

ANÁLISIS DE LAS FLUCTUACIONES DEL POTENCIAL DE RESPOSO


INTERESPIGA DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA NEURONAL

TESIS QUE PRESENTA

**ALBERTO SESEÑA RUBFIARO**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**DR. JOSÉ RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ**

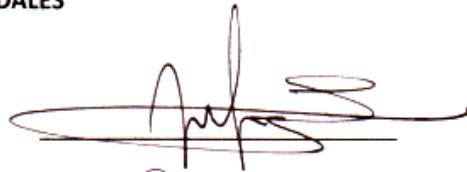
**ASESORES**



**DR. JUAN CARLOS ECHEVERRÍA ARJONILLA**

**SINODALES**

**DR. ROBERTO ÁVILA POZOS**



**DR. MIGUEL ÁNGEL PEÑA CASTILLO**



**DR. JUAN CARLOS ECHEVERRÍA ARJONILLA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**11 DE FEBRERO DEL 2013**

## AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana y en especial a la sección de estudios de posgrado de ingeniería biomédica por darme la oportunidad de alcanzar un paso más en mi formación profesional así como al consejo nacional de ciencia y tecnología por haberme brindado una beca la cual me permitió alcanzar mis objetivos.

En especial a mis asesores de proyecto el Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla y el Dr. José Rafael Godínez Fernández por todo el apoyo brindado durante todo el proceso de mi investigación y culminación de esta tesis.

A los profesores miembros del jurado, Dr. Roberto Ávila Pozos, Dr. Miguel Ángel Peña Castillo, Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla por sus comentarios y correcciones que sirvieron para mejorar la calidad de este trabajo de investigación.

Un muy sincero agradecimiento al Dr. Juan Bernal por su apoyo brindado durante la fase experimental de mi tesis sin la cual no podría haber avanzado rápidamente.

A mi familia, mis amigos, compañeros de trabajo quienes me han acompañado en el transcurso de mi vida.

## Contenido General.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
LA MEMBRANA CELULAR.....	2
TRANSPORTE DE IONES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR.....	2
<i>Difusión pasiva.....</i>	3
<i>Difusión facilitada.....</i>	3
<i>Transporte activo.....</i>	3
SISTEMA NERVIOSO DEL ESPÉCIMEN HÉLIX ASPERSA.....	5
ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN NEURONAS DE HÉLIX ASPERSA.....	6
ANÁLISIS DE FLUCTUACIONES, UN ENFOQUE FRACTAL.....	8
<i>Geometría fractal.....</i>	8
<i>Propiedades de las estructuras fractales.....</i>	9
ANÁLISIS DE SERIES DE TIEMPO FRACTALES.....	10
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
PREPARACIÓN BIOLÓGICA.....	153
REACTIVOS Y SOLUCIONES EXPERIMENTALES.....	15
DISECCIÓN Y AISLAMIENTO DE LA MASA GANGLIONAR <i>PERIOESOFÁGICO</i> DEL CARACOL DE JARDÍN HÉLIX ASPERSA.....	16
PROCEDIMIENTO PARA EL REGISTRO INTRACELULAR DE NEURONAS IDENTIFICADAS DEL CARACOL HÉLIX ASPERSA.....	17
MANEJO DEL AMPLIFICADOR PARA REGISTRO INTRACELULAR.....	18
ANÁLISIS NO LINEAL DE LOS DATOS.....	21
<i>Análisis de fluctuaciones sin tendencia.....</i>	21
ANÁLISIS EN FRECUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA INTERESPIGA.....	24
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
CONJUNTO 1 DE RESULTADOS.....	25
CONJUNTO 2 DE RESULTADOS.....	27
CONJUNTO 3 DE RESULTADOS.....	30
CONJUNTO 4 DE RESULTADOS.....	33
CONJUNTO 5 DE RESULTADOS.....	35
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO 1. RESUMEN DE CONGRESO.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO 2. TABLAS DEL PARÁMETRO ALFA OBTENIDO.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO 3. AUTO AFINIDAD EN EL SEGMENTO INTERESPIGA.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>51</b>

## Resumen.

Con el fin de investigar la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos moduladores del potencial de membrana, en este trabajo se estudiaron las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga en la neurona 1F del ganglio subesofágico del espécimen *Hélix Aspersa* obtenidas mediante registros intracelulares.

Aplicando la herramienta de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA) en los segmentos interespiga de 12 neuronas en actividad eléctrica espontánea, se encontró un exponente de escalamiento  $\alpha=0.971 \pm 0.045$  lo que corresponde a un comportamiento de tipo fractal 1/f. Al realizar permutaciones aleatorias de las fluctuaciones de voltaje en segmentos interespiga, se obtiene un valor de  $\alpha=0.526 \pm 0.009$  que muestra diferencias estadísticamente significativas con un valor de  $p<0.0001$ . En contraste a los valores que toma el exponente  $\alpha$  en los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea, cuando se aplicó un estímulo externo de corriente hiperpolarizante (4 nA) las fluctuaciones en el potencial de membrana de la neurona mostraron  $\alpha=0.692 \pm 0.075$  para los intervalos entre estímulo de 17 neuronas.

Estos resultados indican que para los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea las fluctuaciones de voltaje se encuentran correlacionadas, lo que sugiere coherencia y dependencia temporal en los cambios conformacionales de los canales iónicos. Éstos no manifiestan entonces una dinámica aleatoria, sino que por el contrario reflejan memoria o correlaciones estadísticas persistentes a lo largo de diferentes escalas temporales; circunstancia que no necesariamente coincide con los modelos convencionales “Markovianos” que describen el comportamiento de un canal iónico y que se generalizan para el resto de las poblaciones existentes en la membrana celular.

Al aplicar un estímulo externo de corriente se genera una disminución en las correlaciones de largo plazo en el potencial de membrana determinada posiblemente por la entrada masiva de calcio al medio intracelular, activando así una cascada neurotóxica que en su conjunto afecta directamente la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos moduladoras del potencial de membrana.

Al dividir los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea en dos regiones con la misma longitud se encontró que la dinámica existente en ambas regiones fue estadísticamente similar ( $\alpha=0.876 \pm 0.148$  vs  $\alpha=0.896 \pm 0.164$ ,  $p=0.234$ ). Esto sugiere que los mecanismos moduladores del potencial de membrana actúan a lo largo de todo el segmento interespiga. Se ha considerado que los canales de  $K^+$ , SK son los principales responsables del control del postpotencial. De esta forma a diferencia de lo que normalmente se ha descrito, la activación y desactivación de las diferentes poblaciones de canales SK no están limitadas al tiempo inmediato posterior a la repolarización, sino que parecen manifestarse en todo el segmento interespiga modulando así la frecuencia de aparición de la espiga.

11 de febrero de 2013

Finalmente, el análisis de fluctuaciones sin tendencia en el segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea, exhibió la existencia de un punto de inflexión o “crossover” indicando un cambio de dinámica para una escala de tiempo específica ( $t=36.75 \text{ ms} \pm 0.025$ ) que podría ser vinculada a algún proceso modulador dominante del potencial de membrana.

La importancia de este trabajo radica en la posibilidad de comprender la interacción de los mecanismos moduladores de la actividad eléctrica neuronal por medio del análisis del curso temporal, no estrictamente determinístico, en las fluctuaciones de voltaje del sistema nervioso.

## Lista de figuras.

Figura 1. Diagrama del complejo periesofágico del caracol terrestre hélix aspersa. -----	5
Figura 2. Registro de la actividad eléctrica de la neurona 1F del ganglio subesofágico. -----	6
Figura 3. Activación de los mecanismos generadores de potencial de acción.-----	7
Figura 4. Curvas fractales a) curva de Von Koch, b) curva de David Hilbert. -----	8
Figura 5. Análisis de la dinamica de actividad eléctrica neuronal-----	12
Figura 6. Segmento interespiga de la neurona 1F. -----	14
Figura 7. Neurona 1F en hiperpolarización después de aplicar un estímulo de corriente de 4 nA. -----	14
Figura 8. Diagrama esquemático de la masa ganglionar periesofágica del caracol . -----	16
Figura 9. Bosquejo del equipo utilizado para el registro intracelular-----	167
Figura 10. Ajuste de primer orden para los datos obtenidos a partir del DFA. -----	25
Figura 11. Datos obtenidos del DFA posterior a una permutación aleatoria.-----	26
Figura 12. Datos obtenidos del DFA para el segmento en hiperpolarización. -----	26
Figura 13. Distribución del parámetro $\alpha$ . -----	27
Figura 14. Disminución en los valores del parámetro $\alpha$ para la neurona 1. -----	28
Figura 15. Disminución en los valores del parámetro $\alpha$ para la neurona 2. -----	28
Figura 16. Disminución en los valores del parámetro $\alpha$ para la neurona 3.-----	29
Figura 17. Disminución en los valores del parámetro $\alpha$ para la neurona 4. -----	29
Figura 18. Cambio de dinámica para una escala de tiempo particular. -----	30
Figura 19. Ajuste de regiones para el segmento en hiperpolarización.-----	30
Figura 20. Distribución del parámetro $\alpha$ para las regiones de ajuste del segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea y el segmento en hiperpolarización. -----	31
Figura 21. Distribución del tiempo. -----	32
Figura 22. Segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea dividido en dos partes iguales segmento 1 y segmento 2.-----	33
Figura 23. Distribución del parámetro $\alpha$ para ambos segmentos. -----	33
Figura 24. Segmento en hiperpolarización dividido en dos partes iguales segmento 1 y segmento 2. -----	34
Figura 25. Distribución del parámetro $\alpha$ para ambos segmentos. -----	34
Figura 26. Estimación de la densidad de potencia espectral para actividad eléctrica espontánea en la neurona uno. -----	35
Figura 27. Estimación de la densidad de potencia espectral en hiperpolarización. -----	35
Figura 28. Estimación de la densidad de potencia espectral para actividad eléctrica espontánea en la neurona dos.-----	36
Figura 29. Estimación de la densidad de potencia espectral en hiperpolarización. -----	36
Figura 30. Estimación de la densidad de potencia espectral para actividad eléctrica espontánea en la neurona tres. -----	37
Figura 31. Estimación de la densidad de potencia espectral en hiperpolarización. -----	37
Figura 32. Estimación de la densidad de potencia espectral para actividad eléctrica espontánea en la neurona cuatro. -----	38
Figura 33. Estimación de la densidad de potencia espectral en hiperpolarización. -----	38

## Lista de tablas.

Tabla 1. Relación analítica del exponente fractal-----	11
Tabla 2. Cantidad de registros por neurona -----	20
Tabla 3. Registros realizados en cuatro neuronas para prueba pareada-----	21
Tabla 4. Distribución de parámetro alfa para las neuronas 1 y 2.-----	27
Tabla 5. Estadística descriptiva y ANOVA no paramétrica. -----	28
Tabla 6. Estadística descriptiva para 35 valores del parámetro $\alpha$ y prueba no paramétrica. -----	28
Tabla 7. Estadística descriptiva para 26 valores del parámetro $\alpha$ y prueba no paramétrica.-----	29
Tabla 8. Estadística descriptiva para 22 valores del parámetro $\alpha$ y prueba no paramétrica.-----	29
Tabla 9. Estadística descriptiva para 26 valores del parámetro $\alpha$ y prueba no paramétrica.-----	31
Tabla 10. Prueba no paramétrica mostrando diferencias significativas en dos condiciones.-----	31
Tabla 11. Prueba no paramétrica mostrando diferencias significativas en dos condiciones.-----	32
Tabla 12. Periodo de aparición del crossover. -----	33
Tabla 13. Prueba no paramétrica, comparación del parámetro $\alpha$ en función a cada segmento. -----	34
Tabla 14. Prueba no paramétrica, comparación del parámetro $\alpha$ en función a cada segmento.-----	34

## Glosario.

**Aleatorio.** Resultado que depende del azar.

**Auto-Similitud.** Cuando se cambia de escala en la representación de algún fractal la imagen que resulta es de gran similitud a la imagen original.

**Antipersistente.** Un periodo de crecimiento es seguido por un periodo de decrecimiento.

**Complejidad.** Numero de interacciones no lineales.

**Correlación.** Indica la fuerza y la dirección de una relación lineal entre dos variables aleatorias.

**Dinámica.** La dinámica de cualquier situación se refiere a como el estado de la mencionada situación planteada, evoluciona a lo largo del tiempo.

**Estocástico.** Aleatorio.

**Fenómeno aleatorio.** Es aquel que bajo el mismo conjunto de condiciones iniciales, puede presentar resultados diferentes, es decir, no se puede predecir el resultado de cada experimento particular.

**Fenómeno determinístico.** Es aquel en que se obtiene siempre el mismo resultado bajo las mismas condiciones iniciales.

**Modelo estocástico.** Modelo matemático basado en las probabilidades; la predicción del modelo no es un único número fijo, sino un rango de números posibles.

**Persistente.** Un periodo de crecimiento es seguido por otro análogo.

**Sistema.** Conjunto de elementos interrelacionados entre sí con un objetivo en común.

**Sistemas dinámicos.** Son aquellos que mediante un criterio pueden ser definidos por un conjunto de variables cuyos valores cambian a lo largo del tiempo, dichas variables se denominan *variables de estado* las cuales determinan el *estado* del sistema en un momento dado.

**Sistema complejo.** Es un sistema compuesto por varias partes interconectadas o entrelazadas cuyas interacciones son no lineales.



## **Introducción.**

La membrana plasmática representa una barrera física entre el interior celular y su medio circundante. Diversos mecanismos permiten la transferencia de cargas eléctricas, principalmente iones, a través de la membrana, haciendo posible no sólo la comunicación entre ambos espacios, sino la generación de determinadas señales biológicas [1].

Todas las células poseen una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular, que se denomina potencial de membrana y que se debe a la existencia de gradientes de concentración iónica entre ambos lados de la membrana, y a variaciones en la permeabilidad relativa de la membrana celular a las distintas especies iónicas presentes. Además, las células eléctricamente excitables (células musculares, células secretoras y neuronas) ejercen sus funciones generando señales eléctricas en términos de cambios en este potencial de membrana [1].

Estas señales eléctricas pueden ser: señales breves y de gran amplitud (potenciales de acción), cuya función es transmitir la información rápidamente y a grandes distancias; respuestas más lentas y de menor voltaje que controlan la excitabilidad y, por lo tanto, tienen una importante función integradora; y señales de bajo voltaje (potenciales sinápticos), resultantes de la acción en las sinapsis [1].

Estas modificaciones del potencial de membrana resultan de cambios en los estados conformacionales de las proteínas estructurales de la membrana plasmática, llamados canales iónicos, que provocan variaciones de la permeabilidad selectiva de la membrana a los iones. Así, de esta manera se ha asumido implícitamente que estos cambios conformacionales pueden ser descritos por, 1) diagramas cinéticos con pocos estados conformacionales y respectivas probabilidades de transición entre cada estado, así como por 2) modelos con niveles de energía que separan a cada uno de los estados [2-3].

Se ha mostrado, de forma teórica y experimental, que la dinámica de los canales iónicos tiene movimientos internos y cambios continuos de estados conformacionales [4-5]. Este trabajo retoma esta perspectiva y muestra evidencia, con el análisis de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga, que sugiere una dependencia temporal de los cambios conformacionales de los canales iónicos.

La importancia de este trabajo radica en la posibilidad de comprender la interacción de los mecanismos moduladores de la actividad eléctrica neuronal por medio del análisis del curso temporal, no estrictamente determinístico, de las fluctuaciones de voltaje del sistema nervioso. La información obtenida al analizar las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga, sugiere la necesidad de retomar la investigación sobre las propiedades moleculares de los canales iónicos, ya que estos tienen un impacto considerable en la función fisiológica celular a un nivel macroscópico.

## **Antecedentes.**

### **La membrana celular.**

La unidad funcional de los seres vivos es la célula que en forma general está formada por una membrana celular, un citoplasma que contiene diversos organelos, y un núcleo central. La célula puede considerarse como un conjunto de compartimientos separados, pero que interactúan fuertemente entre sí. Cada compartimiento posee membranas, que separan las sustancias químicas producidas por los diversos organelos. Si bien la estructura de la membrana es la misma para todos los compartimientos, hay diferencias importantes en función y composición molecular [6].

La membrana celular está constituida por una bicapa lipídica que permite el paso selectivo a diversos átomos o moléculas y a otros no. Por esa razón se dice que es semipermeable, permitiendo el libre paso solo a sustancias liposolubles. Para el paso de átomos o de moléculas con carga eléctrica neta se utilizan proteínas que sirven como canales iónicos o como transportadores, pasando iones de un lado a otro de la membrana plasmática.

Así, las principales funciones identificadas de la membrana son la formación de compartimientos, la regulación de movimiento de sustancias, la transferencia de información, la interacción intercelular y la transducción de energía. Otra de las funciones de la membrana celular es mantener en equilibrio la presión osmótica de los líquidos intracelulares y extracelulares, ya que puede existir un gran flujo de nutrientes y de otros elementos entre estos dos medios [7].

Dentro de los elementos que constituyen el líquido extracelular se encuentran: sodio  $\text{Na}^+$ , cloruro  $\text{Cl}^-$ , bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ , oxígeno  $\text{O}_2$ , glucosa, ácidos grasos, aminoácidos. Dentro de los elementos que se encuentran en el líquido intracelular se encuentran: Potasio  $\text{K}^+$ , magnesio  $\text{Mg}^{++}$ , fosfato  $\text{PO}_3^{3-}$ .

### **Transporte de iones a través de la membrana celular.**

Todas las células presentan en general las siguientes propiedades:

- A. Alta permeabilidad a sustancias solubles en lípidos.
- B. Alta permeabilidad al agua.
- C. Mecanismo de transporte selectivo de iones.

Las sustancias atraviesan la membrana por medio de dos procesos; difusión y el transporte activo.

### **Difusión.**

Es el movimiento continuo y aleatorio de las moléculas de diversas sustancias en función a un gradiente de concentración y/o eléctrico, causado por los movimientos cinéticos normales de la materia el cual modifica a su vez el potencial de membrana existente. Existen dos tipos de difusión, pasiva y facilitada [6].

### **Difusión pasiva.**

Es aquella en la cual no existe ninguna fuerza externa actuando para modificar los movimientos de las moléculas individuales, de tal manera que la difusión neta de las moléculas o átomos procede siempre de acuerdo a su gradiente electroquímico [6-8]. Existen ciertos factores que influyen en la intensidad y la velocidad de difusión simple:

- Temperatura: A mayor temperatura mayor energía cinética y por tanto mayor velocidad de difusión.
- Peso molecular: Entre más pequeño el radio molecular más fácil será el paso de moléculas a través de la membrana celular.
- Permeabilidad de la membrana: Es la intensidad de transporte a través de la membrana para una diferencia de concentración dada, ésta condiciona la entrada de ciertas sustancias, muchas de las cuales son necesarias para mantener los procesos vitales y la síntesis de nuevas sustancias, además de regular la salida de agua y productos de excreción, que son eliminados de la célula.
- Gradiente de concentración: Cuanto mayor es la diferencia de concentración de un lado de la membrana con respecto a otro, mayor es la intensidad de difusión.
- Gradiente de presión: Provocado por el choque continuo de moléculas contra la membrana celular.

### **Difusión facilitada.**

Este mecanismo permite que algunas sustancias que no son solubles en lípidos, puedan atravesar la membrana celular gracias a el uso de un transportador (P), que son proteínas de transporte las cuales cambian su configuración para mover a través de la membrana una sustancia en la dirección de sus gradientes químicos o eléctricos por lo que no requiere de consumo de energía. Para realizar este mecanismo se deben considerar los mismos factores de la difusión pasiva además de los siguientes [6-8]:

- Numero de transportadores.
- La rapidez con la que pueda haber interacción química entre el transportador y el elemento a difundir.

### **Transporte activo.**

Es el movimiento de sustancias producido por procesos químicos que proporcionan la energía necesaria para originar este movimiento, el cual depende de procesos enzimáticos ocurridos en la membrana. Durante el proceso de transporte activo se desplazan moléculas contra

11 de febrero de 2013

un gradiente de concentración, presión o eléctrico. Su mecanismo es similar para todas las sustancias y depende de transportadores, que son proteínas que se encuentran a lo largo de la membrana plasmática [6-8].

El transporte activo es bloqueado por enfriamiento y por ciertos desechos metabólicos. Por ejemplo, aquellos que son producidos por medio de la respiración y de la glucólisis. El adenosín trifosfato (ATP) es la fuente energética utilizada para generar estos procesos de transporte activo, utilizando enzimas que los promueven [6-8].

Es así entonces como se generan corrientes entrantes positivas despolarizantes generadas por la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  y corrientes salientes negativas hiperpolarizantes por la entrada de iones  $\text{K}^+$  y salida de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , las cuales modulan el potencial de membrana registrado en una célula.

Las células pueden considerarse, desde un punto de vista eléctrico, como excitables y no excitables ambas presentan una diferencia de potencial a través de la membrana celular que se conoce con el nombre de potencial de membrana. Al potencial de membrana que exhiben las células excitables cuando no generan actividad eléctrica se le llama potencial de reposo [6-8].

Las células excitables, a diferencia de las no excitables, generan actividad eléctrica ante un estímulo adecuado, modificando repentinamente su potencial de membrana (a partir de su potencial de reposo) en forma de espigas. A estos cambios abruptos se les denomina potenciales de acción [8].

El potencial de acción y el potencial de reposo están modulados por los cambios conformacionales de los canales iónicos, que modifican a su vez las concentraciones iónicas del medio intracelular y extracelular [8].

Gracias al estudio de la actividad eléctrica neuronal en diversas especies biológicas, como en el espécimen hélix aspersa, se ha encontrado en mayor o menor medida la comprensión sobre algunos mecanismos inmersos en la generación de actividad eléctrica, así como el probable procesamiento de la información involucrada [9-11]. El amplio uso de este espécimen se debe: a) a la facilidad en manejo del tejido nervioso; además, de que b) el sistema nervioso de este espécimen puede considerarse como un modelo a escala de un sistema nervioso más grande y complejo [9-11].

## Sistema nervioso del espécimen *hélix aspersa*.

El sistema nervioso está compuesto por un par de ganglios bucales y nueve ganglios ordenados en un complejo ganglionar periesofágico (dos cerebrales, dos pleurales, dos pedales, dos parietales y uno visceral) figura 1. Cada ganglio está formado por grupos de neuronas motoras unipolares e interneuronas [12].

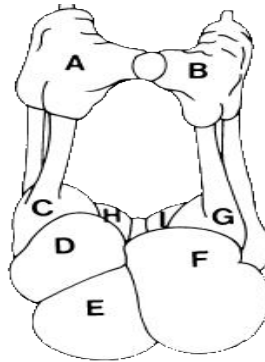


Figura 1. Diagrama del complejo periesofágico del caracol terrestre *Hélix aspersa*, mostrando los ganglios cerebrales (A, B), pleurales (C, G), pedales (H, I), parietales (D, F) y viscerales (E) [15].

Las neuronas desarrollan conexiones con neuropilos de varios ganglios y, por lo tanto, reciben y distribuyen impulsos eléctricos en numerosas uniones sinápticas. Los ganglios cerebrales se encuentran situados en la parte anterior del pie sobre el esófago y de ellos parten dos pares de cordones nerviosos que se prolongan hacia la región posterior del complejo periesofágico hasta conectarse con los ganglios pedales y pleurales. Estos están unidos entre sí por otro par de nervios [9,13-15].

Del ganglio pedal emergen dos cordones nerviosos que se comunican con los ganglios parietales y que desembocan en el ganglio visceral. Los ganglios pedal, pleural, parietal y visceral están localizados en la línea media del pie, por debajo del esófago formando la masa ganglionar subesofágica [13-15].

Los ganglios cerebrales, están encargados de inervar los ojos, los estatocistos, la boca, los tentáculos, el pie y la superficie de la cabeza. Los ganglios pleurales inervan el manto y el músculo columelar. Los ganglios pedales inervan los músculos del pie, la piel y los pliegues epidodiales (quimiorreceptores). Los ganglios parietales inervan al osfradio, que es el sentido olfatorio de los moluscos, permitiendo así modificar su conducta ante diversas situaciones durante su ciclo vital. El ganglio visceral inerva el corazón, el hígado, el riñón, el sistema digestivo, el ano y la musculatura del cuerpo [13-16].

## Actividad eléctrica en neuronas de hélix aspersa.

Los trabajos desarrollados por Kerkut y Cols en 1975, permitieron caracterizar a las neuronas de hélix aspersa, por su morfología, farmacología y patrones de descarga, tal es el caso de los de actividad silente, espontánea, en forma de ráfaga, por mencionar algunos [9].

Las neuronas silentes mantienen su potencial de membrana en reposo sin presentar variaciones, por lo que no generan potenciales de acción, excepto cuando se les estimula. Por su parte, las neuronas que presentan descarga espontánea pueden dividirse en dos grupos: 1) aquellas que son excitadas a través de múltiples conexiones sinápticas con otras neuronas activas y que, por lo tanto, desarrollan patrones de descarga irregulares con una gran cantidad de potenciales postsinápticos inhibitorios y potenciales postsinápticos excitatorios, y 2) las que presentan actividad marcapaso (como las estudiadas en esta investigación) [15-16].

Las neuronas marcapaso poseen descarga regular rítmica, las cuales tienen un menor número de entradas sinápticas (en comparación con las neuronas con descarga irregular) y que por lo tanto, conservan una frecuencia de descarga cuasi-estable durante largos periodos de tiempo, (figura 2).

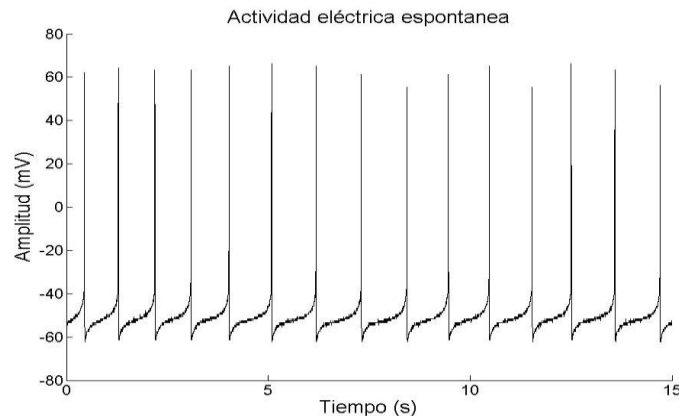


Figura 2. Registro de la actividad eléctrica de la neurona 1F del ganglio subesofágico del espécimen hélix aspersa.

El estudio a profundidad de estas neuronas, ha desenmascarado algunos de los principales mecanismos generadores de su actividad eléctrica. Tal es el caso de los canales de potasio ( $K^+$ ) dependientes de calcio ( $Ca^{++}$ ), BK (con alta dependencia de voltaje y baja dependencia a la concentración de calcio intracelular  $[Ca^{++}]_i$ ) y los SK (con baja dependencia de voltaje y alta dependencia a la  $[Ca^{++}]_i$  [17-18,20-21]. También existen canales de  $K^+$  tardíos y canales de sodio ( $Na^+$ ) dependiente del voltaje [19,22], sumando a estos mecanismos la actividad sináptica y el AMP cíclico como segundo mensajero modulador de la actividad de los canales [23-24,27].

La dinámica de estos mecanismos inmersa en la generación de un potencial de acción funciona de la siguiente manera: el inicio de un potencial de acción es acompañado por un incremento en la concentración de sodio y calcio intracelular, esto es debido a la apertura de canales de sodio y calcio dependientes de voltaje, que generan una disminución del potencial de

membrana, incrementando así la probabilidad de apertura de un canal de calcio, a este proceso se le denomina retroalimentación positiva.

Posterior a esta despolarización la cual depende de un umbral, los canales BK son activados para generar la repolarización, la cual es provocada por una alta conductancia y alta selectividad al potasio, se ha encontrado, que en algunas células la activación de estos canales tiene una duración aproximada de 30 ms [17-20, 26].

La acción de los canales BK provoca un periodo de hiperpolarización (postpotencial), en donde los canales SK se activan entonces por un incremento en la  $[Ca^{++}]_i$ , elevando el potencial de membrana y modulando la frecuencia de disparo debido a la alta permeabilidad a los canales de  $K^+$  (Figura 3) [18, 25]. De esta manera, un incremento en la  $[Ca^{++}]_i$  genera una mayor producción de AMP cíclico que a su vez facilita la actividad sináptica, que es moduladora de la actividad eléctrica [11, 27].

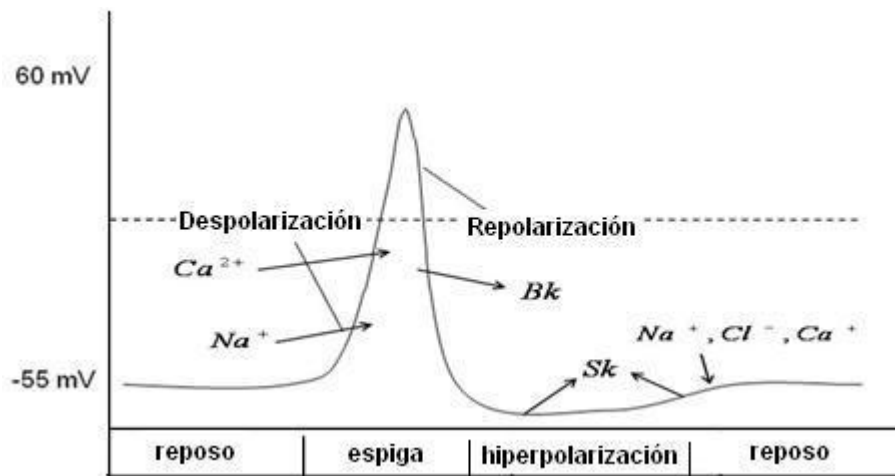


Figura 3. Activación de los mecanismos generadores de potencial de acción y potencial de reposo.

La interacción entre los diversos mecanismos mencionados genera fluctuaciones en el potencial de membrana, generalmente interpretado como una respuesta transitoria a un medio ambiente fluctuante, que tras una inspección inicial, pareciera irregular y completamente aleatorio en los periodos interespiga [61]. Es aquí, donde el enfoque fractal se utilizará con el fin de corroborar que diversos fenómenos biológicos generan fluctuaciones en su dinámica, que más allá de involucrar fluctuaciones aleatorias, presentan una complejidad que se manifiestan a lo largo de diferentes escalas de tiempo.

## Análisis de fluctuaciones, un enfoque fractal.

Los organismos vivos son complejos en función y en estructura. La no linealidad y la no estacionariedad de los parámetros de las funciones fisiológicas humanas como, por ejemplo, la presión arterial, frecuencia respiratoria, frecuencia cardiaca, ha generado que se añadan nuevas herramientas de análisis a las convencionales (análisis tiempo-frecuencia). Esto debido a que éstas por su diseño fundamentado en el análisis de sistemas lineales homeostáticos, no logran siempre ofrecer información crucial sobre la integración e interacción de las presumibles variables en el entorno o la dinámica del sistema [28-30].

El enfoque fractal en particular ha revelado que los procesos fisiológicos pueden operar lejos del equilibrio, además de que sus fluctuaciones exhiben correlaciones temporales de largo plazo que se extienden a lo largo de varias escalas de observación y principalmente, que su dinámica es de tipo no lineal [30-35].

### Geometría fractal.

La geometría fractal tiene sus raíces en los trabajos de matemáticos como Von Koch o Sierpinski Gasket, que generaban estructuras geométricas complejas, a partir de estructuras simples como líneas, triángulos o cubos, aplicándoles una regla de transformación y posteriormente un proceso iterativo. La estructura final presentaba riqueza en igualdad a diferentes escalas de observación y cuando las piezas pequeñas de la estructura eran separadas y comparadas con otras de mayor tamaño presentaban similitud (Figura 4) [30].

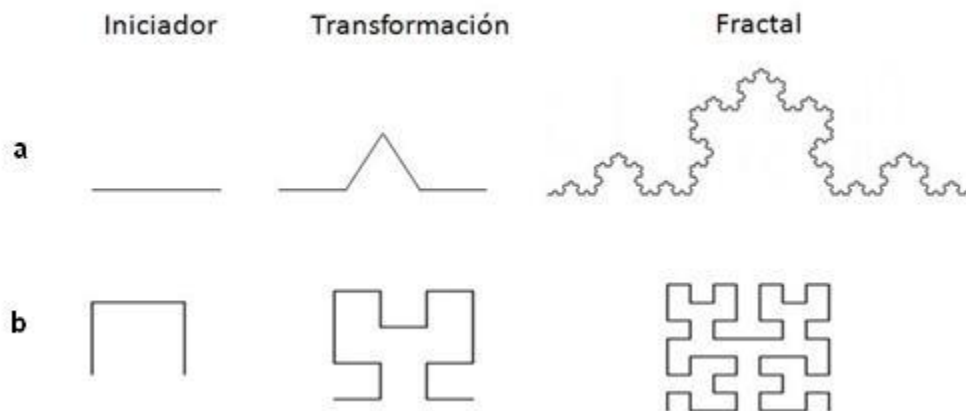


Figura 4. Curvas fractales generadas partir de la iteración de una transformación progresiva en diferentes escalas; a) curva de Von Koch, b) curva de David Hilbert.

Mandelbrot en 1975 induce el termino fractal como parte de un enfoque geométrico para describir y agrupar aquellas formas matemáticas o naturales que no eran adecuadamente representadas por las estructuras regulares de la geometría de Euclides, o por los patrones de



evolución continua de la dinámica de Newton. Desde entonces, el enfoque se ha utilizado para explorar formas o comportamientos naturales complejos, específicamente en donde se encuentre involucrada cierta aleatoriedad y el grado de irregularidad o fragmentación se repita estadísticamente a lo largo de diferentes escalas de observación [36].

### Propiedades de las estructuras fractales.

A diferencia de las estructuras euclidianas que son descritas por axiomas y reglas que describen al objeto en dimensiones enteras (1, 2, 3), las estructuras complejas fractales son descritas por un amplio rango de dimensiones no enteras. Así mismo, los fractales geométricos son definidos por axiomas y por un conjunto de propiedades como son: autosimilitud y un escalamiento por medio de una ley de potencia.

- **Autosimilitud:** En un objeto fractal se refiere a piezas pequeñas del mismo que son similares a piezas de mayor tamaño. Es decir que tienen semejanza a diferentes escalas de observación.

La autosimilitud debe ser distinguido de autoafinidad, la autosimilitud se da solo en objetos que son similares en todas direcciones, en este caso el objeto es isotrópico. Los objetos que presentan autoafinidad son también fractales pero la similitud se observa en una sola dirección, por lo que se considera como un objeto anisotrópico, por ejemplo, una serie de tiempo debido a que sus unidades de amplitud no representan necesariamente la misma dimensión.

- **Relación de escala por ley de potencia:** Cuando una propiedad cuantitativa  $q$  ( $q$  puede ser algún momento estadístico) es medida en cantidades  $s$  ( $s$  puede ser tamaño o precisión, por ejemplo) su valor dependerá de  $s$ :

$$q = f(s) \quad (1)$$

Para un objeto no fractal el valor de  $q$  siempre converge, no siendo así para objetos fractales los cuales exhiben una ley de potencia para  $s$ . De esta manera si  $s$  decrece  $q$  se incrementa.

$$q = ps^\epsilon \quad (2)$$

Donde  $p$  es un factor proporcional y  $\epsilon$  es el exponente fractal. El valor de  $\epsilon$  puede ser fácilmente determinado por la pendiente de una relación lineal aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación dos [30].

$$\log(q) = \log(p) + \epsilon \log(s) \quad (3)$$

En un enfoque geométrico, la dimensión fractal  $D$  es una cantidad numérica que sirve para caracterizar o clasificar objetos irregulares. Una de las interpretaciones de este parámetro, posiblemente la más natural, es la de cuantificar la relación entre las presumibles regiones similares observadas a diferentes escalas de exploración. Desde un punto de vista práctico, la dimensión fractal proporciona una estimación del mínimo número de grados de libertad necesarios para describir el comportamiento dinámico del sistema [37].

## **Análisis de series de tiempo fractales.**

Un enfoque fractal, siendo útil para describir formas geométricas, puede ser extendido para analizar series de tiempo cuyos componentes no se manifiestan en una escala de tiempo específica. Bajo este enfoque el objetivo de un análisis de series de tiempo es poder identificar la presencia de una de las propiedades que caracterizan a un objeto fractal, autosimilitud y/o una relación de escala descrita por medio de una ley de potencia [36-37].

Así, es posible identificar en diferentes contextos series consideradas como fractales, ya que presentan fluctuaciones irregulares en diferentes escalas temporales y resultan invariantes estadísticamente con respecto a la escala de análisis. Estas fluctuaciones son generadas debido a la dinámica de los diversos mecanismos de control, que generalmente involucran interacciones no lineales, de esta forma se asume que el análisis fractal ofrece información crucial sobre la dinámica o interacción de estos mecanismos [36-37].

El primer método que se desarrolló para evaluar el grado de irregularidad de una serie de tiempo, fue llamado análisis de rango escalado. Con este se extraía un parámetro que ha sido relacionado analíticamente con la dimensión fractal  $D$ , llamado exponente de Hurts, en reconocimiento a Harol Edwin Hurts [38-39].

Hurts diseñó la presa de Assua (Egipto) y estudió series temporales relacionadas con el caudal del río Nilo y los problemas de almacenamiento de agua. Utilizó una base de datos de 800 años de archivos y notó que había una tendencia de un año de alto caudal era seguido por otro de caudal más alto, y uno de bajo caudal le seguía otro más bajo [38-39].

Con este motivo Hurts generó un análisis estadístico llamado análisis de rango (R/S). En donde  $R$  indica el rango (por ejemplo la diferencia entre el valor de la descarga máxima y la mínima a lo largo del periodo de estudio) y  $S$  la desviación estándar típica de los valores observados de las descargas acumuladas del río [38-39].

La evaluación del exponente de Hurst es un primer paso en el reconocimiento y caracterización de la dinámica compleja en series de tiempo. Un exponente de Hurts en el rango  $0.5 < H < 1$  corresponde a series de tiempo que presentan persistencia o correlación a lo largo de diferentes escalas temporales. Por ejemplo, un periodo de crecimiento en el caudal es seguido por otro análogo. Mientras que los valores ubicados entre  $0 < H < 0.5$  corresponden a un comportamiento antipersistente, por ejemplo, un periodo de aumento en caudal es seguido por

un periodo de descenso, para valores de  $H=0.5$  corresponde a un comportamiento sin correlaciones [38-39].

El enfoque analítico representado por la ecuación (2), se ha empleado en un gran número de métodos fractales, para obtener exponentes de escala a partir de diferentes parámetros derivados del dominio del tiempo o de la frecuencia. Así, existen métodos que utilizan parámetros estadísticos descriptivos para evaluar la invarianza con respecto a la escala. Por ejemplo, análisis de rango rescalado, de dispersión, de fluctuaciones sin tendencia, y las representaciones logarítmicas de la densidad de potencia espectral de donde se obtiene un exponente espectral de escalamiento  $\beta$  el cual está relacionado analíticamente con el exponente de Hurts (H) y éste a su vez con el parámetro  $\alpha$  [30].

Tabla 1. Relación analítica del exponente fractal

	$\alpha$	$\beta$	H	$D_{Higuchi}$
H	$\alpha$	$(\beta+1)/2$	-	$(6-2 D_{Higuchi})/2$
$\beta$	$2\alpha-1$	-	$(\beta+1)/2$	$5-2 D_{Higuchi}$
$\alpha$	-	$(\beta+1)/2$	H	$(6-2 D_{Higuchi})/2$

En el pasado se han realizado varios esfuerzos en el estudio de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal, encontrándose un comportamiento de tipo fractal  $1/f$  en el estudio de las fluctuaciones de voltaje en redes neuronales. Lo que sugiere que la función cognitiva esta correlacionada a lo largo de varias escalas temporales [40-42]. Sumado a esto, dicho grado de correlación se ha encontrado que está determinado por el nivel de receptores a glutamato (NDMA) [43].

Así mismo, se ha analizado la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en fibras nerviosas en donde se exhibió comportamiento de tipo fractal  $1/f$  lo que sugirió que este comportamiento es generado por movimientos térmicos provocados por el transporte iónico de sodio y potasio a través de canales iónicos [42-43]. De igual forma se ha mostrado que existe este mismo comportamiento de correlaciones de largo alcance en las fluctuaciones temporales para la aparición de los potenciales de acción (intervalos interespiga) registrados en forma extracelular [44-47].

El uso de registros extracelulares ha revelado que las fluctuaciones en la frecuencia de despolarización presenta un comportamiento de tipo  $1/f$  que se mantiene invariante con respecto a la escala de análisis, esto se ha corroborado con el uso de las herramientas de análisis de fluctuaciones sin tendencia y las representación logarítmica de la densidad de potencia espectral, que sugiere que este comportamiento es ocasionado por medio de la actividad sináptica [48-51]. Sin embargo, en otros estudios el análisis del intervalo interespiga sugiere que esta dinámica

compleja es modulada por la interacción de las diversas poblaciones de canales iónicos los cuales presentan memoria de largo plazo indispensable para la ocurrencia de sus cambios conformacionales [52-53].

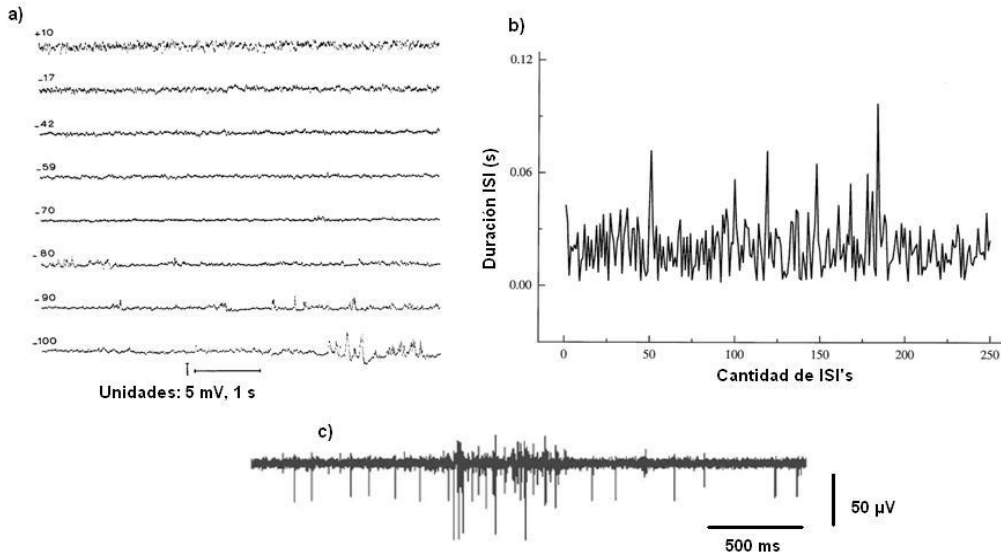


Figura 5. Análisis de la dinámica de actividad eléctrica neuronal. (a) Fluctuaciones de voltaje a diferentes niveles del potencial de membrana de nervio ciático de rana [44], (b) Fluctuaciones temporales en los intervalos interespiga de la actividad eléctrica espontánea de neurona motora de gato [49], (c) Fluctuaciones de voltaje en red neuronal de hipocampo de rata [43].

De esta forma, es entonces como se ha analizado la dinámica de la actividad eléctrica neuronal; sin embargo, aún no queda claro cuáles son los mecanismos que subyacen en este comportamiento de tipo fractal. El trabajo que se desarrollo en esta tesis consistió en analizar las fluctuaciones de voltaje de membrana interespiga, que presumiblemente se generan por la dinámica colectiva de las diversas poblaciones de canales iónicos presentes en la membrana celular en donde subyacen los mecanismos moduladores de la frecuencia de despolarización de la membrana celular. Es así que las fluctuaciones del voltaje de membrana interespiga son de crucial importancia para el procesamiento y transmisión de la información neuronal, pero es importante señalar que la dinámica que éstas exhiben no ha sido explorada a profundidad.

## Objetivos.

1. Análisis de las fluctuaciones del potencial interespiga de la actividad eléctrica espontánea.
2. Análisis de las fluctuaciones del potencial en hiperpolarización generado a partir de la estimulación de una neurona bajo un pulso de corriente.

## **Hipótesis.**

La serie de tiempo interespiga e hiperpolarización no es un proceso aleatorio, presentado fluctuaciones con estructura o dependencia temporal.

Así, en caso de que fuera posible comprobar la hipótesis se ofrecería evidencia de que existe dependencia e influencia de los diversos mecanismos moduladores del potencial de membrana que modifican funcionalmente el comportamiento de la actividad eléctrica neuronal.

## **Materiales y métodos.**

Para el estudio de las fluctuaciones de voltaje de membrana interespiga se utilizaron 12 especímenes, en los que su neurona 1F del ganglio subesofágico de *Hélix Aspersa* presentaba actividad eléctrica espontánea. Ésta neurona fue seleccionada debido a su patrón de despolarización, facilidad de manejo y ubicación topográfica en el ganglio [9]. Para cada neurona se extrajeron en promedio 18 segmentos interespiga (figura 6), cada segmento interespiga contiene un promedio de  $340 \pm 10$  muestras.

Además, se construyó un grupo control a partir de las permutaciones aleatorias de las fluctuaciones de voltaje de los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea con el fin de comparar la dinámica correlacionada con una dinámica aleatoria.

Con el fin de estudiar la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos en función a sus cambios de conductancia, se modificó el patrón de despolarización espontánea de la neurona 1F aplicando a esta un estímulo de corriente. Así, se utilizaron 17 neuronas en donde se aplicó un estímulo de 4nA con una duración de 2 segundos, generando salvas (“burst”) y posterior a esto un periodo de hiperpolarización (figura 7) para analizar las fluctuaciones de voltaje. La duración del registro fue de 20 segundos en promedio, a una frecuencia de muestreo de 40 Hz, obteniéndose en promedio 10 registros por neurona así cada segmento en hiperpolarización contiene en promedio  $300 \pm 10$  muestras.

Cabe mencionarse que el registro intracelular que se realizó es en modo de fijación de corriente. Esto es, por la inyección de un pulso de corriente para despolarizar o hiperpolarizar a la célula. Para lograr esto se utilizó una sección del pre-amplificador llamada *Polarization Current*. Con el manejo adecuado de estos controles se aseguró mayor fidelidad en los datos registrados, así como también un mejor control sobre el experimento.

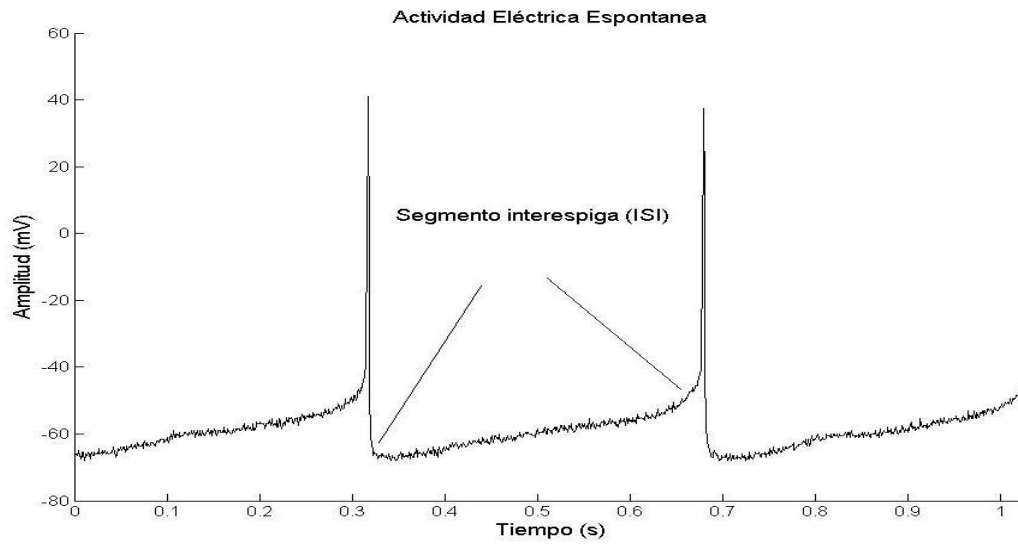


Figura 6. Neurona 1F en actividad eléctrica espontanea, segmento interespiga sweep 1 de 9.

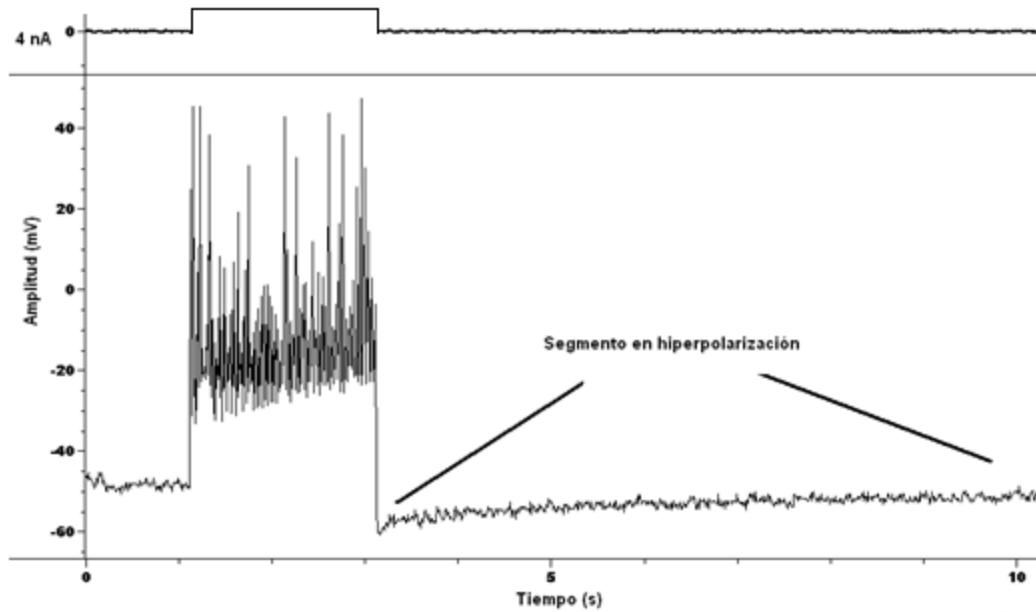


Figura 7. Neurona 1F en hiperpolarización después de aplicar un estímulo de corriente de 4 nA.

## Preparación biológica.

La preparación biológica que se usó en este proyecto, fue el ganglio subesofágico del espécimen *Hélix aspersa*. Dicha preparación presenta distintas ventajas para el desarrollo de este proyecto [9, 17, 54-56]:

- Existen mapas, como el que se muestra en la figura 8, que permiten identificar topográfica, morfológica y electrofisiológicamente el tipo de célula con el que se desea trabajar.
- La neurona que se utilizó en esta investigación fue la 1F, que pertenece al grupo de las más grandes de la masa ganglionar. Estas neuronas llegan a medir hasta 250µm de diámetro, por lo que resulta fácil identificarlas y penetrarlas con más de un microelectrodo.
- Se conocen las concentraciones libres de los diversos iones intracelulares como extracelulares.
- En esta neurona se han identificado la presencia de distintos receptores a glutamato, dopamina, serotonina, acetilcolina.
- También se conoce la naturaleza y cinética de las corrientes iónicas que subyacen a sus potenciales de acción, como son las corrientes iónicas de sodio, potasio y calcio. Además, dichas neuronas pueden generar potenciales de acción dados exclusivamente por calcio, conocidos como potenciales de acción cálcicos. Los potenciales de acción cálcicos y la corriente entrante de calcio son una manera directa de evaluar la activación de canales de calcio dependientes de voltaje.

## Reactivos y Soluciones experimentales.

Los reactivos que aquí se presentan son utilizados para generar la solución Ringer, medio en el que el ganglio subesofágico se encontró sumergido durante y posterior a la disección:

Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el ácido N-hidroxietilpiperazin N'-2 etanolsulfónico (Hepes), Dextrosa, y el cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), proteasa tipo XIV, que fueron obtenidos por Sigma Chemical Co.

Cloruro de potasio (KCl), hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de sodio (NaCl) obtenidos por J.T. Backer. Para disolver cada reactivo es necesario contar con agua tridestilada.

### Solución Ringer.

La composición de la solución Ringer normal usada para bañar la preparación fue la siguiente:

*NaCl 75 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 5 mM, Dextrosa 5 mM.*

Esta composición es para un litro, es importante que la solución tenga un PH de 7.5, éste se ajustó con hidróxido de sodio *1M*.

## **Disección y aislamiento de la masa ganglionar *perioesofágica* del caracol de jardín *Hélix aspersa*.**

Los especímenes fueron hidratados con agua antes de iniciar los experimentos. La disección se desarrolló de la siguiente manera:

1. Se extrajo cuidadosamente la masa nerviosa ganglionar sub y perioesofágica.
2. Se colocó y se fijó (*pin de disección*) dicha masa en una caja de petri cuyo fondo debe encontrarse recubierto con una capa de *syrgard*, la cual, a su vez, contenía solución ringer. *La fijación del ganglio en la cámara debía ser con la cara dorsal expuesta, para que se pudieran identificar los ganglios y cuerpos neuronales.*
3. Utilizando un *microscopio estereoscópico* (Nikon, Japan) y material de microdisección se procedió a retirar la membrana de tejido conectivo que envuelve a la masa ganglionar.
4. Esta remoción de tejido se realizó con *tijera castroviejo* para microdisección, iniciando por el lado izquierdo de la masa ganglionar por arriba del nervio 2 y rebordeando hacia el lado posterior del ganglio E, G y F, hasta la zona de emergencia del nervio 4.
5. Dicha membrana o velo de tejido conectivo se presentó hacia el frente de la preparación y se cortó cuidadosamente de la zona que está adosada a los nervios 1-4, pero evitando cortar dichos nervios.

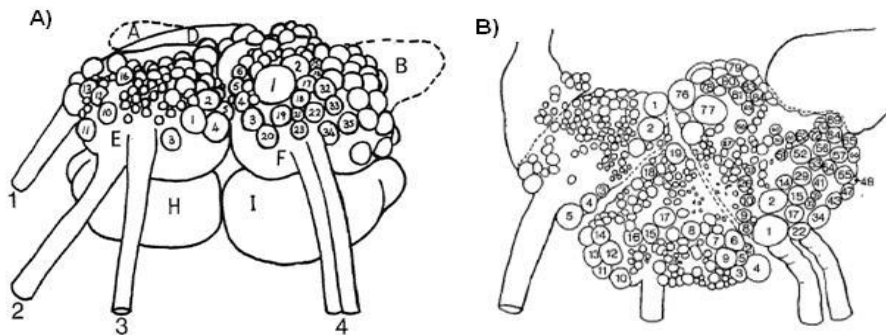


Figura 8. A) Diagrama esquemático de la masa ganglionar *periesofágica* del caracol vista posterior, mostrando células identificadas, B) Vista superior del ganglio subesofágico [9].

6. Posteriormente se aplicó *proteasa tipo XIV* (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 5 mg/10ml en solución Ringer durante un intervalo de tiempo de 15 a 18 minutos a temperatura ambiente, con el propósito de reblandecer una segunda membrana que



11 de febrero de 2013

cubre de forma directa a las neuronas de los ganglios parietales derecho e izquierdo. Después de la acción de la proteasa se observó bajo microscopio y el desprendimiento del velo de tejido conectivo que cubre normalmente a las neuronas.

7. Se lavó la preparación con Ringer, con el propósito de detener la acción de la enzima y se procedió entonces a remover la capa de tejido conectivo con pinzas para microdissección finas y tijeras castroviejo, con el fin de exponer las neuronas de los ganglios D, E y F.
8. Para obtener una observación adecuada de las neuronas se necesitó iluminación óptima, es por ello que se utilizó una fuente de luz fría que incidió tangencialmente la a la cámara de disección.

## **Procedimiento para el registro intracelular de neuronas identificadas del caracol Hélix aspersa.**

1. Manejo de microelectrodos para registro intracelular: Los microelectrodos utilizados fueron pipetas capilares de vidrio, hechos a base de borosilicato. Para obtener pipetas de resistencia y forma óptimas, se utilizó un estirador vertical modelo DKI- 700-C.
2. Era conveniente poner una gota de KCl 3M en el extremo que no tiene punta del microelectrodo y posteriormente colocarlos en refrigeración por 2 minutos, con el fin de generar un relleno por capilaridad y evitar que se generaran burbujas de aire que incrementarían la capacitancia del electrodo. Posteriormente fueron rellenos completamente.
3. Así, los microelectrodos fueron llenados con solución KCl 3M filtrada con un filtro para jeringa marca Corning con dimensiones en los poros de 25mm x 0.20 micras, de esta forma los microelectrodos utilizados tuvieron una resistencia de entre 5-10 Megaohms.
4. Una vez relleno y sin burbujas de aire el electrodo fue colocado en un **holder** que es una peleta de Ag-AgCl<sub>2</sub> (WPI) que se conecta por medio de un dispositivo que acondiciona la señal de entrada y un conector BNC a la entrada del preamplificador.

## Manejo del amplificador para registro intracelular.

1. Se colocó el electrodo de referencia, o tierra, dentro de la solución que baña a la preparación biológica.
2. El electrodo de registro se sumergió en la solución que baña a la preparación biológica.
3. Se ajustó a tierra o referencia el trazo que monitorea el voltaje en el osciloscopio.
4. Si existía desplazamiento del trazo del voltaje, se ajustó con el botón DC (Osciloscopio) y *Offset Voltaje* (pre-amplificador), y se revisó nuevamente poniendo a tierra el monitor de voltaje. *Si ya no existía desplazamiento del voltaje, el trazo del monitor del voltaje en el osciloscopio se consideraba que estaba en 0 mV o tierra.*
5. Se hizo una evaluación estimativa de la resistencia del microelectrodo de registro, moviendo el botón *Electrode Impedance Test*. *Se partió de la premisa de que al mover este botón se aplica una corriente de 1nA.*

Si el desplazamiento del monitor de voltaje se encontraba entre 1-100mV, entonces por ley de ohm se obtuvo una estimación directa de la resistencia del electrodo. Por ejemplo, si el desplazamiento del monitor de voltaje en el osciloscopio es de 10mV, y si se considera que se estaba aplicando 1nA, entonces  $R=10mV/1nA= 10 \text{ Megaohms}$ .

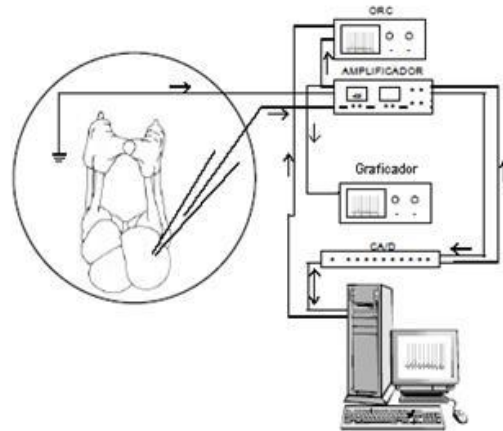
6. Se debía tomar en cuenta que el osciloscopio estaba calibrado a una ganancia de 20mV por división, al aplicar el botón de *electrode impedance test*. De esta forma se observó el desplazamiento del voltaje y se calculó la resistencia del microelectrodo.
7. Calibrar el puente: (Esto implicó nulificar la resistencia intrínseca del microelectrodo de registro, con el propósito de que los cambios del voltaje o resistencia monitoreados fueran exclusivamente de la célula y no de un artefacto; es decir, se eliminó el ruido). Se logró aplicando un estímulo de corriente proveniente del estimulador *Grass* que se conectó a la entrada *Stimulus Input* del pre-amplificador *Dagan 8500*. Para monitorear el estímulo de corriente se conectó un cable de salida del *Stimulus Monitor* del pre-amplificador, el cual se llevaba a una entrada-conexión del canal 2 del osciloscopio o monitor de corriente.

Este canal se calibró a 20mV/división de corriente. El proceso de calibración consistió en aplicar un estímulo aproximado de 1 nA con una frecuencia de 1Hz y con una duración de 200 ms. Estando el osciloscopio a un barrido de 10ms por división, se observó el trazo del voltaje en el canal del monitor de voltaje.

Si existía desplazamiento del trazo de voltaje durante el estímulo, se movía el botón *Bridge Balance* del pre-amplificador, hasta que se ajustaba el valor de resistencia. Es decir hasta que no presentara caída de voltaje durante la aplicación del estímulo. Para confirmar el valor de resistencia del microelectrodo se leyó la caratula del *Bridge Balance* la cual está dada en valores de Megaohms. Este valor debía coincidir con el valor previamente evaluado.

8. Considerando que el electrodo tiene una capacitancia intrínseca, se rotaba el botón de *Capacity Comp* del preamplificado, hacia la derecha, hasta antes de que el sistema empezara a oscilar; con esto se ajusto la capacitancia del microelectrodo.
9. Para penetrar la célula previamente identificada, se colocó la punta del microelectrodo sobre la superficie del cuerpo de la neurona a estudiar, con ayuda de un micromanipulador. Para facilitar dicho proceso se aplicó presión en el botón *Buzz* del pre-amplificador. Esta maniobra hizo oscilar la punta del microelectrodo y facilitó la penetración de las neuronas sin dañar la membrana celular figura 8.

Figura 9. Bosquejo del equipo utilizado para el registro intracelular.



10. Se consideró un modelo eléctrico celular con resistencia y capacitor en configuración paralelo, con el propósito de ajustar los controles que ayudan a mejorar la relación señal-ruido además de:

- Las corrientes de polarización
- El balance de puente de Wheatstone
- La eliminación de componentes capacitivos y artefactos.

11. Frecuencia de corte 10Mhz.

11 de febrero de 2013

Para la visualización y adquisición de datos se utilizó el software Pclamp versión 5.5.2 junto con un convertidor analógico digital Axón Digidata 1200. Se utilizó la frecuencia máxima de adquisición, obteniéndose así 1024 muestras por segundo a 1000 Hz.

A continuación se muestra la tabla 1 que resume los registros obtenidos.

Tabla 2.

Neurona 1F en hiperpolarización (hiper).	Número de segmentos en hiperpolarización obtenidos.	Neurona 1F en actividad eléctrica espontánea (aee).	Número de segmentos interespiga obtenidos.
1	18	1	35
2	8	2	25
3	8	3	20
4	11	4	18
5	4	5	20
6	9	6	19
7	4	7	20
8	11	8	29
9	4	9	6
10	12	10	5
11	11	11	8
12	3	12	6
13	13		
14	9		
15	12		
16	13		
17	12		
<b>Totales</b>	<b>162</b>		<b>211</b>
<b>Promedios</b>	<b>9.54</b>		<b>17.5</b>

Además, de los datos que se muestran en la tabla 1, se registraron cuatro neuronas adicionales en ambas condiciones con el fin de confirmar los resultados obtenidos por el análisis de no lineal. En la tabla 2 se resumen los registros realizados a dichas neuronas.

Tabla 3.

Neurona 1F en hiperpolarización (hiper).	Número de segmentos en hiperpolarización obtenidos.	Neurona 1F en actividad eléctrica espontánea (aee).	Número de segmentos interespiga obtenidos.
1	35	1	75
2	26	2	36
3	22	3	54
4	16	4	19
<b>Totales</b>	<b>99</b>		<b>184</b>

## Análisis no lineal de los datos.

### Análisis de fluctuaciones sin tendencia.

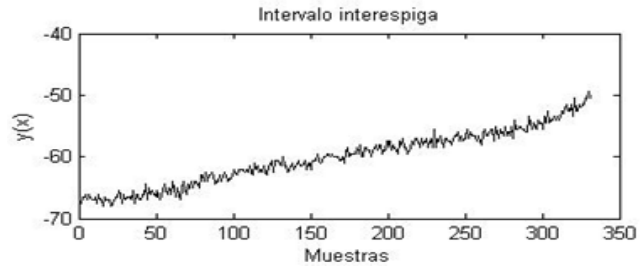
Uno de los métodos fractales que en mayor medida se ha utilizado para el estudio de series de tiempo ha sido el análisis de fluctuaciones sin tendencia. Fue introducido por *Peng et al.* en 1994, siendo este análisis una modificación de la raíz cuadrática media para datos no estacionarios. El método tiene la ventaja de exhibir la existencia de correlaciones de largo alcance en series de tiempo no estacionarias, evitando la detección espuria de una aparente fractalidad, que simplemente podría ser efecto de la no estacionalidad de la señal [31].

En el análisis de fluctuaciones sin tendencia, la serie de datos original es integrada de acuerdo a la siguiente ecuación:

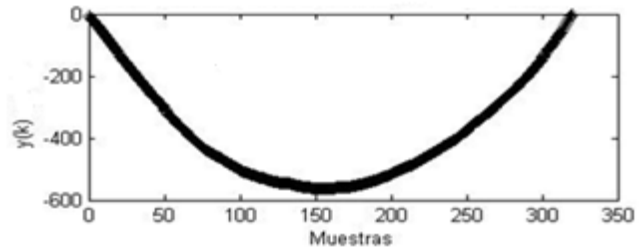
$$Y(k) = \sum_{i=1}^k [y(i) - \bar{y}] \quad (4)$$

en donde  $Y(k)$  representa el  $k$ -ésimo valor resultado de la integración ( $k=1,2,3,\dots,L$ ),  $y(i)$  es el  $i$ -ésimo valor, y  $\bar{y}$  es el valor medio de toda la serie original con  $L$  muestras en total.

$$y(i)$$

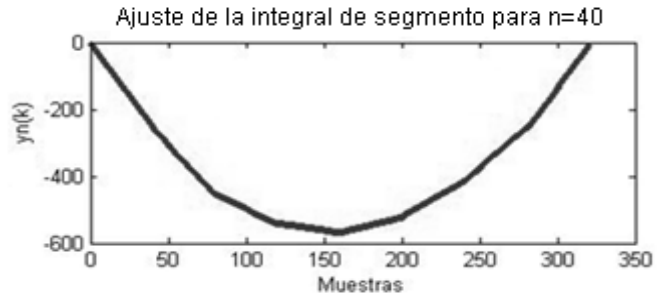


$$Y(k) = \sum_{i=1}^k [y(i) - \bar{y}]$$

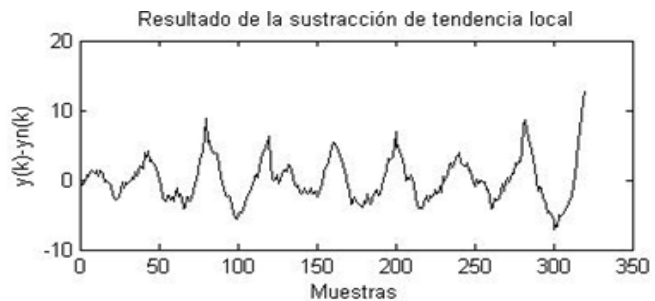


Posteriormente la serie integrada es dividida en segmentos independientes del mismo tamaño  $n$  que comprende a un número de muestras, las cuales abarcan una escala de tiempo particular, para eliminar la tendencia local en estos segmentos, generando así  $Y_n(k)$  y una sustracción posterior con  $Y(k)$ , para obtener la serie ya sin la tendencia.

$$Y_n(k)$$



$$Y(k) - Y_n(k)$$



Así, la fluctuación cuadrática media  $F$  en función de  $n$  puede ser calculada de la siguiente forma:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{k=1}^L [Y(k) - Y_n(k)]^2} \quad (5)$$

Este procedimiento se repite para un conjunto amplio de valores de  $n$ , obteniéndose una relación que se aproxima a una ley de potencia.

$$F(n) = n^\alpha \quad (6)$$

Como en otros métodos fractales, el exponente de escala “ $\alpha$ ” se estima por la pendiente obtenida a partir de una representación logarítmica entre las variables  $F(n)$  y  $n$ . Un exponente con valores cercanos a 0.5 indica que las fluctuaciones de la serie son aleatorias, es decir no presentan correlaciones de largo plazo; para valores cercanos a 1 la serie presenta persistencia, es decir correlaciones de largo plazo que se manifiestan a diferentes escalas temporales; y para valores cercanos o mayores a 1.5 se sugiere que la serie presenta fluctuaciones más regulares, cuyo comportamiento estadístico tiende a manifestarse predominantemente en ciertas escalas particulares [31].

Para el análisis de los datos se utilizó la aplicación libre del DFA, la cual se encuentra disponible en la página de [physionet.org](http://physionet.org), en donde la ventana más pequeña contiene 4 datos y la ventana más grande es la longitud de la señal dividida entre 4 [57], la tabla 3 bosqueja los valores que toma el parámetro “ $\alpha$ ” para las neuronas 3 y 4 en actividad eléctrica espontánea e hiperpolarización.

11 de febrero de 2013

Tabla 4. Distribución del parámetro alfa para las neuronas 1y 2

	Parámetro $\alpha$ en aee. N3	Parámetro $\alpha$ en aee. N4	Parámetro $\alpha$ hiper. N3	Parámetro $\alpha$ en hiper. N4
	1,0180	1,0385	0,6879	0,6779
	0,9769	0,9480	0,6192	0,6149
	1,0147	1,0457	0,7117	0,6363
	1,0067	1,0062	0,7102	0,6615
	1,0357	0,9851	0,6403	0,7240
	1,0406	1,0393	0,6121	0,6860
	1,0023	0,8201	0,4607	0,6700
	1,0413	0,9828	0,5317	0,6984
	0,9772	0,9604		0,6904
	1,0466	0,9075		0,6603
	0,9935	0,9352		0,7251
	0,9958	0,9831		
	0,9559	1,0442		
	0,9700	1,0150		
	1,0042	1,0117		
	1,0214	1,0332		
	0,9726	0,9755		
	0,9593	1,0098		
	1,0248			
	1,0105			
<b>Media</b>	<b>1,0034</b>	<b>0,9856</b>	<b>0,6217</b>	<b>0,6768</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0,0278</b>	<b>0,0573</b>	<b>0,0885</b>	<b>0,0336</b>

### Análisis en frecuencia del potencial de membrana interespiga.

Con el uso de los registros intracelulares de las cuatro neuronas adiciones mencionadas previamente, se tomaron de cada neurona 10 segmentos interespiga con la misma longitud y para cada segmento se realizó un análisis convencional de su contenido en frecuencia, posterior a esto, las 10 estimaciones de la densidad de potencial espectral de cada neurona fueron promediadas, de la misma forma, se realizó este mismo procedimiento para los segmentos en hiperpolarización, el análisis de los datos fue realizado en MATLAB (*The Mathworks, Inc.*).



## Resultados.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje de membrana interespiga se muestran de la siguiente manera:

### Conjunto 1 de resultados.

Las series de datos obtenidos en los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea (aee), grupo control e hiperpolarización (hiper), fueron analizados con la herramienta de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA), encontrándose el parámetro  $\alpha$  como indicador de la dinámica subyacente. Para cada neurona se extrajeron en un promedio de 20 segmentos interespiga y para cada segmento interespiga se obtuvo un parámetro  $\alpha$ , los parámetros  $\alpha$  encontrados fueron promediados para así obtener uno solo para cada neurona. Este mismo procedimiento se realizó para el grupo control y el segmento en hiperpolarización, las graficas 10-12 son ejemplos de un ajuste de primer orden para los datos obtenidos del DFA en las tres condiciones mencionadas.

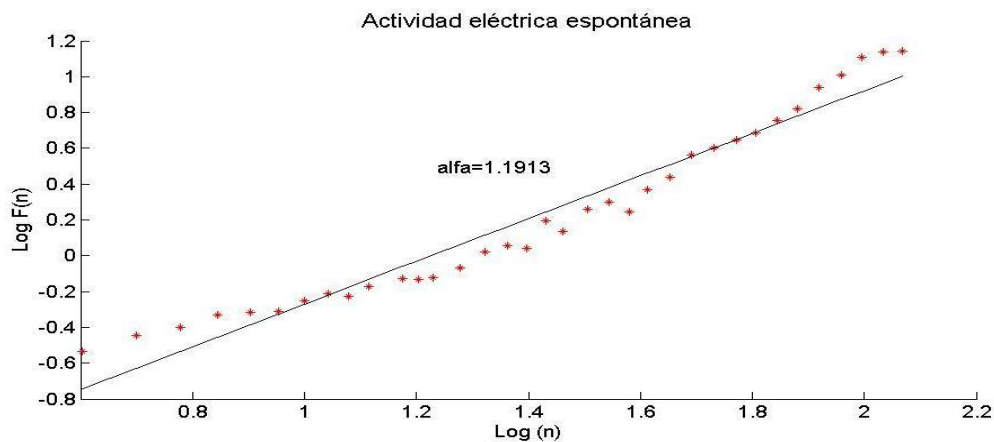


Figura 10. Ajuste de primer orden para los datos obtenidos a partir del DFA en segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea, la pendiente obtenida corresponde al parámetro alfa sugiriendo un comportamiento de tipo fractal  $1/f$ .

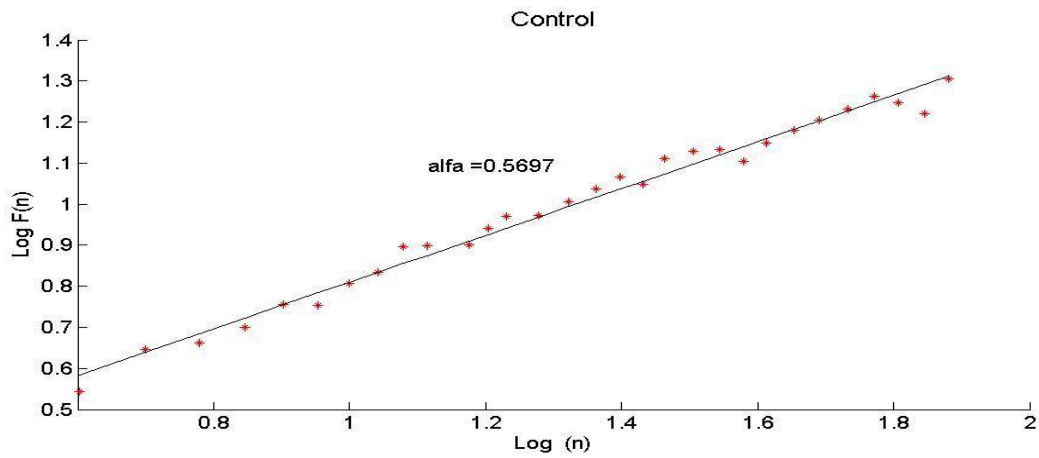


Figura 11. Datos obtenidos del DFA posterior a una permutación aleatoria de las fluctuaciones de voltaje del segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea.

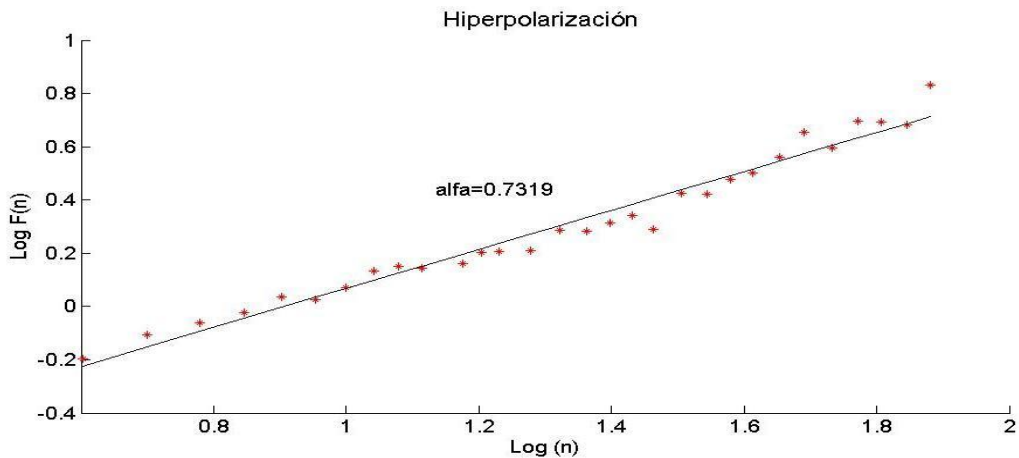


Figura 12. Datos obtenidos del DFA para un segmento en hiperpolarización.

En la tabla 4 se muestra la estadística descriptiva para el parámetro  $\alpha$  de las neuronas estudiadas, además se realizó una prueba ANOVA no paramétrica con el fin de confirmar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los grupos como se había observado previamente en las distribuciones para las tres condiciones mostradas en la figura 13.

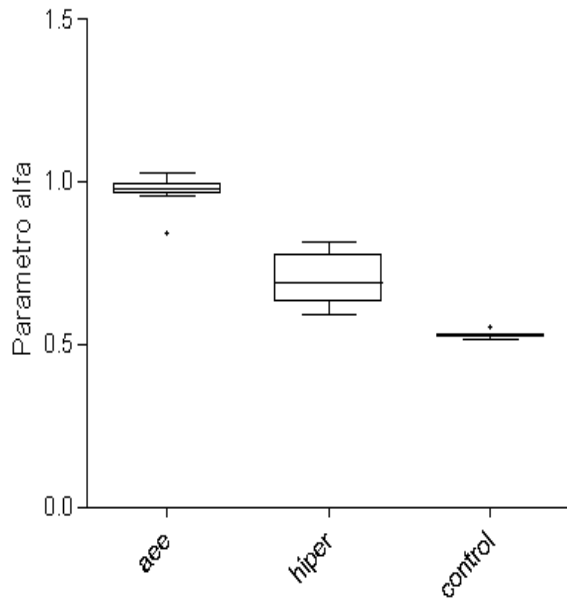


Figura 13. Distribución del parámetro  $\alpha$ .

Tabla 5. Estadística descriptiva y ANOVA no paramétrica.

	aee	hiper	control
Numero de grupos	3		
Numero de valores	12	17	12
Mínimo	0.8432	0.5914	0.5159
Percentil 25%	0.9631	0.6307	0.5214
Mediana	0.9795	0.6905	0.5261
Percentil 75%	0.9952	0.7778	0.5297
Máximo	1.0260	0.8167	0.5514
Media	0.9713	0.6929	0.5269
Std. Desviación	0.0449	0.0759	0.0093
Std. Error	0.0130	0.0184	0.0027
Bajo 95% IC	0.9428	0.6539	0.5210
Arriba 95% IC	0.9998	0.7319	0.5327
Kruskal-Wallis test			
Valor de P	<0.0001		

## Conjunto 2 de resultados.

En esta sección se realizó una prueba pareada para las cuatro neuronas de la tabla 2, la cual consistió en registrar actividad eléctrica neuronal y posteriormente aplicar un estímulo hiperpolarizante como se mencionó previamente. En las tablas 5-8 se muestran los resultados a partir de una prueba t pareada no paramétrica mostrando diferencias significativas en los valores que toma el parámetro  $\alpha$  para cada neurona, así mismo se muestran a lado derecho de las tablas una gráfica de la distribución de estos valores del parámetro  $\alpha$ .

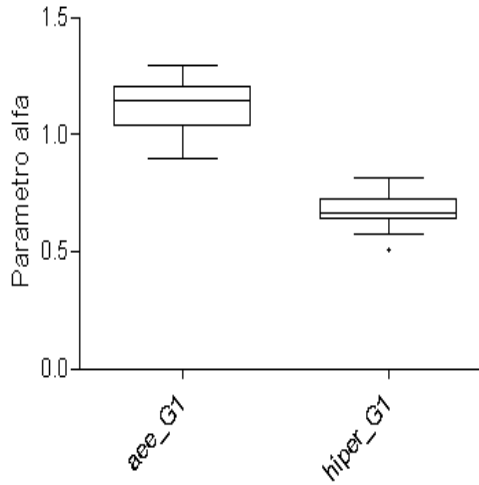


Figura 6. Disminución en los valores del parámetro  $\alpha$  para la neurona 1.

Tabla 6. Estadística descriptiva para 35 valores del parámetro  $\alpha$  y prueba no paramétrica.

	aee_G1	hiper_G1
Numero de valores	35	35
Mínimo	0.9005	0.5083
Percentil 25%	1.0310	0.6380
Mediana	1.1420	0.6642
Percentil 75%	1.2070	0.7232
Máximo	1.2950	0.8114
Media	1.1210	0.6725
Std. Desviación	0.1049	0.0591
Std. Error	0.0123	0.0099
Bajo 95% IC	1.0970	0.6522
Arriba 95% IC	1.1460	0.6928
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

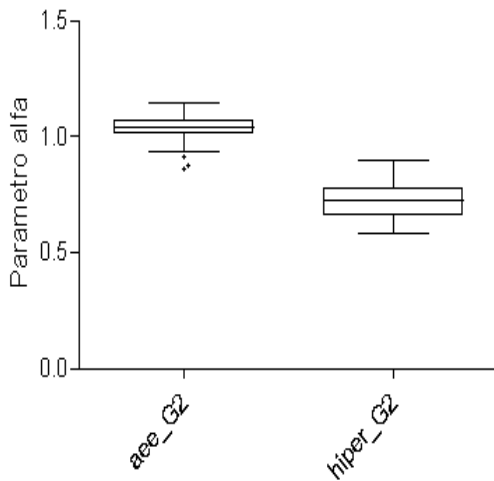


Figura 15. Disminución en los valores del parámetro  $\alpha$  para la neurona 2.

Tabla 7. Estadística descriptiva para 26 valores del parámetro  $\alpha$  y prueba no paramétrica.

	aee_G2	hiper_G2
Numero de valores	26	26
Mínimo	0.8571	0.5832
Percentil 25%	1.0140	0.6553
Mediana	1.0380	0.7243
Percentil 75%	1.0680	0.7781
Máximo	1.1430	0.8950
Media	1.0321	0.7189
Std. Desviación	0.0624	0.0782
Std. Error	0.0104	0.0153
Bajo 95% IC	1.0110	0.6873
Arriba 95% IC	1.0530	0.7505
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

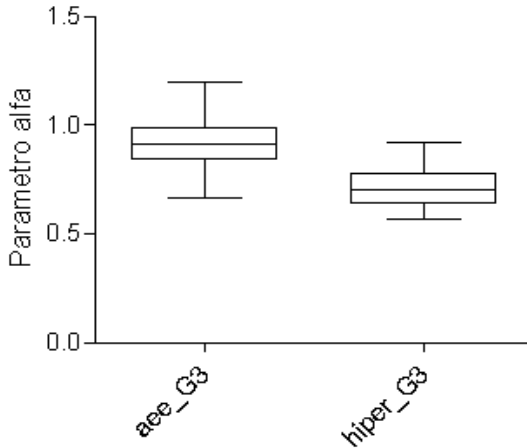


Figura 16. Disminución en los valores del parámetro  $\alpha$  para la neurona 3.

Tabla 8. Estadística descriptiva para 22 valores del parámetro  $\alpha$  y prueba no paramétrica.

	aee_G3	hiper_G3
Numero de valores	22	22
Mínimo	0.6651	0.5691
Percentil 25%	0.8364	0.6387
Mediana	0.9137	0.7024
Percentil 75%	0.9858	0.7786
Máximo	1.1980	0.9215
Media	0.9083	0.7077
Std. Desviación	0.1028	0.0868
Std. Error	0.0139	0.0185
Bajo 95% IC	0.8803	0.6691
Arriba 95% IC	0.9364	0.7462
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

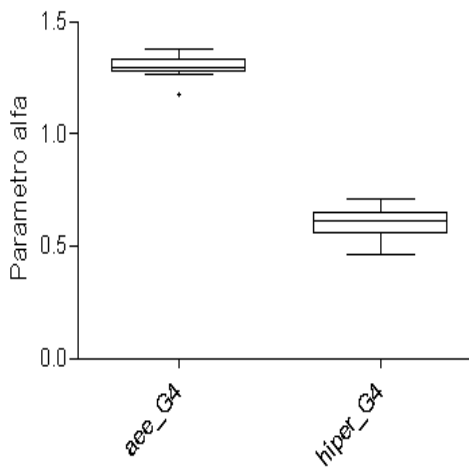


Figura 17. Disminución en los valores del parámetro  $\alpha$  para la neurona 4.

Tabla 9. Estadística descriptiva para 26 valores del parámetro  $\alpha$  y prueba no paramétrica.

	aee_G4	hiper_G4
Numero de valores	16	16
Mínimo	1.1730	0.4607
Percentil 25%	1.2760	0.5495
Mediana	1.2950	0.6126
Percentil 75%	1.3300	0.7686
Máximo	1.3370	0.9215
Media	1.2280	0.6066
Std. Desviación	0.1028	0.0683
Std. Error	0.0097	0.0171
Bajo 95% IC	1.2670	0.5701
Arriba 95% IC	1.2997	0.6430
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

### Conjunto 3 de resultados.

Como se ilustra en las figuras 18-19 existen dos posibles regiones de ajuste para los datos graficados del DFA en el segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea e hiperpolarización. Este conjunto de resultados surge a partir de realizar un ajuste de primer orden para cada región, encontrando así un cambio en la dinámica para una escala de tiempo específica, los datos utilizados fueron obtenidos de las cuatro neuronas mencionadas previamente. Las figuras 18-19 muestran un ajuste de primer orden para este cambio de dinámica que se refleja en el parámetro  $\alpha$ .

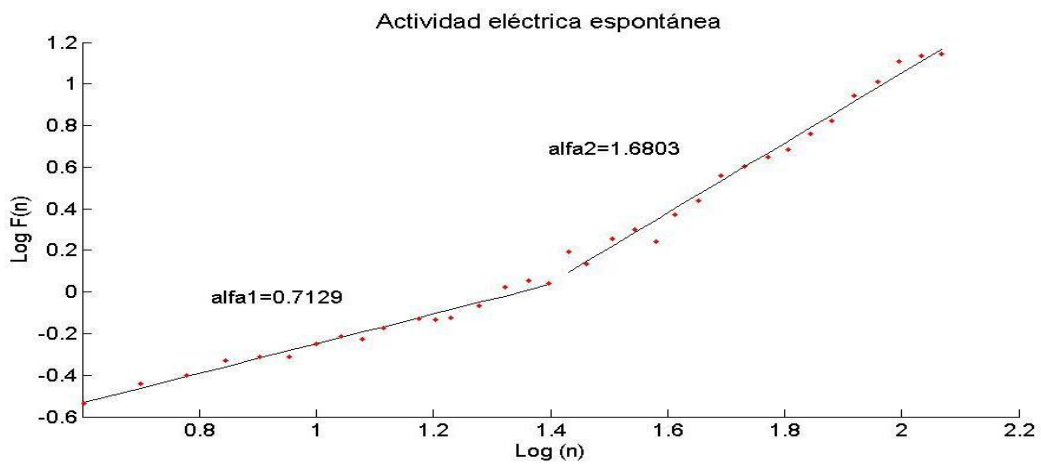


Figura 18. La existencia de dos regiones de ajuste revela un cambio de dinámica para una escala de tiempo particular.

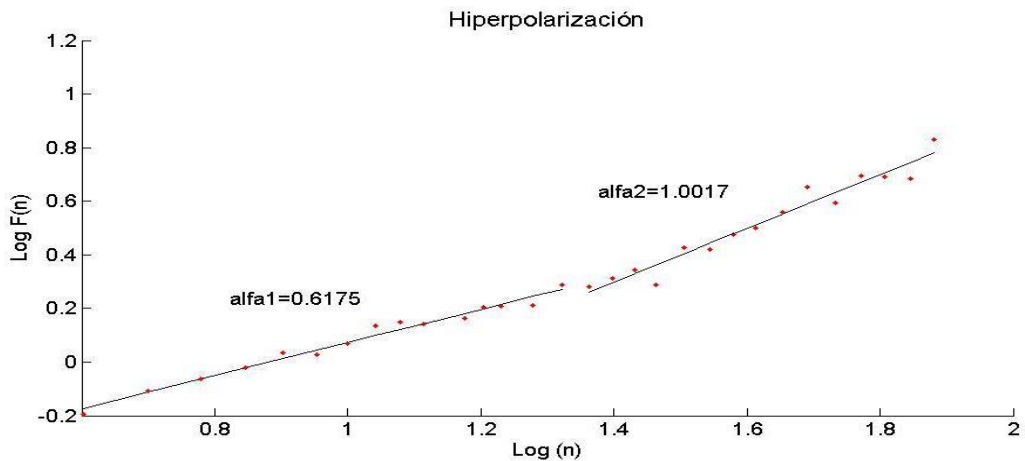


Figura 19. Ajuste de regiones para el segmento en hiperpolarización.

Así mismo, se realizó una prueba t pareada con el fin verificar la existencia de diferencias entre los valores que toma el parámetro  $\alpha$  para las dos regiones de ajuste de los datos obtenidos del DFA tanto para actividad eléctrica espontánea como para hiperpolarización. Las tablas 9-10 muestran esta comparación.

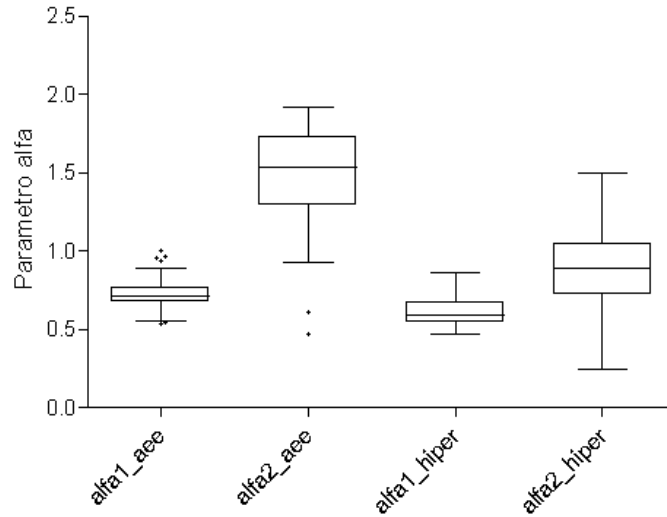


Figura 20. Distribución del parámetro  $\alpha$  para las regiones de ajuste del segmento interespiga de actividad eléctrica espontanea y el segmento en hiperpolarización.

Tabla 10. Prueba no paramétrica pareada mostrando diferencias significativas en parámetro  $\alpha$  para las dos condiciones.

	$\alpha_1$ aee	$\alpha_1$ hiper
Numero de valores	99	99
Mínimo	0.5360	0.4702
Percentil 25%	0.6763	0.5424
Mediana	0.7128	0.5865
Percentil 75%	0.7655	0.6737
Máximo	0.9992	0.8575
Media	0.7232	0.6089
Std. Desviación	0.0841	0.0852
Std. Error	0.0059	0.0082
Bajo 95% IC	0.7114	0.5925
Arriba 95% IC	0.7349	0.6253
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

Tabla 11. Prueba no paramétrica pareada mostrando diferencias significativas en parámetro  $\alpha$  para las dos condiciones.

	$\alpha_2$ aee	$\alpha_2$ hiper
Numero de valores	99	99
Mínimo	0.4699	0.2434
Percentil 25%	1.2960	0.7205
Mediana	1.5350	0.8851
Percentil 75%	0.7655	1.0532
Máximo	1.9210	1.4981
Media	1.4910	0.8742
Std. Desviación	0.2680	0.2412
Std. Error	0.0190	0.0234
Bajo 95% IC	1.4530	0.8276
Arriba 95% IC	1.5280	0.9207
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	

El punto donde ocurre el cambio de dinámica es llamado también “crossover” y este punto representa a su vez número de muestras, por lo que se puede conocer la escala temporal del cambio de dinámica al considerar la frecuencia de muestreo de la señal.

$$T = \frac{n}{f} \text{ en donde } n \text{ representa numero de muestra y } f \text{ frecuencia de muestreo.}$$

De esta forma se obtuvo una escala de tiempo para la cual se identificó este cambio de dinámica tanto para actividad eléctrica espontánea como en hiperpolarización, la tabla 11 muestra la estadística descriptiva con relación a este tiempo.

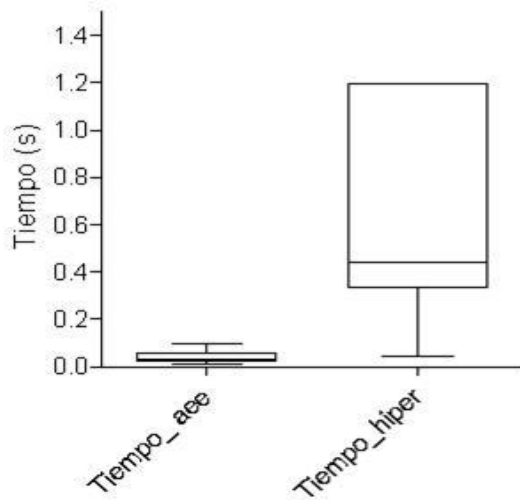


Figura 7. Distribución del tiempo para ambas condiciones.

Tabla 12. Escala de aparición del crossover.

	Tiempo_aee	Tiempo_hiper
Numero de valores	99	99
Mínimo	0.0080	0.0429
Percentil 25%	0.0163	0.3266
Mediana	0.0285	0.4384
Percentil 75%	0.0597	1.1940
Máximo	0.0968	1.1940
Media	0.0367	0.6944
Std. Desviación	0.0253	0.4576
Std. Error	0.0017	0.0453
Bajo 95% IC	0.0332	0.6045
Arriba 95% IC	0.0403	0.7843
Mann-Whitney test		
Valor de P	<0.0001	



### Conjunto 4 de resultados.

En esta sección el segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea fue dividido en dos partes iguales segmento 1, segmento 2. Para cada uno se calculó su exponente  $\alpha$ , de igual forma se realizó este procedimiento para el segmento en hiperpolarización, la tabla 11 muestra que no existen diferencias significativas entre el segmento 1 y 2 en actividad eléctrica espontánea, caso contrario que se muestra en la tabla 12.

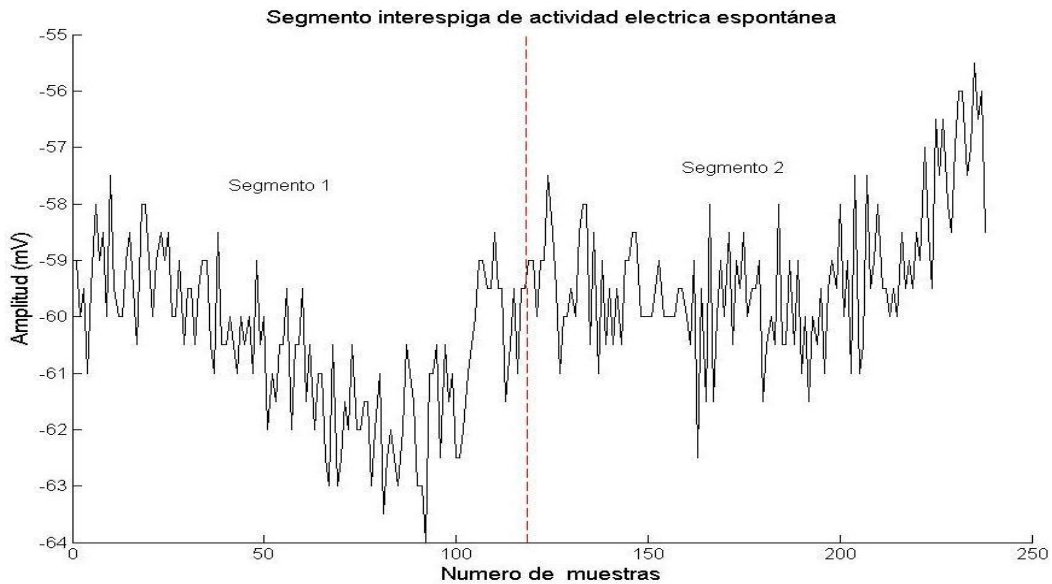


Figura 8. Segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea dividido en dos partes con la misma duración segmento 1 y segmento 2.

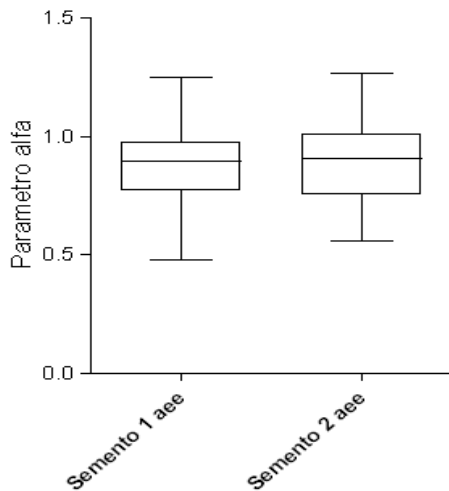


Figura 9. Distribución del parámetro  $\alpha$  para ambos segmentos.

Tabla 13. Prueba no paramétrica pareada, comparación del parámetro  $\alpha$  en función a cada segmento.

	Segmento1_aee	Segmento 2 aee
Numero de valores	184	184
Mínimo	0.4468	0.5591
Percentil 25%	0.7667	0.7519
Mediana	0.8974	0.9052
Percentil 75%	0.9768	1.0120
Máximo	1.3180	1.2670
Media	0.8726	0.8965
Std. Desviación	0.1485	0.1642
Std. Error	0.0107	0.0116
Bajo 95% IC	0.8514	0.8731
Arriba 95% IC	0.8938	0.9200
Mann-Whitney test		
Valor de P	0.2341	

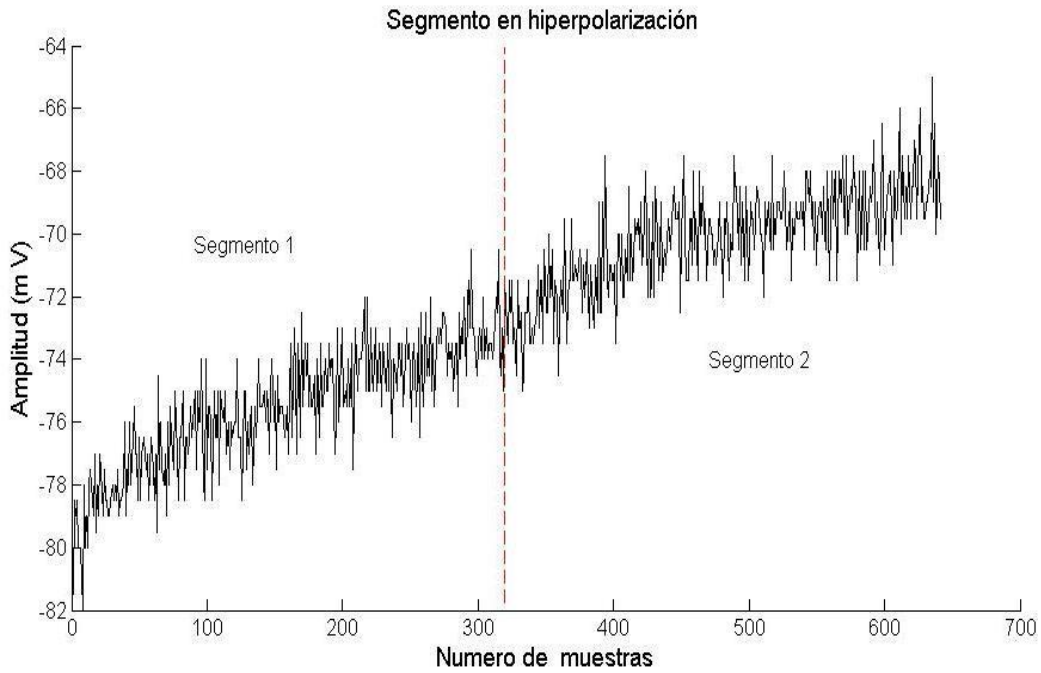


Figura 24. Segmento en hiperpolarización dividido en dos partes iguales segmento 1 y segmento 2.

Tabla 14. Prueba no paramétrica pareada, comparación del parámetro  $\alpha$  en función a cada segmento.

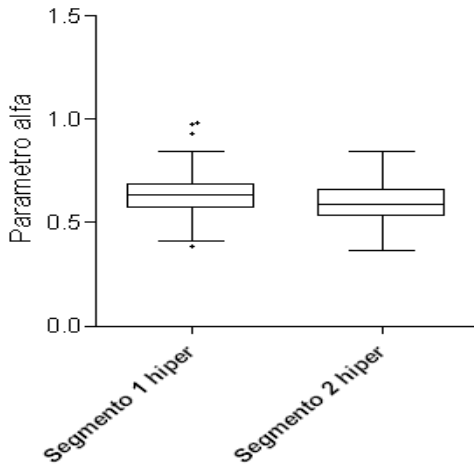


Figura 25. Distribución del parámetro  $\alpha$  para ambos segmentos.

	Segmento1 hiper	Segmento 2 hiper
Numero de valores	99	99
Mínimo	0.3880	0.3666
Percentil 25%	0.5684	0.5307
Mediana	0.6360	0.5876
Percentil 75%	0.6878	0.6588
Máximo	0.9830	0.8427
Media	0.6365	0.5985
Std. Desviación	0.1033	0.0941
Std. Error	0.0098	0.0089
Bajo 95% IC	0.6170	0.5807
Arriba 95% IC	0.6560	0.6163
Mann-Whitney test		
Valor de P	0.0032	

## Conjunto 5 de resultados.

Los resultados obtenidos al realizar una promediación de la densidad espectral de los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea y los segmentos en hiperpolarización, se muestran a continuación en las figuras 26-33.

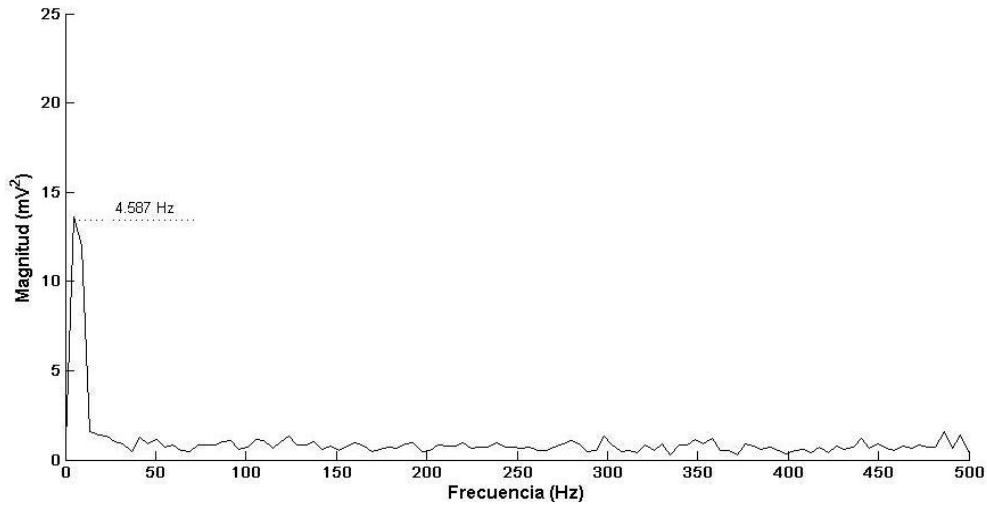


Figura 26. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos interespiga de la neurona uno en actividad eléctrica espontánea.

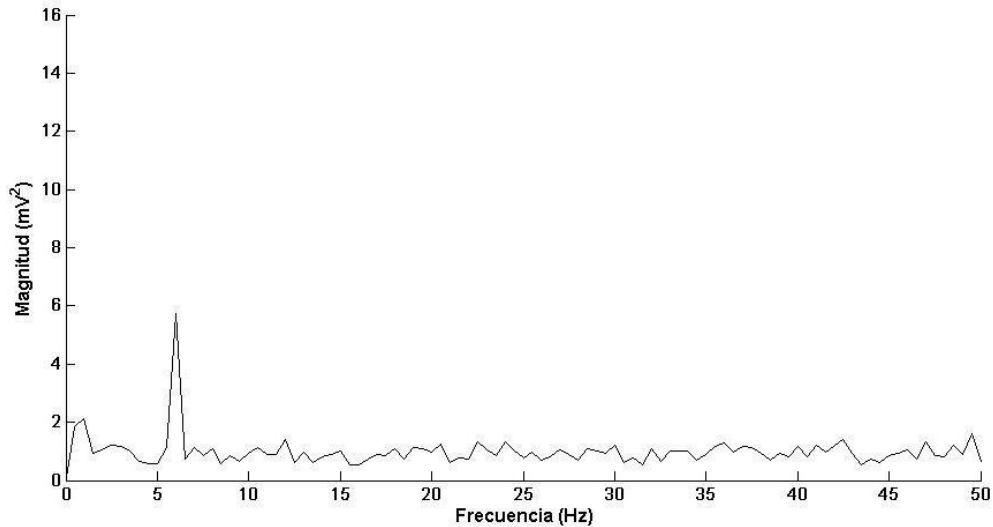


Figura 27. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos en hiperpolarización de la neurona uno.

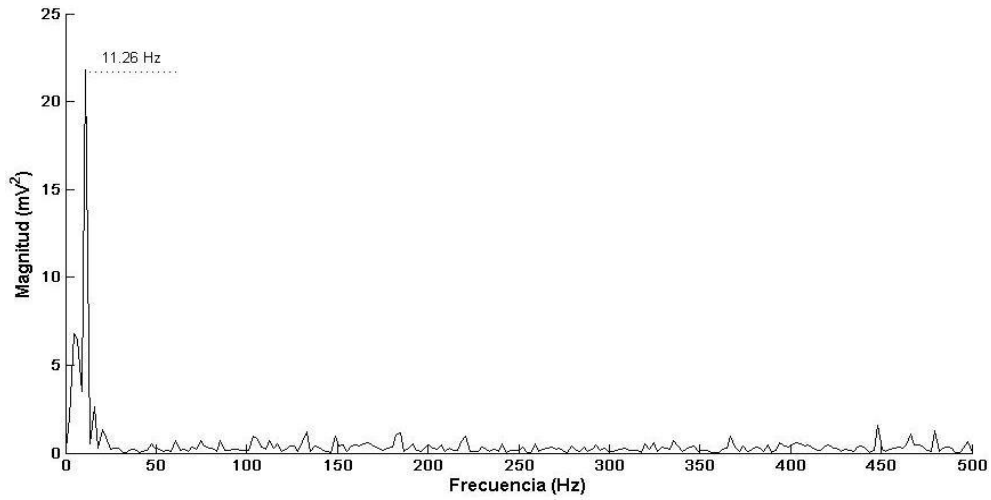


Figura 28. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos interespiga de la neurona dos en actividad eléctrica espontanea.

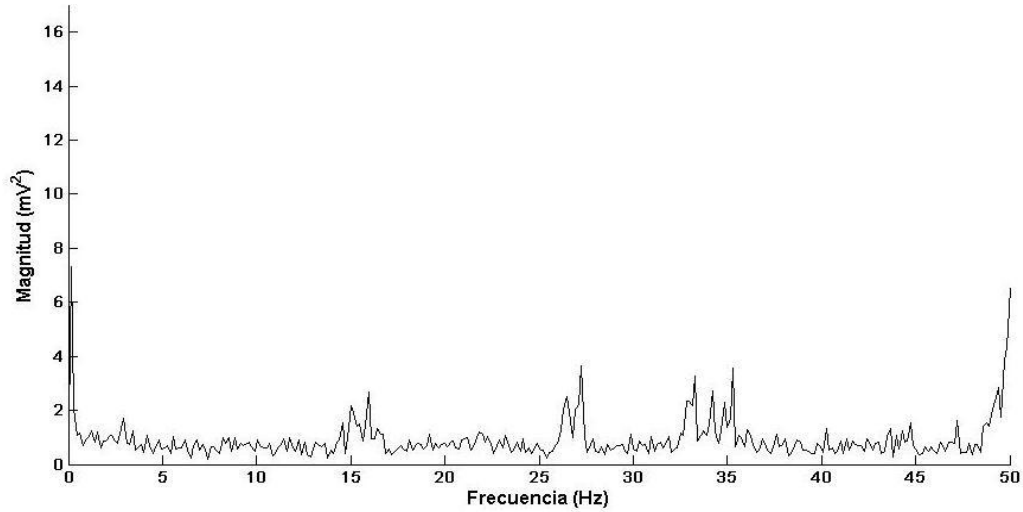


Figura 29. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos en hiperpolarización de la neurona dos.

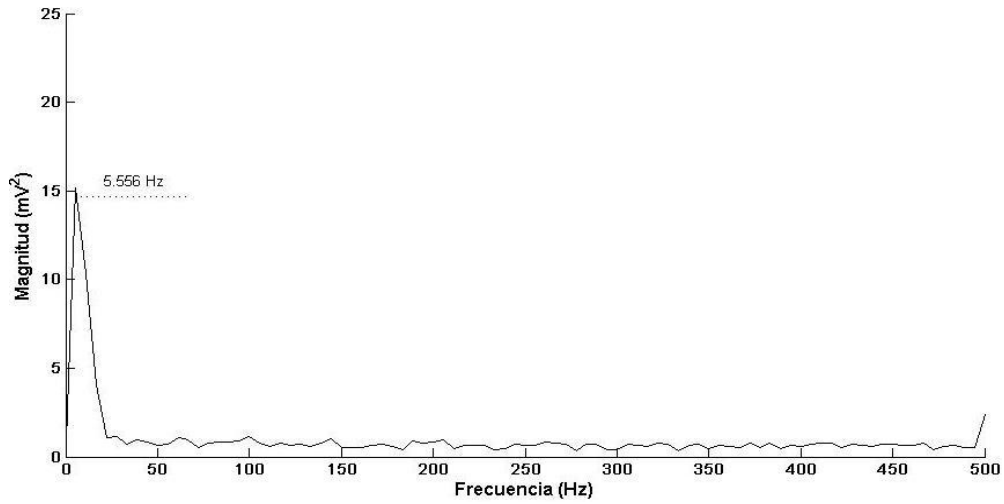


Figura 30. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos interespiga de la neurona tres en actividad eléctrica espontánea.

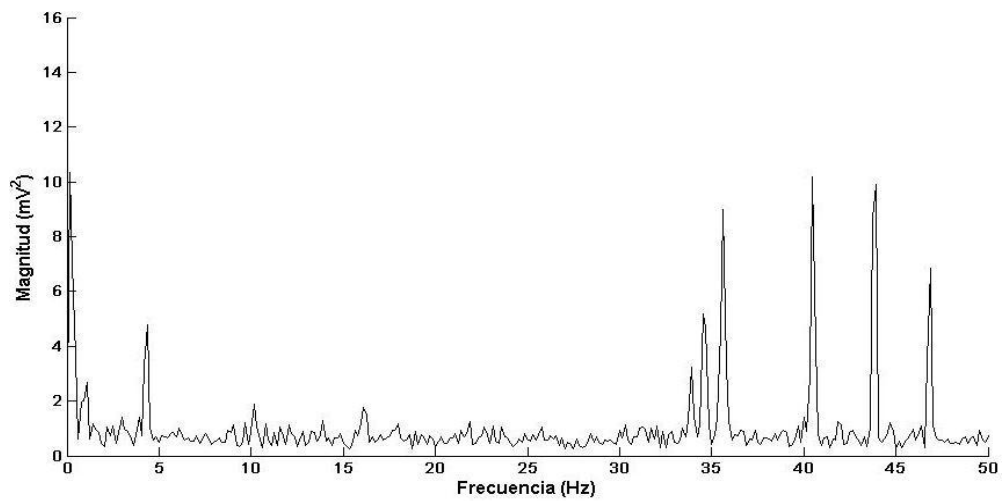


Figura 10. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos en hiperpolarización de la neurona tres.

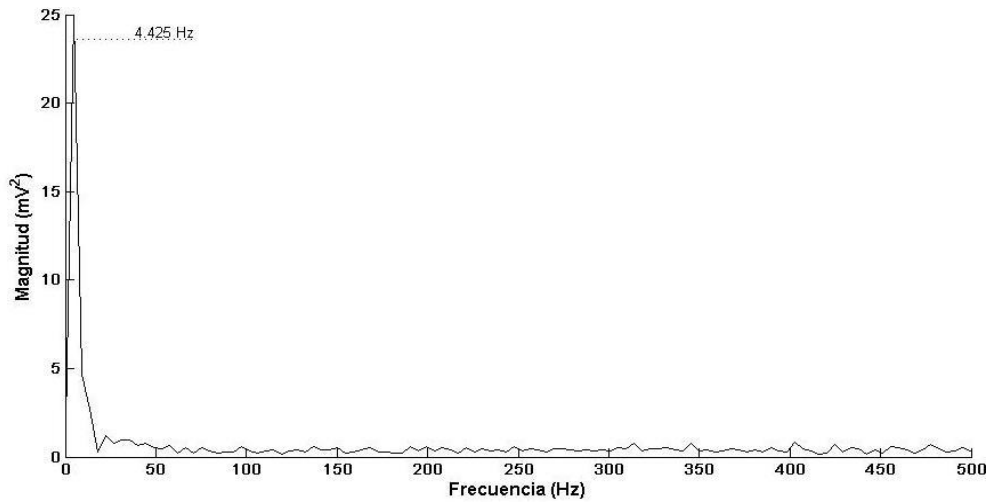


Figura 32. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos interespiga de la neurona cuatro en actividad eléctrica espontánea.

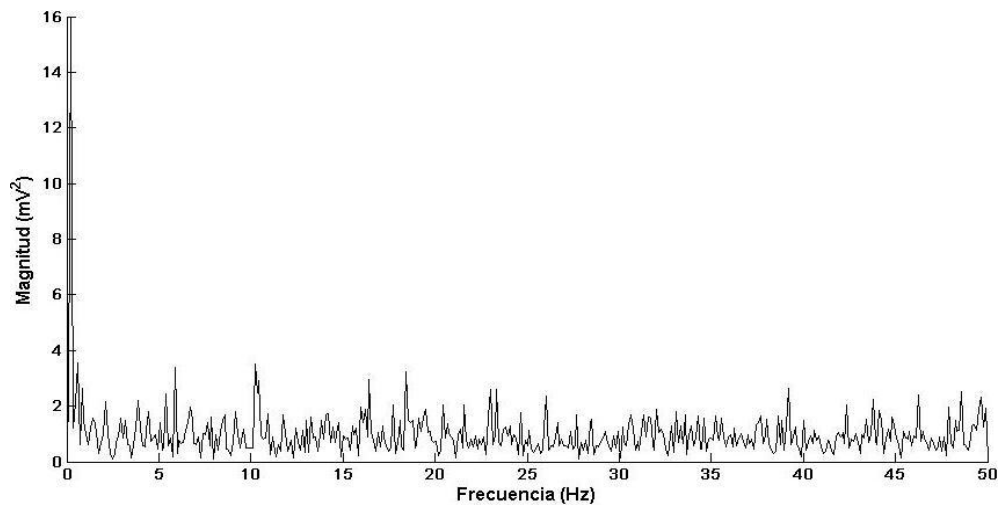


Figura 33. Promediación de la estimación de la densidad de potencia espectral para 10 segmentos en hiperpolarización de la neurona cuatro.

## Discusión de resultados.

Los datos obtenidos en el conjunto uno de resultados (Tabla 3), muestran la existencia de correlaciones de largo plazo o estructura en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga de la actividad eléctrica espontánea. Así mismo, se encontraron diferencias significativas en la dinámica del potencial de membrana en los tres grupos estudiados; actividad eléctrica espontánea, hiperpolarización y control, en donde es posible identificar una marcada separación en los intervalos de confianza para los valores que toma el parámetro alfa “ $\alpha$ ”. Esto confirma la inequívoca presencia de dinámicas diferentes.

De la misma forma, para el conjunto dos de resultados (Tabla 5-8), se vuelve a confirmar la existencia de diferencias significativas entre los grupos; actividad eléctrica espontánea e hiperpolarización. Nuevamente los valores del parámetro alfa se ven disminuidos debido a la aplicación de un estímulo externo de corriente a la neurona, generando así una disminución en las correlaciones de largo plazo en el potencial de membrana. Esto sugiere que una posible causa en la disminución de las correlaciones está determinada por la entrada masiva de calcio al medio intracelular, activando así una cascada neurotóxica que en su conjunto afecta directamente la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos moduladores del potencial de membrana [58].

De esta forma, ambos conjuntos de resultados sugieren que la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos que modulan el potencial de membrana, más allá de ser aleatoria o estocástica, presentan correlaciones; es decir, sus cambios conformacionales dependen de los estados previos a su estado actual. Así mismo, estos cambios conformacionales se encuentran influidos por una amplia gama de escalas temporales para cada estado de transición; por lo tanto, al generar una perturbación externa que modifica la dinámica de estos canales iónicos se sugieren dos efectos que probablemente no son independientes: 1) La modificación o disminución en el número de constantes de tiempo que dominan la transición a cada estado conformacional para cada tipo de canal iónico [60] y 2) la activación incorporada de procesos enzimáticos que modulan el potencial de membrana, y que a consecuencia de la interacción de ambos procesos, genera fluctuaciones de voltaje más aleatorias [59-61].

El conjunto tres de resultados como se mencionó previamente, fue generado a partir de un ajuste de primer orden por regiones, en donde se localizó un punto de cambio de dinámica, llamado “*crossover*”, que ofrece información sobre las dinámicas que subyacen en el potencial de membrana y que están sujetas a un rango de escalas temporales. La suma de las dos dinámicas encontradas genera la dinámica total del sistema que fue la encontrada previamente al realizar un ajuste único en todo el rango de escalas para los grupos uno y dos.

Así, en la figura 20 se muestra la distribución de los parámetros alfa para los grupos; actividad eléctrica espontánea e hiperpolarización, mismos que fueron comparados (Tabla 9-10), encontrándose de esta manera diferencias significativas entre las dinámicas subyacentes. Como

se ha mencionado, el punto “*crossover*” nos ofrece una escala temporal para la cual se exhibe un cambio de dinámica. En la figura 21 se muestra la distribución de los tiempos para los grupos actividad eléctrica e hiperpolarización, así como la estadística descriptiva para cada grupo en la tabla 11, exhibiendo que existe mayor dispersión en las escalas temporales para el grupo de hiperpolarización. Pero no siendo así para actividad eléctrica espontánea la cual se encuentran acotada a un rango limitado. Ésta escala de tiempo podría ser ligada a algún proceso modulador del potencial de membrana.

El conjunto cuatro de resultados muestra un análisis en el segmento interespiga, que se dividió a la mitad del correspondiente intervalo para el posterior análisis de cada segmento (figura 22 y 24). Esto fue debido a la posible existencia de dos dinámicas, para así extraer información sobre los mecanismos involucrados en la generación de las mismas. Este procedimiento se realizó tanto para actividad eléctrica espontánea como para hiperpolarización. Los resultados se muestran en la tabla 11, identificándose que para actividad eléctrica espontánea no existen diferencias significativas en el parámetro alfa, ya que se mantienen las mismas correlaciones a largo del segmento interespiga. Caso contrario para hiperpolarización, en donde los resultados de la tabla 12 muestran diferencias significativas en el parámetro alfa; para el primer segmento existe mayor correlación en las fluctuaciones del potencial de membrana con respecto al segundo segmento en donde se pierden casi por completo.

Así, los resultados muestran correlaciones de largo plazo presentes en el segmento inmediato posterior a la repolarización del potencial de acción y el segmento previo a la despolarización del siguiente potencial de acción. Esto muestra entonces que las diversas poblaciones de canales iónicos tienen una dinámica permanente en el segmento interespiga. Lo que sugiere que a diferencia de lo que normalmente se ha descrito [62-63], la activación y desactivación de los diferentes tipos de canales SK no están limitadas al tiempo inmediato posterior a la repolarización, sino que se manifiestan en todo el segmento interespiga, modulándose así la frecuencia de aparición de la espiga [62].

Para el caso de hiperpolarización se observa que estas correlaciones se pierden tanto para el primer segmento como para el segundo segmento, confirmando así [58], que el nivel de neurotoxicidad generado por la entrada de calcio ocasiona saturación o un desacople entre los mecanismos moduladores del potencial de membrana circunstancia que se manifiesta con fluctuaciones de voltaje más aleatorias.

En una primera inspección visual el segmento interespiga muestra componentes periódicos en las fluctuaciones de voltaje, que podrían ser confirmadas por medio de un análisis espectral. El conjunto cinco de resultados muestra entonces un análisis espectral que es utilizado para poder detectar en mayor detalle estos componentes por medio de una promediación de las diferentes estimaciones de la densidad de potencia espectral (figura 26-33). Estos resultados podrían atribuirse a cambios periódicos de conductancia generados por la activación de los canales SK. Como se ha discutido en el párrafo anterior distintas poblaciones de estos canales



11 de febrero de 2013

podrían encontrarse participando en la modulación del potencial a lo largo de todo el segmento interespiga.

Como se ha podido ver, el análisis espectral ofrece información sobre el comportamiento periódico dominante de los posibles mecanismos de baja frecuencia involucrados en el segmento interespiga. Sin embargo, este análisis no proporciona información sobre la dinámica colectiva de las diversas poblaciones de canales iónicos, y es aquí en donde el análisis fractal nos ha brindado esa información adicional, que parece ser crucial para comprender la dinámica de los mecanismos inmersos en la generación de las fluctuaciones de voltaje interespiga, ya que sugiere la participación coherente de los canales SK a lo largo del segmento interespiga.

## Conclusiones.

El análisis fractal en esta tesis ofreció información integral sobre la dinámica de los mecanismos generadores de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga durante actividad eléctrica espontánea, la cual presenta correlaciones de largo plazo que se manifiestan a lo largo de diferentes escalas temporales. Estas fluctuaciones de voltaje son generadas por las distintas poblaciones de canales iónicos inmersos en la membrana celular, y probablemente en particular por los canales SK.

Con esta evidencia se puede concluir que los modelos convencionales “Markovianos” no logran exhibir en detalle las características principales del comportamiento colectivo de las diferentes poblaciones de canales iónicos, ya que como se ha evidenciado en esta investigación estos canales no muestran una escala de tiempo característica; que es como en general se ha modelado el comportamiento individual de los canales iónicos y que se ha extendido o generalizado para el resto de las poblaciones existentes en la membrana celular [64].

Sumado a esta dinámica compleja que presentan estos canales iónicos, la acción de los diversos neurotransmisores también genera procesos de plasticidad sináptica, que se expresan funcionalmente en la modulación del potencial de membrana a partir del cambio de dinámica en las diferentes poblaciones de canales iónicos.

El fenómeno de hiperpolarización ha mostrado que una perturbación artificial en el potencial de membrana afecta directamente el comportamiento de las diversas poblaciones de canales iónicos, modificando o inclusive restringiendo sus constantes de tiempo de activación, que son dependientes de umbrales de voltaje y de procesos enzimáticos, que son activados principalmente por la inundación de calcio en el medio intracelular, generando así una pérdida de correlaciones en los procesos funcionales celulares.

El análisis del segmento interespiga de actividad eléctrica espontánea, ofrece evidencia de la existencia de una dinámica coherente entre los mecanismos moduladores del potencial de membrana. La cuestión que surge es si esta dinámica es mediada únicamente por la interacción de las diversas poblaciones de canales SK. El análisis no lineal ofrece la ventaja de exhibir la dinámica de estos mecanismos, al mismo tiempo de ser sensible a perturbaciones en el sistema por lo que podría ser útil para diferenciar a neuronas que generan actividad eléctrica por efectos sinápticos y a aquellas en donde esta función es intrínseca modulada por mecanismos moleculares.

De esta forma, el análisis de la dinámica no lineal ofrece información en mayor detalle sobre la dinámica de estos mecanismos moleculares y que podría complementar a los modelos Markovianos con los cuales se ha modelado la dinámica de las diversas poblaciones de canales iónicos.

## Anexo1: Resumen de congreso.

Esta sección corresponde a el trabajo presentado en el congreso internacional de la sociedad de biofísica española (“International Congress of the Spanish Biophysical Society”), celebrado 3-6 de julio del 2012 en Barcelona, España. Solo se presentaron los datos más relevantes de la investigación realizada.

### **Fractal-like Correlations of the Fluctuating Interspike Membrane Potential of Neurons.**

R. A. Seseña, 1, 2 J.C. Echeverría, 2 M. J. Bernal, 1, 2 F.R. Godínez, 2

1 Electrical Engineering Department, Postgraduate Program in Biomedical Engineering.

2Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I), Mexico City, Mexico.

Correspondence: rubfiaro@gmail.com

### **Abstract**

The dynamic behaviour of the interspike period has been widely analysed by nonlinear techniques [1-2], yet the interspike voltage fluctuations remain to be explored in full detail. Here, with the aims of getting insights about the dynamic interplay of mechanisms involved in the regulation of the membrane potential, we analysed the interspike voltage fluctuations of nerve cells recorded from the suboesophageal ganglia of *Hélix aspersa* with the current clamp technique. Time series of interspike voltage fluctuations were collected from 12 specimens under spontaneous activity, and from 17 specimens recorded after applying current stimulating pulses. For each specimen more than 10 interspike intervals were obtained. To assess the dynamic or stochastic nature of the voltage fluctuations, interspike series were analysed by Detrended Fluctuation Analysis (DFA) providing the scaling exponent  $\alpha$ . Whereas for neurons under spontaneous activity this exponent indicated that the interspike voltage fluctuations present fractal-like correlations ( $\alpha=0.979 \pm 0.045$ ), such correlations were diminished and statistical different for the stimulated neurons ( $\alpha=0.692 \pm 0.075$ ,  $p < 0.0001$ ) and for random permuted voltage fluctuations data ( $\alpha=0.526 \pm 0.009$ ,  $p < 0.0001$ ). In addition, when the interspike intervals under spontaneous activity were divided in two consecutive segments, no significant differences for  $\alpha$  were identified ( $0.876 \pm 0.148$  vs  $0.896 \pm 0.169$ ). Given that SK channels seem to play a major role regulating the cell excitability during interspike periods [3-4], our results then suggest that these and presumably other channel populations manifest non-random conformational changes with long-term memory. We consider that this may become relevant information for understanding and modeling the collective behaviour of ionic channels.

### **References**

- [1] **Kristelle R., Nicolas M., Bertrand D., Jean M.**, *Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: A case study for methodological comparison*, Journal of Neuroscience Methods, Vol. 179, pp 142-149, 2009.
- [2] **Asaf Gal, Danny E. , Avner W. , Maya Sandler, Jackie Shiller, Shimon M.**, *Dynamics of excitability over extended timescales in cultured cortical neurons*, Journal of Neuroscience, Vol. 30 , pp 16332- 16342, 2010.
- [3] **Faber Louise, Pankar Sah**, *Calcium activated potassium channels: Multiple contributions to neuronal function*, The neuroscientist, Vol. 9, pp 181-194, 2003.
- [4] **Martin Stocker**, *Calcium- activated potassium channels: Molecular determinants and function of the SK family*, Nature, Vol. 5, pp 758-770, 2004.

## Anexo1: Tablas resultado del análisis de las fluctuaciones del potencial de membrana.

Tabla A. Parámetro  $\alpha$  obtenido de los segmentos interespiga para las 12 neuronas en actividad eléctrica

Parámetro $\alpha$ N1	Parámetro $\alpha$ N2	Parámetro $\alpha$ N3	Parámetro $\alpha$ N4	Parámetro $\alpha$ N5	Parámetro $\alpha$ N6	Parámetro $\alpha$ N7	Parámetro $\alpha$ N8	Parámetro $\alpha$ N9	Parámetro $\alpha$ N10	Parámetro $\alpha$ N11	Parámetro $\alpha$ N12
1,0199	0,9541	1,0180	1,0385	1,0423	0,9713	0,9474	1,0859	1,1576	0,7485	1,0352	0,8327
1,0171	0,8508	0,9769	0,9480	0,9429	0,8222	1,0344	0,9365	0,9488	0,9270	1,0121	0,8223
1,0220	0,9932	1,0147	1,0457	0,9971	0,8534	0,9365	0,9164	1,1366	1,1037	0,9326	0,8636
1,0131	0,9856	1,0067	1,0062	0,8046	0,9945	1,0158	1,0390	0,8781	1,0712	0,9718	0,8605
0,9577	0,9406	1,0357	0,9851	0,9592	1,0519	0,9963	1,0634	0,9417	0,9914	1,0009	0,8520
1,0067	1,0406	1,0406	1,0393	0,9967	0,8520	0,9702	1,0120	1,0955		1,0851	0,8283
0,7271	0,9332	1,0023	0,8201	1,0215	0,9581	0,9983	0,8344			0,8165	
1,0187	1,0174	1,0413	0,9828	0,9334	1,0209	1,0363	1,0405			1,0280	
1,0330	0,9444	0,9772	0,9604	1,0164	1,0034	0,9903	0,9563				
1,1021	1,0067	1,0466	0,9075	0,7698	1,0055	0,9759	1,0242				
0,9284	0,9536	0,9935	0,9352	0,9797	0,9934	0,9533	0,7318				
0,9309	1,0218	0,9958	0,9831	1,0598	0,7259	0,9903	0,9198				
0,9425	1,0276	0,9559	1,0442	0,9734	0,9932	0,9047	1,0870				
1,0383	0,9605	0,9700	1,0150	0,9932	0,9577	0,9781	1,0430				
1,0058	0,9734	1,0042	1,0117	1,0376	1,0596	1,0851	0,8220				
1,0311	0,9951	1,0214	1,0332	0,9189	1,0326	1,0792	0,9876				
0,9367	0,9818	0,9726	0,9755	0,9780	0,9380	1,0308	0,9463				
1,0284	1,0472	0,9593	1,0098	0,8215	1,0271	1,0587	0,9981				
1,0323	0,9451	1,0248		0,9533	1,0357	0,9872	0,8575				
0,9112	1,0624	1,0105		0,9613		0,9868					
0,9900	0,9586										
1,0234	0,9612										
0,9354	0,9314										
1,0201	1,0039										

“Análisis del potencial de reposo interespiga de la actividad eléctrica neuronal”

11 de febrero de 2013

0,9697	0,8526										
0,9909											
0,8587											
1,0341											
1,0090											
0,9176											
1,0958											
1,0430											
1,0047											
0,9570											
1,0045											
<b>Segmentos totales</b>											
35	25	20	18	20	19	20	19	6	5	8	6
<b>Media</b>											
0,9873	0,9737	1,0034	0,9856	0,9580	0,9630	0,9978	0,9632	1,0264	0,9626	0,9853	0,8432
<b>Desviación estándar</b>											
0,0687	0,0521	0,0278	0,0573	0,0783	0,0889	0,0465	0,0980	0,1177	0,1410	0,0817	0,0177

11 de febrero de 2013

Tabla B. Parámetro  $\alpha$  obtenido de los segmentos en hiperpolarización para las 17 neuronas.

Parámetro $\alpha$ N1	Parámetro $\alpha$ N2	Parámetro $\alpha$ N3	Parámetro $\alpha$ N4	Parámetro $\alpha$ N5	Parámetro $\alpha$ N6	Parámetro $\alpha$ N7	Parámetro $\alpha$ N8	Parámetro $\alpha$ N9	Parámetro $\alpha$ N10	Parámetro $\alpha$ N11
0,6047	0,6515	0,6879	0,6779	0,7412	0,7344	0,6673	0,6317	0,5315	0,8329	0,7967
0,5726	0,6131	0,6192	0,6149	0,6860	0,8513	0,6400	0,7361	0,6230	0,7501	0,8367
0,4591	0,5862	0,7117	0,6363	0,6642	0,9525	0,6457	0,6079	0,6869	0,7517	0,7695
0,5623	0,5550	0,7102	0,6615	0,6974	0,7289	0,6286	0,5832	0,5383	0,7264	0,8000
0,8067	0,5476	0,6403	0,7240		0,7516		0,6065		0,7472	0,8219
0,4821	0,5404	0,6121	0,6860		0,7097		0,5665		0,7505	0,5977
0,6831	0,6076	0,4607	0,6700		0,5607		0,6347		0,7443	0,7437
0,7044	0,6299	0,5317	0,6984		0,6191		0,6252		0,7151	0,6963
0,5467			0,6904		0,6549		0,6038		0,6636	0,7984
0,6132			0,6603				0,6205		0,6318	0,7754
0,7702			0,7251				0,6054		0,6187	0,7622
0,7222									0,6056	
0,7862										
0,7554										
0,7209										
0,6914										
0,8331										
0,6644										
<b>Segmentos totales</b>										
18	8	8	11	4	9	4	11	4	12	11
<b>Media</b>										
0,6655	0,5914	0,6217	0,6768	0,6972	0,7292	0,6454	0,6201	0,5949	0,7115	0,7635
<b>Desviación estándar</b>										
0,1102	0,0409	0,0885	0,0336	0,0324	0,1182	0,0162	0,0435	0,0741	0,0677	0,0671

11 de febrero de 2013

Parámetro $\alpha$ N12	Parámetro $\alpha$ N13	Parámetro $\alpha$ N14	Parámetro $\alpha$ N15	Parámetro $\alpha$ N16	Parámetro $\alpha$ N17
0,8445	0,7412	0,6355	0,7376	0,8552	0,6843
0,7416	0,6860	0,7785	0,6441	0,7239	0,7278
0,7844	0,6642	0,6387	0,6746	0,7033	0,4980
	0,6974	0,6418	0,7265	0,6902	0,7152
	0,7232	0,5911	0,7997	0,5536	0,5675
	0,7193	0,5832	0,7468	0,8798	0,6462
	0,7489	0,6676	0,7535	0,6101	0,7232
	0,6270	0,7598	0,6495	0,7630	0,9501
	0,6190	0,6988	0,5809	0,8117	0,7719
	0,7331		0,6171	0,8577	0,7995
	0,6380		0,6939	0,5889	0,6580
	0,6784		0,6225	0,7125	0,6066
	0,6236			0,6264	
<b>Segmentos totales</b>					
3	13	9	12	13	12
<b>Media</b>					
0,7902	0,6846	0,6661	0,6872	0,7213	0,6957
<b>Desviación Estándar</b>					
0,0517	0,0470	0,0682	0,0664	0,1080	0,1171

Tabla C. Parámetro  $\alpha$  obtenido de las permutaciones aleatorias de los segmentos interespiga de actividad eléctrica espontánea

Control $\alpha$ N1	Control $\alpha$ N2	Control $\alpha$ N3	Control $\alpha$ N4	Control $\alpha$ N5	Control $\alpha$ N6	Control $\alpha$ N7	Control $\alpha$ N8	Control $\alpha$ N9	Control $\alpha$ N10	Control $\alpha$ N11	Control $\alpha$ N12
0,5353	0,4547	0,5377	0,5055	0,4727	0,6439	0,5181	0,5183	0,5149	0,5459	0,5428	0,5350
0,5905	0,5175	0,5068	0,5253	0,4345	0,5817	0,4907	0,5192	0,5662	0,5345	0,5436	0,5100
0,6133	0,5224	0,5527	0,4587	0,5099	0,4931	0,5464	0,6321	0,5601	0,5012	0,5589	0,5413
0,4312	0,5551	0,4947	0,5168	0,5596	0,5252	0,4787	0,5183	0,5250	0,5241	0,5387	0,4996
0,5608	0,5345	0,5133	0,5161	0,6641	0,5033	0,5356	0,5364	0,5144	0,5329	0,4985	0,5700
0,5672	0,5295	0,5858	0,5390	0,5308	0,6604	0,5505	0,5320	0,5556		0,5192	0,5204
0,5388	0,5272	0,4585	0,5804	0,4311	0,4949	0,5484	0,5527			0,5096	
0,5832	0,4367	0,5136	0,4375	0,5240	0,5068	0,4588	0,4892			0,5216	
0,4681	0,5593	0,4161	0,4994	0,4502	0,5872	0,5357	0,5214				
0,5221	0,5379	0,5342	0,5796	0,5802	0,5470	0,4478	0,5216				
0,4917	0,5531	0,5148	0,5287	0,5342	0,5714	0,5150	0,5987				
0,6183	0,5521	0,5084	0,5151	0,4505	0,6153	0,5318	0,5290				
0,5952	0,4440	0,5290	0,5461	0,5584	0,5527	0,5133	0,4613				
0,5083	0,4406	0,5386	0,5399	0,5357	0,5054	0,6015	0,5374				
0,4552	0,6135	0,5481	0,4618	0,5128	0,4543	0,5372	0,6455				
0,5159	0,6096	0,4502	0,5386	0,5025	0,5562	0,5169	0,4711				
0,4946	0,5575	0,5119	0,5497	0,4645	0,4814	0,5693	0,4850				
0,4875	0,5714	0,5403	0,5465	0,6556	0,5213	0,5273	0,5252				
0,55	0,5460	0,5305		0,4932	0,5133	0,5343	0,5598				
0,3819	0,5176	0,5331		0,4989		0,4706					



“Análisis del potencial de reposo interespiga de la actividad eléctrica neuronal”

11 de febrero de 2013

0,5819	0,4424										
0,5155	0,5384										
0,4329	0,5373										
0,4687	0,4989										
0,5962	0,5215										
0,6059											
0,5558											
0,5411											
0,5407											
0,4986											
0,4319											
0,5191											
0,5099											
0,4398											
0,6808											
<b>Segmentos totales</b>											
35	25	20	18	20	19	20	19	6	5	8	6
<b>Media</b>											
0,5265	0,5247	0,5159	0,5214	0,5182	0,5429	0,5214	0,5344	0,5394	0,5277	0,5291	0,5294
<b>Desviación Estándar</b>											
0,0649	0,0487	0,0384	0,0386	0,0642	0,0559	0,0375	0,0483	0,0238	0,0167	0,0202	0,0252

### Anexo3: Autoafinidad en el segmento interespiga.

Una serie de tiempo muestra autoafinidad a lo largo de diferentes escalas temporales cuando se exhiben una ley de potencia al realizar la medición de alguna propiedad de la serie. Pero además, el exponente de escalamiento está relacionado analíticamente (Tabla 1) con la dimensión fractal (D) [65,66].

El método de Higuchi plantea una promediación de la longitud de una serie de tiempo  $L_m(k)$  obtenida para diferentes tamaños de patrón de medición  $k$ . Así el resultado exhibe una ley de potencia  $L_m(k) \propto \frac{1}{k^{D_{\text{Higuchi}}}}$ . Usando este método (figura 34) en un segmento interespiga de actividad eléctrica espontanea representativo se encuentra una dimensión fractal de Higuchi que corresponde a  $D_{\text{Higuchi}} = 1.868$  la cual al estar relacionada analíticamente con el exponte fractal  $\alpha_{\text{dfa}}$  (Tabla 1), “ $\alpha_{\text{dfa}} = 1.131$ ”, sugiere autoafinidad a lo largo de las diferentes escalas temporales. El resultado de este enfoque geométrico es similar al obtenido cuando se utiliza directamente el análisis de las fluctuaciones sin tendencia en dicho segmento  $\alpha_{\text{dfa}} = 1.172$ .

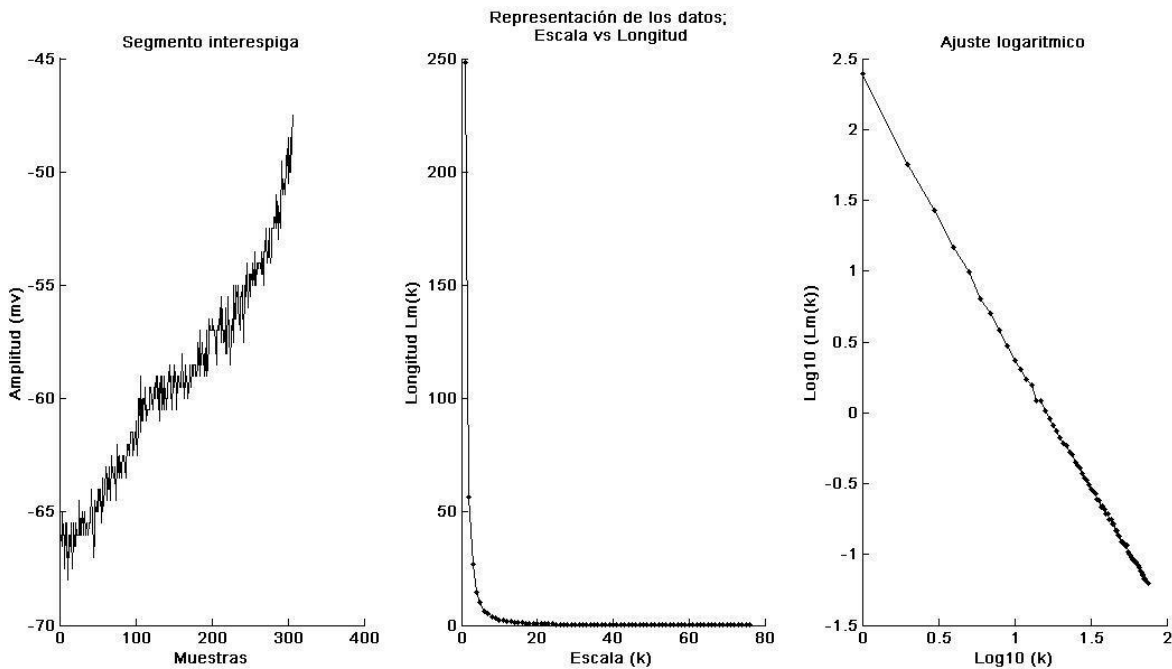


Figura 34. Prueba de autoafinidad en el segmento interespiga a partir de un enfoque geométrico

## Referencias.

- [1] **Kupferman and Kandel.** *Neuronal Controls of a Behavioral Response mediated by the abdominal ganglion of aplysia*, *Science*, Vol. 164, págs.847-850, 1969.
- [2] **Hille B.,** *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second edition, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992.
- [3] **Sakmann, B., and Neher, E.,** *Single-Channel Recording*, 2nd ed., Plenum, New York, 1995.
- [4] **Bassingthwaighte, J. B., Liebovitch, L. S., and West, B. J.,** *Fractal Physiology*, Oxford Univ. Press, New York.,1994.
- [5] **Liebovitch, L. S., and Todorov,A.T.,** *Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel proteins*, *Crit. Rev. Neurobiology*, Vol. 10, págs.169–187, 1996.
- [6] **Antonio B.,** *Química biológica*, Cap. 10, Octava edición, 2007, El ateneo, págs.165-177.
- [7] **Erick P., Hershel R., Kevin T.,** *Vander's Human Physiology*. Cap. 3, Tenth edition, 2005, McGraw- Hill, págs.40-56.
- [8] **Gerard J., Bryan D.,** *Principles of anatomy and physiology*. Cap. 3, Twelfth edition, 2009, Wiley, págs.63-76.
- [9] **Kerkut G., Lambert J. D., Gayton R., Loker and walker,** *Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of Hélix aspersa*, *Comparative biochemistry and physiology*, Vol. 50A, págs.1-25, 1975.
- [10] **Walters E., Carew T., Kandel E.,** *Classical conditioning in aplysia californica*, *Proceedings of the National academy of sciences*, *Neurobiology*, Vol. 76, págs.6675-6679, 1979.
- [11] **Kandel Eric. R.,** *The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses*, *Science*, Vol. 294, págs.1030-1038, 2001.
- [12] **Ratté S., Chase R.,** *Morphology of interneurons in the procerebrum of the snail Hélix aspersa*, *Comparative neurology*, Vol. 384, págs. 359-372, 1997.
- [13] **Barnes R.,** *Zoología de los invertebrados*. Cap. 10, Sexta edición, 1995, McGraw Hill, págs. 318-356.
- [14] **Brusca R., Brusca G.,** *Invertebrados*. Cap. 15, Segunda edición, 2005, McGraw Hill, págs. 463-472.
- [15] **Cruz R.,** *Acción de la nociceptina-orfanina FQ sobre las neuronas del complejo periesofágico del caracol terrestre hélix aspersa*, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tesis, 2001.
- [16] **Velasco N., Vásquez J., Mosquera P., Torres A.,** *Análisis histomorfométrico y ultraestructural del epitelio de revestimiento del osfradio de pomácea mediante MOAR, MET y MEB*, *Acta microscópica*, Vol. 19, págs. 130-137, 2010.
- [17] **Meech R. W., Standen N. B.,** *Potassium activation in hélix aspersa neurones under voltage clamp : A component mediated by calcium influx*, *Journal of physiology*, Vol. 249, págs. 211-239, 1975.

11 de febrero de 2013

- [18] **Lang D. G., Ritchie A. K.**, *Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line*, European journal of physiology, Vol. 410, págs. 614-622, 1987.
- [19] **Meech R. W., Thomas R. C.**, *Voltage-dependent intracellular pH in hélix aspersa neurons*, Journal of physiology, Vol. 390, págs. 433-452, 1987.
- [20] **Meech R. W.**, *Calcium influx induces a post-tetanic hyperpolarization in aplysia neurons*, comparative biochemistry and physiology, Vol. 48A, págs. 387-395, 1974.
- [21] **Adams D. J., Smith S. J., Thompson S. H.**, *Ionic currents in molluscan soma*, Annual Review of Neuroscience, Vol. 3, págs. 141-167, 1980.
- [22] **Kerkut G. A., Walker R. J.**, *The resting potential and potassium levels of cell from active and inactive snails*, Comparative biochemistry and physiology, vol. 2, págs. 76-79, 1961.
- [23] **Shapiro E., Castellucci V., Kandel E. R.**, *Presynaptic membrane potential affects transmitter release in an identified neuron in aplysia by modulating the calcium and potassium currents*, Proceedings of the National academy of sciences neurobiology, Vol. 77, págs. 629-633, 1980.
- [24] **Klein M., Kandel E. R.**, *Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in aplysia*, Neurobiology, Vol. 77, págs. 6912-6916, 1980.
- [25] **Faber Louise, Pankar Sah**, *Functions of SK channels in central neurons*, Clinical and experimental pharmacology and physiology, Vol. 34, 1077-1083, 2007.
- [26] **Faber Louise, Pankar Sah**, *Calcium activated potassium (BK) channel inactivation contributes to spike broadening during repetitive firing the rat lateral amygdale*, Journal of physiology, Vol. 522.2, págs 483-497, 2003.
- [27] **Kononenko N. I.**, *Role of cyclase system in generation of pacemaker activity in fast and slow bursters in snail, hélix pomatia*, Comparative biochemistry and physiology, Vol. 104C, págs.175-180, 1993.
- [28] **Glass Leon**, *Synchronization and rhythmic process in physiology*, Nature, Vol. 410, págs. 227-284, 2001.
- [29] **Buchman Timothy**, *The community of the self*, Nature, Vol. 420, págs. 246-251, 2002.
- [30] **Eke A., Herman P., Koesis L., Kozak L.**, *Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals*, Physiological measurement, Vol. 23, 2002, 1-38.
- [31] **Peng, C.K., Havlin, S., Stanley, H.E., Goldberger, A.L.**, *Quantification of Scaling Exponents and Crossover Phenomena in Nonstationary Heartbeat Time Series*. Chaos, Vol. 5, págs. 82-87, 1995.
- [32] **Penzel T., Kantelhardt J., Grote L., Peter**, *Comparison of detrended fluctuation analysis and spectral analysis for heart rate variability in sleep and sleep apnea*, IEEE Transactions on biomedical engineering, Vol. 50, págs. 1143-1151, 2003.
- [33] **Golberger A., Amaral L., Hausdorff J., Ivanov P., C.-K Peng**, *Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging*, PNAS, Vol. 99, págs. 2466-2477, 2002.

11 de febrero de 2013

- [34] **Hoop B. , Peng C.-K., Stanley**, *Fluctuations and fractal noise in biological Membranes*, *Journal of membrane biology*, Vol. 177, págs.177–185 ,2000.
- [35] **Kantelhard J., Koscielny-Bunde E., Rego H.**, *Detecting long-range correlations with detrended fluctuations analysis*, *Physica A*, Vol. 295, págs. 441-454, 2001.
- [36] **Mandelbrot B.**, *La geometría fractal de la naturaleza*, 2º edición, Metatemáticas Tusquets, Barcelona (2003).
- [37] **Morales O., Tejeida R., Badillo I.**, *Fractal behavior of complex systems*, Wiley InterScience, Vol. 27, págs. 71-86, 2010.
- [38] **Hurts Harold**, *Long- Term Storage Capacity of Reservoirs*, *Transactions of the American society of civil engineers*, Vol. 16, págs. 770-799, 1951.
- [39] **Hurts Harold**, *Obituary*, *Hydrological sciences*, Vol. 24, págs. 539-541, 1978.
- [40] **Buiatti M., Papo D., Baudonnière P.**, *Feedback modulates the temporal scale-free dynamics of brain electrical activity in a hypothesis testing task*, *Journal of Neuroscience*, Vol. 146, págs. 1400-1412, 2007.
- [41] **Kello T., Beltz B., Holden J., Van Orden G.**, *The emergent coordination of cognitive function*, *Journal of Experimental Psychology*, Vol. 136, págs. 551-568, 2007.
- [42] **Wagenmakers E., Farrel S., Ratcliff R.**, *Estimation and interpretation of  $1/f^\alpha$  noise in human cognition*, *Psychonomic Bulletin and Review*, Vol. 11, págs. 579-615, 2004.
- [43] **Mazooni A., Broccard F. D., Elizabeth G. P.**, *On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks*, *Plos One*, Vol. 5, págs e439 1-12, 2007.
- [44] **Verven A., Derksen E.**, *Fluctuation phenomena in nerve membrane*, *Proceedings of the IEEE*, Vol. 56, págs 906-916, 1968.
- [45] **Denis J. Poussart**, *Nerve membrane current noise: Direct measurements under voltage clamp*, *PNAS-Physiology*, Vol. 64, págs. 95-99, 1969.
- [46] **Lass Y., Abeles M.**, *Transmission of information by the axon: Noise and memory in the myelinated nervefiber of the frog*, *Biological Cybernetics*, Vol. 19, págs 61-67, 1975.
- [47] **Kristelle R., Nicolas M., Bertrand D., Jean M.**, *Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: A case study for methodological comparison*, *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 179, págs. 142-149, 2009.
- [48] **S. Blesica, S. Milosevicb, Dj. Stratimirovic, M. Ljubisavljevic**, *Detecting long-range correlations in time series of neuronal discharges*, *Physica A*, Vol. 330, págs. 391-399, 2003.
- [49] **S. Blesica, S. Milosevicb, Dj. Stratimirovic, M. Ljubisavljevic**, *Detrended fluctuation analysis of time series of a firing fusimotor neuron*, *Physica A*, Vol. 268 , págs 275-282, 1999.

11 de febrero de 2013

- [50] **Asaf G., Danny E., Avner W., Maya S.**, *Dynamics of excitability over extended timescales in culture cortical neurons*, Journal of Neuroscience, Vol. 30, págs 16332-16342, 2010.
- [51] **Craig D., Gerard L., Larsen P.**, *Long-Term correlations in the spike trains of medullary, sympathetic neurons*, Journal of neurophysiology, Vol. 85, págs 1614-1622, 2001.
- [52] **Jorgensen F., Kroese A.**, *Ion channel regulation of the dynamical instability of the resting membrane potential in saccular hair cells of the green frog*, Acta Physiologica Scandinavica, Vol. 185, págs. 271-290, 2005.
- [53] **Douglas J., Moore G.**, *Interspike-interval fluctuations in alypsia pacemaker neurons*, Biophysical Journal, Vol. 6, págs. 411-434, 1966.
- [54] **Crest M., Gola M.**, *Large conductance  $Ca^{2+}$  activated K channels are involved in both spike shaping and firing regulation in hélix neuron*, Journal of physiology, Vol. 465, págs. 265-287, 1993.
- [55] **Kerkut G., Meech R.**, *The effect of ions on the membrane potential of snail neurons*, Comparative biochemistry and physiology, vol. 20, págs. 411-429, 1967.
- [56] **Kerkut G., Meech R.**, *The internal chloride concentration of H and D cells in the snail brain*, Comparative biochemistry and physiology, Vol. 19, págs. 819-832, 1966.
- [57] **Goldberger AL, Amaral LAN, Glass L, Hausdorff JM, Ivanov PCh, Mark RG, Mietus JE, Moody GB, Peng C-K, Stanley HE.** PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a New Research Resource for Complex Physiologic Signals. *Circulation* **101**(23):e215-e220 [Circulation Electronic Pages; <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/101/23/e215>]; 2000 (June 13).
- [58] **Sattler R., Charlton M., Hafner M.**, *Distinct influx pathways not calcium load, determined neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity*, Journal of Neurochemistry, Vol. 71, págs. 2349-2364, 1998.
- [59] **Guzman L., Angulo F.**, *Simple model of the aging effect in heart interbeat time series*, Physica Review E, Vol. 67, págs. 052901-1, 052901-4, 2003.
- [60] **Guzman L., Muñoz A., Angulo F.**, *Influence of the loss of time-constants repertoire in pathologic heartbeat dynamics*, Physica A, Vol. 348, págs. 304-316, 2005.
- [61] **Hille B.**, *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second edition, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, Chapter Eighteen, págs 494-502, 1992.
- [62] **Louise Faber E., Pankaj Sah**, *Calcium-Activated Potassium Channels: Multiple Contributions to Neuronal Function*, The neuroscientist, Vol. 9, págs. 181-190, 2003.
- [63] **Louise Faber E., Pankaj Sah**, *Functions of SK channels in central neurons*, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 34, págs. 1077-1083, 2007.

11 de febrero de 2013

[64] **Johnston D. and Miao-Sin Wu**, *Foundations of cellular Neurophysiology*, First edition, The MIT Press Cambridge, Massachusetts, Chapter nine and ten, págs. 227-278, 1994.

[65] **T. Higuchi**, *Approach to an irregular time series on the basis of the fractal theory*, *Physica D*, Vol. 31, págs. 277-283, 1988.

[66] **T. Higuchi**, *Relationship between the fractal dimension and the power law index for a time series: A numerical investigation*, *Physica D*, Vol. 46, págs. 254-264, 1990.