el episodio control (no estimulado) contra 12 ciclos del episodio estimulado. Efectivamente, la estimulación de las aferentes del grupo I del nervio PI produjo una reducción significativa en la latencia al pico del LDP ($p = 0.0004$). En otras palabras, se promovió un adelanto en la fase de extensión. Estos datos fortalecen la hipótesis planteada en este proyecto, de que las fibras aferentes del grupo I de nervios extensores envían conexiones al generador del ritmo del hemicentro extensor. Por lo tanto, dichas aferentes tienen la capacidad de modular el ritmo de la locomoción a través de la vía oligosináptica excitadora.

Adicionalmente, se calculó la latencia de los EPSPs producidos por la estimulación de fibras del grupo I de nervios extensores. Para ello se promediaron de manera separada los EPSPs expresados en la flexión y los que ocurrieron en la extensión. Como se ilustra en la *Figura 10Bii* los EPSPs producidos por un tren de 5 pulsos en las fibras del gr I de PI tuvieron una latencia de 3.5 ms. Lo que sugiere una vía de al menos tres interneuronas interpuestas entre las aferentes extensoras

del grupo I y las motoneuronas extensoras (*Gossard et al., 1994; Figura 7*). Del mismo modo, la aplicación de un pulso único de estimulación en estas fibras fue suficiente para producir los EPSPs oligosinápticos (latencia 3.1 ms). También, fue notable la presencia de IPSPs correspondientes a la inhibición no recíproca (*Figura 10Bi*). De hecho, en la *Figura 10Bii* se muestra el registro extracelular de la motoneurona, con el fin de corroborar la expresión de los IPSPs y descartar los potenciales de campo que pudieron registrarse intracelularmente.

7.1.2. Expresión de EPSPs disinápticos durante la extensión, producidos por la estimulación de aferentes extensoras del grupo I

La activación de las aferentes del grupo I de músculos extensores, durante la locomoción facilita la expresión de vías excitadoras (*Schomburg y Behrends, 1978; Gossard et al., 1994*), cuya expresión está modulada de manera dependiente de la fase de flexión o extensión (*Figura 10B*). *McCrea y colaboradores (1995)* observaron que la estimulación eléctrica de las aferentes del grupo I de nervios extensores produce EPSPs disinápticos en motoneuronas extensoras durante la extensión, no así durante la flexión de la locomoción ficticia inducida por la estimación de la MLR.

La *Figura 11* muestra el registro intracelular de una motoneurona extensora del GS, en presencia de QX314, durante un episodio de locomoción inducido por la administración de L-DOPA (mismo formato que la *Figura 10*). En la parte superior de la *Figura 11A*, se puede observar que la estimulación del nervio homónimo GS (2 xT) produjo EPSPs disinápticos, precedidos por EPSPs monosinápticos, durante la fase de extensión (indicados en azul y por la flecha). Mientras que, durante la flexión, el mismo estímulo produjo únicamente los EPSPs monosinápticos correspondientes a la activación de las fibras Ia (en rojo).

Con la finalidad de calcular la latencia a la cual aparecieron estos EPSPs, se procedió a separarlos con base a las fases de flexión y extensión del ciclo locomotriz y fueron promediados (*Figura 11B; C*). Se puede observar que efectivamente los EPSPs ocurridos durante la flexión ocurrieron con una latencia monosináptica (0.6 ms; *Figura 11B*) mientras que en la extensión se observó la

presencia de EPSPs monosinápticos, seguidos por EPSPs disinápticos (indicados por la flecha; *Figura 11C*), con una latencia de 1.4 ms.

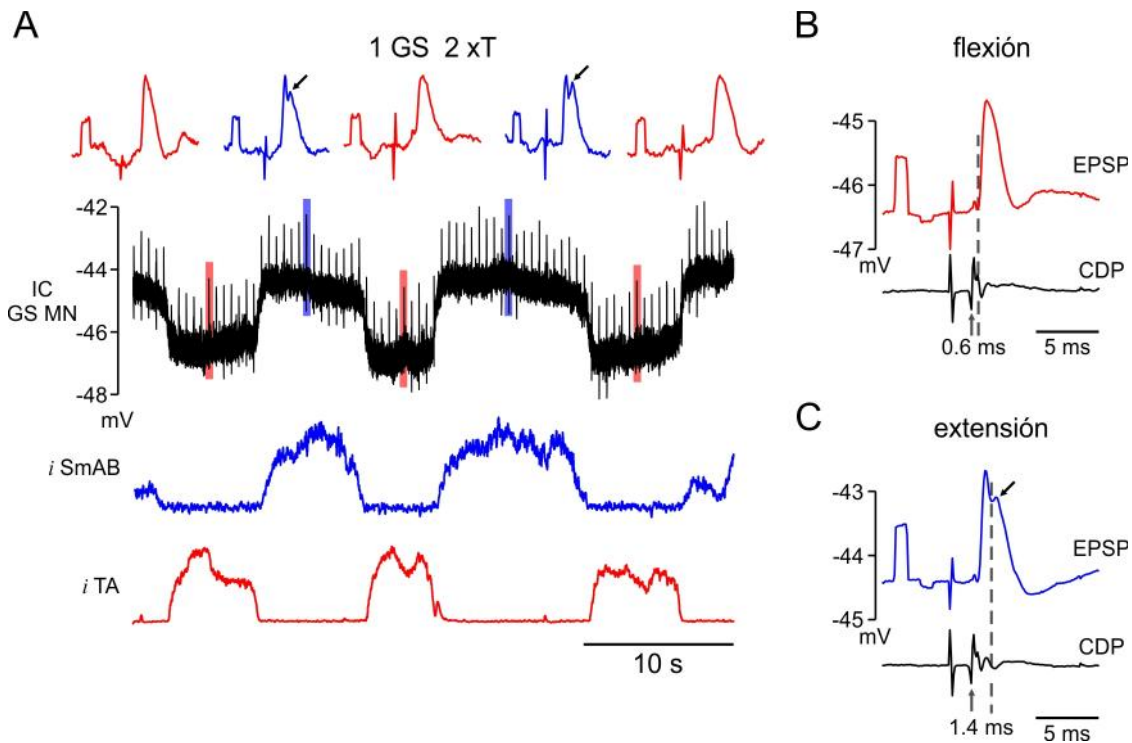


Figura 11. Expresión de EPSPs disinápticos durante la fase de extensión de la locomoción ficticia inducida por L-DOPA, producidos por la estimulación de las fibras aferentes extensoras del grupo I. A. Trazos superiores: registro intracelular de una motoneurona del GS. Se ilustran los EPSPs producidos por la estimulación del nervio homónimo GS (1 pulso, 2 xT). Las barras en rojo indican los EPSPs monosinápticos ocurridos durante la flexión (en rojo); mientras que las barras azules los EPSPs disinápticos (en azul y flechas) expresados durante la extensión. **B.** Promedio de los EPSPs ocurridos durante la fase de flexión, cuya latencia de 0.6 ms sugiere una activación monosináptica. **C.** Promedio de los EPSPs expresados durante la extensión (flecha). La latencia de 1.4 ms sugiere una activación disináptica.

Es importante mencionar que la expresión de los EPSPs disinápticos se observó únicamente en 10 de las 39 motoneuronas registradas. De hecho, en los trabajos de *McCrea et al., (1995)* y *Angel et al., (1996 y 2005)* se reportó la ausencia de estos EPSPs disinápticos (expresados durante la extensión) en algunos episodios de locomoción, o inclusive en algunas preparaciones. Lo que sugiere que la vía disináptica excitadora recibe información del hemicentro extensor pero no forma parte de éste, *i.e.* es seguidora (*Angel et al., 2005*). Asimismo, es posible inferir que los efectos observados por las aferentes extensoras del grupo I en motoneuronas extensoras dependen del grado de excitabilidad interneuronal

exhibido durante la locomoción (*revisar discusión de Pacheco y Guzmán-Flores, 1969*). Lo que explicaría, entonces, porqué en algunos casos se observaron los EPSPs disinápticos (10/39) y en otros no (*Angel et al., 1996; Angel et al., 2005*).

Además, a partir de estos datos se puede concluir que, efectivamente, el control que ejerce la información sensorial proveniente de las fibras extensoras del grupo I sobre los CPGs espinales, depende de la fase de la locomoción en la cual se haya aplicado el estímulo (ya sea, flexión o extensión).

7.2. Interneuronas candidatas para mediar los EPSPs oligosinápticos asociadas al *resetting* hacia la extensión

Con base en los datos obtenidos a partir de los registros intracelulares de motoneuronas extensoras y a lo descrito por *Gossard y colegas (1994)*, se ha propuesto que la vía interneuronal responsable de la expresión de los EPSPs oligosinápticos consiste en al menos tres interneuronas interpuestas entre las aferentes extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras.

La siguiente parte del estudio estuvo enfocada en identificar a las interneuronas que formarían parte de esta vía. Por lo cual, se registraron las espigas extracelulares de interneuronas localizadas principalmente en los segmentos L6 caudal y L7 rostral, con una distribución mediolateral y ventral al núcleo intermedio de la médula espinal. Además, estas interneuronas debieron cumplir los siguientes criterios preestablecidos: *i)* ser activadas por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I, con una latencia mono-, di- o polisináptica; *ii)* activación rítmica durante la fase de extensión de la locomoción inducida por L-DOPA. Todas las interneuronas con activación antidrómica desde los DLF-L1 y DLF-L4 (bilaterales); así como, aquellas activadas antidrómicamente desde el núcleo intermedio contralateral fueron descartadas de este estudio.

Una vez verificado que las interneuronas registradas cumplían con ambos criterios, y que se trataba de interneuronas ipsilaterales y con proyecciones locales, se evaluó si dichas neuronas eran activadas polisinápticamente por las *coFRA* y si disparaban con el mismo patrón que el *resetting* extensor. Para

identificar a las interneuronas de último orden se estimuló al núcleo motor de uno de los nervios extensores (generalmente el núcleo del GS), registrándose la actividad antidrómica de estas interneuronas. Por último, con la finalidad de determinar si las interneuronas de último orden establecían conexiones monosinápticas excitadoras con alguna población de motoneuronas extensoras, se llevó a cabo el análisis mediante el STA, promediando los registros de los EFPs en el núcleo motor y los ENGs de los nervios extensores.

A continuación, se describen algunos ejemplos de las interneuronas registradas, que cumplieron con los criterios principales, y además con una o más de las características ya mencionadas (*sección de objetivos*).

7.2.1. Interneurona activada monosinápticamente por las aferentes extensoras del grupo I y rítmicamente durante la extensión

La *Figura 12A* muestra el registro extracelular de una interneurona localizada mediolateralmente a nivel L6 rostral, a 2.5 mm de profundidad en el núcleo intermedio (*Figura 17A*). Esta interneurona se activó con una latencia de 0.9 ms por la estimulación de las aferentes del grupo I del nervio extensor FDHL. A su vez, se observa claramente que el disparo de la interneurona, por el estímulo de las fibras del grupo I de FDHL, es constante (sin fluctuación de la latencia o “*jittering*”) y que coincide con los EFPs monosinápticos de las fibras del grupo I de FDHL. Lo que sugiere que esta interneurona recibe conexiones monosinápticas provenientes de las aferentes extensoras del grupo I.

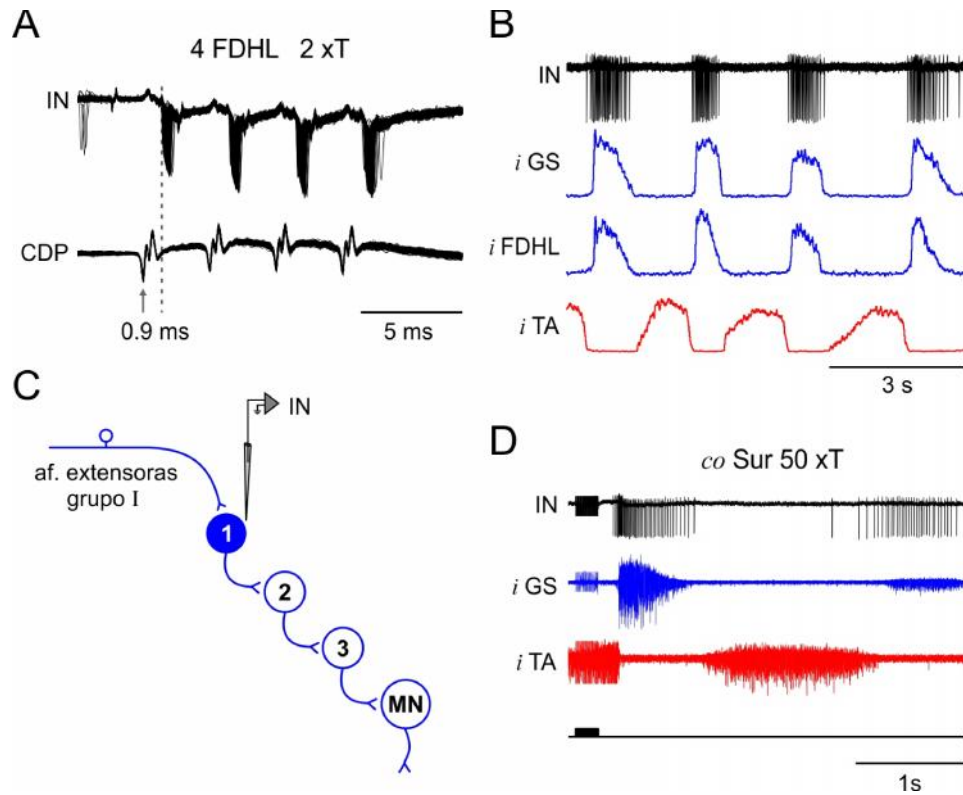


Figura12. Interneurona de primer orden que recibe conexiones monosinápticas desde las aferentes extensoras del grupo I, y se activa rítmicamente durante la extensión. A. Trazo superior: registro extracelular de la activación de la interneurona con una latencia de 0.9 ms (líneas punteadas). Trazo inferior: registro de la salva aferente (CDP) producida por la estimulación del nervio extensor FDHL (4 pulsos, 2 xT). **B.** Trazo superior: registro extracelular del disparo espontaneo de la interneurona durante la extensión. Trazos inferiores: ENGs rectificadas e integradas de los nervios extensores ipsilaterales GS y FDHL (en azul), y del nervio flexor ipsilateral TA (en rojo). **C.** Esquema de la interneurona de primer orden de la vía excitadora polisináptica. **D.** Trazo superior: descarga de las espigas extracelulares de la interneurona con duración y latencia prolongadas por la estimulación de las *co*FRA del nervio cutáneo contralateral sural (*co*Sur; 50 xT). Trazos inferiores: ENGs crudos de los nervios ipsilaterales GS (extensor) y TA (flexor).

Cuando se registró la actividad espontánea de la interneurona durante la locomoción inducida por L-DOPA, se observó que la neurona disparó rítmicamente durante la fase de extensión (*Figura 12B*). Asimismo, se advierte que tras la estimulación con un tren prolongado de pulsos sobre las aferentes de alto umbral de *coSur* (50 xT), la interneurona disparó con una latencia polisináptica y simultáneamente con la descarga prolongada del nervio extensor GS, producida por la activación de las *coFRA* (*Figura 12D*).

Esta interneurona fue clasificada como de primer orden en la vía excitadora que media los EPSPs oligosinápticos (*Figuras 12C y 17B*). Ya que recibe conexiones monosinápticas de las aferentes extensoras del grupo I (*Figura 12A*) y disparó rítmicamente durante la extensión (*Figura 12B*). Además, se puede considerar como una interneurona seguidora del CPG, puesto que expresa el mismo patrón de disparo que reflejo extensor cruzado (*Figura 12D*).

7.2.2. Interneurona activada durante la extensión, disinápticamente por las aferentes extensoras del grupo I y asociada al *resetting* extensor

A continuación, se muestra el registro extracelular de una interneurona localizada medialmente a nivel L6, a una profundidad de 2.3 mm (*Figura 17A*). Al estimular las aferentes del grupo I del GS, la neurona exhibió potenciales de acción con una latencia mínima de 1.3 ms. La variación en latencia entre las espigas extracelulares registradas (*jittering*) apoya que dicha interneurona recibe conexiones disinápticas de las fibras extensoras del grupo I (*Figura 13A*). A su vez, en la *Figura 13B*, se ilustra la actividad espontánea de la interneurona durante la locomoción, cuya actividad rítmica ocurrió durante la extensión. Incluso, se observa claramente que, al disminuir la amplitud de los ENG's de nervios extensores, la interneurona redujo su frecuencia de disparo. Estos datos sugieren fuertemente que esta interneurona es de segundo orden en la vía interneuronal que media los EPSPs oligosinápticos (*Figuras 13C y 17B*).

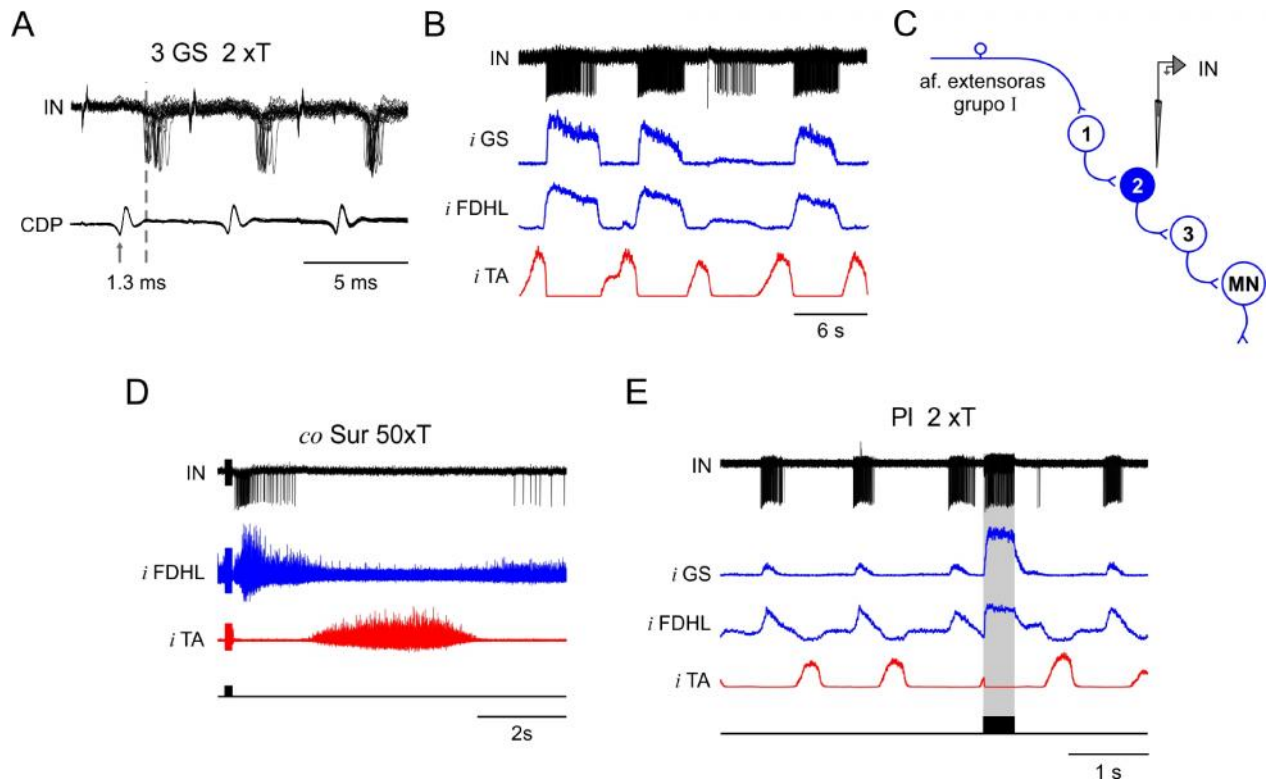


Figura 13. Interneurona activada disinápticamente por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión, polisinápticamente por las *coFRA* y con el mismo patrón que el resetting extensor. A. Trazo superior: espigas extracelulares de la interneurona producidas por la estimulación de las fibras del grupo I del nervio extensor GS. La latencia de 1.3 ms (líneas punteadas) y el *jittering* sugiere una activación disináptica. Trazo inferior: salva aferente (CDP) por la estimulación del GS (3 pulsos, 2 xT). **B.** Trazo superior: registro extracelular de la actividad espontánea de la interneurona durante la extensión. Trazos inferiores: ENGs rectificadas e integradas de los nervios extensores GS y FDHL (extensores, azul) y del TA (flexor, rojo). **C.** Esquema que ilustra a la interneurona de segundo orden en la vía excitadora polisináptica. **D.** Trazo superior: registro extracelular de la interneurona activada polisinápticamente por la estimulación del *coSur* (50 xT). Trazos inferiores: ENGs crudos de los nervios FDHL y TA. **E.** Trazo superior: registro extracelular de la actividad rítmica de la interneurona. Trazos en medio: ENGs rectificadas e integradas de los nervios extensores GS y FDHL (azul) y el TA (flexor, rojo). Trazo inferior: marcador del tren prolongado de pulsos al nervio extensor PI (2 xT, 200 Hz).

Con base a las observaciones anteriores, se consideró la posibilidad de que esta interneurona sea parte del CPG extensor. Para comprobarlo, se aplicó un tren prolongado de pulsos con una intensidad 50 xT para reclutar a las *coFRA*. La *Figura 13D* muestra la actividad polisináptica de la interneurona producida por la estimulación de *coSur*. Es evidente que este estímulo promovió e incrementó la intensidad de descarga del nervio extensor FDHL; además, simultáneamente generó un aumento en la frecuencia de disparo de la interneurona, con la misma latencia y duración prolongadas que el reflejo extensor cruzado. Como lo habían reportado previamente *Jankowska y colegas (1967 a, b)*, apoyando la idea de que esta interneurona pertenece al hemicentro extensor.

Otro aspecto importante que se evaluó fue la hipótesis de que las neuronas de segundo orden de la vía interneuronal excitadora polisináptica pueden ser parte del generador del ritmo. Por lo que estas interneuronas también estarían asociadas al *resetting* extensor. Con el objetivo de comprobar lo anterior, se aplicó un tren de pulsos prolongado con una intensidad 2 xT para reclutar a las aferentes del grupo I de nervios extensores. Este estímulo se aplicó durante la fase de flexión para producir el *resetting* extensor (*Conway et al., 1987*). Con este protocolo experimental se registraron simultáneamente los ENGs de nervios periféricos y de las espigas extracelulares de cada interneurona evaluada (9/62).

En la *Figura 13E*, se puede apreciar que la interneurona disparó con el mismo patrón que el *resetting* hacia la extensión. Es decir, el tren prolongado de pulsos en las fibras extensoras del grupo I de PI produjo una interrupción abrupta de la flexión en curso y un adelanto de la extensión, con la aparición concomitante de las espigas extracelulares de la interneurona, produciéndose así un cambio en el ritmo locomotriz que facilita la extensión. Entonces, se puede concluir que la interneurona de la *Figura 13* es un elemento de segundo orden en la vía que media los EPSPs oligosinápticos y que probablemente dicha interneurona sea parte del generador del ritmo del hemicentro extensor.

7.2.3. Interneurona de segundo y de último orden activada rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor

En la *Figura 14* se presenta una interneurona registrada extracelularmente en el segmento L6 caudal (4.2 mm de profundidad; *Figura 17A*), con una orientación ventromedial. Esta interneurona fue activada con una latencia de 1.3 ms al estimular las aferentes del grupo I de PI (2 xT). Asimismo, se observó un segundo *cluster* de activación, cuya latencia de 2.8 ms sugiere que la interneurona también recibe conexiones polisinápticas de las aferentes del grupo I. De la misma manera, la interneurona generó potenciales de acción con una latencia de 1.2 ms tras reclutar las fibras de los grupos I y II del nervio SmAB con una intensidad de estimulación de 5 xT. Con base a estas mediciones y en la variación en la latencia de las espigas extracelulares de la interneurona, en ambos casos (*Figuras 14Ai; Aii*), se puede decir que esta interneurona recibe una mezcla de conexiones di- y trisinápticas, principalmente de las aferentes del grupo I de nervios extensores.

Si bien, en este episodio de locomoción el nervio SmAB exhibió un patrón bifuncional, debido quizá a que incluía una rama del nervio bíceps posterior. Es evidente, que la interneurona disparó concomitantemente con la actividad de mayor intensidad en los ENG de nervios extensores (barras grises *Figura 14B*), es decir, se activó rítmicamente durante la extensión.

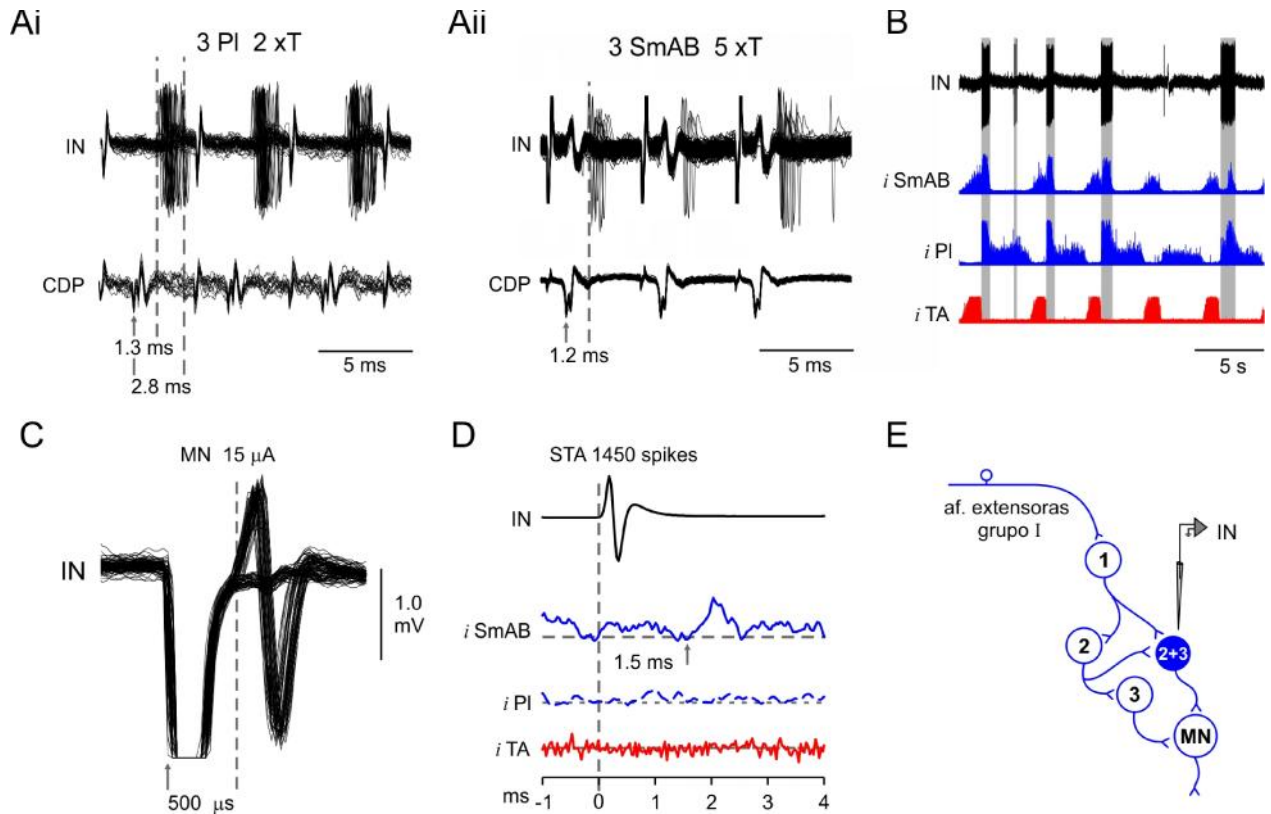


Figura 14. Interneurona activada di- y trisinápticamente por las fibras extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor. Ai. Trazos superiores: registro extracelular de la activación disináptica y trisináptica de la interneurona por la estimulación de las fibras del grupo I del nervio PI (3 pulsos, 2xT; latencias de 1.3 y 2.8 ms). **Aii.** Por la estimulación de fibras de los grupos I y II del nervio SmAB (3 pulsos, 5 x T -grupo II-, latencia 1.2 ms). Trazos inferiores: registro de las salvas aferentes de cada uno de los nervios mencionados (CDP). **B.** Trazo superior: registro extracelular de las espigas espontáneas de la interneurona durante la fase de extensión (barras grises). Trazos inferiores: ENG rectificadas de los nervios extensores SMAB y PI (azul) y del nervio flexor TA (en rojo). **C.** Registro extracelular de la interneurona activada antidrómicamente por la microestimulación del núcleo motor extensor con una intensidad de 15 μ A. **D.** Análisis del STA. Trazo superior: 1450 espigas extracelulares de la interneurona. Trazos inferiores: incremento de la amplitud promedio de los ENG de nervios extensores, que reflejan la actividad sináptica excitadora en las motoneuronas asociada a la activación de la interneurona durante la locomoción. La latencia de 1.5 ms sugiere que la interneurona envía conexiones monosinápticas a dicha población de motoneuronas. **E.** El microelectrodo señala a la interneurona de segundo y tercer orden de la vía excitadora polisináptica. En este caso, la interneurona recibe conexiones di y trisinápticas de las aferentes del grupo I, y envía proyecciones monosinápticas a los núcleos motores del SmAB.

Debido a que la interneurona se localizó en el asta ventral (a 4.2 mm desde la columna dorsal), se investigó si establecía conexiones monosinápticas con motoneuronas extensoras. Para este propósito, se aplicó microestimulación en el núcleo motor extensor (15 μ A), lo que produjo una activación antidrómica en la interneurona (Figura 14C). Con ello, se concluyó que, evidentemente, esta

interneurona envía proyecciones monosinápticas hacia las motoneuronas extensoras. Posteriormente, se evaluó si estas conexiones monosinápticas eran de naturaleza excitadora. Para averiguarlo, se efectuó el análisis del STA infiriendo la actividad sináptica de la interneurona en los ENG rectificados de nervios extensores. En la *Figura 14D* se muestra la promediación de la actividad sináptica en los ENG rectificados asociada con el disparo de 1450 espigas extracelulares de la interneurona. Se utilizó una ventana de análisis de 5 ms, con el objetivo de visualizar únicamente las respuestas sinápticas producidas por la interneurona. Esto evitó incluir la actividad sincronizada de otras neuronas asociadas con la extensión. En efecto, se observó un incremento en la actividad del ENG de SmAB, cuya latencia de 1.5 ms indica que esta población de motoneuronas recibe conexiones monosinápticas de la interneurona. Puesto que coincide con la latencia de los potenciales terminales de las aferentes primarias, correspondientes a la salva aferente del SmAB al sustraer el tiempo de conducción de las fibras motoras del mismo nervio.

Estos resultados sugieren que la vía interneuronal que media los EPSPs oligosinápticos es un circuito complejo, en el cual una sola interneurona puede recibir información de las aferentes del grupo I de un mismo nervio extensor con latencias distintas (*Figuras 14E y 17B*), lo que podría estar asociado con un control bastante especializado de la información sensorial de músculos extensores, por ende, una modulación más *fina* del ritmo locomotriz.

7.2.4. Interneurona de último orden activada rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor

Se debe mencionar que en todos los casos se investigó si las interneuronas registradas eran activadas por las aferentes del grupo I de todos los nervios extensores disecados: GS, PI, FDHL o SmAB. A continuación, se ilustra una interneurona activada por la estimulación de las aferentes del grupo I de GS y SmAB, con una latencia polisináptica de 5 y 6.1 ms, respectivamente (*Figura 15Ai y Aii*). Estas latencias tan prolongadas se pueden explicar por la disminución en la excitabilidad en los elementos que conforman una vía oligosináptica. Por lo que esta interneurona se puede considerar como de último orden en la vía que media los EPSPs oligosinápticos (*Figura 15D*).

Asimismo, se evaluó la actividad espontánea de la neurona durante la locomoción. En la *Figura 15B* se muestra como la interneurona exhibe dos picos de actividad, con el mismo patrón de la descarga de FDHL. Lo anterior se debe a que los músculos FDL y FHL exhiben un comportamiento distinto durante la locomoción (*O'Donovan et al., 1982; Fleshman et al., 1984*). Pero la neurona se activó fundamentalmente durante la fase de extensión.

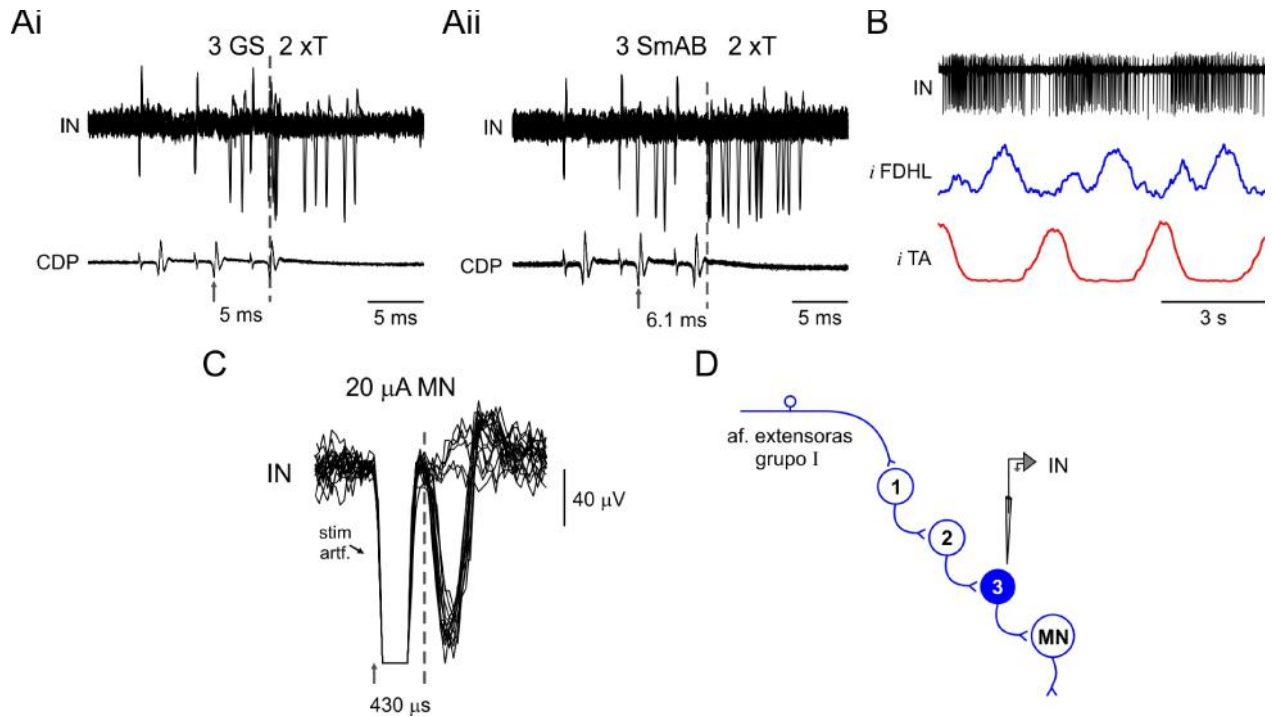


Figura 15. Interneurona activada polisinápticamente por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, rítmicamente durante la extensión y antidrómicamente desde el núcleo motor extensor. A. Trazos superiores: Activación polisináptica de la interneurona por la estimulación de las fibras del grupo I de dos nervios extensores: **Ai.** GS (3 pulsos, 2 xT, latencia 5 ms). **Aii.** SmAB (3 pulsos, 2 x T, latencia 6.1 ms). Trazos inferiores: registro de las salvas aferentes de cada uno de los nervios mencionados (CDP). **B.** Trazo superior: registro extracelular de las espigas espontaneas de la interneurona durante la extensión. Trazos inferiores: ENGs rectificadas e integradas del nervio extensor FDHL (en azul) y del nervio flexor TA (en rojo). **C.** Registro extracelular de la interneurona activada antidrómicamente por la microestimulación del núcleo motor extensor con una intensidad de 20 μ A. **D** Esquema de la interneurona de último orden en la vía excitadora oligosináptica.

Como se ilustra en la *Figura 15C*, la interneurona disparó con una latencia menor a 0.5 ms en respuesta a la microestimulación del núcleo motor extensor, lo cual corresponde a una activación antidrómica. Lo que sugiere que esta interneurona envía proyecciones monosinápticas hacia las motoneuronas extensoras (*Figuras 15D y 17B*). Esta interneurona se localizó a 3.3 mm de profundidad, con una orientación medial en el asta ventral (*Figura 17A*).

7.2.5. Localización de las interneuronas candidatas a formar parte de la vía que media los EPSPs oligosinápticos

En total se registraron 62 interneuronas que cumplieron con los criterios y características antes mencionados. En el mapa de la *Figura 16* se muestra la localización de cada una de ellas. La mayor parte de estas interneuronas fueron registradas en los segmentos L6 – L7 rostral (58/62) y 4 más en L5. La ubicación en el mapa de cada interneurona está basada en la profundidad a la cual fueron registradas. Esta medición se hizo desde la superficie de la médula espinal en la columna dorsal L6 (donde se insertó la micropipeta), tomando en cuenta el ángulo de trayecto (0° - 10°) del microelectrodo de registro. Asimismo, se consideró la distancia a la cual se registraron los EFPs de las fibras del grupo I en el núcleo intermedio y se realizó un ajuste de 0.5 mm (*Eccles et al., 1954*).

En la *Figura 16A* se puede observar que algunas de las interneuronas registradas exhibieron únicamente potenciales de acción monosinápticos (14/62, *círculos azules*) por la estimulación de aferentes del grupo I de nervios extensores; otro grupo de interneuronas se activó disinápticamente (8/62, *círculos amarillos*) y un grupo más recibió conexiones polisinápticas (13/62 *círculos rojos*). Sin embargo, la mayoría de las interneuronas se activaron con una combinación de latencias, es decir, recibieron ya sea conexiones mono- y disinápticas (4/62, *círculos verdes*), o proyecciones mono-, di- y polisinápticas (23/62, *círculos naranja*) de las aferentes del grupo I de los distintos nervios extensores disecados. Lo que sugiere que la vía interneuronal que modula los EPSPs oligosinápticos en motoneuronas extensoras es una vía compleja, que integra la información de distintas aferentes propioceptivas. Lo que permitiría una regulación más fina de la información sensorial que tiene acceso al CPG.

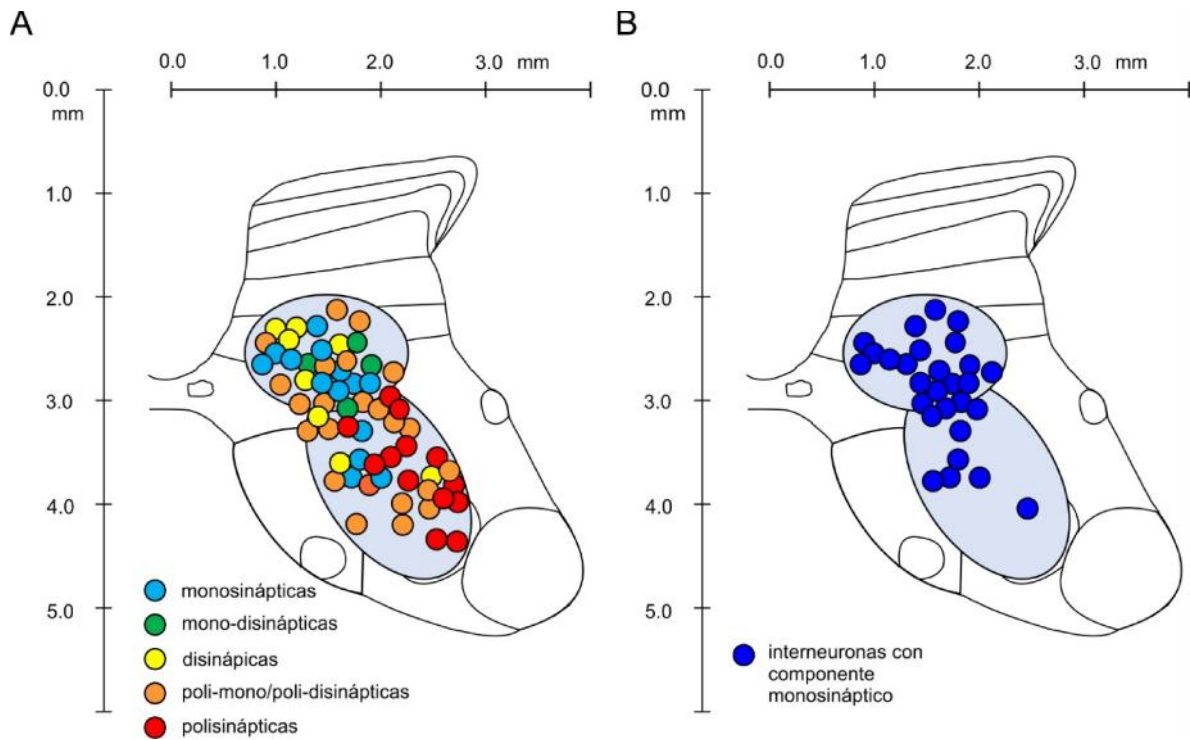


Figura 16. Localización de las interneuronas candidatas que forman parte de la vía excitadora oligosináptica activada por la estimulación de las fibras extensoras del grupo I. Todas las interneuronas presentadas en este mapa cumplieron con los criterios importantes para ser consideradas como candidatas (*objetivos particulares*). La mayoría fue registrada en los segmentos L6 caudal - L7 rostral, con una distribución mediolateral en las láminas VI - VII de Rexed. Este mapa fue construido con base a un corte transversal a nivel L6 (Rexed, 1954). **A.** Se muestran las 62 interneuronas registradas durante la fase de extensión de la locomoción ficticia inducida por L-DOPA. Los círculos azules representan las interneuronas que recibieron conexiones monosinápticas ($n = 14$) de las aferentes extensoras del grupo I de nervios extensores. Los círculos verdes representan las interneuronas que recibieron conexiones mono- y disinápticas ($n = 4$). Los círculos amarillos representan las interneuronas con aferencias disinápticas ($n = 8$). Los círculos naranjas son las interneuronas activadas mono-/di- polisinápticamente ($n = 23$). Finalmente, los círculos rojos ilustran las interneuronas con proyecciones polisinápticas de las aferentes extensoras del grupo I ($n = 13$). **B.** Se muestran todas las interneuronas con aferencias monosinápticas, incluyendo aquellas con conexiones di o polisinápticas de las fibras extensoras del grupo I.

Por último, en la *Figura 16B* se agruparon todas aquellas interneuronas que exhibieron algún componente monosináptico, incluyendo las interneuronas que también se activaron di o polisinápticamente. Esto con la finalidad de identificar a las interneuronas registradas en el asta ventral que recibieron conexiones monosinápticas (6/62). Debido a que las aferentes Ib del órgano tendinoso de Golgi llegan únicamente hasta el núcleo intermedio (Brown y Fyffe et al., 1979;

Hongo et al., 1978). Se debe considerar, entonces, que estas interneuronas se activaron monosinápticamente por las fibras Ia de los husos musculares, y que posiblemente medien la inhibición recíproca (Jankowska y Lindström, 1972). Por otro lado, 2/6 de estas interneuronas con activación monosináptica (Figura 16B) también se activaron antidrómicamente desde el núcleo motor extensor. Lo cual sugiere que forman parte de la vía que genera los EPSPs disinápticos (Figura 11; Angel et al., 2005).

En total se registraron 6/62 interneuronas con actividad antidrómica desde los núcleos motores extensores (5/6 en el asta ventral; 1/6 en el núcleo intermedio de la lámina VII). Considerando el tipo de conexiones que recibieron estas interneuronas de las aferentes del grupo I, se tiene que 4/6 se activaron con una combinación de latencias di y polisinápticas (n =3; Figura 14 v.gr.), o únicamente con una latencia polisináptica (n = 1; Figura 15) al estimular las fibras extensoras del grupo I. Mientras que 2/6 interneuronas se activaron monosinápticamente por las fibras Ia de nervios extensores, por lo que quizá medien los EPSPs disinápticos expresados durante la extensión (Figura 11C; Angel et al., 2005).

Por otro lado, a través del análisis mediante el STA, se observó un incremento en la actividad sináptica de algunos ENGs de nervios extensores en 4/6 interneuronas activadas antidrómicamente desde el núcleo motor (Figura 14D v.gr). Lo que indica que éstas interneuronas de último orden hacen conexiones monosinápticas excitadoras con las poblaciones de las motoneuronas de algunos de los nervios extensores disecados.

Finalmente, la *Figura 17A* muestra únicamente la localización de los cuatro ejemplos ilustrados en las *Figuras 12-15*, los cuales son indicados en el esquema de la vía polisináptica excitadora en la *Figura 17B*, siguiendo el código de color establecido en la *Figura 16A*, es decir, de acuerdo al tipo de interneurona que se trate y dependiendo de las conexiones que reciben desde las aferentes extensoras del grupo I.

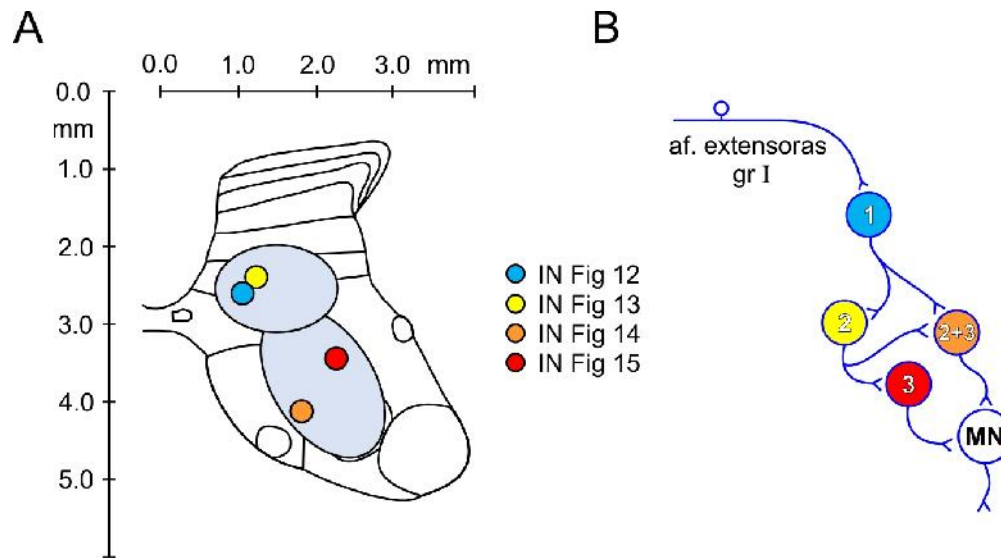


Figura 17. Localización y representación de algunos elementos neuronales de la vía oligosináptica excitadora asociada al *resetting* extensor. **A.** Mismo mapa que en la *Figura 16A*, pero en este caso sólo se ilustran las interneuronas de los ejemplos correspondientes a las *Figuras 12-15*. **B.** Esquema de la vía que media los EPSPs oligosinápticos en motoneuronas extensoras. Se muestra la posición de cada una de las interneuronas en las *Figuras 12-15*, con base al tipo de conexiones que reciben de las aferentes extensoras del grupo I. Es decir, en azul se indica la interneurona ilustrada en la *Fig. 12*, la cual corresponde a la interneurona de 1er orden. En amarillo la interneurona de 2do orden y asociada al *resetting* extensor (*Fig. 13*). En naranja se muestra la interneurona activada di y trisinápticamente ilustrada en la *Figura 14*. Finalmente, en rojo, el ejemplo de la interneurona de último orden (*Fig.15*). El código de colores usado aquí es el establecido en el mapa de la *Figura 16A*.

VIII. DISCUSIÓN

El presente proyecto se centró en estudiar la participación de la información sensorial proveniente de las aferentes del grupo I de nervios extensores en la modulación del ritmo locomotriz.

Se ha descrito que la activación eléctrica de las fibras aferentes propioceptivas de bajo umbral de músculos extensores produce una gran excitación en motoneuronas extensoras durante la locomoción ficticia. La cual, es mediada por una vía interneuronal oligosináptica conformada por tres interneuronas interpuestas entre las aferentes del grupo I y las motoneuronas extensoras (*Gossard et al., 1994; Figura 10*). Además, la estimulación eléctrica de las aferentes extensoras del grupo I durante la flexión en curso, la interrumpe de manera abrupta y genera un adelanto de la extensión subsiguiente, es decir, un *resetting* hacia la extensión (*Conway et al., 1987; Figura 13E*). Bajo la hipótesis de que este cambio en el ritmo es producido por la vía interneuronal excitadora oligosináptica, se planteó el objetivo de registrar interneuronas candidatas a mediar los EPSPs oligosinápticos y se evaluó si dichas interneuronas estaban asociadas al *resetting* extensor.

Los datos aquí presentados muestran que las interneuronas registradas reciben conexiones mono-, d-i y polisinápticas, o mixtas (*Figura 16A*) de las aferentes del grupo I de nervios extensores. Estas interneuronas se activan rítmicamente durante la extensión (*Figuras 12B-15B*) y concomitantemente con la descarga de los ENGs extensores (con una latencia y duración prolongadas) en respuesta a la estimulación de las *coFRA* (*Figuras 12D y 13D; Jankowska et al., 1967 a, b*). Además, se encontró que, efectivamente, algunas de ellas (9/62) disparan con el mismo patrón que el *resetting* extensor (*Figura 13E*). Asimismo, se registraron interneuronas con proyecciones monosinápticas hacia las motoneuronas extensoras (*Figuras 14C y D; 15C*). Esto sugiere que las interneuronas registradas pueden formar parte del CPG de la locomoción, y que algunas de ellas son candidatas para mediar el *resetting* extensor, es decir, pertenecer al generador del ritmo del hemicentro extensor (*Figura 18A y 19B*).

8.1. La activación de las aferentes del grupo I de músculos extensores durante la locomoción facilita la excitación de motoneuronas extensoras

Mientras que en condiciones de reposo la activación de fibras aferentes del grupo I de músculos extensores produce una *inhibición* del tipo *no recíproca* en motoneuronas extensoras (*Eccles et al., 1957; Jankowska et al., 1981; Jankowska, 1992*). Durante la locomoción ficticia la activación de dichas fibras produce una *excitación* en las motoneuronas extensoras (*Duysens y Pearson, 1980; Conway et al., 1987; Gossard et al., 1994; Figuras 10 y 11*). Lo anterior sugiere que la información sensorial transmitida por las aferentes extensoras del grupo I se transforma de un sistema de retroalimentación negativo a uno positivo, a fin de incrementar la fuerza de contracción de los músculos extensores, para soportar el peso del cuerpo y mantener el equilibrio durante la locomoción (*Pearson y Collins, 1993; Pearson 2008*).

No obstante, como se observa en la *Figura 10B*, la inhibición no recíproca prevalece, aunque es reducida y enmascarada por la enorme excitación que se expresa durante la locomoción. En efecto, se ha descrito que la *inhibición no recíproca heterogénea*; es decir, aquella producida por aferentes del grupo I de músculos extensores sinergistas de otras articulaciones, se ve reducida durante la locomoción, pero no desaparece (*Ross y Nichols, 2009; Lyle y Nichols, 2018*). Por el contrario, esta inhibición heterogénea ocurre de manera coordinada entre las articulaciones de la cadera, la rodilla y del tobillo (*Harrison et al., 1983; Jankowska, 1992; Nichols, 1994*), permitiendo que se lleve a cabo correctamente la serie de movimientos que componen a las fases de la locomoción, descritas por *Engberg y Lundberg* en 1969 (*Figura 3A*).

Por lo tanto, debe existir un equilibrio entre la excitación exacerbada expresada durante la locomoción, la cual conlleva a un incremento en la fuerza de contracción en los músculos extensores durante la fase de apoyo (*Dietz y Duyens, 2000; Donelan y Pearson, 2004; Duyens y Pearson, 1980*); y la *inhibición no recíproca*

heterogénica, que favorece una mejor distribución de este aumento en la fuerza de contracción en los músculos extensores de todas las articulaciones, a fin de evitar un desgaste en el sistema músculo esquelético durante la locomoción (Nichols, 2018).

En la *Figura 10Bi*, se puede observar que un solo pulso en las fibras extensoras del grupo I produce un IPSP disináptico, seguido de una excitación de gran amplitud. Cabe mencionar que la expresión de estos IPSPs fue consistente en todas las motoneuronas registradas (n = 39). Lo cual se puede explicar por el balance entre la *inhibición no recíproca* y la del sistema de retroalimentación positivo expresado durante la locomoción (Nichols 2018).

Debido a que los IPSPs presentaron una amplitud mayor durante la extensión (fase activa), en comparación con los que se expresaron durante la flexión (fase inactiva) (*Figura 10Bi*), se debe considerar que ello sea consecuencia de la misma despolarización (i.e, un alejamiento del potencial de equilibrio del Cl⁻ durante la fase activa), sin descartar una posible facilitación de la interneurona que media la *inhibición no recíproca* durante la extensión.

8.2. La vía interneuronal que genera los EPSPs oligosinápticos durante la locomoción está asociada al “resetting” hacia la extensión

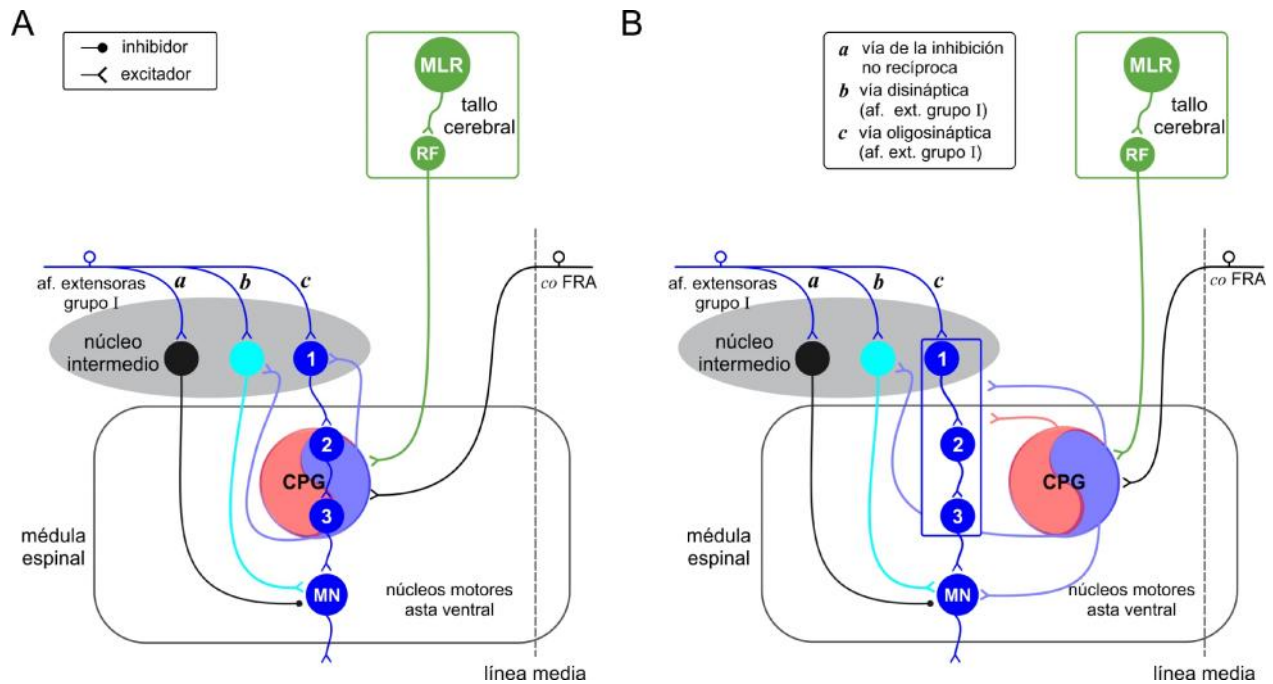
Por otro lado, se ha confirmado que la información propioceptiva de músculos extensores es esencial para regular la transición entre las fases de la locomoción. Por ejemplo, la estimulación por estiramiento de los músculos extensores del tobillo, durante la marcha en una banda sin fin, prolonga la duración e incrementa la actividad electromiográfica extensora en la fase de apoyo, retrasando la descarga de los EMGs flexores. Lo anterior previene el inicio de la fase de balanceo, debido a que se generó un aumento de la fuerza de contracción en músculos extensores (Duysens y Pearson, 1980). A su vez, la activación eléctrica de las fibras extensoras del grupo I induce una suspensión de

la flexión en curso y un inicio anticipado de la extensión subsiguiente (*resetting* extensor), lo cual ocurre con un desfase, es decir, un cambio en la temporalidad del ciclo locomotriz (*Conway et al., 1987; Figura 13E*). Esta adaptación en el ritmo de la locomoción probablemente sea parte del mecanismo de retroalimentación positiva que permite un mejor soporte del peso y el balance correcto del cuerpo durante la fase de apoyo.

Los efectos de la activación de las fibras extensoras Ib durante la locomoción derivan en la expresión de una excitación observada poblacionalmente en las motoneuronas extensoras (*Duysens y Pearson 1980; Conway et al. 1987; Figura 13E*). Es más, se ha demostrado que la activación eléctrica de las aferentes del grupo I de nervios extensores, después de inducirse la actividad locomotriz, genera EPSPs oligosinápticos en motoneuronas extensoras con una latencia de 3.5 – 4 ms, la cual sugiere que estos EPSPs son mediados por una vía interneuronal de al menos tres interneuronas (*Gossard et al., 1994; Figuras 10B y 17A*). Esta vía está posiblemente asociada al *resetting* hacia la extensión (*Figura 13E*), por lo tanto, las neuronas que forman parte de esta vía neuronal, tendrían que pertenecer, a su vez, al generador del ritmo del hemicentro extensor del CPG espinal (*Figura 18A*).

Una evidencia que apoya esta hipótesis, es el hecho de que un tren de tan sólo cinco pulsos en las fibras del grupo I de nervios extensores promueve el inicio de la extensión, es decir, la transición de la flexión hacia la extensión (*Figura 10A y C*). Asimismo, los EPSPs que ocurren durante la fase de extensión son de menor amplitud que aquellos expresados en la flexión (*Figura 10 A y B*), debido a una posible oclusión sináptica a nivel de las interneuronas. Finalmente, de acuerdo con los estudios de *Jankowska et al. (1967 a y b)* y *Lundberg (1981)*, las interneuronas del hemicentro extensor deben ser activadas por las *coFRA* y disparar en fase al reflejo '*extensor cruzado*' de latencia prolongada expresado durante la locomoción. Lo anterior se probó con 22/62 interneuronas, las cuales, efectivamente dispararon con una latencia y duración prolongadas, similar a la descarga de los nervios extensores, tras la estimulación de las *coFRA* (*Figura 12D y 13D*).

Del mismo modo, la estimulación condicionante de las *coFRA* facilita los EPSPs oligosinápticos producidos por la estimulación de las aferentes extensoras del grupo I, lo que indica una convergencia a nivel interneuronal (Conway *et al.*, 1987; Gossard *et al.*, 1994; Figura 6C). En otras palabras, las aferentes extensoras del grupo I accederían al generador del ritmo del hemicentro extensor, a través de algunas de las interneuronas que median los EPSPs oligosinápticos, las cuales deben ser parte del CPG de la locomoción (Figuras 18A; 19).



8.3. Las interneuronas candidatas de la vía excitadora oligosináptica implicadas en el *resetting* hacia la extensión forman parte del hemicentro extensor

En este trabajo se lograron registrar 62 interneuronas, las cuales cumplieron con los dos criterios principales para ser consideradas como candidatas de la vía que media los EPSPs oligosinápticos: *i*) activación con una latencia mono-, di-, o polisináptica, por la estimulación de aferentes del grupo I de nervios extensores; y *ii*) actividad espontánea con el mismo ritmo que la fase de extensión de la locomoción ficticia (*Figuras 12-15*).

De acuerdo con el mapa presentado en la *Figura 16A*, la mayoría de las interneuronas registradas se localizaron en el núcleo intermedio en las láminas VI y VII de Rexed. De las cuales, algunas recibieron conexiones monosinápticas o disinápticas y muchas otras presentaron una convergencia de aferencias mono- y disinápticas; mono- (o di-) y polisinápticas de las aferentes extensoras del grupo I. Asimismo, se registraron interneuronas más ventrales al núcleo intermedio, en la lámina VII (circundantes a los núcleos motores), principalmente con aferencias puramente polisinápticas (o con una mezcla mono-, di- y polisináptica) y otras pocas con conexiones sólo disinápticas de las aferentes extensoras del grupo I.

Si bien, un número considerable de las interneuronas candidatas se localizan en el núcleo intermedio (láminas VI - VII) (*Figura 16A*), ello no descarta que puedan, ya sea, pertenecer al CPG espinal de locomoción, o ser seguidoras del éste (*Figura 18*). En el caso de las interneuronas consideradas de primer orden, estas podrían recibir conexiones de las interneuronas de segundo y tercer orden (candidatas al hemicentro extensor), a través de un circuito reverberante (*Figura 18B*). Este circuito actuaría como un sistema de control o ajuste de la transmisión sináptica de la misma vía excitadora oligosináptica, o de otras vías implicadas en la modulación de la información sensorial durante la locomoción, como son, la vía refleja de corrección al tropiezo (*Fossberg, 1979; McCrea, 2001; Quevedo et al., 2005 a y b*), y las vías que producen la inhibición presináptica en las

fibras aferentes primarias Ia y Ib, así como en las aferentes cutáneas de bajo umbral (*Dueñas y Rudomin, 1988; Gossard et al., 1989, 1991; Gossard, 1996*).

Referente a lo anterior, se ha planteado que existen interneuronas seguidoras del ritmo de la locomoción y que funcionan como relevos, o un primer filtro, y que integran la información sensorial que accederá a los CPGs espinales (*Rossignol et al., 2006; Côté et al., 2018*), a fin de adaptar el ritmo y patrón locomotrices. Tal es el caso de las interneuronas excitadoras que expresan el receptor huérfano nuclear ROR alfa (interneuronas ROR); las cuales reciben información cutánea proveniente de los mecanorreceptores de bajo umbral (*Bourane et al. 2015; Koch, 2019*). O, las interneuronas derivadas del progenitor dorsal 3 (dl3), localizadas en el núcleo intermedio (lamina VII), y que reciben proyecciones de fibras de bajo umbral mielinizadas. Por lo que están asociadas al control de la actividad locomotriz especializada (caminata sobre una barra o rodillo, *v. gr.*) (*Bui et al., 2013; 2016; Koch, 2019*). Debido a que estas interneuronas (ROR ; dl3), así como las candidatas de primer orden (*Figura 12*) se activan rítmicamente durante la locomoción, son consideradas como seguidoras del CPG, lo cual indica que posiblemente reciben proyecciones reverberantes del generador del ritmo (*Figuras 18A y 19B*).

En cuanto a las interneuronas que se localizaron en el núcleo ventral (lámina VII) y que reciben conexiones polisinápticas o poli- y disinápticas de las aferentes extensoras del grupo I, fueron consideraras de segundo o tercer orden (*Figuras 14 y 15*), así como candidatas a pertenecer al RG o a la PF. Ya que, se ha descrito que los CPGs de la locomoción se localizan principalmente en el asta ventral de la médula espinal (en la lámina VII profunda) (*Kjaerulff y Kiehn 1996*). Además de que el registro de los EFPs monosinápticos de las terminales de vías retículoespinales (activadas por la estimulación de la MLR) en el cuerno ventral, sugiere que dichas vías asociadas al inicio de la locomoción hacen conexiones monosinápticas con neuronas localizadas en el cuerno ventral, es decir, con las interneuronas del generador del ritmo (*Noga et al., 1995; Figura 18A*).

El hecho de que algunas de las interneuronas que recibieron proyecciones di-, poli- o poli- y disinápticas de las fibras aferentes extensoras del grupo I

expresaran un mismo patrón de disparo que el *resetting* extensor (*Figura 13 E, 9/62*), afirma la idea de que sean candidatas generadoras del ritmo en el hemicentro extensor (*Figura 18A*). Aun si algunas de ellas fueron localizadas en el núcleo intermedio (lámina VII). Pues se debe considerar que en la médula espinal la distribución de los somas neuronales de las distintas poblaciones es muy dispersa en el núcleo intermedio, en comparación con la estratificación tan definida de las capas de la corteza motora *v.gr.* Asimismo, en el ratón se ha descrito un grupo de interneuronas con capacidad ritmogénica; las cuales expresan el factor de transcripción *Shox2*; pero no el *Chx10*, por lo que se denominan interneuronas *Shox2⁺/Chx10⁻*, cuya localización va desde el núcleo intermedio hasta el asta ventral (en la lámina VII), con una distribución mediolateral (*Dougherty et al., 2013; Li et al., 2019*). Similar a las interneuronas candidatas aquí registradas (*Figura 16A*).

Por otro lado, una característica más de las interneuronas del generador del ritmo, es que tienen proyecciones locales (en el mismo segmento de la médula espinal) e ipsilaterales (*Dougherty et al., 2013; Kiehn 2016; Dougherty y Ha, 2019*). Todas las interneuronas candidatas cumplieron con tal criterio, es decir, no se activaron antidrómicamente desde el núcleo intermedio contralateral ni por la estimulación de los DLF-L1 o por los DLF-L4 bilaterales, fortaleciendo la hipótesis de que las interneuronas candidatas de segundo orden y tercer orden podrían formar parte del hemicentro extensor y que algunas de ellas pertenecerían al generador del ritmo (*Figuras 13E, 18A y 19B*).

Por medio de la técnica del STA se pudo determinar que aquellas interneuronas registradas con activación antidrómica desde los núcleos motores extensores, establecen proyecciones monosinápticas excitadoras con alguna de las poblaciones de motoneuronas de nervios extensores (*Figuras 14 y 15*). Esto es importante, ya que las interneuronas candidatas de la vía que media los EPSPs oligosinápticos deben ser de naturaleza excitadora. No obstante, debido a las condiciones metodológicas, es difícil verificar si las interneuronas candidatas de primer orden, y algunas de segundo orden, son también excitadoras.

Sin embargo, se puede considerar que las interneuronas de segundo orden, candidatas a formar parte del RG del hemicentro extensor, son de naturaleza excitadora. Ya que todas las neuronas ritmogénicas descritas en el ratón hasta el momento tienen un fenotipo glutamatérgico (*Willson et al., 2005; Dougherty et al., 2013; Dougherty y Ha, 2019*), las cuales envían información del ritmo locomotriz a las motoneuronas, por medio de interneuronas premotoneuronales o de último orden. Por ejemplo, se ha descrito un subtipo de interneuronas que expresan ambos factores de transcripción Shox2 y Chx10, denominadas Sho2⁺/Chx10⁺; éstas envían conexiones monosinápticas a las motoneuronas y reciben información de las generadoras del ritmo (Shox2⁺/Chx10⁻). Además, estas neuronas son glutamatérgicas y están consideradas como parte de la red formadora de patrones (*Dougherty et al., 2013; Kiehn 2016*). Lo que sugiere que las interneuronas candidatas de último orden, aquí reportadas, podrían pertenecer a la PF del hemicentro extensor (*Figura 18A y 19*).

Aunque en un principio se planteó un modelo con una arquitectura de tres niveles (*Burke et al. 2001; McCreary y Rybak, 2008*) en el hemicentro extensor (*Figura 19A*). En el cual las interneuronas de primer orden se localizarían en el núcleo intermedio, siendo estas seguidoras del CPG. Mientras que los elementos de segundo y tercer orden, candidatos a ser parte del CPG, se encontrarían localizados principalmente en la parte ventral de la médula espinal. No obstante, algunas de las interneuronas de segundo orden fueron registradas en el núcleo intermedio (en la lámina VI profunda o en la lámina VII superficial, *Figura 16A*) Esto abre la posibilidad de que dichas interneuronas participen en la generación del ritmo de la locomoción, ya que algunas de ellas presentaron un patrón de disparo similar al resetting extensor (*Figura 13 v.gr.*).

De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo de investigación, las aferentes del grupo I de nervios extensores modulan el ritmo locomotriz, favoreciendo la extensión; ya que acceden al hemicentro extensor por medio de la vía excitadora oligosináptica, en la cual participan al menos tres interneuronas entre las fibras extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras (*Figuras 18A y 19B*). Del mismo modo, se debe considerar la opción de que esta vía que media

los EPSPs oligosinápticos reciba información del CPG (*Figura 18B*) y que no sea parte de éste. No obstante, ello implicaría la participación de otra vía alterna y más compleja que actué directamente en el generador del ritmo y también reciba información de las aferentes extensoras de bajo umbral para producir el *resetting* extensor. Además, como se muestra en el *Figura 10C*, la estimulación con un tren breve de pulsos en las aferentes del grupo I de nervios extensores es capaz de dar inicio a la extensión, acortando el tiempo de transición entre la flexión y la extensión; es decir, favorece un cambio en la temporalidad de los ciclos de la locomoción. Esta observación brinda soporte a la hipótesis de que la vía interneuronal que media los EPSPs oligosinápticos está asociada al *resetting* extensor, por lo que comparte algunos elementos neuronales con el generador del ritmo del hemicentro extensor (*Figura 18A*).

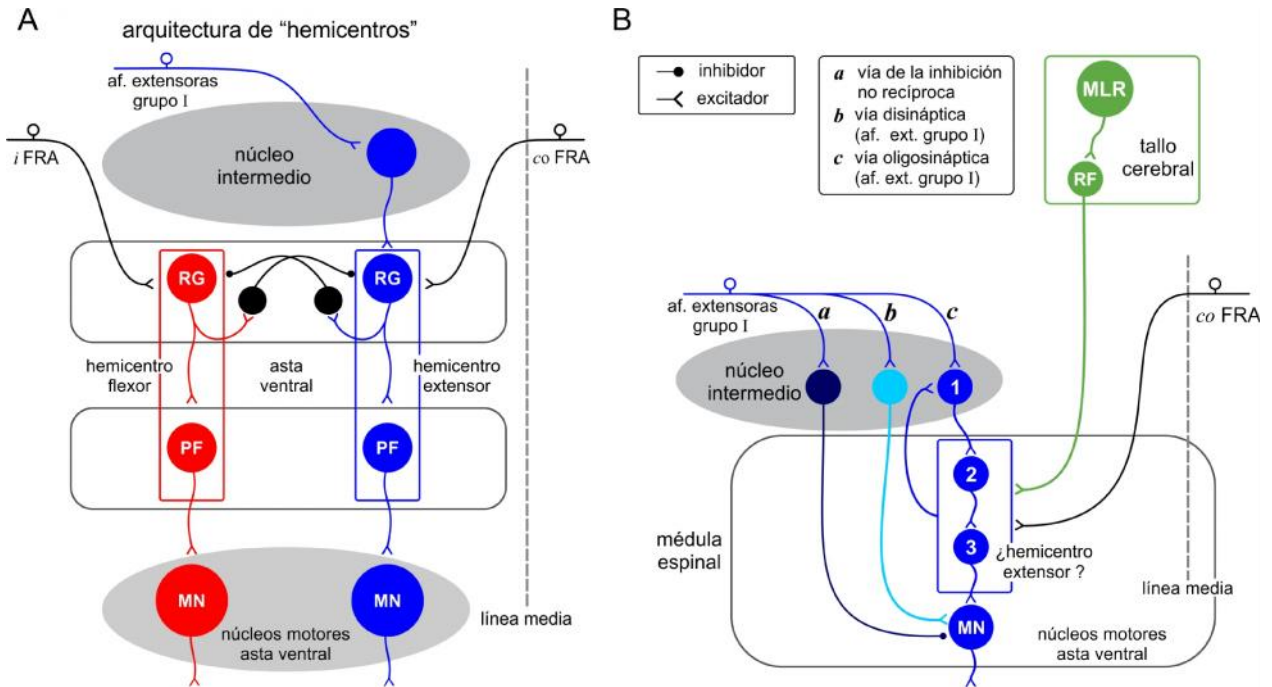


Figura 19. Modelo hipotético del CPG de la locomoción con un arreglo de tres niveles en el hemicentro extensor. **A.** Esquema del modelo de CPG basado en la arquitectura de los hemicentros de T. Graham Brown. Se ilustra las proyecciones de las *i*FRA hacia el hemicentro flexor (rojo), con sus correspondientes dos niveles: el generador del ritmo (RG) y la red formadora de patrones (PF). Asimismo, se muestra el hemicentro extensor (azul), el cual recibe proyecciones de las *co*FRA y de las fibras extensoras del grupo I. En este caso, la interneurona de primer orden de la vía excitadora polisináptica es la que integra la información proveniente de las fibras de bajo umbral de músculos extensores, para después ser enviada al RG y subsecuentemente a la PF. **B.** Esquema de la hipótesis de la vía excitadora polisináptica (*c*) activada por las aferentes extensoras del grupo I durante la locomoción, y que comparte elementos con el hemicentro extensor: interneuronas de segundo (2) y de último orden (3). Se ilustra a la interneurona de primer orden (1) recibiendo proyecciones reverberantes desde el hemicentro extensor (ver detalles en la *Figura 18*).

IX. CONCLUSIÓN

La información sensorial proveniente de músculos extensores facilita la transición de la fase de flexión a la de extensión durante la locomoción ficticia, por ende, tiene la capacidad de modular la temporalidad del ritmo locomotriz. Este cambio en la temporalidad, o *resetting* hacia a la extensión, ocurre a través de una vía interneuronal excitadora conformada por al menos tres interneuronas interpuestas entre las fibras del grupo I de nervios extensores y las motoneuronas extensoras. Por consiguiente, dicha vía comparte elementos con el generador del ritmo del hemicentro extensor.

9.1. Hallazgos relevantes

1. En este estudio se pudo confirmar que la estimulación de las fibras aferentes del grupo I de músculos extensores, durante la locomoción ficticia inducida por L-DOPA, produce EPSPs oligosinápticos en las motoneuronas extensoras con una latencia promedio de 3.5 ms, lo cual es compatible con una vía de tres interneuronas interpuestas entre las aferentes extensoras del grupo I y las motoneuronas extensoras
2. Las interneuronas que conforman esta vía excitadora podrían ser parte del hemicentro extensor, ya que se activan rítmicamente durante la fase de extensión y en respuesta a la estimulación de aferentes del grupo I de músculos extensores con latencias mono-, di-, y polisinápticas, o una combinación de ellas. Además, exhiben una descarga concomitante al reflejo extensor cruzado, con una latencia y duración prolongadas por la estimulación de las *coFRA*
3. Las interneuronas de segundo orden con un patrón de disparo similar al *resetting* extensor podrían formar parte del generador del ritmo del hemicentro extensor (*Figuras 13, 17 y 18A*)

X. PERSPECTIVAS A FUTURO

1. Evaluar si ocurre una oclusión sináptica a nivel de las interneuronas durante la locomoción, mediante el registro de las espigas extracelulares de interneuronas que disparan rítmicamente durante la extensión y aquellas producidas por la estimulación simultánea de las fibras aferentes extensoras del grupo I
2. Investigar las vías neuronales implicadas en la regulación de ritmo locomotriz producido por la estimulación de aferentes musculares flexoras del grupo II y cutáneas
3. Investigar los posibles mecanismos involucrados en la reversión de la *inhibición no recíproca* a una excitación oligosináptica
4. Desarrollar la preparación del ratón descerebrado con locomoción ficticia inducida por la aplicación de L-DOPA (Meehan et al., 2017, 2017), con la finalidad de obtener un modelo de estudio de los circuitos espinales de la locomoción en el ratón adulto *in vivo*
 - a) Estudiar el control de la información sensorial en el ritmo locomotriz
 - b) Investigar en ratones transgénicos con técnicas de optogenética las interneuronas asociadas al *resetting* extensor
 - c) Realizar un marcaje retrógrado transináptico de las interneuronas que producen *resetting*, mediante la inyección intramuscular (en músculos extensores) de trazadores virales y demostrar el genotipo de las interneuronas (Shox2, Hb9, *v.gr.*)

XI. REFERENCIAS

- Andén NE**, Jukes MG, Lundberg A, Vyklický L. (1996 a). The effect of DOPA on the spinal cord 1. Influence on transmission from primary afferents. *Acta Physiol Scand* 67: 373-386. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1966.tb03324.x
- Andén NE**, Jukes MG, Lundberg A (1996 b). The effect of DOPA on the spinal cord 2. A pharmacological analysis. *Acta Physiol Scand* 67:387-397. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1966.tb03325.x
- Angel MJ**, Guertin P, Jiménez I, McCrea DA. (1996). Group I extensor afferents evoke disynaptic EPSPs in cat hindlimb extensor motoneurons during fictive locomotion. *J Physiol* 494:851-861. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021538
- Angel MJ**, Jankowska E, McCrea DA (2005) Candidate interneurons mediating group I disynaptic EPSPs in extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 563:597-610. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.076034
- Arber S**, Costa RM. (2018). Connecting neuronal circuits for movement. *Science* 360: 1403-1404. DOI: 10.1126/science.aat5994
- Azmitia EC**. (1999). Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21:33S-45S. DOI: 10.1016/S0893-133X(99)00022-6
- Barbeau H**, Rossignol S. (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult cat chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res* 546: 250-260. DOI: 10.1016/0006-8993(91)91489-N
- Berg RW**, Alaburda A, Hounsgaard J. (2007). Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal half-centers. *Science* 315: 390-393. DOI: 10.1126/science.1134960
- Biering-Sørensen F**, Nielsen JB, Klinge K. (2006). Spasticity-assessment: a review. *Spinal Cord* 44:708-722. DOI: 10.1038/sj.sc.3101928
- Bourane S**, Duan B, Koch SC, et al. (2015). Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. *Science* 350: 550-554. DOI:10.1126/science.aac8653
- Bouvier J**, Caggiano V, Leiras R, Caldeira V, Bellardita C, Balueva K, Fuchs A, Kiehn O. (2015). Descending Command Neurons in the Brainstem that Halt Locomotion. *Cell* 163:1191-1203. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.074
- Brown AG**, Fyffe RE. (1979). The morphology of group Ib afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J Physiol* 296:215-226. DOI: 10.1113/jphysiol.1979.sp013001
- Brown TG**. (1911). The Intrinsic Factors in the Act of Progression in the Mammal. *Proc R Soc B Biol Sci* 84:308-319. DOI: 10.1098/rspb.1911.0077
- Brown TG**. (1912). Rhythmic movements: a contribution in the study of the central nervous system. *Thesis University of Edinburgh* Edinburgh
- Brown TG**. (1914). On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system. *J Physiol* 48:18-46. DOI: 10.1113/jphysiol.1914.sp001646

- Brown TG.** (1924). Studies in the Physiology of the Nervous System. XXVIII: Absence of algebraic equality between the magnitudes of central excitation and effective central inhibition given in the reflex centre of a single limb by the same reflex stimulus. *Quart J Exp Physio* 14:1-23. DOI: 10.1113/expphysiol.1924.sp000309
- Brownstone RM, Chopek JW.** (2018). Reticulospinal systems for tuning motor commands. *Front in Neural Circ Frontiers Media S.A.* DOI: 10.3389/fncir.2018.00030
- Buchanan JT, Grillner S, Cullheim S, Risling M.** (1989). Identification of excitatory interneurons contributing to generation of locomotion in lamprey: structure, pharmacology, and function. *J Neurophysiol* 62: 59-69. DOI:10.1152/jn.1989.62.1.59
- Bui TV, Akay T, Loubani O, Hnasko TS, Jessell TM, Brownstone RM.** (2013). Circuits for grasping: spinal dl3 interneurons mediate cutaneous control of motor behavior. *Neuron* 78: 191-204. DOI:10.1016/j.neuron.2013.02.007
- Burke RE, Degtyarenko AM, Simon ES.** (2001). Patterns of locomotor drive to motoneurons and last-order interneurons: Clues to the structure of the CPG. *J Neurophysiol* 84:447-462. DOI: 10.1152/jn.2001.86.1.447
- Cabaj AM, Majcyn´ski H, Couto E, Gardiner PF, Stecina K, Sławin´ska U, Jordan LM.** (2017). Serotonin controls initiation of locomotion and afferent modulation of coordination via 5-HT7 receptors in adult rats. *J Physiol* 595: 301-320. DOI: 10.1113/JP272271
- Caggiano V, Leiras R, Goñi-Erro H, Masini D, Bellardita C, Bouvier J, Caldeira V, Fisone G, Kiehn O.** (2018). Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature* 55:455-460. DOI: 10.1038/nature25448
- Cappelli P, Pivetta C, Esposito S, Arber S.** (2017). Locomotor speed control circuits in the caudal brainstem. *Nature* 16:551(7680):373-377. DOI: 10.1038/nature24064
- Conway BA, Hultborn H, Kiehn O.** (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Exp Brain Res* 68:643-656. DOI: 10.1007/BF00249807
- Côté MP, Murray LM, Knikou M.** (2018). Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions. *Front in Physiol* 9:784. DOI: 10.3389/fphys.2018.00784
- Cowley KC, Schmidt BJ.** (1994). A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neurosci Lett* 71:147-150. DOI: 10.1016/0304-3940(94)90626-2
- Cullheim S, Arvidsson U.** (1995). The peptidergic innervation of spinal motoneurons via the bulbospinal 5-hydroxytryptamine pathway. *Prog Brain Res* 104: 21-40. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)61782-3
- Dietz V, Duysens J.** (2000). Significance of load receptor input during locomotion: a review. *Gait Posture* 1: 102-110. DOI: 10.1016/s0966-6362(99)00052-1
- Donelan JM, Pearson KG.** (2004). Contribution of force feedback to ankle extensor activity in decerebrate walking cats. *J Neurophysiol* 92: 2093-2104. DOI:10.1152/jn.00325.2004
- Dougherty KJ, Ha NT.** (2019). The rhythm section: an update on spinal interneurons setting the beat for mammalian locomotion. *Curr Opin Physiol* 8: 84-93. DOI: 10.1016/j.cophys.2019.01.004

- Dougherty KJ**, Zagoraïou L, Satoh D, Rozani I, Doobar S, Arber S, Jessell TM, Kiehn O. (2013). Locomotor Rhythm Generation Linked to the Output of Spinal Shox2 Excitatory Interneurons. *Neuron* 80:920-933. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.08.015
- Dueñas SH**, Rudomin P. (1988). Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* 70: 15-25. DOI: 10.1007/BF00271842
- Duysens J**, Pearson KG. (1980). Inhibition of flexor burst generation by loading ankle extensor muscles in walking cats. *Brain Res* 187:321-332. DOI: 10.1016/0006-8993(80)90206-1
- Eccles JC**, Eccles RM, Lundberg A. (1957). Synaptic actions on motoneurons caused by impulses in Golgi tendon organ afferents. *J Physiol* 138:227-252. DOI: 10.1113/jphysiol.1957.sp005849
- Eccles JC**, Fatt P, Landgren S, Winsbury GJ. (1954). Spinal cord potentials generated by volleys in the large muscle afferents. *J Physiol* 125:590-606. DOI: 10.1113/jphysiol.1954.sp005183
- El Manira A**, Zhang W, Svensson E, Bussi eres N. (1997). 5-HT inhibits calcium current and synaptic transmission from sensory neurons in lamprey. *J Neurosci* 17: 1786-1794. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-05-01786.1997
- Endo T**, Kiehn O. (2008). Asymmetric operation of the locomotor central pattern generator in the neonatal mouse spinalcord. *J. Neurophysiol* 100:3043-54. DOI: 10.1152/jn.90729.2008
- Engberg I**, Lundberg A. (1969). An Electromyographic Analysis of Muscular Activity in the Hindlimb of the Cat during Unrestrained Locomotion. *Acta Physiol Scand* 75:614-630. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1969.tb04415.x
- Fetz EE**, Jankowska E, Johannisson T, Lipski J. (1979). Autogenetic inhibition of motoneurons by impulses in group Ia muscle spindle afferents. *J Physiol* 293:173-195. DOI: 10.1113/jphysiol.1979.sp012884
- Fetz EE**, Perlmutter SI, Maier MA, Flament D, Fortier PA. (1996). Response patterns and postspike effects of premotor neurons in cervical spinal cord of behaving monkeys. In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Canadian Science Publishing 74:531-546. DOI: 10.1139/y96-036
- Fleshman JW**, Lev-Tov A, Burke RE. (1984). Peripheral and central control of flexor digitorum longus and flexor hallucis longus motoneurons: The synaptic basis of functional diversity. *Exp Brain Res* 54:133-149. DOI: 10.1007/BF00235825
- Forsberg H**, Grillner S. (1973). The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res* 50:184-186. DOI: 10.1016/0006-8993(73)90606-9
- Forsberg H**. (1979). Stumbling corrective reaction: A phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *J Neurophysiol* 42:936-953. DOI: 10.1152/jn.1979.42.4.936
- Frigon A**, Rossignol S. (2006). Functional plasticity following spinal cord lesions. *Prog Brain Res* 157:231-260. DOI: 10.1016/s0079-6123(06)57016-5
- Garcia-Rill E**, Skinner RD, Fitzgerald JA. (1985). Chemical activation of the mesencephalic locomotor region. *Brain Res* 330: 43-54. DOI: 10.1016/0006-8993(85)90006-x
- Garcia-Rill E**. (1986). The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res* 11: 47-63. DOI: 10.1016/0165-0173(86)90009-3

- Ghosh M**, Pearse DD. (2015). The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Front in Neural Circ* 8:151. DOI: 10.3389/fncir.2014.00151
- Gossard JP**, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H. (1994). Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* 98:213-228. DOI: 10.1007/BF00228410
- Gossard JP**, Cabelguen JM, Rossignol S. (1989). Intra-axonal recordings of cutaneous primary afferents during fictive locomotion in the cat. *J Neurophysiol* 62:1177-1188. DOI: 10.1152/jn.1989.62.5.1177
- Gossard JP**, Cabelguen JM, Rossignol S. (1991). An intracellular study of muscle primary afferents during fictive locomotion in the cat. *J Neurophysiol* 65:914-926. DOI: 10.1152/jn.1991.65.4.914
- Gossard JP**. (1996). Control of transmission in muscle group Ia afferents during fictive locomotion in the cat. *J Neurophysiol* 76: 4104-4112. DOI: 10.1152/jn.1996.76.6.4104
- Grillner S**, El Manira A. (2020). Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. *Physiol Rev* 100:271–320. DOI:10.1152/physrev.00015.2019
- Grillner S**, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs—roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28: 364–370. DOI: 10.1016/j.tins.2005.05.004.
- Grillner S**, Rossignol S. (1978). On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats. *Brain Res* 146:269-277. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90973-3
- Grillner S**, Shik ML. (1973). On the descending control of the lumbosacral spinal cord from the “mesencephalic locomotor region”. *Acta Physiol Scand* 87: 320-333. DOI: 10. 1111/j.1748-1716.1973.tb05396.x
- Grillner S**, Zangger P. (1975). How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Res* 88: 367-371. DOI: 10.1016/0006-8993(75)90401-1
- Grillner S**, Zangger P. (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* 34: 241-261. DOI: 10.1007/BF00235671
- Grillner S**. (1973). Locomotion in the spinal cat: In control of posture and locomotion. *Adv. in Behav. Biol.* (pp. 515-535). DOI:
- Grillner S**. (1981). Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In JM.; Mountcastle, VB., (edit). Handbook of Physiology-The Nervous Brookhart System II. *American Physiological Society* (pp.1179-1236). DOI: 10.1002/cphy.cp010226
- Guertin P**, Angel MJ, Perreault MC, McCrea DA. (1995). Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487:197-209. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020871
- Han P**, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ. (2007). Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *J of Neurosci* 27: 13192-13204. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1279-07.2007
- Han P**, Whelan PJ. (2009). Modulation of AMPA Currents by D(1)-like but Not D(2)-like Receptors in Spinal Motoneurons. *Neurosci* 158:1699-707. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.11.040

- Harrison PJ**, Jankowska E, Johannisson T. (1983). Shared reflex pathways of group I afferents of different cat hind-limb muscles. *J Physiol* 338:113-128. DOI: 10.1113/jphysiol.1983.sp014664
- Hiebert GW**, Whelan PJ, Prochazka A, Pearson KG. (1996). Contribution of hind limb flexor muscle afferents to the timing of phase transitions in the cat step cycle. *J Neurophysiol* 75:1126-1137. DOI: 10.1152/jn.1996.75.3.1126
- Hongo T**, Ishizuka N, Mannen H, Sasaki S. (1978). Axonal trajectory of single group Ia and Ib fibers in the cat spinal cord. *Neurosci Lett* 8:321-328. DOI: 10.1016/0304-3940(78)90143-X
- Hultborn H**, Conway BA, Gossard JP, Brownstone R, Fedirchuk B, Schomburg ED, Enriquez-Denton M, Perreault M. (1998). How do we approach the locomotor network in the mammalian spinal cord? *Ann NY Acad Sci* 16:70-82. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09039.x
- Hultborn H**. (2003). Changes in neuronal properties and spinal reflexes during development of spasticity following spinal cord lesions and stroke: studies in animal models and patients. *J Rehabil Med* 46-55. DOI: 10.1080/16501960310010142
- Jankowska E**, Johannisson T, Lipski J. (1981). Common interneurons in reflex pathways from group Ia and Ib afferents of ankle extensors in the cat. *J Physiol* 310:381-402. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013556
- Jankowska E**, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A. (1967a). The Effect of DOPA on the Spinal Cord 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand* 70: 369-388. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1967.tb03636.x
- Jankowska E**, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A. (1967b). The Effect of DOPA on the Spinal Cord 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol Scand* 70: 389-402. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1967.tb03637.x
- Jankowska E**, Lindström S. (1972). Morphology of interneurons mediating Ia reciprocal inhibition of motoneurons in the spinal cord of the cat. *J Physiol* 226:805-823. DOI: 10.1113/jphysiol.1972.sp010011
- Jankowska E**. (1992). Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog Neurobiol* 38: 335-378. DOI: 10.1016/0301-0082(92)90024-9pe
- Jordan LM**, Pratt CA, Menzies JE. (1979). Locomotion evoked by brain stem stimulation: occurrence without phasic segmental afferent input. *Brain Res* 177:204-207. DOI: 10.1016/0006-8993(79)90933-8
- Josset N**, Roussel M, Lemieux M, Lafrance-Zoubga D, Rastqar A, Bretzner F. (2018). Distinct Contributions of Mesencephalic Locomotor Region Nuclei to Locomotor Control in the Freely Behaving Mouse. *Curr Biol* 28: 884-901.e3. DOI: 10.1016/j.cub.2018.02.007
- Kiehn O**, Dougherty K. (2013). Locomotion: Circuits and physiology. In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical* (pp. 1209-1236). Springer. DOI:
- Kiehn O**, Hultborn H, Conway BA. (1992). Spinal locomotor activity in acutely spinalized cats induces by intrathecal application of noradrenaline. *Neurosci Lett* 143: 243-246. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90274-B

- Kiehn O**, Kjærulff O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J Neurophysiol* 75: 1472-1482. DOI: 10.1152/jn.1996.75.4.1472
- Kiehn O**. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29: 279-306. DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910
- Kiehn O**. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nat Rev Neurosci* 17: 224-238. DOI: 10.1038/nrn.2016.9
- Kim LH**, Sharma S, Sharples SA, Mayr KA, Kwok CHT, Whelan PJ. (2017). Integration of descending command systems for the generation of context-specific locomotor behaviors. *Front in Neurosci* 11: 581. DOI: 10.3389/fnins.2017.00581
- Kjaerulff O**, Kiehn O. (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord In vitro: A lesion study. *J Neurosci* 16:5777-5794. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-18-05777.1996
- Koch SC**. (2019). Motor task-selective spinal sensorimotor interneurons in mammalian circuits. *Curr Opin Physiol*. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/j.cophys.2019.01.014
- Li EZ**, Garcia-Ramirez DL, Dougherty KJ. (2019). Flexor and Extensor Ankle Afferents Broadly Innervate Locomotor Spinal Shox2 Neurons and Induce Similar Effects in Neonatal Mice. *Front Cell Neurosci* 13:452. DOI: 10.3389/fncel.2019.00452
- Lin S**, Li Y, Lucas-Osma AM, et al. (2019). Locomotor-related V3 interneurons initiate and coordinate muscles spasms after spinal cord injury. *J Neurophysiol* 121:1352-1367. DOI:10.1152/jn.00776.2018
- López Ruiz LP**, Osuna Carrasco CL, López Valenzuela NE, Franco Rodríguez B, de la Torre Valdovinos B, Jiménez Estrada I, Dueñas Jiménez JM, and Dueñas Jiménez SH, (2015). The hippocampus participates in the control of locomotion speed. *Neurosci* 311:207-215. DOI: 10.1016/j.n.2015.10.034
- Lundberg A**. (1979). Multisensory control of spinal reflex pathways. *Prog Brain Res* 50:11-28. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)60803-1
- Lundberg A**. (1981). HALF-CENTRES REVISITED. In: Regulatory Functions of the CNS Principles of Motion and Organization, pp 155–167. *Elsevier*. DOI: 10.1016/b978-0-08-026814-9.50025-9
- Lyle MA**, Nichols TR. (2018). Patterns of intermuscular inhibitory force feedback across cat hindlimbs suggest a flexible system for regulating whole limb mechanics. *J Neurophysiol* 119: 668-678. DOI: 10.1152/jn.00617.2017
- McCrea DA**, Rybak IA. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57: 134-146. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.08.006
- McCrea DA**, Shefchyk SJ, Stephens MJ, Pearson KG. (1995). Disynaptic group I excitation of synergist ankle extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487: 527-539. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020897
- McCrea DA**. (2001). Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J Physiol* 15:41-50. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0041b.x

- Meehan CF**, Grondahl L, Nielsen JB, Hultborn H. (2012). Fictive locomotion in the adult decerebrate and spinal mouse in vivo. *J Physiol* 590: 289-300. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.214643
- Meehan CF**, Mayr, KA, Manuel M, Nakanishi ST, Whelan PJ. (2017). Decerebrate mouse model for studies of the spinal cord circuits. *Nature Protocols* 12: 732-747. DOI: 10.1038/nprot.2017.001
- Ménard A**, Grillner S. (2008). Diencephalic locomotor region in the lamprey afferents and efferent control. *J Neurophysiol* 100: 1343-1353. DOI:10.1152/jn.01128.2007
- Mori S**, Sakamoto T, Ohta Y, Takakusaki K, Matsuyama K. (1989). Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res* 505: 66-74. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90116-9
- Nichols TR**. (1994). A biomechanical perspective on spinal mechanisms of coordinated muscular action: an architecture principle. *Acta Anat (Basel)* 151: 1-13. DOI: 10.1159/000147637
- Nichols TR**. (2018). Distributed force feedback in the spinal cord and the regulation of limb mechanics. *J Neurophysiol* 119:1186-1200. DOI:10.1152/jn.00216.2017
- Noga BR**, Fortier PA, Kriellaars DJ, Dai X, Detillieux GR, Jordan LM. (1995). Field potential mapping of neurons in the lumbar spinal cord activated following stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurosci* 15: 2203-2217. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-02203.1995
- Noga BR**, Kriellaars DJ, Brownstone RM, Jordan LM. (2003). Mechanism for activation of locomotor centers in the spinal cord by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90: 1464-1478. DOI: 10.1152/jn.00034.2003
- Noga BR**, Turkson RP, Xie S, Taberner A, Pinzon A, Hentall ID. (2017). Monoamine release in the cat lumbar spinal cord during fictive locomotion evoked by the mesencephalic locomotor region. *Front in Neural Circ* 11. DOI:10.3389/fncir.2017.00059
- O'Donovan MJ**, Pinter MJ, Dum RP, Burke RE. (1982). Actions of FDL and FHL muscles in intact cats: Functional dissociation between anatomical synergists. *J Neurophysiol* 47:1126-1143. DOI: 10.1152/jn.1982.47.6.1126
- Ohta Y**, Mori S, Kimura, H. (1988). Neuronal structures of the brain stem participating in postural suppression both in decerebrate cats and in freely moving, awake cats. *Exp Brain Res* 5: 181-202. DOI: 10.1016/0168-0102(88)90048-X
- Orlovsky GN**. (1969). Spontaneous and induced locomotion in the thalamic cat. *Biophysics* 14: 115-162. DOI:
- Pacheco P**, Guzmán-Flores C. (1969). Intracellular recording in extensor motoneurons of spastic cats. *Exp Neurol* 25:472-481. DOI: 10.1016/0014-4886(69)90091-0
- Pearson KG**, Collins DF. (1993). Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity. *J Neurophysiol* 70:1009-1017 DOI: 10.1152/jn.1993.70.3.1009
- Pearson KG**. (2008). Role of sensory feedback in the control of stance duration in walking cats. *Brain Res Rev* 57: 222-227. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.014

- Perreault MC**, Angel MJ, Guertin P, McCrea DA. (1995). Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487: 211-220. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020872
- Perret C**, Cabelguen JM. (1976). Central and reflex participation in the timing of locomotor activations of a bifunctional muscle, the semi-tendinosus, in the cat. *Brain Res* 106:390-395. DOI: 10.1016/0006-8993(76)91035-0
- Perret C**, Cabelguen JM. (1980). Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. *Brain Res* 187:333-352 DOI: 10.1016/0006-8993(80)90207-3
- Puhl JG**, Masino MA, Mesce KA. (2012). Necessary, sufficient and permissive: A single locomotor command neuron important for intersegmental coordination. *J Neurosci* 32: 17646-17657. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2249-12.2012
- Puhl JG**, Mesce KA. (2008). Dopamine activates the motor pattern for crawling in the medicinal leech. *J Neurosci* 28: 4192-4200. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0136-08.2008
- 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
- 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
- Roseberry TK**, Lee AM, Lalive AL, Wilbrecht L, Bonci A, Kreitzer AC. (2016). Cell-Type Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell* 164: 526–537. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.037.
- Ross KT**, Nichols TR. (2009). Heterogenic feedback between hindlimb extensors in the spontaneously locomoting preammillary cat. *J Neurophysiol* 101: 184-197. DOI: 10.1152/jn.90338.2008
- Rossignol S**, Dubuc R, Gossard JP. (2006). Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiol Rev* 86: 89-154. DOI: 10.1152/physrev.00028.2005
- Rossignol S**, Martinez M, Escalona M, Kundu A, Delivet-Mongrain H, Alluin O, Gossard JP. (2015). The "beneficial" effects of locomotor training after various types of spinal lesions in cats and rats. *Prog Brain Res* 218:173-198. DOI: 10.1016/bs.pbr.2014.12.009
- 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*. DOI:
- Rybak IA**, Shevtsova NA, Lafreniere-Roula M, McCrea DA. (2006a). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: Insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol* 577:617-639. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.118703
- Rybak IA**, Stecina K, Shevtsova NA, McCrea DA. (2006b) Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: Insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol* 577:641-658. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.118711

- Schomburg ED**, Behrends HB. (1978). The possibility of phase-dependent monosynaptic and polysynaptic Ia excitation to homonymous motoneurons during fictive locomotion. *Brain Res* 143: 533-537. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90363-3
- Schomburg ED**, Petersen N, Barajon I, Hultborn H. (1998). Flexor reflex afferents reset the step cycle during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* 122: 339-350. DOI: 10.1007/s002210050522
- Schwartz EJ**, Gerachshenko T, Alford S. (2005). 5-HT prolongs ventral root bursting via presynaptic inhibition of synaptic activity during fictive locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 93: 980–988, 2005. DOI:10.1152/jn.00669.2004
- Sharma S**, Kim LH, Whelan PJ. (2019). Towards a connectome of descending commands controlling locomotion. *Curr Opin Physiol Elsevier Ltd*. DOI: 10.1016/j.cophys.2018.12.005
- Sharples SA**, Koblinger K, Humphreys JM, Whelan PJ. (2014). Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Front in Neural Circ* 8:55. DOI: 10.3389/fncir.2014.00055
- Sharples SA**, Whelan PJ. (2017). Modulation of rhythmic activity in mammalian spinal networks is dependent on excitability state. *ENeuro* 4. DOI: 10.1523/ENEURO.0368-16.2017
- Sherrington CS**. (1910). Flexion-reflex on the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J. Physiol Lond* 40: 28-121. DOI: 10.1113/jphysiol.1910.sp001362
- Shik ML**, Orlovskii GN, Severin F V. (1966a). Organization of locomotor synergism. *Biophysics (Oxf)* 11:879-886. DOI:
- Shik ML**, Severin F V., Orlovskii GN. (1966b). Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics (Oxf)* 11: 659-666. DOI:
- Shik ML**, Severin FV, Orlovsky GN. (1967). Structures of the brain stem responsible for evoked locomotion. *Sechenov Physiol J USSR* 53: 1125-1132. DOI:
- Sqalli-Houssaini Y**, Cazalets JR. (2000). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Res* 852: 100-109. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)02219-2
- 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
- Takakusaki K**, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, Habaguchi T. (2004). Role of basal ganglia brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143: 231-237. DOI: 10.1016/S0079-6123(03)43023-9
- Takeoka A**, Arber S. (2019). Functional Local Proprioceptive Feedback Circuits Initiate and Maintain Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell Rep* 27:71-85.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.010
- Takeoka A**, Vollenweider I, Courtine G, Arber S. (2014). Muscle spindle feedback directs locomotor recovery and circuit reorganization after spinal cord injury. *Cell* 159:1626-1639. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.019

- Tartas M**, Morin F, Barrière G, Goillandeau M, Lacaille JC, Cazalets JR, Bertrand SS. (2010). Noradrenergic modulation of intrinsic and synaptic properties of lumbar motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Front in Neural Circ* 4. DOI: 10.3389/neuro.04.004.2010
- Wallén P**, Buchanan JT, Grillner S, Hill RH, Christenson J, Hökfelt T. (1989). Effects of 5-hydroxytryptamine on the afterhyperpolarization, spike frequency regulation, and oscillatory membrane properties in lamprey spinal cord neurons. *J Neurophysiol* 61:759-768. DOI:10.1152/jn.1989.61.4.759
- Whelan P**. (1996). Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog in Neurobiol* 49: 481-515. DOI: 10.1016/0301-0082(96)00028-7
- Wilson JM**, Hartley R, Maxwell DJ, Todd AJ, Lieberam I, Kaltschmidt JA, Yoshida Y, Jessell TM, Brownstone RM. (2005). Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein. *J Neurosci* 25:5710-5719. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0274-05.2005