



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Estudio de la dinámica de las fluctuaciones del potencial de membrana y su relación con la actividad neuronal de tipo marcapaso.

Tesis que presenta para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias (Ingeniería Biomédica)

M. C. Alberto Seseña Rubfaro

Asesores:

Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Jurado calificador:

Presidente: Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla

Secretario: Dra. Virginia González Vélez

Vocal: Dr. Ramón González Camarena

Vocal: Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez

Vocal: Dr. Javier Vargas Sánchez

27 de Noviembre de 2017

Índice

1. Agradecimientos	6
2. Resumen.	7
3. Capítulo 1.	10
3.1. Introducción	10
3.2. Antecedentes	10
3.3. Planteamiento del problema.	14
4. Capítulo 2.	15
4.1. Hipótesis	15
4.2. Objetivo general	15
4.3. Objetivos particulares	15
4.4. Materiales y métodos	15
4.4.1. Uso del espécimen <i>Helix aspersa</i>	15
4.4.2. Análisis de las fluctuaciones sin tendencia (DFA).	17
4.4.3. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.	18
4.4.4. Dinámica del intervalo interespiga (ISI)	19
4.4.5. Exploración de la presencia de entradas sinápticas en la neurona 1F y 7E.	20
4.4.6. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.	21
4.4.7. Relación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con el intervalo interespiga (ISI).	23
4.4.8. Estimación del número de neuronas.	24
4.4.9. Ecuación de Langevin y modelo de cascadas complejas.	25
4.4.10. Análisis estadístico.	26
5. Capítulo 3	27
5.1. Resultados.	27
5.1.1. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.	27
5.1.2. Dinámica del intervalo interespiga (ISI).	27
5.1.3. Exploración de la presencia de entradas sinápticas en la neurona 1F y 7E.	27
5.1.4. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.	32
5.1.5. Efecto de la solución salina de cadmio y cafeína en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.	32
5.1.6. Relación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con el intervalo interespiga (ISI).	34
5.1.7. El uso de la ecuación de Langevin y la generación de cascadas complejas como modelo explicativo de la presencia de correlaciones de largo plazo en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje interespiga.	36
6. Discusión de resultados	38
6.1. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.	38
6.2. Análisis del intervalo interespiga (ISI).	38
6.3. Efecto de la actividad sináptica sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.	38
6.4. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.	39
6.5. Ecuación de Langevin y modelo de cascadas complejas.	40

7. Conclusiones	41
8. Limitaciones	41
9. Trabajo a futuro	41
10. Artículos publicados	42
11. Anexo A: Disección del espécimen <i>Helix aspersa</i>	43
12. Anexo B: Relación de la función de auto-correlación con el exponente de escalamiento α .	44
13. Anexo C: Análisis de las fluctuaciones sin tendencia	45
14. Anexo D: Cascada compleja y Ecuación de Langevin.	47
14.1. Cascada compleja (Sistema críticamente auto-organizado)	47
14.2. Ecuación de Langevin.	47
15. Anexo E: Canales SK, Ca^{2+} tipo L, N y GIRK.	49
15.1. Canales SK	49
15.2. Estructura de los canales SK	49
15.3. Canales de Ca^{2+} .	50
15.3.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}	50
15.3.2. Canales de Ca^{2+} tipo L	50
15.3.3. Canales de Ca^{2+} tipo N	51
15.4. Canales GIRK	51
15.5. Estructura de los Canales GIRK	51
15.6. Activación de los Canales GIRK	51

Índice de figuras

1. En esta imagen se presentan registros celulares para los que se ha realizado un análisis de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal: (a) fluctuaciones de voltaje a distintos niveles de potencial de membrana en el nervio ciático de rana (fibras) [1], (b) fluctuaciones temporales en los intervalos interespiga de la actividad eléctrica espontánea en motoneurona de gato (ISI) [2], (c) fluctuaciones de voltaje en la red neuronal del hipocampo de rata (redes) [3].	11
2. Síntesis de los enfoques utilizados para el estudio de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal, en los que se ha identificado un comportamiento con correlaciones de largo plazo que se manifiesta a lo largo de diferentes escales espaciales y temporales, tanto para a) el estudio de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana en fibras nerviosas [1, 4-7], b) en el estudio de las fluctuaciones temporales de aparición de los potenciales de acción (ISI) en redes neuronales [3, 8, 9] y para c) neuronas individuales inmersas en redes neuronales [2, 10-13].	13
3. Bosquejo del complejo periesofágico del caracol terrestre <i>H. aspersa</i> , se muestran los ganglios cerebrales (A, B), pleurales (C, G), pedales (H, I), parietales (D, F), y visceral (E). También se muestra la posición de la neurona marcapaso 1F y de la neurona silente 7E la cual se ha reportado que presenta entras sinápticas. Imagen tomada de Kerkut et al. 1975.	16
4. Mecanismos identificados que participan en la generación del potencial de acción de la neurona 1F del espécimen <i>H. aspersa</i> .	17

5.	Secuencia de experimentos para comparar y caracterizar la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga antes y después de realizar el registro intracelular en la neurona marcapaso 1F.	19
6.	En esta etapa experimental se realizó un registro intracelular continuo de la actividad eléctrica de tipo marcapaso de la neurona 1F, el registro tiene una duración aproximada de 26 minutos. Posteriormente se recolectaron los intervalos temporales interespiga para generar una serie de datos. Con la herramienta de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA) se evaluó la dinámica de la serie.	20
7.	Este procedimiento permitió explorar la posible presencia de entradas sinápticas excitadoras en la neurona marcapaso 1F y en la neurona silente 7E. Esta etapa experimental permitió exhibir el efecto de la actividad sináptica sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.	21
8.	El estudio a detalle del cambio de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo, generó como resultado la identificación de un perfil temporal en la dinámica, que se puede asociar a la activación de diferentes poblaciones de canales iónicos.	22
9.	En esta imagen se muestra la secuencia de los experimentos realizados bajo perfusión con la solución de salina CdCl ₂ 100 μM y cafeína 20 mM, con el fin de modificar el manejo de Ca ⁺² intracelular.	22
10.	Bajo una condición control y la perturbación del manejo de calcio intracelular, se exploró la asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos temporales interespiga (ISI).	23
11.	El uso de la ecuación de Langevin y el modelo de cascadas complejas ha ayudado a comprender en mayor medida el funcionamiento de sistemas así como la interacción entre sus componentes, por lo que se consideraron que podían explicar la fuente de un comportamiento con correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.	25
12.	En el panel A se muestra un ejemplo típico de las fluctuaciones de voltaje con electrodo próximo antes y después del registro intracelular de la neurona 1F (datos registrados a una frecuencia de muestreo de 1Khz), también se muestra la estimación del exponente de escalamiento α para su correspondiente serie de fluctuaciones de voltaje. En el panel B, se muestra la distribución de los datos obtenidos al estimar el exponente de escalamiento α con la herramienta DFA.	28
13.	En el panel A se muestra un ejemplo típico de las fluctuaciones de voltaje con electrodo próximo antes y después del registro intracelular de la neurona 1F (datos registrados a una frecuencia de muestreo de 10Khz), también se muestra la estimación del exponente de escalamiento α para su correspondiente serie de fluctuaciones de voltaje. En el panel B, se muestra la distribución de los datos obtenidos al estimar el exponente de escalamiento α con la herramienta DFA y los resultados obtenidos al estimar la relación señal a ruido de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.	29
14.	En el panel derecho se presenta la secuencia del intervalo interespiga (ISI) de la neurona 1F, esta serie representa un registro intracelular continuo con una duración de 26 minutos en donde se obtuvieron 350 ISI's, y la distribución de frecuencia de los intervalos interespiga. En el panel izquierdo se muestra la estimación del exponente de escalamiento para la secuencia del intervalo interespiga (ISI) $\alpha = 1.09 \pm 0.03$	30
15.	Neurona 7E en hiperpolarización bajo la inyección de corriente continua de 1 nA, se observan potenciales postsinápticos excitadores (Panel, izquierdo), también se muestra las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ a lo largo de la duración de la serie (Panel, derecho).	31

16.	Neurona 1F en hiperpolarización bajo inyección de corriente continua de 2 nA, no presenta un comportamiento coincidente con entradas sinápticas lo que corrobora trabajos anteriores [14]. También se muestra las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ a lo largo de la duración de la serie (Panel Inferior).	32
17.	Perfil normalizado de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga de tres condiciones experimentales, para el análisis se utilizó una ventana móvil de 1500 muestras. Las líneas punteadas representan la media y desviación estándar de la estimación de α para series de control numérico, con correlaciones de largo plazo ($\alpha \approx 1$) y de tipo aleatorio ($\alpha \approx 0.5$).	33
18.	(Panel Izquierdo) Efecto de la solución salina de cadmio en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. La prueba de Bonferroni confirmó una reducción significativa de la magnitud de las correlaciones de largo plazo en la primera parte del perfil ($P < 0.01$). (Panel Derecho) Efecto de la solución salina de cafeína en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. La prueba de Bonferroni no confirma una reducción significativa de la magnitud de las correlaciones de largo plazo en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga ($P > 0.05$), $N=5$	34
19.	En el panel izquierdo se observa un ejemplo típico del registro intracelular de la neurona 1F en donde se observan cambios en la frecuencia de aparición del potencial de acción debido a la perturbación del manejo de calcio intracelular. En el panel derecho se muestra la estimación del coeficiente de determinación (R^2), a partir de graficar cada intervalo interespiga con su correspondiente exponente de escalamiento (α) obtenido del análisis de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, también se observa la disminución de la magnitud de R^2 en función al manejo de calcio intracelular. . . .	35
20.	Diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0.0001$). Al comparar los promedios de los exponentes de escalamiento estimados de las fluctuaciones de voltaje, no fue posible encontrar diferencias entre los grupos ($\alpha_{normal} = 0,950 \pm 0,136$, $\alpha_{cadmio} = 0,937 \pm 0,289$, $\alpha_{cafeina} = 0,946 \pm 0,111$). De la misma forma, tampoco fue posible encontrar diferencias significativas en los promedios de los tiempos del intervalo interespiga $ISI(S)_{normal} = 0,940 \pm 0,686$, $ISI_{cadmio} = 0,324 \pm 0,168$, $ISI_{cafeina} = 0,238 \pm 0,0457$	36
21.	Series sintéticas con fluctuaciones de voltaje similares al segmento interespiga que se obtiene mediante el registro intracelular (Panel, Izquierdo). Análisis de las series sintéticas mediante la herramienta DFA. El resultado sugiere la presencia de correlaciones de largo plazo; para el uso de la ecuación de Langevin se consideraron 10^5 canales iónicos. Este mismo número de canales fue considerado para la generación de cascadas complejas y además considerando que presentan una conectividad de 0.03 (Panel, Derecho). . . .	37
22.	A) Diagrama esquemático de la masa ganglionar periesofágica, se muestra la posición de la neurona marcapaso 1F, y la neurona silente con entras sinápticas 7E, imagen tomada de Kerkut et al. 1975.	43
23.	Proceso de eliminación de tendencia en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga para $n=2500$ y $n=10$ muestras.	45
24.	Topología del canal SK incrustado en la membrana celular [15,16].	50
25.	Se muestra un bosquejo de la estructura tridimensional del canal del Ca^{2+} dependiente de voltaje, así como la posible asociación con las distintas subunidades que lo conforman [17].	51
26.	Topología del canal GIRK incrustado en la membrana celular [18].	52
27.	Mecanismo de activación del canal GIRK [15].	52

1. Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por brindarme la oportunidad de formar parte de ella y no sólo por otorgarme una gran formación académica, sino por todo su apoyo en el desarrollo de mi trabajo doctoral.

A CONACYT por otorgarme una beca que me permitió desarrollar mi trabajo de investigación doctoral, no. 358414.

En especial al Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla, por confiar en mí y hacer que mi formación académica mejorara constantemente. Sin su tiempo, paciencia y consejos no hubiera sido posible el desarrollo de la presente tesis.

A el Dr. José Rafael Godínez Fernández, por su ayuda, experiencia y asesoramiento. La generosidad y amabilidad demostrada por el doctor Rafael, me permitió recobrar el aliento durante las adversidades que surgen en el proceso experimental.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y consejos que siempre fueron de gran ayuda especialmente en momentos de frustración.

A mis sinodales de examen de grado, por su tiempo y dedicación al evaluar mi trabajo doctoral.

Finalmente a mis padres, a mi hermano su esposa e hijas, que me dieron inspiración para cada día hacer las cosas mejor y que sin su apoyo incondicional nunca hubiera llegado a este punto en mi carrera profesional.

Muchas muchas gracias!!

2. Resumen.

El objetivo principal de este trabajo fue identificar una relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y el intervalo interespiga (ISI) de la actividad eléctrica de tipo marcapaso, que se consideran como medio de adaptación, transmisión y codificación de la información neuronal [19,20].

Así, se comparó y se caracterizó la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga antes y después de realizar el registro intracelular de la neurona 1F del espécimen *Helix aspersa*, la cual presenta actividad eléctrica de tipo marcapaso. Los registros se obtuvieron a una frecuencia de muestreo de 1 y 10 KHz, los datos fueron analizados con la herramienta DFA (análisis de las fluctuaciones sin tendencia) [21]. De esta forma los resultados obtenidos mostraron la presencia de correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga que contrasta con la dinámica estocástica aleatoria para las fluctuaciones de voltaje registradas antes y después del registro intracelular.

La mediana del exponente de escalamiento α para las fluctuaciones de voltaje antes de introducir el electrodo a la célula fue 0.506 ([0.459, 0.529] cuartil inferior y superior), 1.015 ([0.871, 1.151]) para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y 0.571 ([0.516, 0.598]) para las fluctuaciones de voltaje después de introducir el electrodo a la célula con electrodo próximo. Se realizó un análisis Kruskal-Wallis encontrando diferencias significativas ($P < 0.0001$).

Además, para los datos registrados a una frecuencia de 10 KHz se estimó la relación señal a ruido media obtenida antes de introducir el electrodo a la célula 0.732 ± 0.182 dB ([0.494, 0.516] intervalo de confianza inferior y superior del 95%), la estimación para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga fue: 24.08 ± 0.086 dB ([24.04 24.12]), y 0.312 ± 0.245 dB ([0.197 0.426]) después de introducir el electrodo con electrodo próximo.

El uso de modelos físicos-biológicos ha ayudado a comprender en mayor medida el funcionamiento de sistemas, así como la interacción entre sus componentes. El uso de la ecuación de Langevin y el modelo de cascadas complejas, adaptados para canales iónicos, permitió generar series sintéticas con fluctuaciones de voltaje con correlaciones de largo plazo, similares al segmento interespiga que se obtiene del registro intracelular de la neurona marcapaso 1F. Esto sugirió y reforzó la consideración de que el posible origen de las correlaciones de largo plazo se encuentra determinado por la interacción de canales iónicos, que podrían tener diferentes pesos en la modulación del potencial de membrana lo que también podría coincidir con la idea de identificar a un sistema críticamente auto-organizado [22].

Por otro lado, con el fin de explorar la presencia de correlaciones de largo plazo en la dinámica de las fluctuaciones temporales del intervalo interespiga (ISI), también se realizó un registro intracelular continuo de la neurona marcapaso 1F con una duración de 26 minutos, lo que permitió recolectar 350 intervalos interespiga para ser posteriormente analizados con la herramienta DFA. El exponente de escalamiento $\alpha = 1.09 \pm 0.03$ indicó un comportamiento con correlaciones de largo plazo.

Se exploró la posible presencia de entradas sinápticas que podrían ejercer un efecto sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y consecuentemente estar involucradas en el origen de las correlaciones de largo plazo. Así, se procedió a hiperpolarizar a la neurona 7E y a la neurona 1F hasta llevar su potencial de membrana a -80 mv en donde sería posible observar la presencia de potenciales postsinápticos excitadores. Para el caso de la neurona 7E se presentaron potenciales postsinápticos excitadores; este resultado contrasta con la neurona 1F en donde no se identificó la presencia de actividad sináptica.

Complementariamente, con la herramienta DFA se estudió el cambio en la dinámica de las fluc-

tuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo mediante una ventana móvil de 1500 muestras [23]. Los resultados sugieren que para la escala temporal en donde se aprecia un potencial postsináptico excitador, el análisis a través de la herramienta DFA indicó un incremento en el exponente de escalamiento α . Mostrando que la actividad sináptica podría incrementar la interacción entre los mecanismos que modulan el potencial de membrana y por lo tanto la función de la neurona silente 7E.

Para el caso de la neurona marcapaso 1F, no se observaron cambios en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje a lo largo de la duración del registro, en consistencia con la ausencia de entradas sinápticas. La ausencia de entradas sinápticas permitió dirigir la exploración del posible origen de correlaciones de largo plazo exclusivamente a la interacción de las diferentes poblaciones de canales iónicos y el manejo de calcio intracelular en estas neuronas.

De forma similar, con la herramienta DFA se estudió el cambio en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo [23], mediante una ventana móvil de 1500 muestras para la neurona marcapaso 1F, lo que dio como resultado la identificación de un perfil temporal en la dinámica de estas fluctuaciones que se pudo asociar a la activación de diferentes poblaciones de canales iónicos.

Así, se sugiere que la dinámica de los canales SK introduce correlaciones de largo plazo en la primera parte del perfil, y este comportamiento podría ser modulado por la entrada de Ca^{+2} al medio intracelular [24–26]. Por otro lado, la parte central del perfil que muestra una pérdida de correlaciones de largo plazo podría ser modulada por la dinámica de canales de potasio K_v y canales GIRK [27–29]. Esta ausencia de correlaciones se mantiene hasta el punto en donde los canales (Na_v , Ca^{+2} de tipo L y N) son activados para generar la fase de despolarización del potencial de acción [27, 30, 31], lo que introduce nuevamente correlaciones de largo plazo en la parte final del perfil temporal.

Es así entonces como el exponente de escalamiento α parece reflejar la interacción entre las diferentes poblaciones de canales iónicos involucrados en la generación de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. En este sentido, se realizó la perturbación del manejo de Ca^{+2} intracelular a través del bloqueo aproximado del 60% de la corriente de Ca^{+2} con la solución de salina cadmio (CdCl_2 100 μM) [32]. El estudio del perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje mostró un decremento significativo del parámetro α al inicio del perfil y en menor grado al final, lo que permitió identificar que estos efectos son probablemente generados por la perturbación específica de la dinámica de los canales SK y Ca_v .

Adicionalmente, se aprovechó el uso de la solución salina cafeína para generar la liberación de Ca^{+2} de los compartimientos intracelulares y de esta forma perturbar su regulación (Cafeína 20 mM) [33, 34]. De esta manera, se encontró como primer resultado un incremento en la frecuencia de aparición del potencial de acción. Además al hacer una inspección en el perfil temporal de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje se observó un incremento o mantenimiento del exponente de escalamiento α a lo largo de la duración del segmento interespiga.

Este incremento podría entonces ser ocasionado por la falta de regulación de los mecanismos intracelulares que dependen de Ca^{+2} , en donde las constantes de activación de estos mecanismos podrían estar traslapadas [35, 36], y cubrir un amplio rango de escalas temporales [37], lo que da lugar a un incremento o mantenimiento del exponente de escalamiento α . Uno de estos mecanismos podría ser la no inactivación de los canales SK cuya dinámica podría estar presente a lo largo de la duración del segmento interespiga.

Como se ha descrito con anterioridad, los resultados obtenidos muestran la presencia de correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, son probablemente

generadas por la interacción de las diferentes poblaciones de canales iónicos que modulan el potencial de membrana.

Finalmente, se exploró una posible asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos interespiga a través de la estimación del coeficiente de determinación R^2 cuyo resultado fue 0.683 ([0.647 0.776] cuartil inferior y superior), $N=5$. Se exploraron los posibles cambios en la asociación bajo la perfusión de la solución de salina cadmio que resultó en R^2 0.405 [0.381 0.495]. De la misma forma, se perfundió la solución de salina cafeína lo que dió como resultado: $R^2 = 0.151$ [0.118 0.222]. Las diferencias significativas entre los grupos fueron confirmadas por la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.001$).

Estos resultados indican una relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y el intervalo interespiga (ISI), que se ha considerado como el mecanismo codificación de la información neuronal y que de acuerdo a estos resultados esta asociación funcional es mediada por el manejo de Ca^{+2} intracelular.

La presente investigación complementa estudios previos sobre la dinámica de la frecuencia de aparición del potencial de acción, en la que se ha encontrado la presencia de correlaciones de largo plazo y que se considera como medio de adaptación y transmisión de la información neuronal [19,20].

3. Capítulo 1.

3.1. Introducción

Las neuronas con actividad eléctrica de tipo marcapaso se han encontrado en redes neuronales de mamíferos que se localizan a lo largo de diferentes áreas del sistema nervioso. Por ejemplo, en la neocorteza, ganglios basales, tálamo, locus cerúleo, hipotálamo, área tegmental ventral, hipocampo, amígdala y el complejo pre-Bötzinger. Estas regiones están asociadas a procesos como sueño, excitación, motivación, consolidación de memoria, miedo y control de la respiración [38–40].

Las neuronas marcapaso son identificadas por su característica intrínseca de generar actividad eléctrica rítmica que depende de la interacción dinámica entre poblaciones de canales iónicos, la activación de segundos mensajeros y un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular [40, 41]. De esta forma, se ha asumido que la interacción de estos componentes generan fluctuaciones en la actividad eléctrica neuronal ya sea en la frecuencia de aparición del potencial de acción o en el voltaje del potencial de membrana.

Con el fin de tener una mayor comprensión sobre la interacción de los mecanismos que regulan la actividad eléctrica neuronal se han realizado varios estudios de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje y la frecuencia de aparición del potencial de acción en diferentes modelos celulares. Los resultados han sugerido un comportamiento con correlaciones de largo plazo¹ en las fluctuaciones temporales para la aparición del potencial de acción (ISI), tanto para una neurona inmersa en una red neuronal [2, 10, 43] como para conjuntos neuronales registrados de forma extracelular [3, 12, 44]. Este mismo comportamiento se ha encontrado en las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana de fibras nerviosas que se han registrado de forma extracelular [1, 4].

Sin embargo, aún no queda claro cuáles son los posibles mecanismos que subyacen a este comportamiento con correlaciones de largo plazo. Pero estos hallazgos sugieren la ubicuidad de este comportamiento en la dinámica de la actividad eléctrica neuronal que se manifiesta a lo largo de diferentes escalas espaciales y temporales, por lo que algunos autores sugieren inclusive que éste podría corresponder a un fenómeno críticamente auto-organizado que representaría una ventaja evolutiva para el procesamiento, almacenamiento y transmisión de la información [8, 9, 45]. No obstante, todavía se discute si el fenómeno es una propiedad intrínseca neuronal, o surge por la interacción celular en la red neuronal [45].

Dentro de los principales mecanismos que darían origen a este comportamiento se podrían encontrar: 1) el efecto generado por la liberación de neurotransmisores [46], 2) la presencia de una dinámica con correlaciones de largo plazo en los cambios conformacionales de diferentes poblaciones de canales iónicos [47–54] y 3) el manejo de calcio intracelular [55], puesto que se conoce que todos estos mecanismos tienen una participación relevante en la regulación fisiológica.

3.2. Antecedentes

En décadas recientes se han realizado varios esfuerzos en el estudio de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal para comprender la interacción entre los mecanismos de control interno y el medio externo. Así, se ha encontrado un comportamiento con correlaciones de largo plazo: a) en el estudio

¹Las correlaciones de largo plazo se entenderán en esta tesis como una característica de las series de tiempo en donde los valores actuales en la serie están correlacionados estadísticamente no sólo con los valores inmediatamente anteriores, sino también con todos los valores previos, revelando así un comportamiento no-aleatorio o una estructura temporal [42]. En el anexo B y C se describe el método utilizado en esta investigación que permiten exhibir la presencia de correlaciones de largo plazo en series de tiempo.

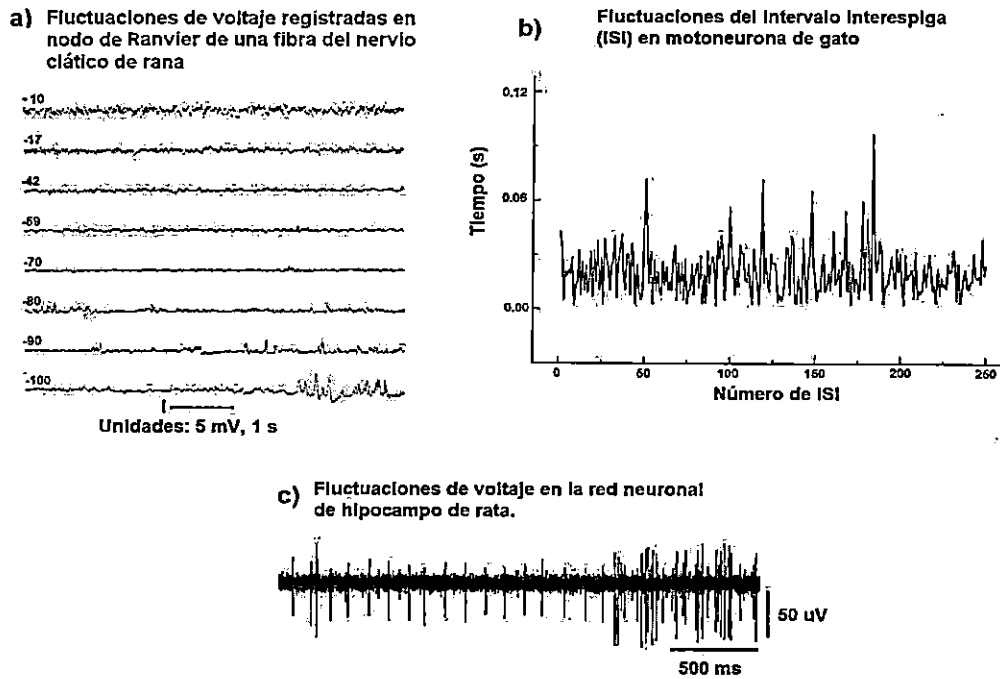


Figura 1: En esta imagen se presentan registros celulares para los que se ha realizado un análisis de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal: (a) fluctuaciones de voltaje a distintos niveles de potencial de membrana en el nervio ciático de rana (fibras) [1], (b) fluctuaciones temporales en los intervalos interespiga de la actividad eléctrica espontánea en motoneurona de gato (ISI) [2], (c) fluctuaciones de voltaje en la red neuronal del hipocampo de rata (redes) [3].

de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana en fibras nerviosas [1,4-7], b) en el estudio de las fluctuaciones temporales de aparición de los potenciales de acción (ISI), tanto para redes neuronales [3,8,9] como para neuronas individuales inmersas en redes neuronales [2,10-13,43], y c) en el estudio de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga [56]. A continuación estos estudios se describen con mayor detalle.

Los estudios de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana en fibras nerviosas han mostrado un comportamiento con correlaciones de largo plazo; por ejemplo, en el nervio ciático de rana, introduciendo un enfoque que considera a estas fluctuaciones como un medio para la codificación de la información neuronal, misma que podría depender del periodo refractario (tiempo en donde los canales de Na^+ sensibles a voltaje se encuentran inactivos) [6,7]. Contrariamente, otros estudios habían sugerido que estas fluctuaciones de voltaje en fibras nerviosas de nervio ciático podrían estar relacionadas con movimientos térmicos generados por el flujo de iones de sodio y potasio a través de la membrana plasmática [1,4,5], como se muestran en la figura 1.

Por otro lado, también se han encontrado correlaciones de largo plazo en el estudio de las fluctuaciones temporales en la aparición de potenciales de acción de registros extracelulares en redes neuronales; en cultivo de neuronas del hipocampo de rata; y en cultivo de neuronas de sanguijuela, los autores sugieren que la presencia de correlaciones de largo plazo podrían estar determinada por el nivel de receptores a glutamato (NDMA) [3], figura 1.

Además, se han realizado registros invasivos de electroencefalografía en pacientes con epilepsia, a partir de los cuales se ha identificado un comportamiento con correlaciones de largo plazo, que parece estar relacionado con la activación de redes neuronales, así como con la formación de memoria de

largo plazo. Así, se ha propuesto como base para la organización de la actividad eléctrica neuronal, a una dinámica críticamente auto-organizada como el origen del comportamiento con correlaciones de largo plazo, cuya característica principal es la falta de una escala particular, lo que da lugar a una distribución en forma de ley de potencia y que se atribuye a la interacción de los componentes de un sistema complejo [8, 9, 22, 45].

En la figura 2 se ilustra una síntesis de los diferentes enfoques utilizados para el estudio de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal en los que se ha identificado un comportamiento con correlaciones de largo plazo.

Al respecto, es relevante mencionar que recientemente se ha mostrado de forma teórica y experimental que los canales iónicos de K_{Ca} y K_v presentan análogamente una dinámica con correlaciones de largo plazo en sus cambios conformacionales [47-54].

Además, en mi tesis de maestría realicé un estudio de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga de la actividad eléctrica de la neurona marcapaso 1F del espécimen *Helix aspersa*. Ahí, planteé como hipótesis que dichas fluctuaciones de voltaje no estaban estrictamente originadas por un proceso estocástico vinculado a la instrumentación necesaria para el registro de la actividad eléctrica.

El resultado de dicho estudio mostró, similarmente a los trabajos mencionados, una dinámica con correlaciones de largo plazo, que surge probablemente como una expresión de la interacción de los mecanismos que actúan a lo largo de diferentes escalas temporales y que modulan el potencial de membrana [57]. Sin embargo, en dicha indagación faltó identificar a los posibles mecanismos que darían origen a fluctuaciones de voltaje con correlaciones de largo plazo y por otro lado, si la dinámica de estas fluctuaciones de voltaje se encuentra asociada a las fluctuaciones del intervalo temporal interespiga (ISI) para identificar un posible significado funcional.

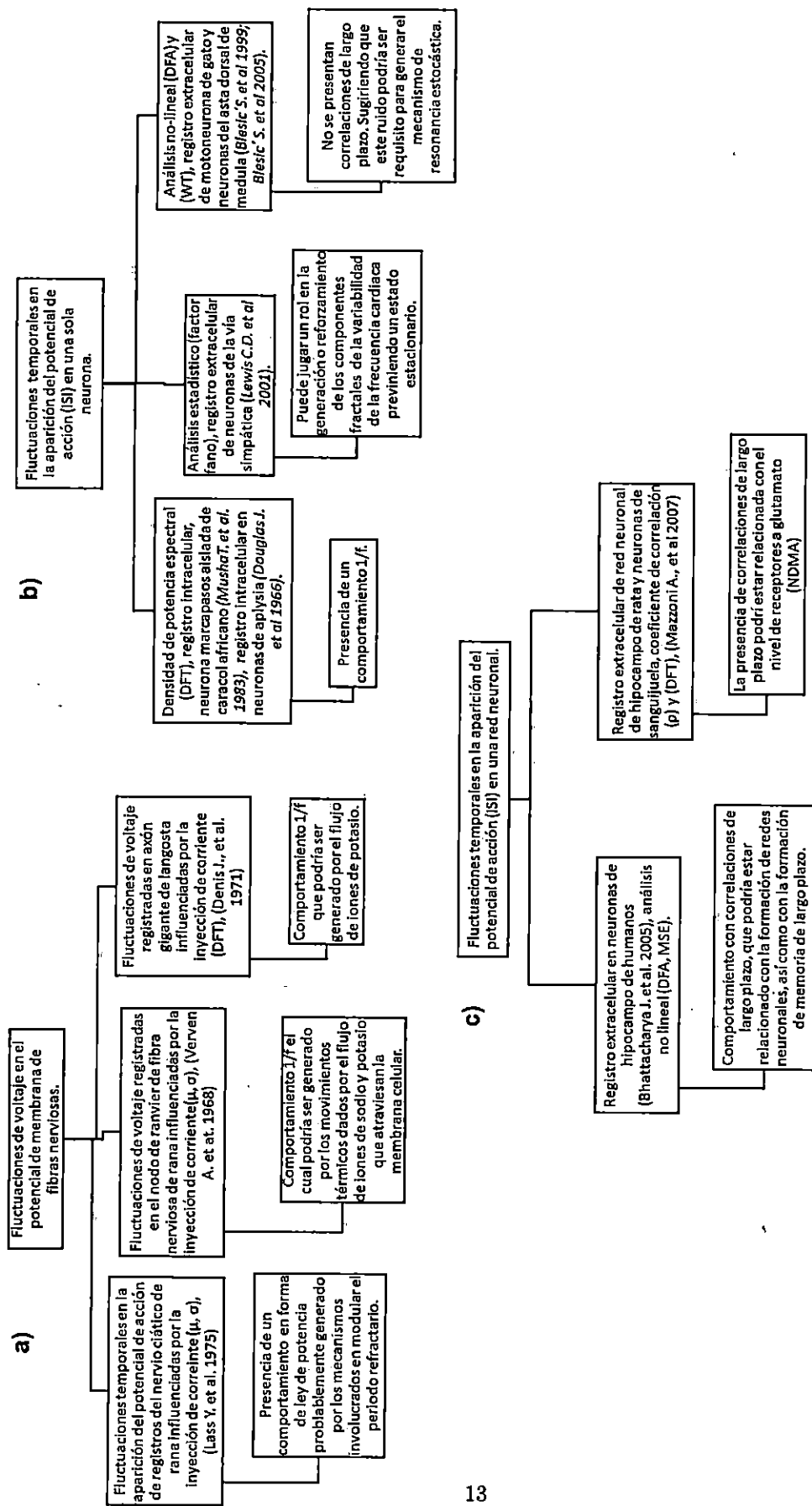


Figura 2: Síntesis de los enfoques utilizados para el estudio de la dinámica de la actividad eléctrica neuronal, en los que se ha identificado un comportamiento con correlaciones de largo plazo que se manifiesta a lo largo de diferentes escalas espaciales y temporales, tanto para a) el estudio de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana en fibras nerviosas [1, 4-7], b) en el estudio de las fluctuaciones temporales de aparición de los potenciales de acción (ISI) en redes neuronales [3, 8, 9] y para c) neuronas individuales inmersas en redes neuronales [2, 10-13].

3.3. Planteamiento del problema.

Se ha asumido que las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) codifican la información a través de cambios en la frecuencia de aparición del potencial de acción [58]. Así, con el fin de comprender la interacción de los mecanismos que regulan la actividad eléctrica neuronal se han realizado estudios de la dinámica de los intervalos interespiga (ISI). En éstos se ha encontrado la presencia de una dinámica con correlaciones de largo plazo que podría estar ligada a la facilitación de procesos de plasticidad neuronal y transmisión de información [12, 43, 59].

Por otro lado, el estudio de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga ha sugerido también un comportamiento con correlaciones de largo plazo, que podría estar relacionado con la dinámica de los mecanismos que modulan el potencial de membrana entre los cuales se encontrarían la interacción entre diferentes poblaciones de canales iónicos, el manejo de Ca^{+2} intracelular como segundo mensajero y la actividad sináptica [6, 50, 56, 60].

Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que subyacen a estos comportamientos con correlaciones de largo plazo y, por otro lado también, si la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga se encuentra funcionalmente relacionada con la frecuencia de despolarización en neuronas con actividad eléctrica de tipo marcapaso.

4. Capítulo 2.

4.1. Hipótesis

- Dado que las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga parecen reflejar la interacción de los mecanismos que regulan el potencial de membrana en neuronas marcapaso, entonces la presencia de correlaciones de largo plazo en éstas debe estar asociada a las fluctuaciones de intervalo temporal interespiga (ISI).

4.2. Objetivo general

- Determinar la relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones en el potencial de membrana interespiga y el intervalo interespiga (ISI) de la actividad eléctrica de neuronas tipo marcapaso.

4.3. Objetivos particulares

- Caracterizar y comparar el ruido generado por el sistema de registro de la actividad eléctrica con las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga que se vinculan a los mecanismos que regulan el potencial de membrana.
- Comparar la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana interespiga de neuronas marcapaso con la dinámica de las fluctuaciones en el potencial de membrana de neuronas silentes.
- Buscar la relación entre la activación de los canales SK, Ca^{+2} y la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.
- Indagar una posible asociación entre la dinámica de las fluctuaciones en el potencial de membrana interespiga y las fluctuaciones de intervalo temporal interespiga (ISI) de la actividad eléctrica de neuronas tipo marcapaso.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Uso del espécimen *Helix aspersa*.

El uso de diversos modelos biológicos como el espécimen *H. aspersa* ha permitido comprender en mayor o menor medida los mecanismos que subyacen a la actividad eléctrica neuronal, así como el probable procesamiento de la información [61–63]. El amplio uso de este modelo se debe a la facilidad de manejo del tejido nervioso; se conoce la ubicación topográfica de las neuronas y su patrón de actividad eléctrica, además se le puede considerar como un modelo a escala de un sistema nervioso más grande y complejo [63].

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), ver figura 3. Cada ganglio está formado por grupos de neuronas motoras unipolares e interneuronas [64]. En el anexo A se describe el procedimiento utilizado para la exposición de la masa ganglionar.

Los ganglios cerebrales, están encargados de inervar los ojos, órganos del equilibrio (estatócitos), boca, tentáculos, pie y superficie de la cabeza. Los ganglios pleurales inervan el manto (superficie que cubre los órganos viscerales) y el músculo columella (músculo que provoca la retracción del cuerpo). Los ganglios parietales inervan al osfradio, órgano que se encuentra básicamente influido por los niveles de humedad en el ambiente, lo que influye en la conducta del espécimen durante su ciclo vital. El ganglio visceral inerva el corazón, hígado, riñón, sistema digestivo, ano, y musculatura del cuerpo [64–66],

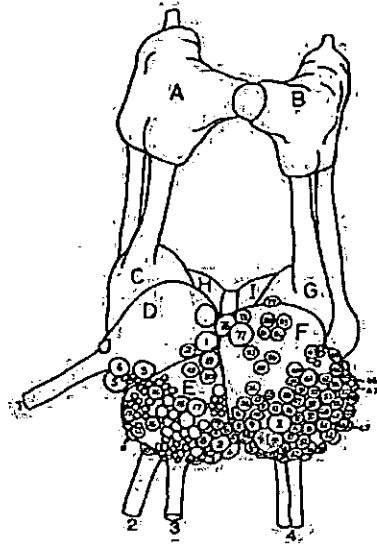


Figura 3: Bosquejo del complejo periesofágico del caracol terrestre *H. aspersa*, se muestran los ganglios cerebrales (A,B), pleurales (C, G), pedales (H, I), parietales (D, F), y visceral (E). También se muestra la posición de la neurona marcapaso 1F y de la neurona silente 7E la cual se ha reportado que presenta entras sinápticas. Imagen tomada de Kerkut et al. 1975.

ver figura 3.

Los trabajos de Kerkut y Cols en 1975 permitieron caracterizar a las neuronas del espécimen *H. aspersa*, por su morfología, farmacología y patrones de descarga, tal es el caso de neuronas silentes (7E), y neuronas con actividad eléctrica intrínseca de tipo marcapaso (1F) [63].

La neurona silente 7E mantiene su potencial de membrana en reposo a lo largo del tiempo, por lo que no genera potenciales de acción, excepto cuando cuando recibe una entrada sináptica excitadora o un estímulo mecánico. La ubicación topográfica de la neurona permite su fácil identificación, y su diámetro oscila entre 10-20 μm [14].

Por otro lado a diferencia de la neurona 7E, la neurona 1F presenta actividad eléctrica de tipo marcapaso, se conocen varios de los mecanismos involucrados en la modulación de su potencial de membrana (descritos a continuación), la neurona 1F no presenta entradas sinápticas [14]; no obstante, sí tiene receptores a sustancias neuromoduladoras, su diámetro oscila entre los 100-200 μm lo que permite su registro intracelular [57].

El estudio a profundidad de las neuronas del espécimen *H. aspersa*, ha permitido conocer varios de los mecanismos involucrados en la modulación de su potencial de membrana. Entre los mecanismos reportados se encuentran los canales de K^+ y Na^+ dependientes de voltaje y también los canales de Cl^- [67]. Así mismo se conoce que dichas neuronas presentan canales BK (con alta dependencia al voltaje y baja dependencia a la concentración de Ca^{2+} intracelular); canales SK (con baja dependencia al voltaje y alta dependencia a la concentración de Ca^{2+} intracelular) [68, 69]; y por otro lado, tanto canales de Ca^{2+} tipo L y N [27] como también canales GIRK [29, 70].

La participación de dichos canales es de la siguiente manera. El inicio de un potencial de acción es generado por la activación de canales de Na_v^+ dependientes de voltaje que provocan la disminución del potencial de membrana e incrementan la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo N y L. Esto da lugar a la despolarización de la membrana celular [27, 67], en la figura 4 se muestra la

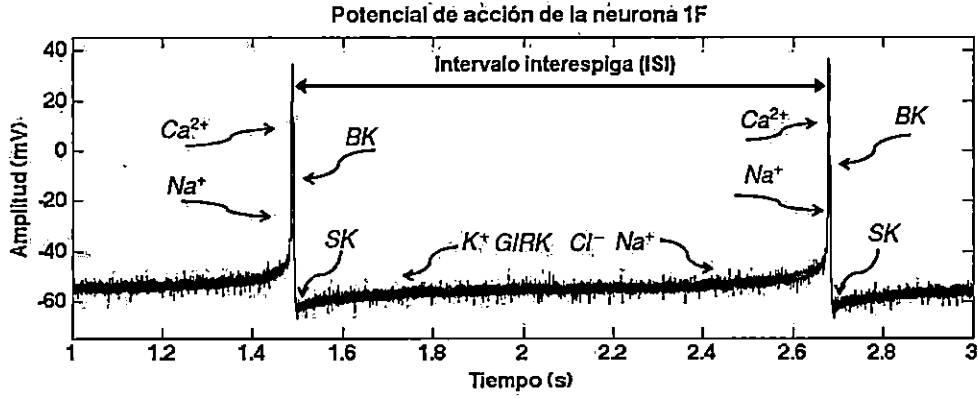


Figura 4: Mecanismos identificados que participan en la generación del potencial de acción de la neurona 1F del espécimen *H. aspersa*.

fase de activación de estos canales.

Por otro lado, la acción de los canales BK permite un incremento de la conductancia de iones de K^+ al medio intracelular lo que repolariza la membrana celular [69], y facilita que se genere la fase de hiperpolarización. En ésta fase los canales SK son activados por un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular [16, 71], y este proceso da inicio al periodo interespiga que se encuentra modulado por la interacción de canales de K^+ , Cl^- , GIRK, Na^+ , Ca^{2+} tipo L y N entre otros [29], en la figura 4 se muestra la fase de activación de estos canales.

4.4.2. Análisis de las fluctuaciones sin tendencia (DFA).

El método de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA) ha demostrado ser útil para identificar la presencia de correlaciones de largo plazo en las series de tiempo a través de la estimación del exponente de escalamiento α , que entre otros aspectos, se considera que refleja las interacciones de los mecanismos que generan la serie de datos. Una de las razones por la cual se utiliza este análisis es que evita la falsa detección de correlaciones de largo plazo, que podrían ser generadas por la no estacionalidad de la serie de datos [21, 72]. En el anexo C se muestra un ejemplo de cómo el método ayuda a eliminar la tendencia que se observa en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. A continuación se describe el método:

En primer lugar la serie de datos es integrada y su media es sustraída.

$$y(k) = \sum_{i=1}^k x(i) - \bar{x} \quad (1)$$

A continuación, la serie $y(k)$ es dividida en escalas o segmentos de igual longitud n que no se superponen. Para cada una de las cajas de longitud n se realiza un ajuste de primer orden por mínimos cuadrados para así obtener $y_n(k)$. De esta forma se elimina la tendencia de $y(k)$ por medio de la sustracción de la tendencia local $y_n(k)$ en cada caja. Entonces la raíz de la fluctuación cuadrática media es calculada de la siguiente manera:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2} \quad (2)$$

Este cálculo es repetido sobre todo el conjunto de escalas o tamaños de cajas dando como resultado una relación de ley de potencia como función del tamaño de caja n , se considera que la ventana más pequeña contiene 4 datos y la ventana más grande corresponde a la longitud de la serie dividida entre 4, esto con el fin de evitar una sobreestimación [73].

$$F(n) \approx n^\alpha \quad (3)$$

Finalmente, se obtiene una relación lineal al aplicar logaritmo a ambos lados de la ecuación que ofrece un exponente de escalamiento α . Los valores cercanos a 0.5 indican que las fluctuaciones de la serie son aleatorias no presenta correlaciones de largo plazo. Para valores de α cercanos a 1 la serie presenta correlaciones de largo plazo (es decir, los valores actuales de las serie están correlacionados estadísticamente no sólo con valores inmediatamente anteriores sino también con valores de tiempo previos, lo que revela un comportamiento no aleatorio o con una estructura temporal). Y para valores de α cercanos o mayores a 1.5 la serie presenta correlaciones que tienden a manifestarse en ciertas escalas de tiempo particulares, debido a que las fluctuaciones de la serie son más regulares [21,42].

4.4.3. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.

Para obtener los registros intracelulares se utilizó el amplificador Dagan 8500 en la configuración de fijación de corriente, el cual tiene una impedancia de entrada de $5 \times 10^{11} \Omega$, con una corriente de *bias* ajustable a zero (valor nominal 3pA). La adquisición y visualización de los datos se llevó a cabo bajo la interfaz PicoScope 4424 A/D.

A partir de capilares de vidrio de borosilicato con diámetro de 2 mm (de la marca WPI) y con el uso del equipo DKI 700-C se fabricaron microelectrodos con una resistencia de 40-50 M Ω . Estos se rellenaron con solución de KCl a una concentración de 0.5 M, los microelectrodos se montaron en un *holder* con un filamento de Ag-Cl.

En todos los experimentos la masa ganglionar fue colocada en una cámara de registro intracelular que presenta una capacidad de 1.5 ml. Se utilizó solución salina normal con la siguiente composición: NaCl 75 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM y Hepes 5 mM, con pH de 7.5 ajustado con NaOH a 1M. Los reactivos fueron obtenidos de la empresa J.T. Baker.

La caracterización y comparación el ruido generado por el sistema de registro se llevó acabo mediante la obtención de señales de ruido de fondo en la solución salina (sin electrodo próximo a la neurona) antes y después de registrar la neurona 1F. Los datos fueron adquiridos a una frecuencia de muestreo de 1KHz en el que se consideraron 10 segmentos interespiga con una longitud de 340 ± 10 muestras de un solo espécimen. Para comparar y corroborar los resultados obtenidos, se registró también a una frecuencia de muestreo de 10 KHz para considerar 20 segmentos interespiga con una longitud de 22000 ± 3000 muestras de un solo espécimen. En la figura 5 se muestra la secuencia de estos experimentos.

Para el análisis de los datos se utilizó el código libre de la herramienta DFA, la cual se encuentra disponible en la pagina de physionet.org [73].

Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro

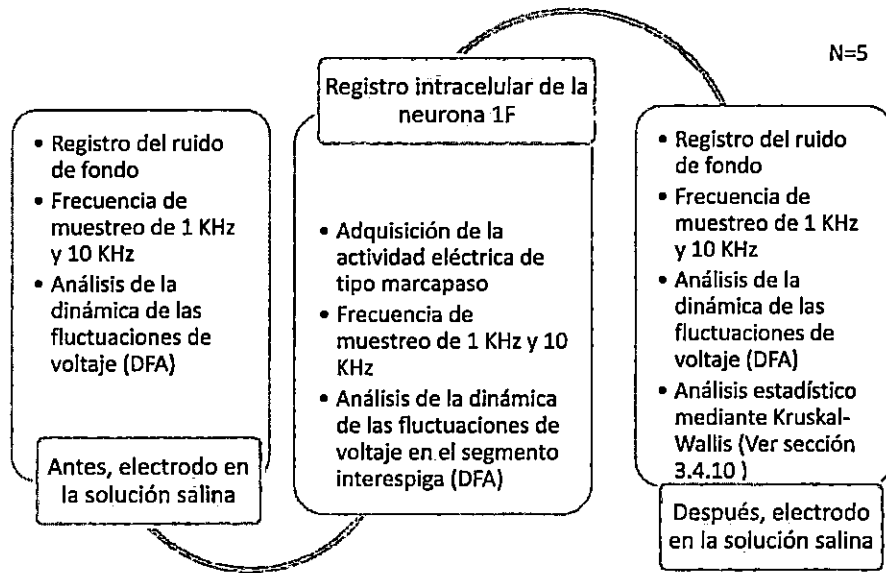


Figura 5: Secuencia de experimentos para comparar y caracterizar la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga antes y después de realizar el registro intracelular en la neurona marcapaso 1F.

4.4.4. Dinámica del intervalo interespiga (ISI)

Con el fin de explorar la posible presencia de un comportamiento con correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones temporales para la aparición del potencial de acción (ISI, figura 14) y contrastar los resultados con otros estudios, se realizó un registro intracelular de la actividad eléctrica de la neurona 1F el cual presentó una duración de 26 minutos. Este experimento permitió recolectar 350 intervalos interespiga para posteriormente analizar estos datos con la herramienta DFA. En la figura 6 se esquematiza el proceso experimental y de análisis de datos.

Dinámica del intervalo interespiga (ISI)

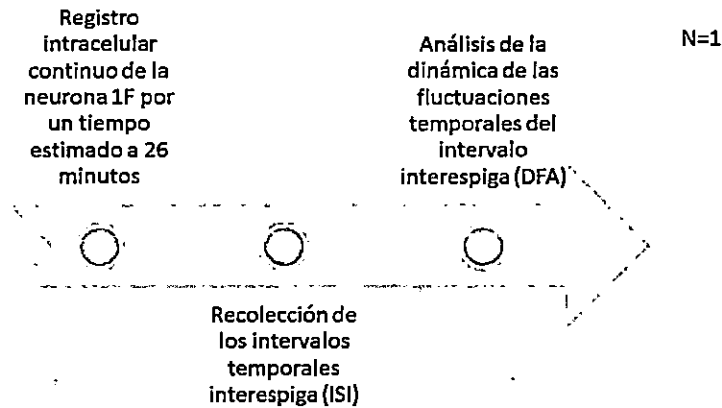


Figura 6: En esta etapa experimental se realizó un registro intracelular continuo de la actividad eléctrica de tipo marcapaso de la neurona 1F, el registro tiene una duración aproximada de 26 minutos. Posteriormente se recolectaron los intervalos temporales interespiga para generar una serie de datos. Con la herramienta de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA) se evaluó la dinámica de la serie.

4.4.5. Exploración de la presencia de entradas sinápticas en la neurona 1F y 7E.

En esta etapa experimental se exploró la posible presencia de entradas sinápticas excitadoras en las neuronas 1F y 7E (esta última se reconoce por ser una neurona silente [14]) que podrían ejercer un efecto sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, y por lo tanto estar involucradas en el origen de las correlaciones de largo plazo. Entonces, se realizó el registro intracelular a una frecuencia de muestreo de 10 KHz, se usaron microelectrodos con un rango de resistencia de 50-60 M Ω rellenos con una solución de KCl 0.5 M. Para cada una de las neuronas estudiadas se aplicó una corriente hiperpolarizante de 1-2 nA para llevar el potencial de membrana a -80 mV y confirmar la presencia de potenciales postsinápticos excitadores. En la figura 7 se bosqueja el proceso experimental.

Para el análisis de los datos se utilizó la herramienta DFA, se exploró el cambio en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo a través de una ventana móvil de 1500 muestras. Trabajos similares han mostrado la utilidad de este método para estimar las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ [23]. Los resultados se muestran en el siguiente capítulo.

Así, con el fin de explorar la posible presencia de entradas sinápticas excitadoras en la neurona marcapaso 1F y en la neurona silente 7E ambas se hiperpolarizaron a -80 mV. Con este procedimiento se logró exhibir la presencia de potenciales postsinápticos excitadores para el caso de la neurona 7E, a diferencia de la neurona 1F en la que no se observan cambios en su potencial de membrana

Exploración de la presencia de entradas sinápticas en la neurona 1F y 7E

N=1

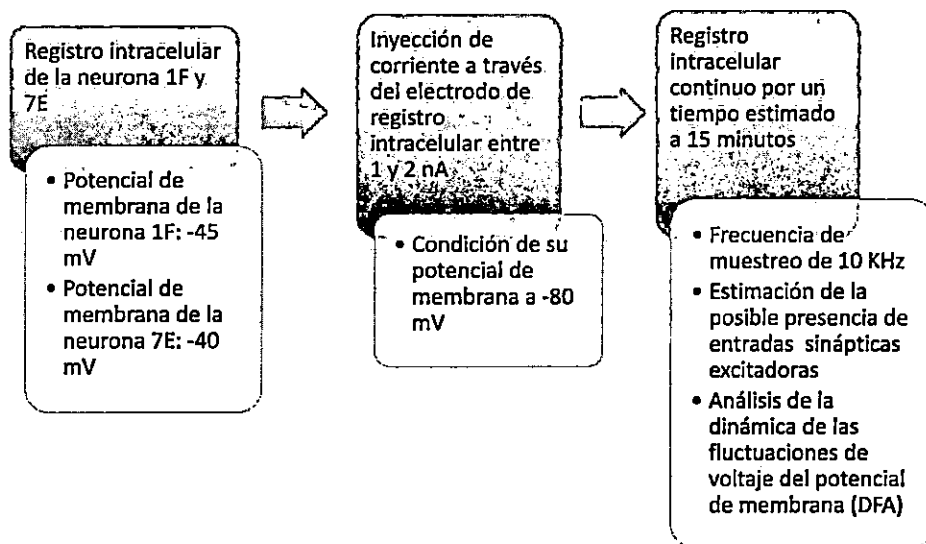


Figura 7: Este procedimiento permitió explorar la posible presencia de entradas sinápticas excitadoras en la neurona marcapaso 1F y en la neurona silente 7E. Esta etapa experimental permitió exhibir el efecto de la actividad sináptica sobre dinámica de las fluctuaciones de voltaje.

4.4.6. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

En otra serie de experimentos se realizó la perturbación del manejo de calcio intracelular; al agregar a la solución salina normal: CdCl_2 100 μM y cafeína 20 mM respectivamente. Bajo el uso de estas soluciones se esperaba que se modificara la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga para la neurona 1F. En la figura 8 se resume el proceso experimental y de análisis de datos.

El ganglio fue perfundido en un inicio con la solución salina normal bajo un flujo de 2.5 ml/min en una cámara de registro con capacidad de 1.5 ml, el registro intracelular comenzó después de 60 s de perfusión y tuvo una duración de 10 min; posteriormente, el ganglio fue perfundido con la solución salina cadmio después de 30 s y con una duración de 7 min. En la figura 9 de forma detallada se muestra la secuencia de estos experimentos. Se ha reportado que 100 μM de CdCl_2 bloquea el 60 % de la corriente de Ca^{+2} en las neuronas de *H. aspersa* [32].

En otro experimento, el registro intracelular inició después de 30 s de perfusión con solución salina normal, y tuvo una duración de 10 min; posteriormente, el ganglio fue perfundido con solución salina cafeína después de 20 s y tuvo una duración de 5 min. Se reconoce que la cafeína permite la liberación de Ca^{+2} de los compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático) [33, 34]. En la figura 9 se muestra la secuencia de estos experimentos.

De forma similar, con la herramienta DFA se estudió el cambio en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo, a través de una ventana móvil de 1500 muestras con el fin de estimar las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ [23]. La duración del segmento interespiga fue expresada en términos de un porcentaje con respecto a la duración total, ya que se ve modificada con respecto a la condición experimental. Se consideró para los grupos solución

Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga

N=5

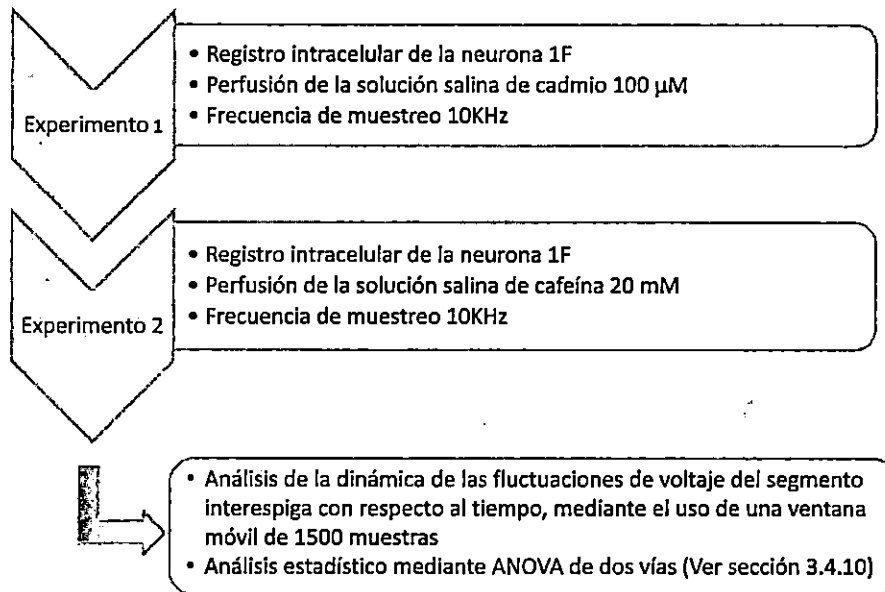


Figura 8: El estudio a detalle del cambio de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo, generó como resultado la identificación de un perfil temporal en la dinámica, que se puede asociar a la activación de diferentes poblaciones de canales iónicos.

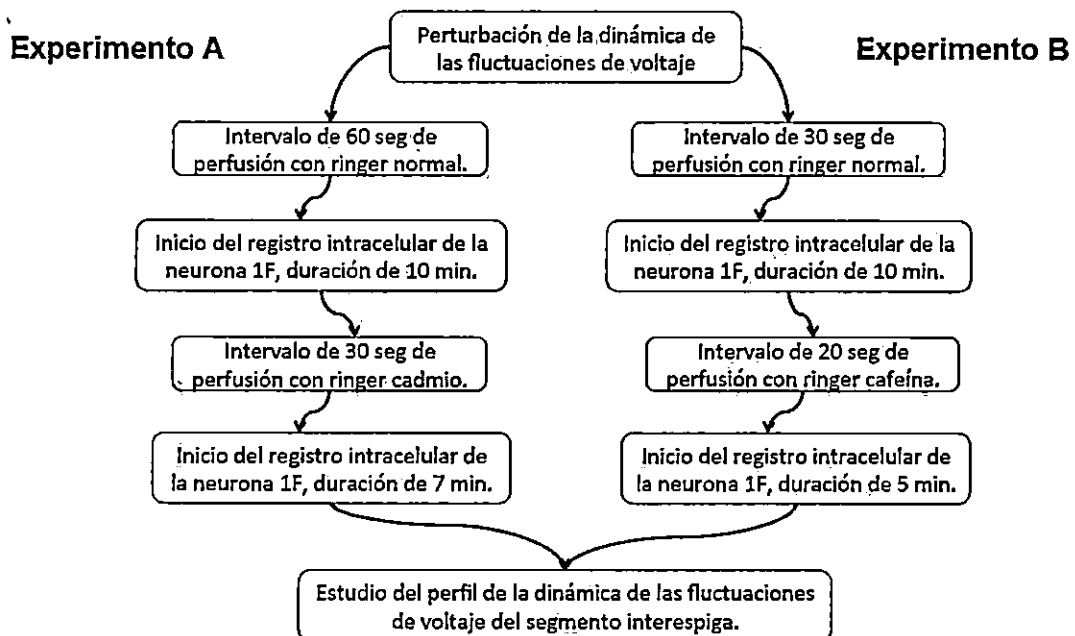


Figura 9: En esta imagen se muestra la secuencia de los experimentos realizados bajo perfusión con la solución de salina CdCl_2 100 μM y cafeína 20 mM, con el fin de modificar el manejo de Ca^{+2} intracelular.

Relación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con el intervalo interespiga (ISI)

N=5

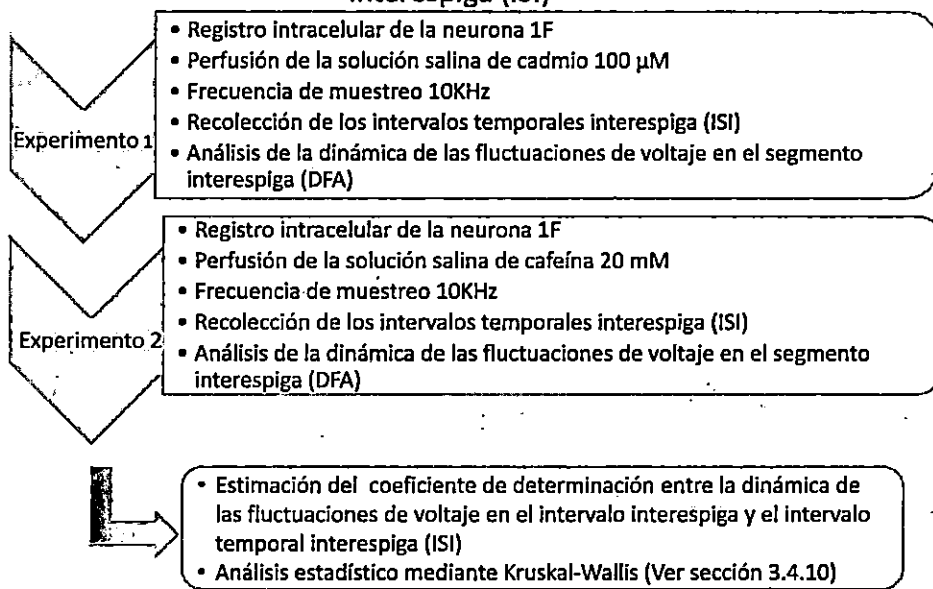


Figura 10: Bajo una condición control y la perturbación del manejo de calcio intracelular, se exploró la asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos temporales interespiga (ISI).

salina: normal, cadmio y cafeína, 20 segmentos interespiga, N= 5; los datos fueron obtenidos a una frecuencia de muestreo de 10KHz.

4.4.7. Relación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con el intervalo interespiga (ISI).

Con el fin de explorar una posible asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos interespiga, se consideraron de 48 a 50 exponentes de escalamiento α obtenidos del análisis de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y así, con su respectivo intervalo interespiga, se generó en un diagrama de dispersión de datos, del que se estimó la correlación expresada como el coeficiente de determinación R^2 . Este procedimiento se aplicó para cada uno de los grupos de solución salina: normal, cadmio y cafeína. En la figura 10 se esquematiza el proceso experimental y de análisis de datos.

4.4.8. Estimación del número de neuronas.

La estimación del mínimo número de neuronas marcapaso necesarias para los experimentos de perfusión de la soluciones de salina cadmio y salina cafeína se obtuvo a partir del cálculo de intervalo de confianza de la media poblacional del parámetro α que fue obtenido mediante el análisis de la dinámica de segmento interespiga, tomando como referencia los resultados previamente encontrados [56]. En dicho estudio, se consideraron 3 neuronas 1F cada una con 20 segmentos interespiga dando como resultado $\alpha = 0,986 \pm 0,044$. Así, considerando este resultado y con una probabilidad del 95 % de encontrar diferencias significativas en la estimación del parámetro α , además de un posible error del 2 % se obtuvo [74]:

$$n = \frac{(Z^2) * (\sigma^2)}{(Error^2)} \approx 5 \quad (4)$$

Con base en esto se registraron al menos 5 neuronas 1F para cada etapa experimental y al menos 20 segmentos interespiga por neurona.

Modelos físico-biológicos

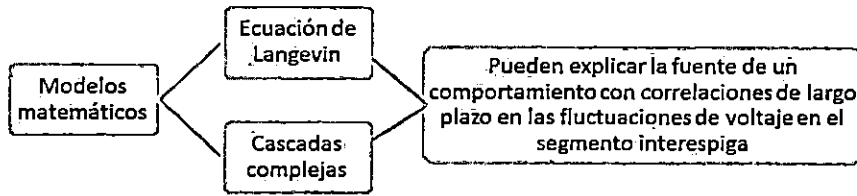


Figura 11: El uso de la ecuación de Langevin y el modelo de cascadas complejas ha ayudado a comprender en mayor medida el funcionamiento de sistemas así como la interacción entre sus componentes, por lo que se consideraron que podían explicar la fuente de un comportamiento con correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

4.4.9. Ecuación de Langevin y modelo de cascadas complejas.

El uso de modelos físicos-biológicos ha ayudado a comprender en mayor medida el funcionamiento de sistemas así como la interacción entre sus componentes. En diferentes trabajos se ha utilizado la ecuación de Langevin la cual ha permitido describir la dinámica de aparición del potencial de acción en una red neuronal como función de la evolución del potencial de membrana $V_i(t)$:

$$\frac{dV_i(t)}{dt} = \frac{(V_{rep} - V_i(t))}{\tau} + \Gamma_i(t) \quad (5)$$

en donde V_{rep} es el potencial de reposo, τ la constante de membrana y $\Gamma_i(t)$ un factor estocástico con una distribución normal. En el anexo D se describe en mayor detalle este modelo [75, 76].

En este estudio, se empleó dicha ecuación para modelar las fluctuaciones en el potencial de membrana que sufren las neuronas, ya sea por procesos sinápticos o vía la interacción de canales iónicos, lo que también podía ser útil para explorar el origen de las correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga [75, 76]. En la figura 21 se muestran estos resultados.

Por otro lado, también se exploró una dinámica críticamente auto-organizada que podía análogamente explicar el origen del comportamiento con correlaciones de largo plazo. La característica principal de este modelo es la falta de una escala particular que da lugar a una distribución en forma de ley de potencia y que se atribuye a la interacción de los componentes de un sistema complejo [22]. Esta dinámica se ha propuesto como base para la organización de la actividad eléctrica neuronal generada por la actividad sináptica [8, 77]. En el anexo D se describe en mayor detalle este modelo [35]. En la figura 11 se bosquejan los métodos utilizados para la simulación de las fluctuaciones de voltaje.

4.4.10. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los registros intracelulares y del ruido generado por el sistema de registro fueron comparados con la prueba de Kruskal-Wallis, debido a que el conjunto de datos no presentaba una distribución simétrica alrededor de su media. De igual forma se contrastaron los datos experimentales que resultaron de la perturbación del manejo de calcio intracelular mediante la perfusión de la solución salina cadmio y cafeína. Para todos los casos se realizaron pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk [74].

Por otro lado, se estimó el coeficiente de determinación (R^2) con el fin de conocer la proporción de la variación de las fluctuaciones temporales del intervalo interespiga, que se vincula a los cambios en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. La comparación de R^2 con los grupos solución salina: normal, cadmio y cafeína también se realizó con la prueba Kruskal-Wallis [74].

Finalmente, se utilizó una prueba ANOVA de dos vías para identificar como la actividad eléctrica de la neurona marcapaso 1F es afectada por la perturbación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, mediante del uso de sustancias que interfieren con el manejo de calcio intracelular [74].

La significancia estadística se asumió en $P < 0.05$.

5. Capítulo 3

5.1. Resultados.

5.1.1. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.

Se caracterizó y comparó el ruido generado por el sistema de registro, obteniéndose señales de ruido de fondo (sin electrodo próximo a la neurona) antes y después de registrar la neurona 1F. Para estos registros se consideraron 10 segmentos interespiga con una longitud de 340 ± 10 muestras de un solo espécimen, los datos se registraron con una frecuencia de muestreo de 1KHz. En la figura 12 se muestran estos resultados.

La mediana del exponente de escalamiento α para las fluctuaciones de voltaje antes de introducir el electrodo a la célula fue 0.506 ([0.459, 0.529] cuartil inferior y superior), 1.015 ([0.871, 1.151]) para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y 0.571 ([0.516, 0.598]) para las fluctuaciones de voltaje después de introducir el electrodo a la célula. Se realizó un análisis Kruskal-Wallis encontrándose diferencias significativas ($P < 0.0001$). En la figura 12 se muestran estos resultados.

Para comparar y corroborar los resultados obtenidos, se registró también a una frecuencia de muestreo de 10 KHz en donde se consideraron 20 segmentos interespiga con una longitud de 22000 ± 3000 muestras de un solo espécimen; así mismo, se estimó la relación señal a ruido del segmento interespiga. Para evitar su sobre estimación se eliminó la tendencia del segmento interespiga bajo el uso del método DFA.

La mediana del exponente de escalamiento α para las fluctuaciones de voltaje antes de introducir el electrodo a la célula es 0.500 ([0.494, 0.516] cuartil inferior y superior), 1.034 ([1.014, 1.053]) para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y 0.570 ([0.567, 0.582]) para las fluctuaciones de voltaje después de introducir el electrodo a la célula. Se realizó un análisis Kruskal-Wallis encontrando diferencias significativas ($P < 0.0001$). En la figura 13 se muestran estos resultados.

Adicionalmente, se estimó la relación señal a ruido la media obtenida antes de introducir el electrodo a la célula la cual resulto en 0.732 ± 0.182 dB ([0.494, 0.516] intervalo de confianza inferior y superior del 95%), la estimación se hizo para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga obteniendo 24.08 ± 0.086 dB ([24.04 24.12]), y finalmente 0.312 ± 0.245 dB ([0.197 0.426]) después de introducir el electrodo. En la figura 13 se muestran estos resultados.

5.1.2. Dinámica del intervalo interespiga (ISI).

Se exploró la presencia de un comportamiento con correlaciones de largo plazo en los intervalos interespiga de un espécimen, a partir de un registro intracelular con una duración de 26 minutos obteniéndose 350 intervalos interésiga. Con estos datos se generó una serie en donde se estimó su exponente de escalamiento α en la figura 14 se presentan estos resultados.

5.1.3. Exploración de la presencia de entradas sinápticas en la neurona 1F y 7E.

Se exploró la posible presencia de entradas sinápticas que podrían ejercer un efecto sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, y consecuentemente determinar si estas están involucradas en el origen de las correlaciones de largo plazo. Por lo que se procedió a hiperpolarizar a la neurona 7E hasta llevar su potencial de membrana a -80 mv en donde podría ser posible observar la presencia de potenciales postsinápticos excitadores, en la figura 15 se muestran los re-

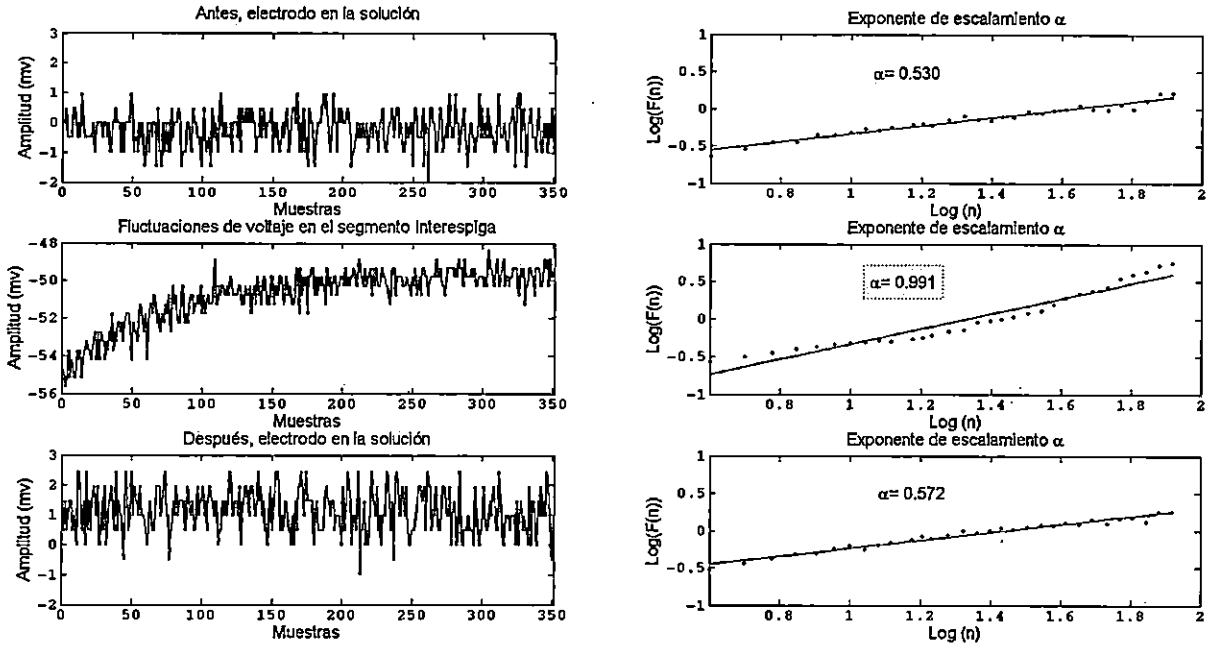
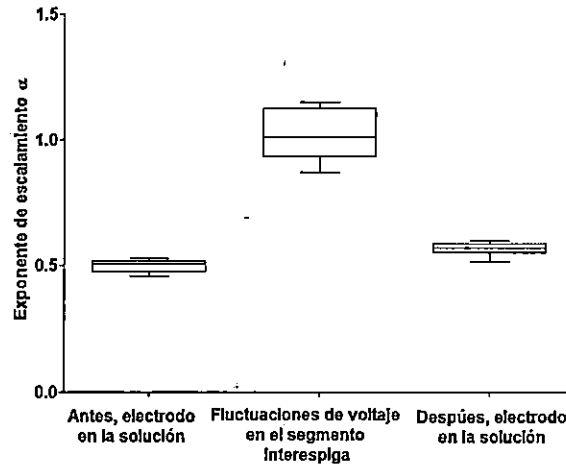
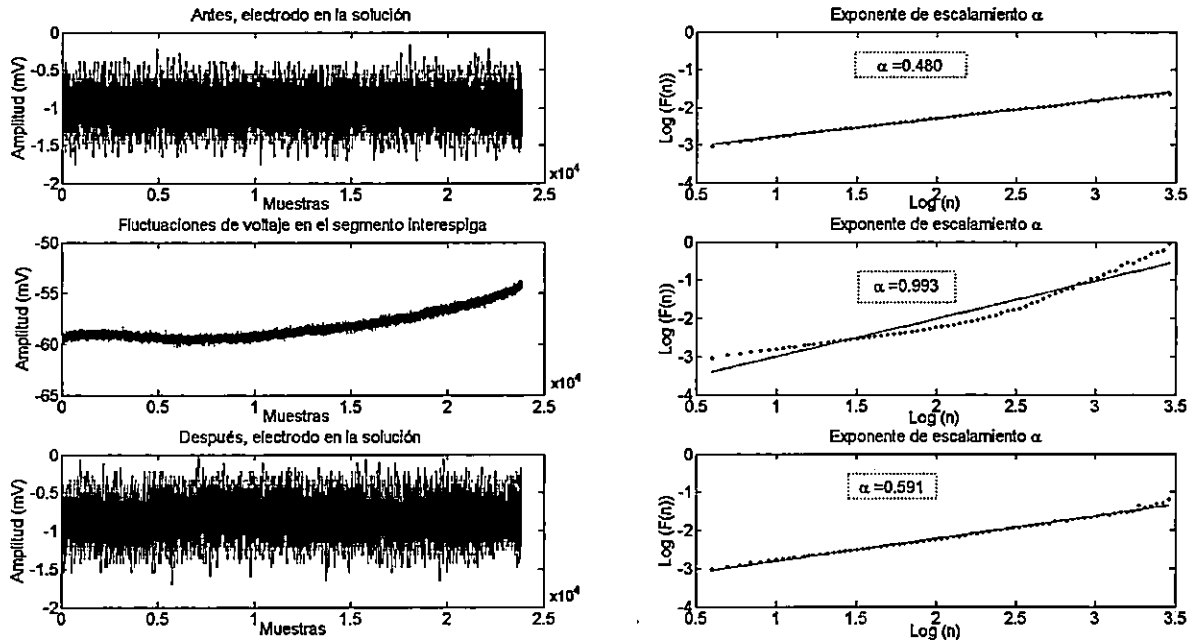
A**B**

Figura 12: En el panel A se muestra un ejemplo típico de las fluctuaciones de voltaje con electrodo próximo antes y después del registro intracelular de la neurona 1F (datos registrados a una frecuencia de muestreo de 1Khz), también se muestra la estimación del exponente de escalamiento α para su correspondiente serie de fluctuaciones de voltaje. En el panel B, se muestra la distribución de los datos obtenidos al estimar el exponente de escalamiento α con la herramienta DFA.

A



B

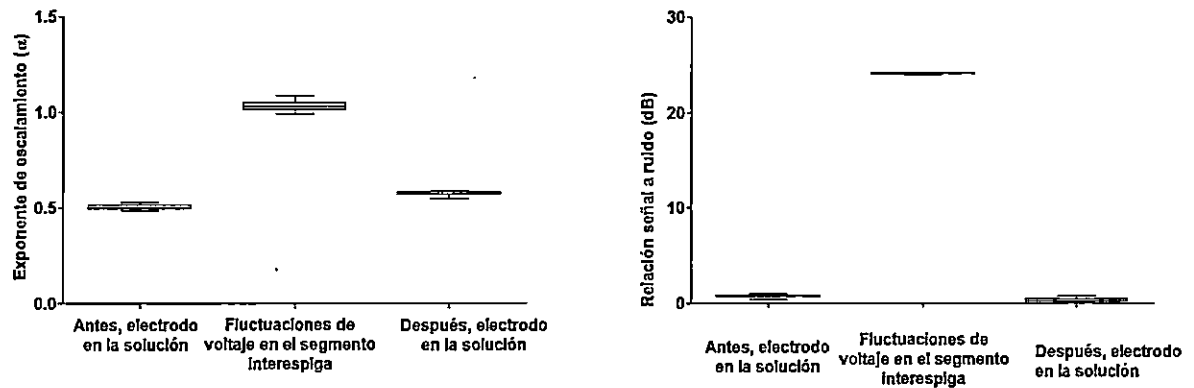


Figura 13: En el panel A se muestra un ejemplo típico de las fluctuaciones de voltaje con electrodo próximo antes y después del registro intracelular de la neurona 1F (datos registrados a una frecuencia de muestreo de 10Khz), también se muestra la estimación del exponente de escalamiento α para su correspondiente serie de fluctuaciones de voltaje. En el panel B, se muestra la distribución de los datos obtenidos al estimar el exponente de escalamiento α con la herramienta DFA y los resultados obtenidos al estimar la relación señal a ruido de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

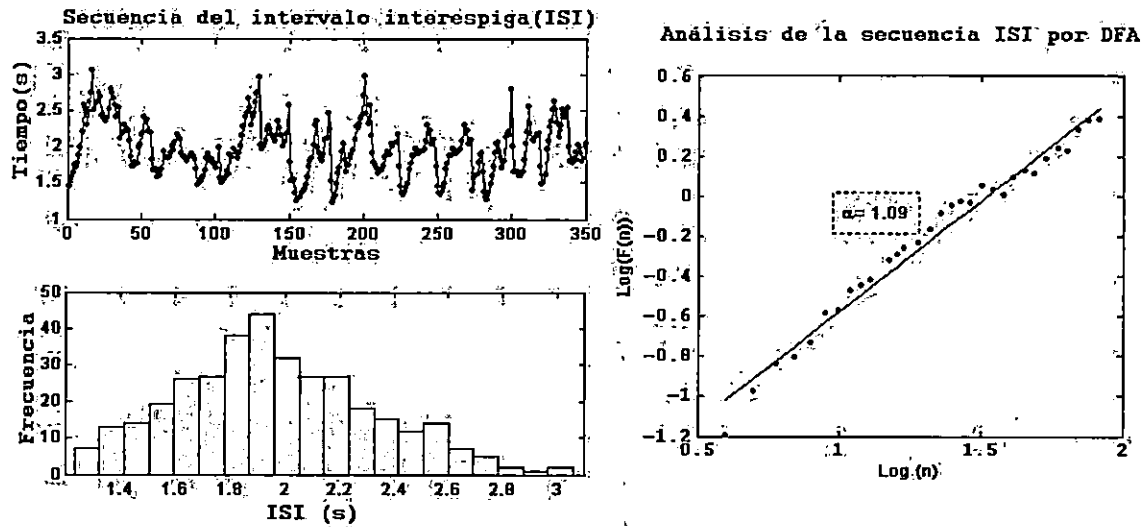


Figura 14: En el panel derecho se presenta la secuencia del intervalo interespiga (ISI) de la neurona 1F, esta serie representa un registro intracelular continuo con una duración de 26 minutos en donde se obtuvieron 350 ISI's, y la distribución de frecuencia de los intervalos interespiga. En el panel derecho se muestra la estimación del exponente de escalamiento para la secuencia del intervalo interespiga (ISI) $\alpha = 1.09 \pm 0.03$.

sultados obtenidos. Este mismo procedimiento se llevó a cabo sobre la neurona 1F los resultados se muestran en la figura 16.

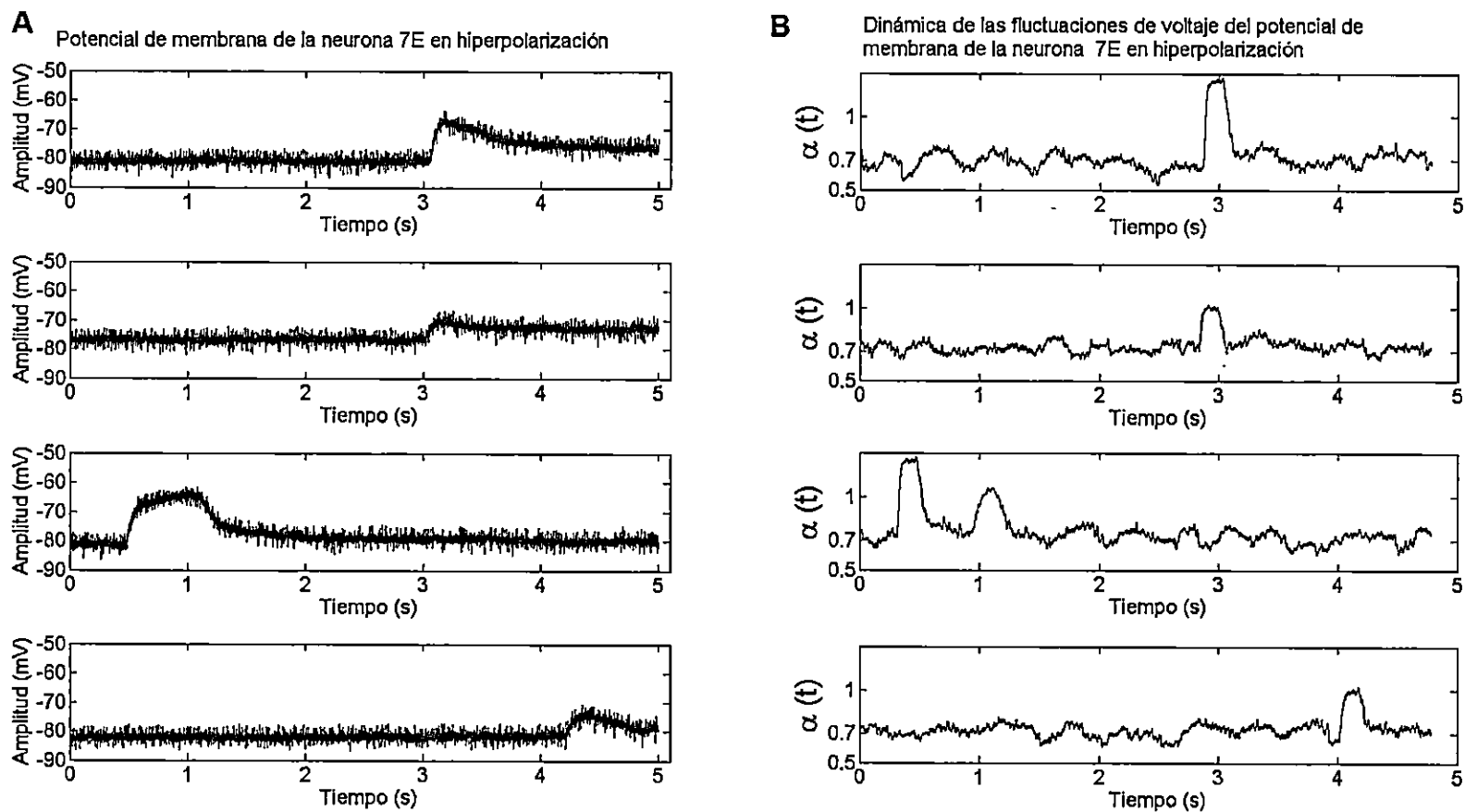


Figura 15: Neurona 7E en hiperpolarización bajo la inyección de corriente continua de 1 nA, se observan potenciales postsinápticos excitadores (Panel, izquierdo), también se muestra las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ a lo largo de la duración de la serie (Panel, derecho).

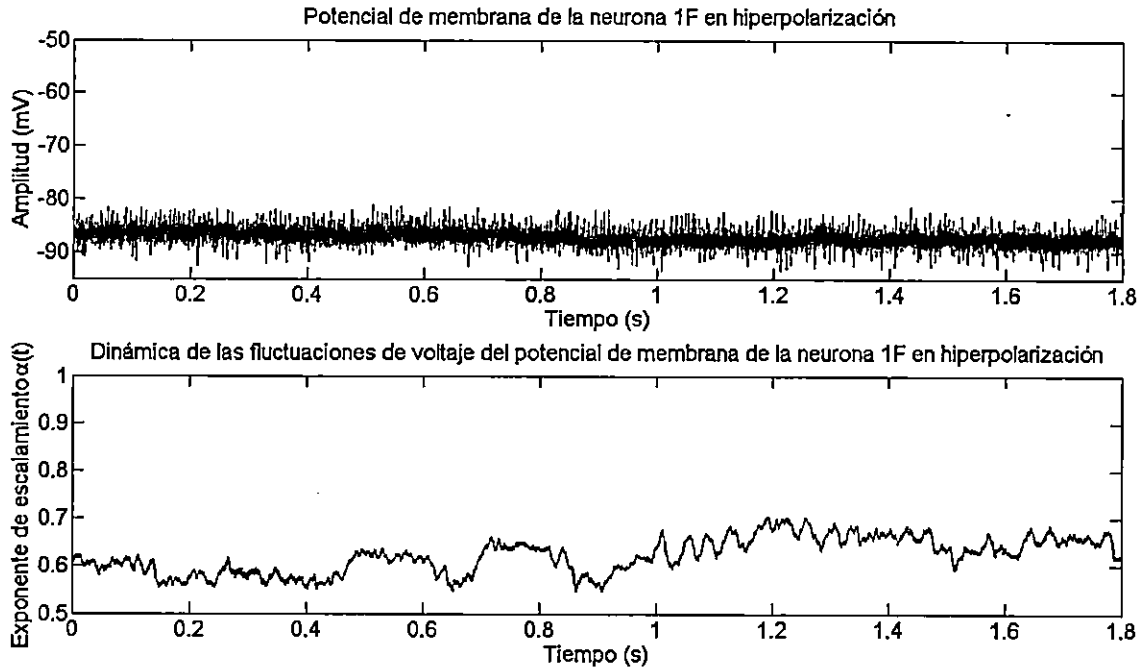


Figura 16: Neurona 1F en hiperpolarización bajo inyección de corriente continua de 2 nA, no presenta un comportamiento coincidente con entradas sinápticas lo que corrobora trabajos anteriores [14]. También se muestra las variaciones del exponente de escalamiento $\alpha(t)$ a lo largo de la duración de la serie (Panel Inferior).

5.1.4. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

Con el fin de estudiar de forma detallada la dinámica de las fluctuaciones de voltaje a lo largo de la duración del segmento interespiga, se analizó de forma progresiva con la herramienta DFA con una ventana móvil de 1500 muestras las fluctuaciones de voltaje. La duración del segmento interespiga fue expresada en términos de porcentaje. 20 segmentos interespiga fueron considerados por neurona para los tres tipos de solución salina: normal, cadmio y salina cafeína. En la figura 17 se muestran los perfiles típicos.

5.1.5. Efecto de la solución salina de cadmio y cafeína en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.

Se estimó un perfil promedio considerando los datos de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje para los diferentes porcentajes de duración del segmento interespiga, $N=5$ (ver figura 17). Los efectos de la solución de cadmio y cafeína sobre el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga se presentan en la figura 18. Se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías para evaluar la interacción entre el exponente de escalamiento y el porcentaje de duración del segmento interespiga ($P < 0.0002$).

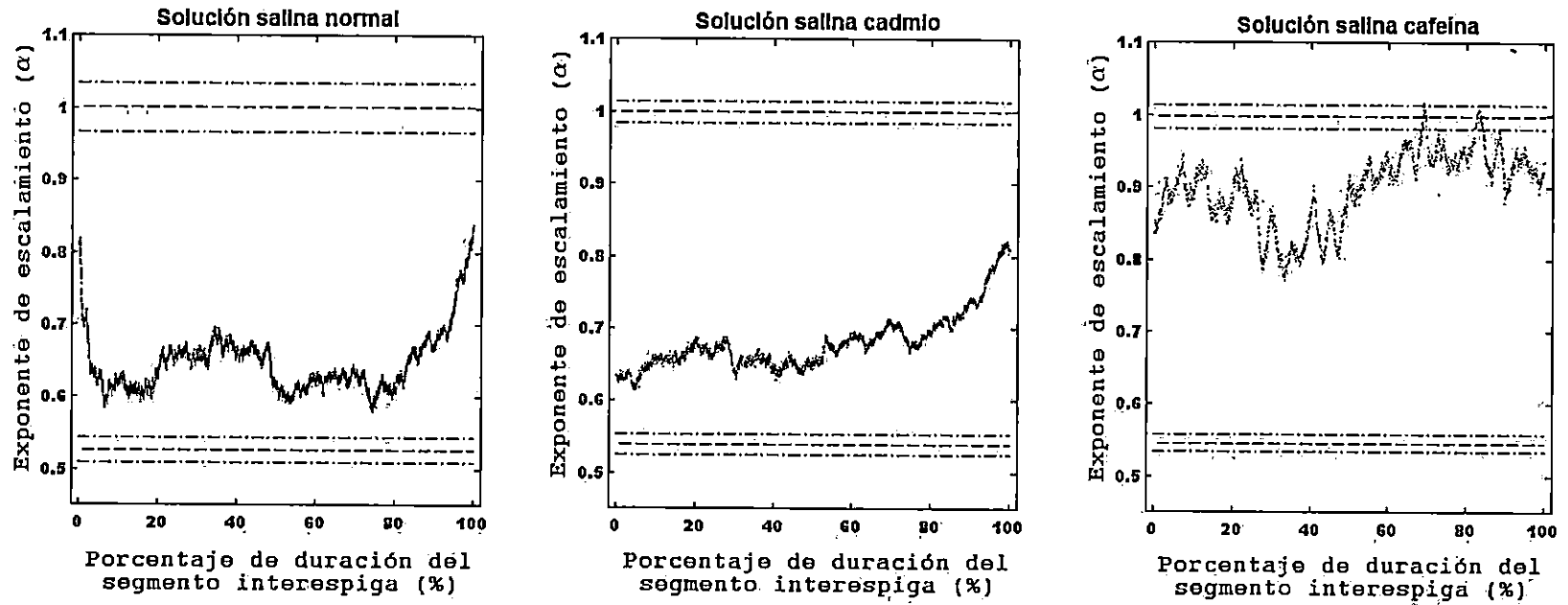


Figura 17: Perfil normalizado de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga de tres condiciones experimentales, para el análisis se utilizó una ventana móvil de 1500 muestras. Las líneas punteadas representan la media y desviación estándar de la estimación de α para series de control numérico, con correlaciones de largo plazo ($\alpha \approx 1$) y de tipo aleatorio ($\alpha \approx 0.5$).

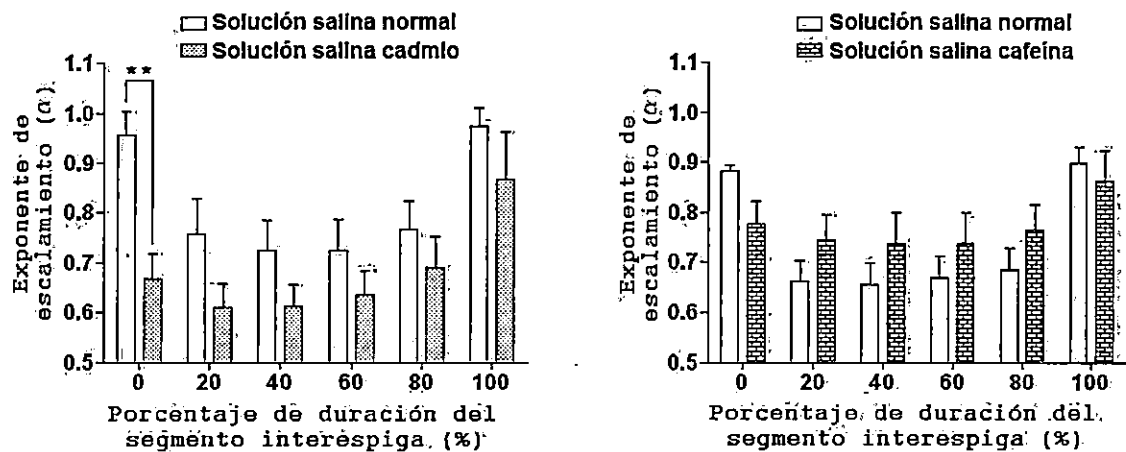


Figura 18: (Panel Izquierdo) Efecto de la solución salina de cadmio en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. La prueba de Bonferroni confirmó una reducción significativa de la magnitud de las correlaciones de largo plazo en la primera parte del perfil ($P < 0.01$). (Panel Derecho) Efecto de la solución salina de cafeína en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. La prueba de Bonferroni no confirma una reducción significativa de la magnitud de las correlaciones de largo plazo en el perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga ($P > 0.05$), $N=5$.

5.1.6. Relación de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con el intervalo interespiga (ISI).

Bajo perfusión continua de la solución salina normal en la neurona 1F, se exploró la relación de la duración del intervalo interespiga (ISI) y su correspondiente exponente de escalamiento (α), figura 19. Con estos datos se estimó la mediana del coeficiente de determinación R^2 obteniendo: 0.683 ([0.647 0.776] cuartil inferior y superior), $N=5$. Se exploraron los posibles cambios en la asociación bajo la perfusión de la solución de salina cadmio obteniendo una R^2 de: 0.405 [0.381 0.495]. De la misma forma, se perfundió la solución de salina cafeína lo que dio como resultado para R^2 : 0.151 [0.118 0.222]. Las diferencias significativas entre los grupos fueron confirmadas por la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.001$), en la figura 20 se muestran estos resultados.

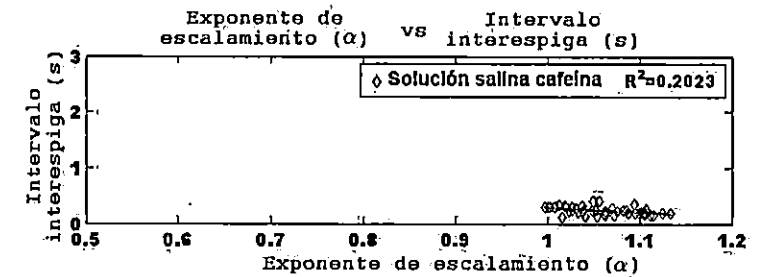
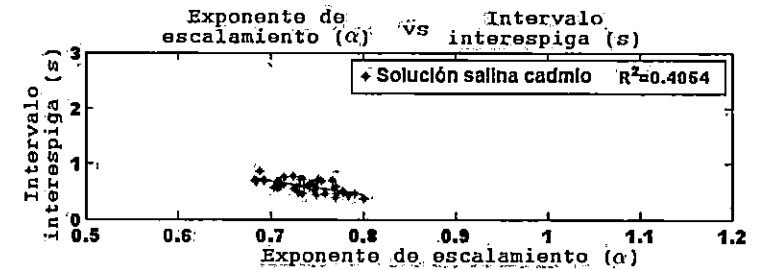
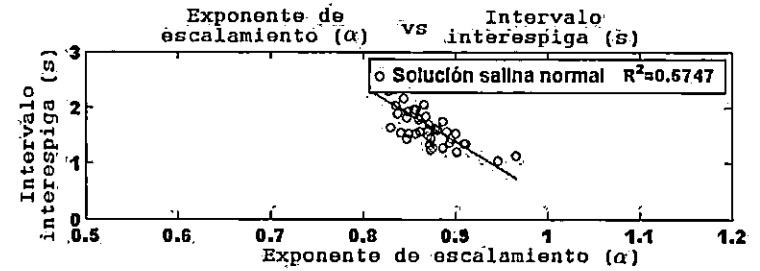
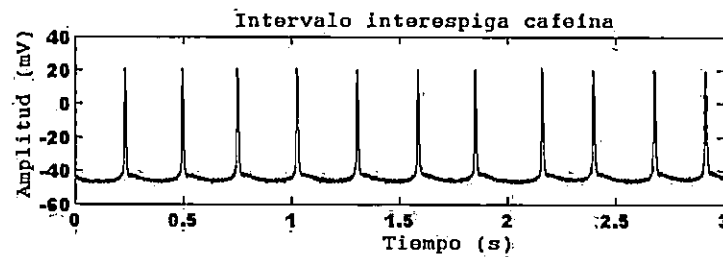
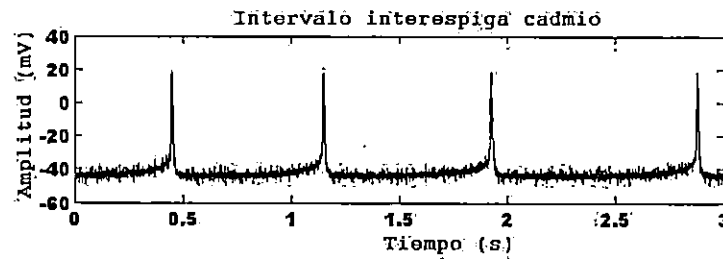
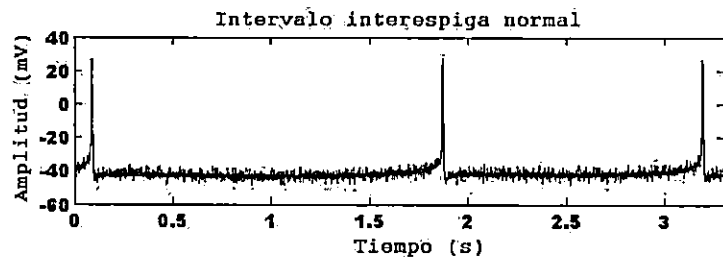


Figura 19: En el panel izquierdo se observa un ejemplo típico del registro intracelular de la neurona 1F en donde se observan cambios en la frecuencia de aparición del potencial de acción debido a la perturbación del manejo de calcio intracelular. En el panel derecho se muestra la estimación del coeficiente de determinación (R^2), a partir de graficar cada intervalo interespiga con su correspondiente exponente de escalamiento (α) obtenido del análisis de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, también se observa la disminución de la magnitud de R^2 en función al manejo de calcio intracelular.

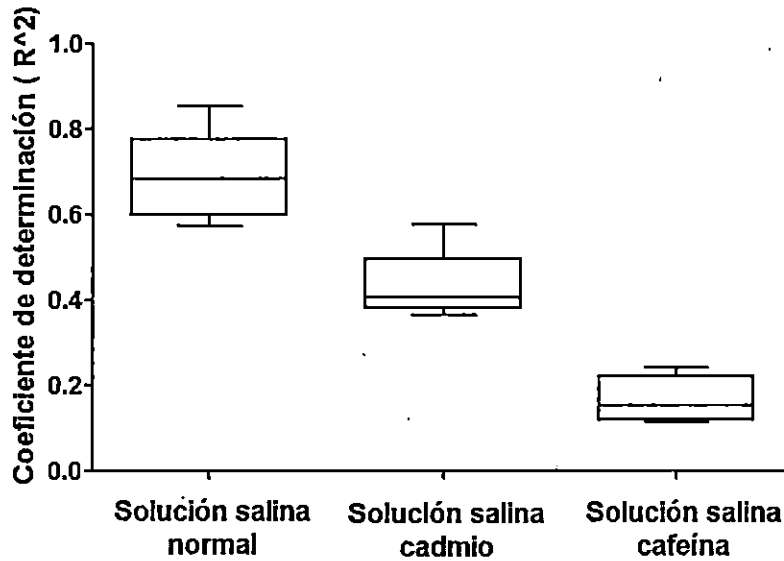


Figura 20: Diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0.0001$). Al comparar los promedios de los exponentes de escalamiento estimados de las fluctuaciones de voltaje, no fue posible encontrar diferencias entre los grupos ($\alpha_{normal} = 0,950 \pm 0,136$, $\alpha_{cadmio} = 0,937 \pm 0,289$, $\alpha_{cafeína} = 0,946 \pm 0,111$). De la misma forma, tampoco fue posible encontrar diferencias significativas en los promedios de los tiempos del intervalo interespiga $ISI(S)_{normal} = 0,940 \pm 0,686$, $ISI_{cadmio} = 0,324 \pm 0,168$, $ISI_{cafeína} = 0,238 \pm 0,0457$.

5.1.7. El uso de la ecuación de Langevin y la generación de cascadas complejas como modelo explicativo de la presencia de correlaciones de largo plazo en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje interespiga.

El uso de la ecuación de Langevin y el modelo de generación de cascadas complejas, adaptados para canales iónicos, permitió generar series sintéticas con fluctuaciones de voltaje similares al segmento interespiga que se obtiene del registro intracelular de la neurona 1F. En la figura 21 se muestran dos series sintéticas con correlaciones de largo plazo que fueron confirmadas por su exponente de escalamiento α (1.067 ± 0.03 y 0.982 ± 0.04 , respectivamente). Estas series fueron obtenidas ajustando la desviación estándar del término estocástico de la ecuación de Langevin y, por otro lado, considerando un crecimiento en tasa exponencial de la conectividad entre los miembros que propagan una cascada compleja.

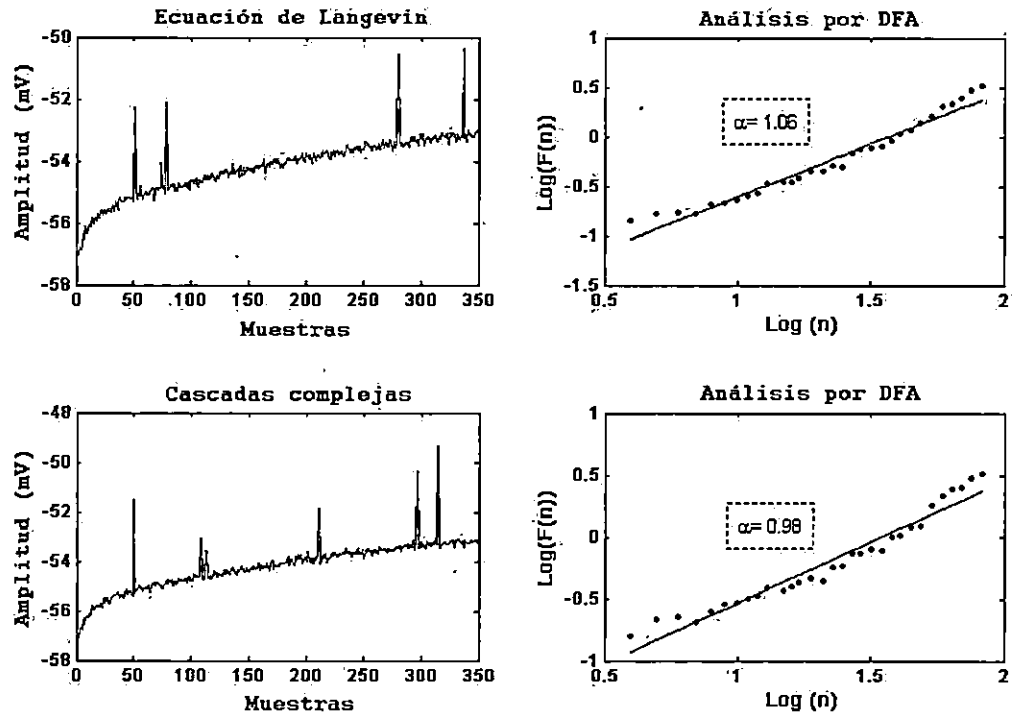


Figura 21: Series sintéticas con fluctuaciones de voltaje similares al segmento interespiga que se obtiene mediante el registro intracelular (Panel, Izquierdo). Análisis de las series sintéticas mediante la herramienta DFA. El resultado sugiere la presencia de correlaciones de largo plazo; para el uso de la ecuación de Langevin se consideraron 10^5 canales iónicos. Este mismo número de canales fue considerado para la generación de cascadas complejas y además considerando que presentan una conectividad de 0.03 (Panel, Derecho).

6. Discusión de resultados

6.1. Registros intracelulares y caracterización del ruido generado por el sistema de registro.

Al inicio de esta investigación se comparó y caracterizó la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga antes y después de realizar el registro intracelular (sin electrodo próximo a la neurona); los datos se obtuvieron a una frecuencia de muestreo de 1KHz. El conjunto de resultados que se presentan en la figura 12 muestra que las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga presentan una dinámica con correlaciones de largo plazo. Por otro lado, las fluctuaciones de voltaje antes y después de realizar el registro intracelular presentan una dinámica aleatoria, sin correlaciones.

Para comparar y corroborar los resultados previamente encontrados, el mismo experimento se repitió a una frecuencia de muestreo de 10KHz y de igual forma se estudió la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento antes y después de realizar el registro intracelular (sin electrodo próximo a la neurona). Además con este conjunto de datos se estimó su relación señal a ruido. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos, en donde la estimación de la relación señal a ruido es significativamente mayor en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga en comparación con las fluctuaciones de voltaje antes y después de realizar el registro intracelular.

De esta forma se descartó que la presencia de correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga podría ser generada por efecto del sistema de registro y adquisición de los datos. Estos resultados sugieren entonces que la presencia de correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga ofrece información funcional sobre la interacción de los mecanismos involucrados en la modulación del potencial de membrana de la neurona marcapaso.

6.2. Análisis del intervalo interespiga (ISI).

A lo largo del tiempo se ha asumido que las neuronas del sistema nervioso central codifican la información a través de cambios en la frecuencia de aparición del potencial de acción. Al respecto, el estudio de las fluctuaciones del intervalo interespiga (ISI) ha sugerido un comportamiento con correlaciones de largo plazo [2, 12, 59].

Con el fin de corroborar y comparar dichos hallazgos previos de la dinámica del intervalo interespiga, se realizó un registro continuo de la actividad eléctrica de la neurona marcapaso 1F. Los resultados que se muestran en la figura 14 sugieren un comportamiento con correlaciones de largo plazo, lo que coincide con otros trabajos en donde se reporta el mismo comportamiento. Los autores sugieren que la presencia de correlaciones de largo plazo en la dinámica del intervalo-interespiga podría estar relacionada a la frecuencia de despolarización, plasticidad neuronal y al proceso de transmisión de información [3, 13], excitación y sincronización de grupos neuronales.

6.3. Efecto de la actividad sináptica sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.

Las neuronas marcapaso se identifican por generar actividad eléctrica intrínseca generada por la interacción de diferentes poblaciones de canales iónicos, el metabolismo de segundos mensajeros y el manejo de Ca^{+2} intracelular [40, 60, 78]. Por otro lado, la modulación de estos mecanismos dada por la presencia de entradas sinápticas, también puede influir en un incremento o decremento de su excitabilidad.

Así, con el fin de explorar la posible presencia de entradas sinápticas excitadoras en la neurona marcapaso 1F y en la neurona silente 7E ambas se hiperpolarizaron a -80 mV. Con este procedimiento se logró revelar la presencia de potenciales postsinápticos excitadores para el caso de la neurona 7E, a diferencia de la neurona 1F en la que no se observan cambios en su potencial de membrana. En las figuras 15 y 16 se muestran estos resultados.

Esto permitió descartar que la actividad eléctrica de la neurona 1F es modulada por entradas sinápticas excitadoras, circunstancia que también se respalda por un mapeo topográfico de la neurona 1F que no reveló dicho tipo de entradas [14,63], (ver figura 16).

Además, se exploró el efecto de la actividad sináptica sobre dinámica de las fluctuaciones de voltaje a lo largo de la duración del registro. Para el caso de la neurona 7E hiperpolarizada se puede observar (figura 15) que, para la escala temporal en donde se aprecia un potencial postsináptico excitador, el análisis a través de la herramienta DFA indicó un incremento en la magnitud del exponente de escalamiento α . Este incremento sugiere que la actividad sináptica podía efectivamente influir e incrementar la interacción entre los mecanismos que modulan el potencial de membrana y por lo tanto la función de la neurona silente 7E.

Pero, para el caso de la neurona marcapaso 1F, no se observan cambios en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje a lo largo de la duración del registro (ver figura 16), en consistencia con la ausencia de entradas sinápticas [14,63]. Esta falta de entradas sinápticas permitió entonces dirigir la exploración del posible origen de correlaciones de largo plazo en la neurona 1F exclusivamente a la interacción de las diferentes poblaciones de canales iónicos y a el manejo de calcio intracelular tal como se discute a continuación.

6.4. Perfil de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

El estudio a detalle de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con respecto al tiempo generó como resultado la identificación de un perfil temporal. Este perfil se puede asociar a la activación de diferentes poblaciones de canales iónicos, particularmente a los canales SK cuya activación es generada por la entrada de Ca^{+2} al medio intracelular durante el potencial de acción, ya que se ha identificado que su acción se presenta durante la fase posterior a la hiperpolarización y se reconoce que la actividad de estos canales permite modular la frecuencia de aparición del potencial de acción [24–26].

El perfil temporal sugiere que la dinámica de los canales SK introduce correlaciones de largo plazo en la primera parte del perfil y este comportamiento podría ser modulado por la entrada de Ca^{+2} al medio intracelular. Por otro lado la parte central de perfil con pérdida de correlaciones de largo plazo podría estar modulada por la dinámica de canales de potasio K_v y canales GIRK [27–29]. Esta ausencia de correlaciones se mantiene hasta el punto en donde los canales (Na_v , Ca^{+2} de tipo L y N) son activados para generar la fase de despolarización del potencial de acción [27,30,31], lo que introduce nuevamente correlaciones de largo plazo en la parte final del perfil temporal. En la figura 17 se muestran estos resultados.

Es así entonces como los cambios en el exponente de escalamiento α parecen reflejar la interacción entre las diferentes poblaciones de canales iónicos inmersos en la generación de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. Para indagar más sobre esto, se realizó la perturbación del manejo de Ca^{+2} intracelular a través del bloqueo aproximado del 60 % de la corriente de Ca^{+2} con la solución salina cadmio [32], lo que resultó en la modificación del perfil temporal de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje.

El uso de la solución salina de cadmio generó un decremento significativo del parámetro α al inicio del perfil y en menor grado al final. Lo que permitió identificar que estos efectos son probablemente generados por la perturbación específica de la dinámica de los canales SK y Ca_v (ver figura 17).

Para explorar el efecto opuesto, se aprovechó el uso de la solución salina cafeína ocasionando la liberación de Ca^{+2} de los compartimientos intracelulares y de esta forma la perturbación de su regulación [33,34]. Con esto se encontró como primer resultado un incremento en la frecuencia de aparición del potencial de acción. Y al hacer una inspección en el perfil temporal de la dinámica de las fluctuaciones de voltaje se observó un incremento o mantenimiento del exponente de escalamiento α a lo largo de la duración del segmento interespiga (ver figura 17).

Este incremento podría entonces ser ocasionado por la falta de regulación de los mecanismos intracelulares que dependen de Ca^{+2} , en donde las constantes de activación de estos mecanismos podrían estar traslapadas [35,36], y cubrir un amplio rango de escalas temporales [37], lo que da lugar a un incremento o mantenimiento del exponente de escalamiento α . Uno de estos mecanismos podría ser la no inactivación de los canales SK cuya dinámica podría estar presente a lo largo de toda la duración del segmento interespiga.

Por otro lado, se exploró una posible asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos interespiga a través de la estimación del coeficiente de determinación. Así, para la solución salina normal, se encontró que cerca del 70 % de los cambios que se observan en la frecuencia de aparición del potencial de acción se vinculan a la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga. Por otro lado, para el caso de la solución salina cadmio se encontró que se reduce esta asociación al 40 % y es aun más notable para la solución salina cafeína que se redujo al 20 %. Estos resultados indican una relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y el intervalo interespiga (ISI), que se ha considerado como el mecanismo de codificación de la información neuronal y que de acuerdo a dichos resultados esta asociación funcional es mediada por el manejo de Ca^{+2} intracelular, (ver figuras 19 y 20).

Finalmente, es importante resaltar que al estimar un único exponente de escalamiento α para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, no se ofrece información sobre los momentos en donde se presenta un mayor o menor grado de correlaciones [72,79]. Por lo anterior, fue necesario realizar un análisis con mayor resolución temporal como también se han realizado en otros trabajos en donde se identifican cambios temporales de la dinámica [23].

6.5. Ecuación de Langevin y modelo de cascadas complejas.

El empleo de modelos físicos-biológicos ha ayudado a comprender en mayor medida el funcionamiento de sistemas, así como también la interacción de sus componentes. Aquí, mediante el uso de la ecuación de Langevin y el modelo de cascadas complejas se logró reproducir las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga con correlaciones de largo plazo. Lo que permite sugerir y sustentar que el posible origen de las correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga es generado por la interacción de canales iónicos.

Este resultado coincide con la idea de identificar un sistema críticamente auto-organizado, en donde los componentes del sistema trabajan de forma individual hasta un punto *umbral* en donde se generan cascadas o avalanchas que surgen por la interacción de sus componentes [22,45]. De esta forma, la distribución espacial y temporal de dichas cascadas se caracteriza por presentar una ley de potencial que describe el comportamiento dinámico del sistema [80], (ver figura 21).

Algunos trabajos sugieren que la actividad eléctrica en el sistema nervioso central, podría considerarse de manera similar como una especie de avalancha neuronal, en la que la actividad eléctrica se propaga cuando las neuronas individuales generan el potencial de acción en las neuronas subsiguientes a través de las entradas sinápticas [9, 81]. Los resultados de esta tesis podrían sugerir que un sistema críticamente auto-organizado se manifestaría a nivel de una sola neurona (ver figura 21).

7. Conclusiones

Tradicionalmente se han considerado a las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga como un error en la medición o como ruido de fondo generado por el sistema de registro, por lo que a menudo estas fluctuaciones son filtradas y excluidas del análisis final de los datos para enfocarse en los valores promedios considerados como los que mejor describen al sistema.

Por el contrario, los resultados obtenidos en esta tesis muestran claramente la presencia de correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, que parecen ser generadas por la interacción de las diferentes poblaciones de canales iónicos que modulan el potencial de membrana.

La principal contribución de este trabajo fue identificar una relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y el intervalo interespiga (ISI) de la actividad eléctrica de tipo marcapaso, que se considera como medio de adaptación, transmisión y codificación de la información neuronal [19, 20].

De esta forma, la presente investigación provee hallazgos que indican una relación funcional entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y el intervalo temporal interespiga (ISI) y que funcionalmente está mediada por el manejo de Ca^{+2} intracelular.

8. Limitaciones

La limitación de este trabajo se encuentra al no confirmar que los canales SK introducen específicamente correlaciones de largo plazo en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, ya que no fue posible el bloqueo específico de los canales SK. Sin embargo, se considera que de forma indirecta sí se perturbó su dinámica lo que llevó a modificar la asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga y los intervalos temporales interespiga (ISI) que se ha considerado como el mecanismo de codificación y transmisión de la información a lo largo del sistema nervioso central [13].

9. Trabajo a futuro

- Identificar la posible presencia de otras características como no-linealidad, direccionalidad y multifractalidad en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, para así comprender en mayor medida el tipo de interacción de los componentes que modulan su dinámica [82-84].
- Indagar con mayor profundidad los posibles mecanismos que están involucrados en generar la asociación entre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje y los intervalos interespiga, bajo el uso de bloqueadores específicos para canales iónicos; en particular el uso de apamina para el bloqueo de canales SK y tertiapina-q para canales GIRK [85, 86].

- Realizar mediciones del cambio en la concentración de calcio intracelular con respecto al curso temporal de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga, con el fin de evaluar el efecto del calcio sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje [87, 88].
- Estudiar la dinámica de las fluctuaciones de voltaje interespiga de la neurona marcapaso 1F bajo cultivo y explorar el efecto del tipo de sustrato en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje, ya que se reconoce que el tipo de sustrato puede afectar el comportamiento de las diferentes poblaciones de canales iónicos así como la morfología y función de las neuronas [89, 90].
- Explorar con mayor detalle el efecto de la actividad sináptica sobre la dinámica de las fluctuaciones de voltaje y tratar de identificar a la cascada de posibles mecanismos que se activan debido a el efecto del neurotransmisor, y que dan lugar a una dinámica no aleatoria en las fluctuaciones de voltaje en el potencial de membrana de neuronas silentes [3, 9].
- Explorar en mayor medida los modelos físicos-biológicos en donde se asocie la dinámica de las fluctuaciones de voltaje con los intervalos interespiga, y vincular el efecto de la actividad sináptica sobre esta relación [22, 75].

10. Artículos publicados

- Seseña-Rubfiaro A., Echevarría J.C., Godínez-Fernández J.R., (2014). Fractal-like correlations of the fluctuating inter-spike membrane potential of a *Helix aspersa* pacemaker neuron. *Comput Biol Med.* 53, 258-264.
- Seseña-Rubfiaro A., Godínez-Fernández J.R., Echevarría J.C., (2017). Relationship of pacemaker neurons between the long-term correlations of membrane voltage fluctuations and the duration of the inter-spike interval. *J. Membr Biol.* 250, 249-257.

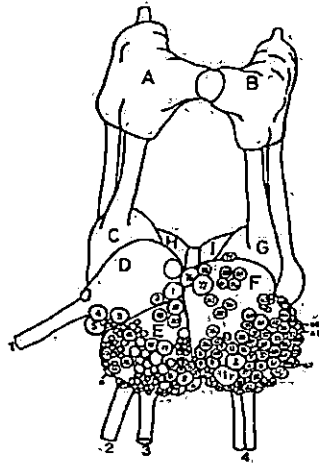


Figura 22: A) Diagrama esquemático de la masa ganglionar periesofágica, se muestra la posición de la neurona marcapaso 1F, y la neurona silente con entras sinápticas 7E, imagen tomada de Kerkut et al. 1975.

11. Anexo A: Disección del espécimen *Helix aspersa*

Los especímenes utilizados fueron hidratados con agua simple 72 horas antes del inicio de cada experimento. La disección se desarrolló de la siguiente manera.

1. Se extrajo cuidadosamente la masa nerviosa ganglionar sub y periesofágica.
2. La masa ganglionar se colocó y se fijó con alfileres de disección sobre una caja petri cuyo fondo se encuentra recubierto por una capa de PDMS (polidimetilsiloxano) de la marca Sylgard 184.
3. La fijación fue con la cara dorsal expuesta con el fin de identificar la estructura de la masa ganglionar y observar los cuerpos neuronales, cabe mencionar que la caja de petri debe contener solución salina normal con la siguiente composición: NaCl 75 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM y HEPES 5 mM, con pH de 7.5 ajustado con NaOH a 1M.
4. Utilizando un microscopio estereoscópico de American Optical y material de microdisección se procedió a retirar la membrana del tejido conectivo que envuelve a la masa ganglionar.
5. Esta remoción se realizó con tijeras para microdisección, iniciando por el lado izquierdo de la masa ganglionar sobre el nervio 2 y rebordeando hacia el lado posterior del ganglio E, G y F, hasta la zona de emergencia del nervio 4, ver figura 22.
6. Se cortó cuidadosamente el tejido conectivo adosado a los nervios 1-4 son cortar estos nervio, posteriormente se aplicó proteasa tipo XIV a una concentración de 5 mg/10 ml en solución salina normal durante un intervalo de 10-15 min a temperatura ambiente, con el propósito de reblandecer la segunda capa de tejido conectivo que cubre directamente las neuronas.
7. Se lavó la preparación con salina normal para detener la acción de la enzima y se procedió a remover esta última capa de tejido con pinzas para microdisección para así exponer las neuronas del ganglio F en particular la neurona marcapaso 1F.

12. Anexo B: Relación de la función de auto-correlación con el exponente de escalamiento α .

La intención de realizar un estudio de la dinámica de las fluctuaciones en una serie de tiempo es identificar una posible interacción de los mecanismos que darían origen a la serie, de tal forma que se buscan características como auto-afinidad y/o una relación de escala dada por una ley de potencia [91, 92]. Estos parámetros a su vez se relacionan con la función de auto-correlación $R_{xx}[k]$, la cual permite determinar en qué medida el valor actual de la serie $x[i]$ depende de sus valores previos $x[i-k]$.

$$R_{xx}[k] = \sum_{i=-\infty}^{\infty} x[i]x[i-k] \quad (6)$$

en donde k representa cualquier valor entero $-\infty \leq k \leq \infty$. Para series generadas a partir de las permutaciones aleatorias de sus valores, la función de auto-correlación $R_{xx}[k]$ es 0 para $x[i-k]$ [92].

Por otro lado, para series que presentan correlaciones de corto plazo, la función de auto-correlación decae exponencialmente $R_{xx}[k] \approx \exp(-\tau_0)$ en donde $\tau_0 = x[i-k] / x[i-k_0]$, para series con una escala de tiempo característica .

Finalmente, en series que presentan correlaciones de largo plazo, la función de auto-correlación se comporta en forma de una ley de potencia $R_{xx}[k] \approx \tau^{-\gamma}$ para $\tau = x[i-k]$. Así, la relación entre α y γ ésta dada por $\alpha = 1 - (\gamma/2)$ [92].

Un exponente de escalamiento α con valores cercanos a 0.5 indica que las fluctuaciones de la serie son aleatorias no presenta correlaciones de largo plazo. Para valores de α cercanos a 1 la serie presenta correlaciones de largo plazo (es decir, los valores actuales de las serie están correlacionados estadísticamente no sólo con valores inmediatamente anteriores sino también con valores de tiempo previos, lo que revela un comportamiento no aleatorio o con estructura temporal). Para valores de α cercanos o mayores a 1.5 la serie presenta correlaciones que tienden a manifestarse en ciertas escalas de tiempo particulares, debido a que las fluctuaciones de la serie son más regulares [21, 42].

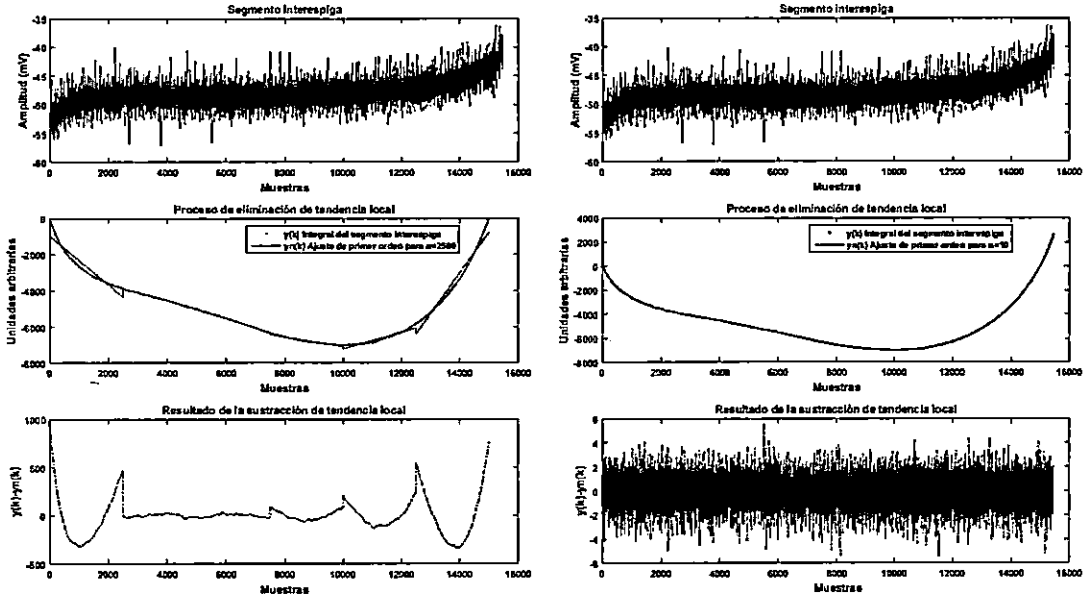


Figura 23: Proceso de eliminación de tendencia en las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga para $n=2500$ y $n=10$ muestras.

13. Anexo C: Análisis de las fluctuaciones sin tendencia

El método de análisis de fluctuaciones sin tendencia (DFA) ha demostrado ser útil para exhibir la presencia de correlaciones de largo plazo en las series de tiempo a través de la estimación del exponente de escalamiento α , que se considera refleja las interacciones de los mecanismos que generan la serie de datos. Una de las razones por la cual se utiliza este método es que evita la falsa detección de correlaciones de largo plazo, que podrían ser generadas por la no estacionalidad de la serie de datos [21, 72].

Primero, la serie de datos original es integrada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y(k) = \sum_{i=1}^k [y(i) - \bar{y}] \quad (7)$$

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

Posteriormente, la serie integrada es dividida en segmentos independientes del mismo tamaño n que comprende al número de muestras y que abarcan una escala de tiempo particular. En este conjunto de muestras se realiza un ajuste por mínimos cuadrados para generar $y_n(k)$ y con el cual se sustrae la tendencia local de la serie integrada $y(k)$, ver figura 23.

La fluctuación cuadrática media $F(n)$ puede ser calculada de la siguiente forma:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{L} * \sum_{k=1}^L [y(k) - y_n(k)]^2} \quad (8)$$

Este procedimiento se repite para un conjunto amplio de valores de n , obteniéndose una relación que se aproxima a una ley de potencia $F(n) = n^\alpha$. Así, el exponente de escala α se estima por la

pendiente obtenida a partir de la la representación logarítmica entre las variables $F(n)$ y n .

Un exponente de escalamiento α con valores cercanos a 0.5 indica que las fluctuaciones de la serie son aleatorias no presenta correlaciones de largo plazo. Para valores de α cercanos a 1 la serie presenta correlaciones de largo plazo (es decir, los valores actuales de las serie están correlacionados estadísticamente no sólo con valores inmediatamente anteriores sino también con valores de tiempo previos, lo que revela un comportamiento no aleatorio o con estructura temporal). Para valores de α cercanos o mayores a 1.5 la serie presenta correlaciones que tienden a manifestarse en ciertas escalas de tiempo particulares, debido a que las fluctuaciones de la serie son más regulares [21, 42].

14. Anexo D: Cascada compleja y Ecuación de Langevin.

14.1. Cascada compleja (Sistema críticamente auto-organizado)

De acuerdo al modelo de Brunk la probabilidad P_{cc} de continuar una cascada compleja está dada por la siguiente ecuación:

$$P_{cc} = \frac{(n-r)^g}{N-r} \quad (9)$$

En donde N es el total de miembros en el sistema, n representa al número de miembros que pueden transmitir una cascada, r es el número de miembros que actualmente toman parte de la cascada y g representa la conectividad entre los miembros de la cascada [35].

- $N = 10^5$; Número de canales iónicos.
- $r \leq n \leq N$; En donde n y r son un número aleatorio de canales iónicos.
- $g = 7,5$; Conectividad entre canales iónicos (ajuste empírico).
- $V_{rmax} = 4mV$; Cambio de voltaje máximo en el segmento interespiga desde la etapa de hiperpolarización hasta el umbral de disparo del potencial de acción.
- $V_{canal} = 0,00004mV$; Contribución de voltaje por canal al segmento interespiga.
- $\Delta V = N * P_{cc} * V_{canal}$; Cambio de voltaje en el potencial de membrana.
- $V_r = A1 * e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A2 * e^{\frac{-t}{\tau_2}} + A3 * e^{\frac{-t}{\tau_3}} + M * \tau + C$; Función de ajuste para simular la tendencia de un segmento interespiga típico. En donde $A1 = -9,20529$; $A2 = 0,53177$; $A3 = -1,45376$; $\tau_1 = -670,149$; $\tau_2 = -170,821$; $\tau_3 = 12,498$; $M = 0,02436$; $C = -46,5285$.
- $V_m = V_r + \Delta V + \xi$; Fluctuaciones del voltaje del segmento interespiga con una dinámica no aleatoria, en donde ξ representa ruido aleatorio con una distribución normal (0, 1).

14.2. Ecuación de Langevin.

La ecuación de Langevin considerada como una ecuación diferencial que gobierna la dinámica del potencial de membrana interespiga V_m [75, 76] y es generado por lo siguiente:

$$\frac{dV_m(t)}{dt} = L(V_m, t) + \Gamma_i(V_m, t) \quad (10)$$

En donde $L(V_m, t) = \frac{V_0 - V_m}{\tau_m}$ o $L(V_m, t) = A$ siendo A una constante; en ambos casos el modelo responde de la misma forma respecto a datos aleatorios. $\Gamma_i(V_m, t)$ es un parámetro estocástico con distribución Gaussiana delta correlacionada que se caracteriza por μ y σ [93].

Se utilizó la ecuación de Fokker-Planck para obtener la solución de parámetro estocástico de la ecuación de Langevin [75]:

$$\frac{\partial P(V_m, t)}{\partial t} = \frac{\sigma^2}{2} * \frac{\partial^2 P(V_m, t)}{\partial V_m^2} - \left(\mu - \frac{(V_0 - V_m)}{\tau_m} \right) * \frac{\partial P(V_m, t)}{\partial V} - \frac{1}{\tau_m} * P(V_m, t) \quad (11)$$

En donde $V_0 = V_m$ para $t = 0$, $\tau_m =$ Constante de la membrana, $P(V_m, t) =$ Distribución de probabilidad.

La siguiente ecuación muestra la solución normalizada de la función de probabilidad para el parámetro estocástico [75, 93].

$$P_N(V_m, t) = \frac{P}{\sqrt{\pi * \epsilon * \alpha_0}} * \frac{e^{-tb_0}}{\sqrt{1 - \gamma^2(t)}} * \exp\left[-\frac{1}{1 - \gamma^2(t)} * \left(\frac{P * r_0}{2 * b_0 * \sqrt{\epsilon * \alpha_0}} - \gamma(t) * P * z\right)^2\right] \quad (12)$$

En donde $-57\text{mV} \leq V_m \leq -53\text{mV}$ son valores típicos para las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga.

- τ_m ; Constante de membrana.
- C ; Conectividad entre canales iónicos.
- M ; Número total de canales iónicos.
- J ; Contribución de voltaje del potencial de membrana por la población de canales iónicos.
- v ; Frecuencia de apertura del canal iónico.
- ϵ Duración de la función delta.
- $\gamma(t) = e^{-tb_0}/2 * b_0 * \sqrt{\epsilon * \alpha_0}$
- $\mu = C * M * v * J$
- $\sigma^2 = C * M * v * J^2$
- $b_0 = 1/\tau_m$
- $a_0 = (\mu * \tau_m - v_i)/\tau_m$
- $P = 1/\sigma * \sqrt{b_0}$
- $\alpha_0 = P^2 + 1/(4 * b_0^2 * \epsilon)$
- $z = a_0 + b_0 * V_m$
- $\Delta V = P_v * V_{rmax}$ En donde P_v es un valor aleatorio de $P_N(V_m, t)$
- $V_m = V_r + \Delta V + \xi$ Fluctuaciones del voltaje del segmento interespiga con una dinámica no aleatoria, en donde ξ representa ruido aleatorio con una distribución normal (0, 1).

Se utilizarán los siguientes valores para la simulación: $\epsilon = 10^{-8}\text{ms}$, $C = 1$, $M = 10^5$, $J = 0,1\text{mV}$, $\mu\tau_m = 45\text{mV}$, $\sigma^2\tau_m = 4,5\text{mV}^2$, $\tau_m = 15\text{ms}$ [94]

15. Anexo E: Canales SK, Ca²⁺ tipo L , N y GIRK.

Gracias al estudio de la actividad eléctrica neuronal en diversas especies biológicas, como 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 [95,96]. 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/o complejo [63,95,97].

En esta investigación se identificó y seleccionó a la neurona 1F que presenta las siguientes ventajas: su actividad eléctrica es de tipo marcapaso; se conocen varios de los mecanismos involucrados en la modulación de su potencial de membrana; esta neurona no presenta entradas sinápticas [14], no obstante, si tiene receptores a sustancias neuromoduladoras; la ubicación topográfica permite el fácil manejo del tejido nervioso, además de que su diámetro oscila entre los 100-200 μm , lo que permite su fácil identificación y su registro intracelular [57].

El estudio a profundidad de estas neuronas, ha permitido conocer varios de los mecanismos involucrados en la modulación de su potencial de membrana, entre los mecanismos reportados se encuentran los canales de $\text{Kv}_{1,1-1,6}^+$ y $\text{Nav}_{1,2}^+$ dependientes de voltaje [27,67]. Así, mismo se conoce que dicha neurona presenta canales BK_1 (con alta dependencia al voltaje y baja dependencia a la concentración de Ca^{2+} intracelular), canales SK2 y SK3 (con baja dependencia al voltaje y alta dependencia a la concentración de Ca^{2+} intracelular) [68,69], canales de $\text{Ca}_{1,2}^{2+}$ de tipo L, canales de $\text{Cav}_{2,2}^{2+}$ de tipo N y $\text{P/Q}_{2,1}$ [27], y también canales GIRK2 [27,29,70].

Dentro de los principales canales iónicos que se consideran podrían tener un efecto significativo en la dinámica de las fluctuaciones de voltaje en el segmento interespiga se encuentran, los canales SK, Ca^{2+} de tipo L y N. A continuación se describen algunas de las propiedades de estos mecanismos.

15.1. Canales SK

Los canales SK conocidos también como canales de pequeña conductancia han sido encontrados en miocitos ventriculares de mamífero, músculo esquelético, músculo liso de la vejiga urinaria, y son también ampliamente expresados en el sistema nervioso [98-101]. Los canales SK presentan una conductancia aproximada entre los 10-20 pS. A diferencia de los canales BK, no son afectados por bajas concentraciones de TEA (tetraetil amonio), charybdotoxina o iberiotoxina. Sin embargo, son bloqueados de forma específica por apamina, sustancia extraída del veneno de abeja [85], tubocurarina y bicuculina [102]. Su activación está dada exclusivamente por un incremento en la concentración de calcio intracelular en un rango máximo de 400-800 nM [103,104]. La activación de estos canales origina una corriente denominada *corriente media de potasio* la cual se presenta durante la fase de hiperpolarización (mAHP) [105,106].

15.2. Estructura de los canales SK

Los canales SK son codificados por el gen denominado *KCNN1-3* [101] con una terminal C y N citoplasmática. El canal SK presenta una topología similar a la familia de canales de potasio activados por voltaje (Kv). Estos canales consisten en seis segmentos transmembranales (S1-S6) con el poro localizado entre S5 y S6. El segmento S4 corresponde al sensor de voltaje que es similar al de los canales de potasio dependientes de voltaje. Además, en la terminal C se encuentra acoplada la proteína calmodulina (CaM) que es el sitio de activación del canal, seguido de un co-ensamble con la proteína fosfatasa A (PP2A) y la proteína quinasa A (CK2) que tienen una influencia opuesta en la actividad del canal [16,26]. La CK2 fosforila a CaM reduciendo la sensibilidad al calcio intracelular, mientras que PP2A ejerce un efecto de desfosforilación en CaM incrementando la sensibilidad al calcio

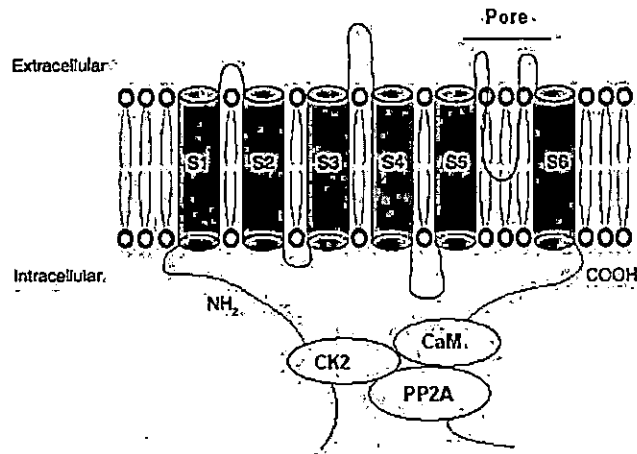


Figura 24: Topología del canal SK incrustado en la membrana celular [15,16].

intracelular [15,25] figura 24.

15.3. Canales de Ca^{2+} .

Se ha considerado que la vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones de Ca^{2+} a través del poro del canal, lo queda lugar a una gran variedad de procesos entre los que se encuentra la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, actúa como segundo mensajero en la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, etc. Así, los canales de Ca^{2+} constituyen el enlace fundamental entre la modulación de señales eléctricas y el metabolismo intracelular [107,108].

15.3.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} son proteínas oligoméricas, constituidos por una subunidad principal α_1 , que sirve como poro y sensor del cambio de potencial y diversas subunidades reguladoras o auxiliares tales como β , $\alpha_2\sigma$, p95 [109]. Con un tamaño de 2000 aminoácidos, la subunidad α_1 tiene la misma estructura general que los canales de Na^+ dependientes de voltaje [110]; está constituida por 4 dominios, los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembranales. El cuarto de estos segmentos, se encuentra altamente cargado por lo que se considera es la zona que actúa como sensor de los cambios de potencial, mientras que el quinto y sexto segmento forman parte de poro del canal [111], en la figura 25 se muestra un bosquejo de la estructura del canal.

15.3.2. Canales de Ca^{2+} tipo L

Los canales de Ca^{2+} se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables. Constituyen la principal vía de entrada de iones de Ca^{2+} . Su activación es voltaje dependiente cercano a los -30 mV, el curso temporal de su inactivación puede depender de 1) el ion que pasa a través del canal (los iones de Ca^{2+} la aceleran y los iones de Ba^{2+} la enlentecen), 2) los quelantes de Ca^{2+} intracelular enlentecen su inactivación, 3) la inactivación depende de la amplitud de la corriente (cuando más grande, más rápida la inactivación). Por lo tanto, la inactivación de estos canales depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular y del potencial de membrana [112].

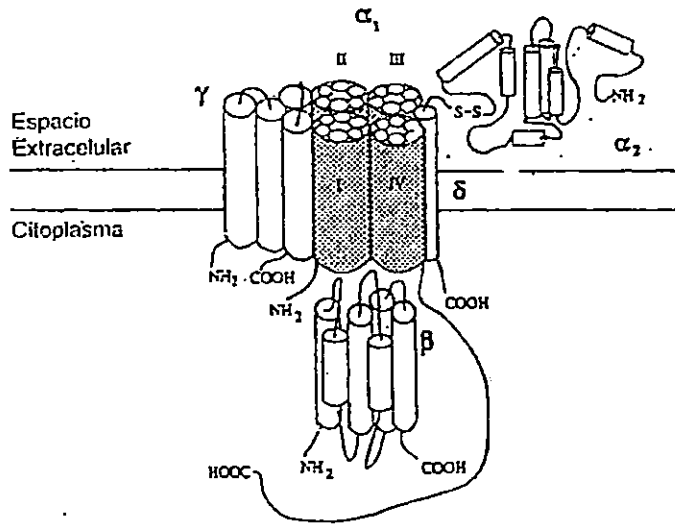


Figura 25: Se muestra un bosquejo de la estructura tridimensional del canal del Ca^{2+} dependiente de voltaje, así como la posible asociación con las distintas subunidades que lo conforman [17].

15.3.3. Canales de Ca^{2+} tipo N

Los canales de tipo N, se denominan así porque parecen ser específicos del sistema nervioso y de tejidos relacionados con éste, puesto que solo se han descrito en células de origen nervioso [113]. Debido a la variabilidad de la conductancia de canal único (11-20 pS), de su cinética de apertura y del curso temporal de su inactivación (50-80 ms en neuronas del ganglio dorsal de pollo) es difícil diferenciar por métodos electrofisiológicos los canales de tipo N de otros canales de Ca^{2+} que se activan cerca de -30mV [114].

15.4. Canales GIRK

Los canales rectificadores de corriente entrante de potasio acoplados a la proteína G o canales GIRK se han expresado en corazón, en el sistema nervioso central y en su periferia, así como en tejido endócrino de mamífero. Hasta este momento se han encontrado cuatro tipos de canales los cuales se han denominado Kir3.1-4 [115]. En células cardíacas los canales GIRK presentan una conductancia aproximada de 50 pS con alta concentración de potasio en el medio extracelular 300mM [96]. Los canales GIRK se mantienen abiertos a un nivel basal. Sin embargo, su máxima activación está dada por la unión de un neurotransmisor con el receptor de la proteína G. Dentro de las sustancias que podrían bloquear estos canales se encuentra el Cs^+ , Ba^{2+} , poliaminas como la espermina y bloqueadores específicos como tertiapina-q extraído del veneno de abeja [86, 116, 117].

15.5. Estructura de los Canales GIRK

La estructura primaria de los canales GIRK está caracterizada por dos dominios transmembranales (M1, M2) con la región del poro (P) entre ambos dominios, además cuenta con una terminal N y C citoplasmática. La terminal amino y carboxil contienen dominios que interactúan con las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ regulando la apertura del canal [18] figura 26.

15.6. Activación de los Canales GIRK

La activación de los canales GIRK es llevada a cabo bajo la unión de un neurotransmisor con el receptor (GPCR) de la proteína G la cual está asociada al sensor G_i/o que se acopla a la subunidad

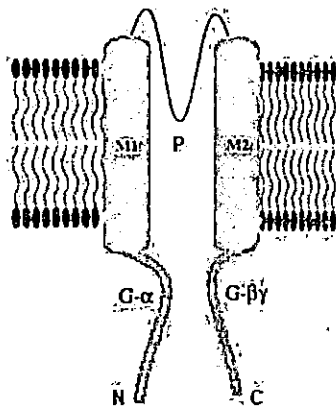


Figura 26: Topología del canal GIRK incrustado en la membrana celular [18].

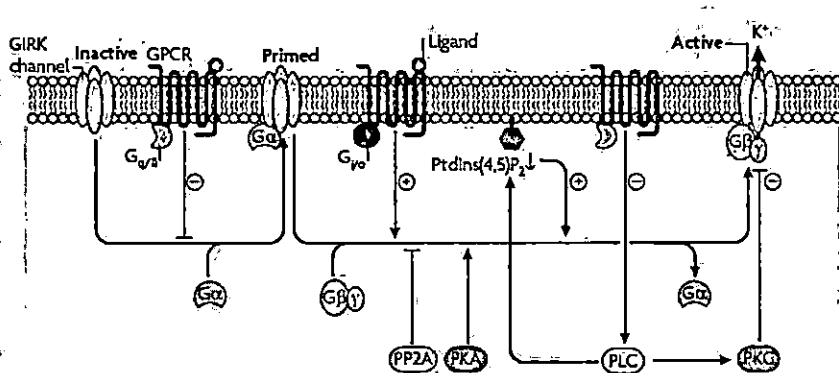


Figura 27: Mecanismo de activación del canal GIRK [15].

$G\beta\gamma$ para mediar la activación del canal GIRK. Mientras este proceso se lleva a cabo la subunidad $G\alpha$ se encuentra acoplada a la compuerta del canal lo que facilita la unión de la subunidad $G\beta\gamma$ para así incrementar la conductancia del canal. Por otro lado, la activación de la proteína quinasa A (PKA) y un incremento en la concentración del fosfolípido PtdIns(4,5) o (Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) incrementa la conductancia del canal [115, 118, 119].

La reducción de la conductancia del canal puede ser generada por la activación de la subunidad ($G_q/11$), la cual activa a la fosfolipasa C (PLC) que al mismo tiempo activa a la proteína quinasa C y disminuye la concentración del PtdIns(4,5). Por otro lado la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) genera este mismo efecto. Dentro de los neurotransmisores que activan a los canales GIRK se encuentran los de tipo muscarínico (M2), ácido gamma-aminobutírico (GABA), serotonina (5HT1A), adenosina (P1), somatostatina, opioides, adrenergicos y dopamina [15, 70, 120]. Así, bajo este mecanismo el canal GIRK despolariza la membrana modulando la excitabilidad neuronal figura 27.

Referencias

- [1] Derksen H. E. Verveen A. A. Fluctuations of resting neural membrane potential. *Science*, 151:1388–1389, 1966.
- [2] Stratimirović D.j. Ljubisavljević M. Blesić S., Milošević S. Detrended fluctuation analysis of time series of a firing fusimotor neuron. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 268:275–282, 1999.
- [3] Garcia-Perez E. Bonifazi P. Ruaro M.E. Torre V. Mazoni A., Broccard F.D. On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks. *Plos One*, 2(5):e439, 2007.
- [4] Derksen H. E. Verveen A. A. Fluctuation phenomena in nerve membrane. *Proceedings of the IEEE*, 56:906–916, 1968.
- [5] Denis J. M. Poussart. Membrane current noise in lobster axon under voltage clamp. *Biophys J.*, 11:211–234, 1971.
- [6] Derksen H. E. Verveen A. A. Fluctuations in membrane potential of axons and the problem of coding. *Biological Cybernetics*, 2:152–160, 1965.
- [7] Abeles M. Lass Y. Transmission of information by the axon: Noise and memory in the myelinated nervefiber of the frog. *Biological Cybernetics*, 19:61–67, 1975.
- [8] Thivierge J-P Breakspear M. Rubinov M., Sporns O. Neurobiologically realistic determinants of self-organized criticality in networks of spiking neurons. *PLoS Comput Biol*, 7:1–14, 2011.
- [9] Mamelak A. M. Schuman E. M. Bhattacharya J., Edwards J. Long-range temporal correlations in the spontaneous spiking of neurons in the hippocampal-amygdala complex of humans. *Neuroscience*, 131:547–555, 2005.
- [10] Inoue T. Muscha T., Takeuchi H. 1/f fluctuations in the spontaneous spike discharge intervals of giant snail neuron. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 30:194–197, 1983.
- [11] Moore P. G. Douglas J. Interspike-interval fluctuations in alypsia pacemaker neurons. *Biophysical Journal*, 6:411–434, 1966.
- [12] Larsen P.D. Barman S.M. Lewis C.D., Gebber G.L. Long-term correlations in the spike trains of medullary sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.*, 85(4):1614–1622, 2001.
- [13] Degos B. Deniau J.M. Martinerie J. Pezard L. Robin K., Maurice N. Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: a case study for methodological comparison. *J. Neurosci. Methods.*, 179(1):142–149, 2009.
- [14] Walker R.J. Kerkut G.A., French M.C. The location of axonal pathways of identifiable neurones of helix aspersa using the dye procion yellow m-4r. *Comp. Biochem. Physiol.*, 32:681–690, 1970.
- [15] Adelman J. P. Lujan R., Maylie J. New sites of action for girk and sk channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7:475–480, 2009.
- [16] Sah P. Faber E.S. Functions of sk channels in central neurons. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34(10):1077–1083, 2007.
- [17] Zavaleta A.I. Izaguirre V. Canales de calcio voltaje dependientes. Ciencia e investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- [18] Herlitze S. Mark M. D. G-protein mediated gating of inward-rectifier k+ channels. *Eur J Biochem.*, 267:5830–6, 2000.

- [19] Longtin A. Benda J., Maler L. Linear versus nonlinear signal transmission in neuron models with adaptation currents or dynamic thresholds. *J. Neurophysiol.*, 104(5):2806–2820, 2010.
- [20] Schwalger. Patterns of interval correlations in neural oscillators with adaptation. *Front. Comput. Neurosci.*, 7:1–8, 2009.
- [21] Stanley H.E. Golberger A.L. Peng C.K., Havlin S. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time-series. *Chaos*, 5(1):82–87, 1995.
- [22] Wiesenfeld K. Bak P., Tang C. Self-organized criticality: An explanation of $1/f$ noise. *Phys. Rev. Lett.*, 59(4):381–384, 1987.
- [23] Farmer S.F. Berthouze L. Adaptive time-varying detrended fluctuation analysis. *J. Neurosci Methods*, 209(1):178–188, 2012.
- [24] Rivard A. Wayman G. Johnson-Pais T. Keen J.E. Ishii T. Hirschberg B. Bond C.T. Lutsenco S. Maylie J. Adelman J.P. Xia X.M., Fakler B. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701):503–507, 1995.
- [25] Stocker M. Ca^{2+} -activated K^{+} channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10:758–770, 2004.
- [26] Sah P. Adelman J.P., Maylie J. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Ann. Rev. Physiol.*, 74:245–269, 2012.
- [27] Pes N. Peres-Bruzón R.N. Aisa J. Junquera C. Maestú C. Lahoz M. Martínez-Ciriano C. Vera-Gil A. Del Moral A. Azanza M.J., Pérez-Castejón C. Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in *Helix aspersa* suboesophageal brain ganglia neurons. *Histol. Histopathol.*, 23(4):397–406, 2008.
- [28] Carrasquillo Y.-Nerbonne J.M. Herzog E.D. Granados-Fuentes D., Norris A. J. $I(a)$ channels encoded by $Kv1.4$ and $Kv4.2$ regulated neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms in locomotor activity. *J. Neurosci.*, 32(29):10045–10052, 2012.
- [29] Raehal K.M. Kaltenbronn K.M.-Bohn L.M. Mennerick S.J. Blumer K.J. Zhou H., Chisari M. Girk channel modulation by assembly with allosterically regulated rgs proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109(49):19977–19982, 2012.
- [30] Tsuda Y. Wilson D.L. Brown A.M., Morimoto K. Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspersa*. *J. Physiol.*, 320:193–218, 1981.
- [31] Bean B.P. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6:451–465, 2007.
- [32] Green G.G. Sanders D.J. Bal R., Janahmadi M. Effect of calcium and calcium channels blockers on transient outward current of $f76$ and $d1$ neuronal soma membranes in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *J. Membr. Biol.*, 173(3):179–185, 2000.
- [33] Collis R. Effects of caffeine on snail (*Helix aspersa*) neurons. *Neurophysiology*, 29:286–286, 1997.
- [34] Thomas R.C. Calcium content of the endoplasmic reticulum of snail neurones releasable by caffeine. *Cell Calcium*, 53(2):120–124, 2013.
- [35] Brunk G. G. Understanding self-organized criticality as a statistical process. *Complexity*, 5:26–33, 2000.
- [36] Peng C.K. Hopp B. Fluctuations and fractal noise in biological membranes. *J. Membr Biol.*, 177(3):177–185, 2000.

- [37] Angulo-Brown F. Guzmán-Vargas L. Simple model of the aging effect in heart interbeat time series. *Physical Review E*, 67:1–4, 2003.
- [38] Arshavsky Y. I. Cellular and network properties in the functioning of the nervous system: from central pattern generators to cognition. *Brain Res Brain Res Rev.*, 41:229–267, 2003.
- [39] Draguhn A. Buzsaki G. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304:229–267, 2004.
- [40] Pena F. Ramirez J.-M., Tryba A. K. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Current Opinion in Neurobiology*, 14:665–674, 2004.
- [41] Llinas RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242:1654–1664, 1988.
- [42] West B. J. Fractal physiology and fractional calculus: a perspective. *Front. Physiol.*, 1(12):1–17, 2010.
- [43] Stratimirović D.j. Ljubisavljević M. Blesić S., Milošević S. Detecting long-range correlations in time series of dorsal horn neuron discharges. *Annals. N.Y. Acad. Sci.*, 1048:385–391, 2005.
- [44] Holden J. Van Orden G. Kello T., Beltz B. The emergent coordination of cognitive function. *Journal of Experimental Psychology*, 136:551–568, 2007.
- [45] Copelli M. Gollo L.L., Kinouchi O. Single-neuron criticality optimizes analog dendritic computation. *Sci. Rep.*, 3:3222, 2013.
- [46] Cerutti S. Signorini M.G. Lamanna J., Malgaroli A. Detection of fractal behavior in temporal series of synaptic quantal release events: a feasibility study. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2012:1–9, 2012.
- [47] Neumcke B. $1/f$ noise in membranes. *Biophys. Struct. Mechanism*, 4:179–199, 1978.
- [48] Bruin De G. Van Den Berg R. J., Siebenga E. Potassium ion noise currents and inactivation in voltage-clamped node of ranvier. *Nature*, 265:177–179, 1977.
- [49] Liebovitch L.S. Selector L.Y. Todorov A.T. Yeandle S. Churrilla A.M., Gottschalke W.A. Membrane potential fluctuations of human t-lymphocytes have fractal characteristics of fractional brownian motion. *Ann. Biomed. Eng.*, 24(1):99–108, 1996.
- [50] Todorov A.T. Liebovitch L.S. Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel proteins. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10(2):169–187, 1996.
- [51] Consoni L.H.A. Rodrigues A.R.A. Varanda W.A. Nogueira R.A. Campos de Oliveira R.A., Barbosa C.T.F. Long-term correlation in single calcium-activates potassium channel kinetics. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 364:13–22, 2006.
- [52] Abdalla A.N. Cheng B. Wang S. Lan T.H., Gao Z.Y. Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. *Cell Biol. Int.*, 32(2):247–252, 2008.
- [53] Yang L. Mei H. C. Ping J. H. Jie X. Y. Lin C. X. Peng Z. Y., Lan T. H. Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. *Cell Biology International*, 36:973–979, 2012.
- [54] Jia-Rui L. Tong-Han L., Huang X. Correlation character of ionic current fluctuations: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. *Biophysical Chemistry*, 117:191–197, 2005.
- [55] Hajnoczky G. Robb-Gaspers L.D. Jr. Putney J.W. Thomas A.P., Bird G.S. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.*, 10:1505–17, 1996.

- [56] Godínez-Fernández J.R. Seseña-Rubfiaro A., Echeverría J.C. Fractal-like correlations of the fluctuating inter-spike membrane potential of a helix aspersa pacemaker neuron. *Comput. Biol. Med.*, 53:258–264, 2014.
- [57] Godínez-Fernández J.R. Seseña-Rubfiaro A., Echeverría J.C. Análisis de las fluctuaciones del potencial de reposo interespiga de la actividad eléctrica neuronal. Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 2013.
- [58] Crutchfield J.P. Marzen S.E., DeWeese M.R. Time resolution dependence of information measures for spiking neurons: scaling and universality. *Front. Comput. Neurosci.*, 9:1–18, 2015.
- [59] Inoue T. Musha T., Takeuchi H. $1/f$ fluctuations in the spontaneous spike discharge intervals of a giant snail neuron. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 30(3):194–197, 1983.
- [60] Liu J.-Lyashkov A.E. Guiriba T.R. Okamoto Y. Ziman B.D. Lakatta E.G. Yaniv Y., Ahmet I. Synchronization of sinoatrial node pacemaker cell clocks and its autonomic modulation impart complexity to heart beating intervals. *Heart Rhythm*, 11(7):1210–1219, 2014.
- [61] Kandel Eric R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, 294:1030–1038, 2001.
- [62] Kandel E. Walters E., Carew T. Classical conditioning in aplysia californica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:6675–6679, 1979.
- [63] Gayton R.J.-Loker J.E. Walker R.J. Kerkut G.A., Lambert J.D.C. Mapping of nerve cells in subesophageal ganglia of helix aspersa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50(1):1–25, 1975.
- [64] Chase R. Ratte S. Morphology of interneurons in the procerebrum of the snail helix aspersa. *Comp. Neurol.*, 384:359–372, 1997.
- [65] Cruz R. Acción de la nociceptina-orfanina fq sobre las neuronales del complejo periesfágico del caracol terrestre helix aspersa. Tesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2001.
- [66] Barnes R. *Zoología de los invertebrados*, volume Cap. 10. McGraw-Hill, sexta edición edition, 1995.
- [67] Thompson S.H. Adams D.J., Smith S.J. Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.*, 3:141–167, 1980.
- [68] Standen N.B. Meech R.W. Potassium activation in helix aspersa neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. *J. Physiol.*, 249(2):211–239, 1975.
- [69] Ritchie A.K. Lang D.G. Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the gh3 anterior pituitary cell line. *Pflugers Arch.*, 410(6):614–622, 1987.
- [70] Slesinger P.A. Lüscher C. Emerging concepts for g protein-gated inwardly rectifying potassium (girk) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 11(5):301–315, 2010.
- [71] Sah P. Faber E.S. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist*, 9(3):181–194, 2003.
- [72] Chen Z.-Carpena P. Stanley H.E. Hu K., Ivanov P.C. Effect of trends on detrended fluctuations analysis. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, 64(1):011114, 2001.
- [73] Glass L.-Hausdorff JM. Ivanov P. Mark RG. Mietus JE. Moody GB Peng C.-K Stanley HE. Golberger A., Amaral L. Components of a new resource for complex physiologic signals. *Circulation*, 101(23):e215–e220, 2000.

- [74] Trapp R. G. Dawson-Saunders B. *Bioestadística médica*. El manual moderno., segunda edición edition, 1997.
- [75] Derek J. D. Physics research notes on the langevin equation for a neuronal spiking model. *University Tunk Abdul Rahman, Faculty of Engineering and Science, Malaysia*, pages 1–34, 2008.
- [76] Sekimoto K. Stochastic energetics, physics of langevin equation. *Lecture notes in physics, Springer Berlin Heidelberg*, 779:3–66, 2010.
- [77] Sanada A.-Yano R. Kanzaki R. Bakkum D.J. Hierlemann A. Takahashi H. Yada Y., Mita T. Development of neural population activity toward self-organized criticality. *Neuroscience*, 20:55–65, 2017.
- [78] Forger D.B. Sim C.K. Modeling the electrophysiology of suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Biol. Rhythms*, 22:445–453, 2007.
- [79] Hu K.-Stanley H.E Chen Z., Ivanov P.C. Effect of nonstationarities on detrended fluctuation analysis. *Physical Review E*, 65:1–15, 2001.
- [80] Bak P. Paczuski M., Maslov S. Avalanche dynamics in evolution , growth, and depinning models. *Physical Review E*, 53:414–443, 1996.
- [81] Plenz D. Beggs J.M. Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J. Neurosci.*, 23:11167–11177, 2003.
- [82] Havlin S. Peng C. K. Yamamoto Y. Goldberger A. L. Stanley H. E. Ashkenazy Y., Ivanov P. C. Decomposition of heartbeat time series: scaling analysis of the sign sequence. *Comput Cardiol.*, 27:139–142, 2000.
- [83] Schroeder R. Baumert M. Caminal P. Voss A., Schulz S. Methods derived from nonlinear dynamics for analysing heart rate variability. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 367:277–296, 2009.
- [84] Yang F. Yu L. Tang L., Huiling Lv. Complexity testing techniques for time series data: A comprehensive literature review. *Chaos, Solitons and Fractals*, 81(A):117–135, 2015.
- [85] Schmid-Antomarchi H. Lazdunski M. Romey G., Hugues M. Apamin: A specific toxin to study a class of calcium dependent potassium channels. *Journal of Physiology*, 79:259–264, 1984.
- [86] Bunemann M. Hommers L. G., Lohse M. J. Regulation of the inward rectifying properties of g-protein-activated inwardly rectifying k+ (girk) channels by gbeta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 278:1037–43, 2002.
- [87] Lechleiter J.D. Herman B. Takahashi A., Camacho P. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.*, 79(4):1089–125, 1999.
- [88] Katayama Y. Tatsumi H., Hirai K. Measurement of the intracellular calcium concentration in guinea-pig myenteric neurons by using fura 2. *Brain Res*, 451(1-2):371–375, 1988.
- [89] De-Miguel F.F. Vargas J. Growth-inhibiting extracellular matrix proteins also inhibit electrical activity by reducing calcium and increasing potassium conductances. *Neuroscience*, 158(2):592–601, 2009.
- [90] Wang D. Fawcett J.W. Kwok J.C., Dick G. Extracellular matrix and perineuronal nets in cns repair. *Dev. Neurobiol.*, 71(11):1073–1089, 2011.
- [91] Koesis L. Kozak L. Eke A., Herman P. Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals. *Physiological measurement*, 23:1–38, 2002.

- [92] Beran J. *Statistics for long-memory processes*. New York: Chapman and Hall, 1994.
- [93] Fusi S. Reutimann J., Giugliano M. Even-driven simulation of spiking neurons with stochastic dynamics. *Neural Computation*, 15:811–830, 2003.
- [94] Brunel N. Fourcaud N. Dynamics of the firing probability of noisy integrate and fire neurons. *Neural Computation*, 14:2057–2110, 2002.
- [95] Kandel E. R. Kupfermann I. Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of aplysia. *Science*, 164:847–850, 1969.
- [96] Trube G. Sakmann B. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *Journal of Physiology*, 347:641–657, 1984.
- [97] Neher E. Sakmann B. *Single-Channel Recording*. Plenum, 1995.
- [98] Terentyeva R. Roder K. Koren G. Li W. Terentyev D., Rochira J. A. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release is both necessary and sufficient for SK channel activation in ventricular myocytes. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol.*, 10.1152/ajpheart.00621.2013., 1993.
- [99] Jacobson D. Adelman J. P. Maylie J. Neelands T. R., Herson P. S. Small-conductance calcium-activated potassium currents in mouse hyperexcitable denervated skeletal muscle. *Journal Of Physiology*, 536:397–407, 2001.
- [100] Nelson M. T. Herrera G. M., Heppner T. J. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and SK and BK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279:60–68, 2000.
- [101] Bond C. T. Kinzie J. M. Marrion N. V. Maylie J. Kohler M., Hirschberg B. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, 273:1709–1714, 1996.
- [102] Seutin V. Johnson S. W. Bicuculline methiodide potentiates $NMDA$ -dependent burst firing in rat dopamine neurons by blocking apamin-sensitive calcium activated potassium currents. *Neuroscience Letters*, 231:13–16, 1997.
- [103] Magleby K. L. Blatz A. L. Calcium activated potassium channels. *Trends in Neuroscience*, 10:463–467, 1987.
- [104] Park Y. B. Ion selectivity and gating of small conductance calcium activated potassium channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *Journal of Physiology*, 481:555–570, 1994.
- [105] Schwindt P. C. et al. Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *Journal Of Physiology*, 59:424–449, 1988.
- [106] Storm J. F. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal Of Physiology*, 409:171–190, 1989.
- [107] Vignes S. Diochot S. Valmier J. Desmadryl G., Hilaire C. Developmental regulation of T , n and q type calcium currents in mouse embryonic sensory neurons. *Eur J Neurosci*, 10:545–552, 1998.
- [108] Noebels J.L. Zwingman T., Neumann P.E. $Rocker$ is a new variant of the voltage-dependent calcium channel gene $Ca_{v}1a$. *J. Neurosci.*, 21:1169–1178, 2001.
- [109] Catterall W.A. Functional subunit structure of voltage-calcium channels. *Science*, 253:1499–1500, 1991.
- [110] Horne W.A. Tsien R.W., Ellinor P.T. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trend Pharmacol. Sci.*, 12:349–354, 1991.

- [111] McClesky E.W. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4:230–236, 1994.
- [112] Tsien R.W. Lee K.S., Marban E. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.*, 364:395–411, 1985.
- [113] Bean B.P. Boland M.L.K., Morril J.A. Omega-conotoxin block of n-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.*, 14:5011–5027, 1994.
- [114] Hess P. Plummer M.R., Logothetis D.E. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2:1453–1463, 1989.
- [115] Reuveny E. Sadjia R., Alagem N. Gating of girk channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron*, 39:9–12, 2003.
- [116] Sutcliffe M. J. Stanfield P. R. Spermine is fit to block inward rectifier (kir) channels. *Journal of General Physiology*, 122:481–484, 2003.
- [117] Adams D. J. Bellingham M. C. Kanjhan R., Coulson E. J. Tertiapin-q blocks recombinant and native large conductance k⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther.*, 314:1353–61, 2005.
- [118] Kurachi Y. Isomoto S., Kondo C. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Journal of Biological Chemistry*, 47:11–39, 1997.
- [119] Wickman K. Clapham D. E. Jelacic T. M., Kennedy M. E. Functional and biochemical evidence for g-protein-gated inwardly rectifying k⁺ (girk) channels composed of girk2 and girk3. *Eur J Biochem.*, 275:36211–6, 2000.
- [120] Dascal N. Signalling via the g protein-activated k⁺ channels. *Cellular Signalling*, 9:551–573, 1997.



Relationship in Pacemaker Neurons Between the Long-Term Correlations of Membrane Voltage Fluctuations and the Corresponding Duration of the Inter-Spike Interval

Alberto Seseña Rubfiaro¹ · José Rafael Godínez¹ · Juan Carlos Echeverría¹

Received: 6 September 2016 / Accepted: 7 April 2017 / Published online: 17 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Several studies of the behavior in the voltage and frequency fluctuations of the neural electrical activity have been performed. Here, we explored the particular association between behavior of the voltage fluctuations in the inter-spike segment (VFIS) and the inter-spike intervals (ISI) of F1 pacemaker neurons from *H. aspersa*, by disturbing the intracellular calcium handling with cadmium and caffeine. The scaling exponent α of the VFIS, as provided by detrended fluctuations analysis, in conjunction with the corresponding duration of ISI to estimate the determination coefficient R^2 (48–50 intervals per neuron, $N = 5$) were all evaluated. The time-varying scaling exponent $\alpha(t)$ of VFIS was also studied (20 segments per neuron, $N = 11$). The R^2 obtained in control conditions was 0.683 ([0.647 0.776] lower and upper quartiles), 0.405 [0.381 0.495] by using cadmium, and 0.151 [0.118 0.222] with caffeine ($P < 0.05$). A non-uniform scaling exponent $\alpha(t)$ showing a profile throughout the duration of the VFIS was further identified. A significant reduction of long-term correlations by cadmium was confirmed in the first part of this profile ($P = 0.0001$), but no significant reductions were detected by using caffeine. Our findings endorse that the behavior of the VFIS appears associated to the activation of different populations of ionic channels, which establish the neural membrane potential and are mediated by the intracellular calcium handling. Thus, we provide evidence to consider that the behavior of the VFIS, as determined by the scaling exponent α , conveys insights into

mechanisms regulating the excitability of pacemaker neurons.

Keywords *Helix aspersa* · Pacemaker neuron · Inter-spike interval · Neural encode · Long-range temporal correlations · Self-organized criticality

Introduction

Neurons of the central nervous system (CNS) are assumed to encode information by changing the pattern or the frequency of appearance of action potentials (Marzen et al. 2015). Some of these neurons generate intrinsic electrical activity mediated by the interplay among ionic channels, second messenger pathways, and the oscillations in space and time of the Ca^{2+} intracellular concentration, which is considered as a “clock-like” mechanism that modulates the rhythms of pacemaker neurons (Ramirez et al. 2011; Sim and Forger 2007; Yaniv et al. 2014). The voltage fluctuations in the neuronal membrane were identified and earlier recorded (Fatt and Katz 1952; Verveen et al. 1967). These fluctuations were related to the flow of ions through ionic channels in the membrane. More recently, other authors found that such voltage fluctuations may enhance the signal detection and information encoding (Wiesenfeld and Moss 1995; Hopp and Peng 2000; Kretzberg et al. 2001).

Unlike thermal fluctuations that convey information about the perturbation of a system, other types of biological fluctuations are also known to originate from the interplay of regulatory or control actions (West 2010). Aiming to understand the interactions of the intrinsic neural control mechanisms, several studies of the behavior in the voltage and frequency fluctuations of the neuronal electrical activity have been performed. Correspondingly, the time-

✉ Alberto Seseña Rubfiaro
rubfiaro@gmail.com

¹ Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa Division de Ciencias Basicas e Ingenieria, Mexico City, Mexico

series analysis of neuronal activity is applied to identify, as in other physiological data, stochastic or statistical properties that are usually related to the complexity of the underlying mechanisms. Considered in these properties is the concept of scaling behavior that results from the presence of long-term correlations in the time series (i.e., the current values of series are statistically correlated not only with immediately preceding but also with earlier time values, thereby disclosing a non-random behavior or temporal structure) (West 2010). In this way, some authors reported the existence of long-term correlations in the duration of the inter-spike interval fluctuations identifying that this behavior, explored in the extracellular recordings of spontaneous electrical activity of different types of neurons, is linked to the frequency of depolarization (Musha et al. 1983; Blesić et al. 1999, 2005; Lewis et al. 2001), neuronal facilitation or plasticity, and signal transmission (Jungle and Moore 1966; Mazooni et al. 2007; Robin et al. 2009).

The presence of long-term correlations in the membrane voltage fluctuations of nerve fibers has also been detected, which is suggested to be related to the flow of ions throughout the plasma membrane resulting from the structural changes of different populations of ionic channels (Vandenberg et al. 1977; Neumcke 1978; Churrilla et al. 1996). Furthermore, some studies have shown theoretically and experimentally that ionic channels present internal movements and continuous dynamical changes that exhibit long-term correlations (Liebovitch and Todorov 1996; Campos de Oliveira et al. 2006; Lan et al. 2008).

Recently, we studied the behavior of the voltage fluctuations of the inter-spike segment of pacemaker neurons. Our results indicated the presence of long-term correlations, which lead us to consider that such voltage fluctuations result from the interactions of the mechanisms involved in regulating the inter-spike membrane potential. The correlations could be also linked to the frequency of neuronal depolarization and thereby neural encoding (Seseña-Rubfiaro et al. 2014).

Among results of other studies, this previous finding may suggest the ubiquity of long-term correlations spanning across temporal and spatial scales in the voltage or frequency fluctuations of the neural electrical activity, thereby manifesting a critical-like phenomenon that could facilitate the regulation of the processing, storage, and information transmission (Chialvo 2010).

Given that the long-term correlations of the voltage fluctuations of the inter-spike segment may reflect the interplay of control or regulatory actions, here we hypothesized that such correlations are associated with the actual duration of the inter-spike interval (ISI). Accordingly, in this research we analyzed the presence of long-

term correlations in the intracellular voltage fluctuations, as described by the scaling exponent α of the inter-spike segment from *H. aspersa* F1 neurons, and their association with the duration of the inter-spike interval by disturbing the intracellular calcium handling.

Results presented in this manuscript indicate that the scaling exponent α of the inter-spike voltage fluctuations is related to the inter-spike interval duration and it is possibly mediated by the intracellular calcium handling, which causes changes of the excitability and rhythms of pacemaker neurons and of their encoded information as well.

Materials and Methods

Biological Preparation

The F1 cell of the subesophageal ganglion identified as a pacemaker neuron of the *H. aspersa* specimen was used in the present study (Kerkut et al. 1975; Kostyuk 1995). The principal ionic channels that generate its electrical activity are fully known such as calcium-dependent potassium channels BK and SK (Meech and Standen 1975; Lang and Ritchie 1987; Faber and Sah 2003), voltage-gate potassium channels K_v , sodium Na^+ and chloride Cl^- channels (Adams et al. 1980), L-type and N-type voltage-gate calcium channels, as well as the G protein-activated inwardly rectifying potassium channels (Azanza et al. 2008). Several studies considered the Ca^{2+} -activated potassium channels (SK) and G protein-activated inward-rectifying potassium channels (Faber and Sah 2007; Lüscher and Slesinger 2010) as the main factors involved in establishing the inter-spike membrane potential in the pacemaker neurons (Zhou et al. 2012; Adelman et al. 2012).

Ringer Solution and Electrodes

Once stretched with a DKI 700-C puller device, borosilicate-based glass capillaries were prepared (2-mm-diameter wall with filament), and the capillaries were provided by the WPI company. The electrodes were filled with 0.5 M KCl solution giving a resistance of 40–50 M Ω , which were mounted in the holder with a chlorinated silver filament to act as the electrical ground in the bath. The mechanical dissection and exposition of neurons of the subesophageal ganglia were followed according to standard conditions (e.g., Kerkut et al. 1975; Seseña-Rubfiaro et al. 2014).

The ganglia were perfused with a Ringer control solution with the following composition: NaCl 75 mM, KCl 4 mM, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, and HEPES 5 mM. The pH 7.5 was adjusted with NaOH to a concentration of 1 M. The ganglia were also perfused with Ringer cadmium and Ringer caffeine solutions, which were prepared by

adding CdCl_2 100 μM and Caffeine 20 mM to a Ringer control solution, respectively. All salts were provided by J.T. Baker and Sigma-Aldrich brands.

The subesophageal ganglia perfusions were attained with a Ringer control solution under a flow of 2.5 mL/min in a recording chamber having a capacity of 1.5 mL . Intracellular recordings of the pacemaker F1 began after 60 s and continued during 10 min; subsequently, the ganglia were perfused with the Ringer cadmium solution that was used to block the calcium current (Bal et al. 2000). A further intracellular recording then began after 30 s during 7 min. In addition, the ganglia were perfused with the Ringer caffeine solution that was used to release calcium of the intracellular stores as reported before (Thomas 2013); for this preparation, the intracellular recording began after 20 s during 5 min.

Electrophysiological Recordings

The intracellular recordings were achieved in the current-clamp configuration using a Dagan 8500 amplifier with an input impedance of $5 \times 10^{11} \Omega$ and input bias current adjustable to zero (nominally 3pA). The estimation of the input resistance of the neuron was $20.69 \times 10^6 \pm 3.854 \Omega$. For the acquisition and visualization of the data, the PicoScope 4424 A/D interface was employed. We used a sampling frequency of 10 kHz; root-mean-square values of typical inter-spike segments and noise generated by the setup were used to estimate the signal-to-noise ratio at $24.08 \pm 0.086 \text{ dB}$ (See Appendix A, Fig. 5). To study the voltage in the membrane potential of the inter-spike segment, 11 specimens were used, and for each F1 neuron of these specimens about 48–50 inter-spike segments were considered.

Inter-Spike Voltage Fluctuations and Inter-Spike Interval Series

The inter-spike segments were analyzed with detrended fluctuation analysis as described below to obtain the scaling exponent α of the voltage fluctuations. Per neuron from 48 to 50 scaling exponents α and the corresponding inter-spike interval duration were obtained to explore their association using scatter plots, $N = 5$. These data, according to a linear-best-fit model, were used to estimate the correlation expressed as the determination coefficient " R^2 ." This procedure was performed for all groups Ringer control solution, the Ringer cadmium solution, and Ringer caffeine solution; ganglia from 5 different specimens were studied. A Kruskal–Wallis test was used for the statistical comparisons of R^2 between groups (significance level $P < 0.005$).

Detrended Fluctuation Analysis (DFA)

Detrended Fluctuation Analysis (DFA) was introduced to explore long-term correlations in time series by the estimation of the scaling exponent α that is considered to reflect the interactions underlying the statistical process that generates the data. One reason for the use of this method is to avoid the identification of spurious long-term correlations that may result from the non-stationary content of time series, like the baseline drift or trend manifested in the voltage fluctuations of the inter-spike segment. (See Fig. 6 in Appendix A for an illustration on how DFA becomes practical for removing voltage trends in the inter-spike segment) (Peng et al. 1995; Hu et al. 2001; Shao et al. 2012). Following DFA, in this study the series of the inter-spike voltage fluctuations were numerically integrated and their average value subtracted as

$$Y(k) = \sum_{j=1}^k x(j) - \bar{x}.$$

The integrated time series $Y(k)$ were divided in non-overlapping segments of equal length n and for each segment or scale a least-square regression was used to obtain $Y_n(k)$. Thus, the local linear trends of $Y(k)$ were removed by subtracting $Y_n(k)$ from each segment and calculated the root-mean-square fluctuation $R(n)$ as

$$R(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [Y(k) - Y_n(k)]^2}.$$

The scaling exponent α was then estimated as the slope of a linear relationship by applying a logarithmic operator on $R(n)$ as a function of segment size or time scale n , i.e., ($R(n) \approx n^\alpha$). Approximately, if $\alpha = 0.5$, the series show random fluctuations, and if $\alpha \approx 1$, the series present long-term correlations.

Profile of the Voltage Fluctuations Dynamics of the in the Inter-Spike Segment

A study of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment as a function of time was also considered, and this time was expressed as percentage of the duration of the inter-spike segment. The data were computed progressively by applying DFA with a moving window size of 1500 samples over the length of the inter-spike segment. This procedure has been used previously to detect time-varying scaling exponents α in time series (Berthouze and Farmer 2012); such number of samples is in accordance with the results of previous studies that estimated the scaling exponent α from short

segments of synthetic fractal-like data (Peña et al. 2009). Then 20 inter-spike segments were considered per neuron, $N = 11$. A two-way ANOVA test was selected to compare the profiles between groups at different percentages of the duration of the inter-spike segment (significance level $P < 0.05$).

Results

Inter-Spike Interval Versus Scaling Exponent α

We explored the association of the duration of the inter-spike interval (ISI) and its corresponding scaling exponent α in a continuous perfusion of a Ringer control solution of the pacemaker F1 neuron, Fig. 1. We estimated the determination coefficient, R^2 , between ISI and α obtaining 0.683. ([0.647 0.776] lower and upper quartiles), $N = 5$. Changes in this association were then explored by the continuous perfusion of Ringer cadmium solution, also estimating R^2 and thereby obtaining 0.405 [0.381 0.495], $N = 5$. In the same way, we also perfused Ringer caffeine solution obtaining an R^2 of 0.151 [0.118 0.222], $N = 5$. Significant differences among preparations of R^2 were confirmed by a Kruskal–Wallis test ($P = 0.001$), Fig. 2.

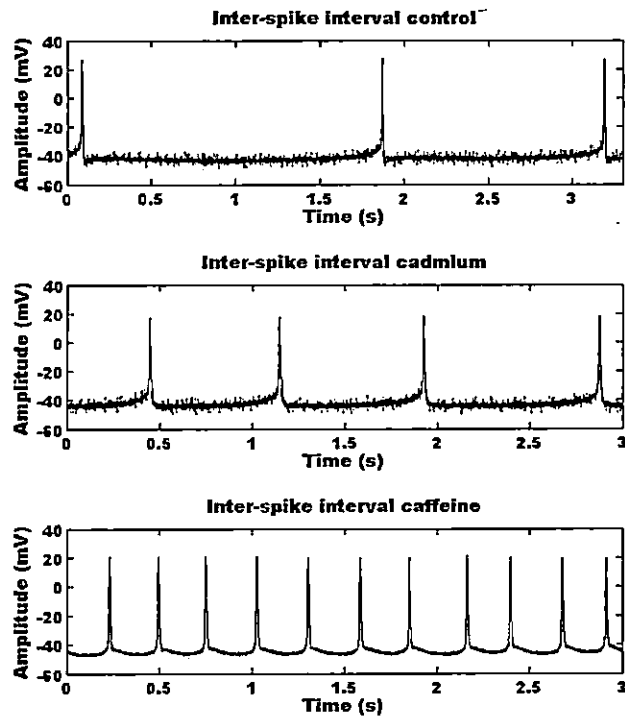


Fig. 1 Intracellular recordings of the F1 pacemaker neuron. The left panel illustrates the well-known changes of the inter-spike interval under three different experimental conditions. Each inter-spike

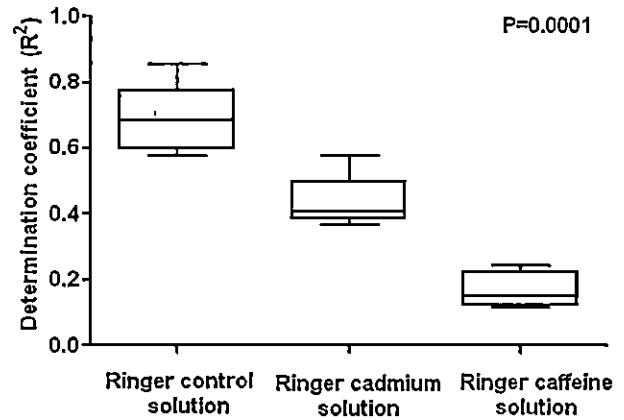
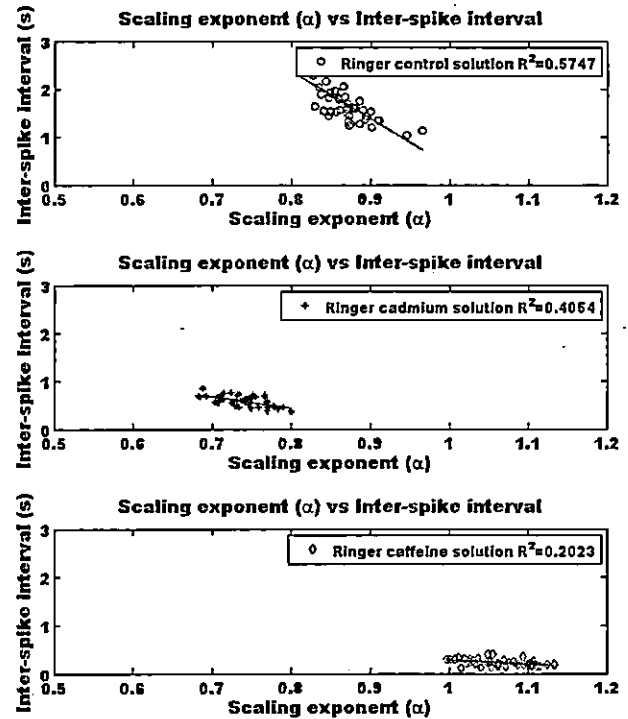


Fig. 2 Significant differences between the R^2 of the experimental groups ($P = 0.0001$). These differences among groups were not possible to be identified by just comparing the average of the scaling exponents α estimated from the duration of inter-spike interval ($ISI(s)_{control} = 0.940 \pm 0.686$, $ISI(s)_{cadmium} = 0.324 \pm 0.168$, $ISI(s)_{caffeine} = 0.238 \pm 0.045$) or rather the scaling exponent of the inter-spike voltage fluctuations $\alpha_{control} = 0.955 \pm 0.136$, $\alpha_{cadmium} = 0.937 \pm 0.289$, $\alpha_{caffeine} = 0.946 \pm 0.111$, $P > 0.05$

Profile of the Scaling Exponent α of the Voltage Fluctuations in the Inter-Spike Segment

A study of the scaling exponent α of the voltage fluctuations throughout the inter-spike segment was obtained



interval was plotted in relation to the corresponding scaling exponent α of its voltage fluctuations (right panel) using a linear-best-fit model to estimate the determination coefficient R^2

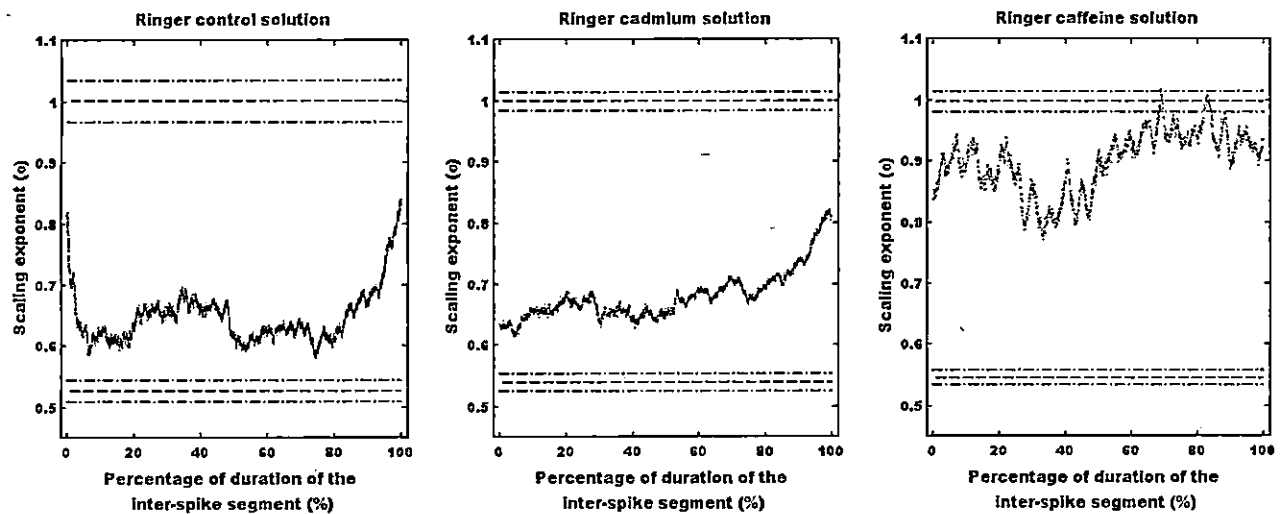


Fig. 3 Normalized profiles of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment under three different experimental conditions by using a moving window with 1500 samples. As reference, the dotted lines represent the mean and standard deviation

in the estimation of α from consecutive windows with 1500 samples of numerical control series having long-term correlations ($\alpha \approx 1$) and random-like ($\alpha \approx 0.5$) correlations

under a perfusion process by using cadmium or caffeine; typical profiles are presented in Fig. 3.

Effects of the Ringer Cadmium and Caffeine Solutions in the Profile of the Scaling Exponent α of the Voltage Fluctuations in the Inter-Spike Segment

An average profile of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment was estimated by considering the data of neurons at different percentages of the total duration of the inter-spike segment, $N = 5$ (see Fig. 3). The effects of Ringer cadmium and caffeine solutions in the profile of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment, $N = 5$, are presented in Fig. 4. Two-way ANOVA was used to evaluate the interaction between the scaling exponent α and the percentage of duration of the inter-spike segment ($P = 0.0005$).

Discussion

Our main finding was the identification of a significant association between the scaling exponent α of the voltage fluctuations of the inter-spike segment and the duration of the inter-spike interval (ISI) for the three groups studied (Fig. 2), which is probably mediated by the intracellular calcium handling involved in the changes of excitability and rhythms of pacemaker neurons as further discussed below.

The assessment of the voltage fluctuations in the inter-spike segment by the estimation of a single scaling exponent α exhibited long-term correlations in the three groups studied (i.e., $\alpha \approx 1$) and non-significant differences were found when this exponent was compared among groups $\alpha_{\text{control}} = 0.955 \pm 0.136$, $\alpha_{\text{cadmium}} = 0.937 \pm 0.289$, $\alpha_{\text{caffeine}} = 0.946 \pm 0.111$.

It was thus necessary to evaluate the scaling exponent α of the voltage fluctuations as a function of time, which was expressed as a percentage of the duration of the inter-spike interval. The corresponding finding was the identification of a non-uniform behavior or profile of the scaling exponent α throughout the duration of the inter-spike segment. This profile can be associated with the activation of different populations of ionic channels that establish the inter-spike membrane potential, specifically with the Ca^{2+} -activated potassium channels SK, whose activation is accomplished by the calcium entry during the action potential. These channels are also known to mediate the behavior occurring at the after-hyperpolarization as described before (Xia et al. 1995; Stocker 2004; Adelman et al. 2012).

The possible mechanisms that introduce the existence of long-term correlations during the first part of the inter-spike segment of the control profile (Fig. 3) are the dynamics of SK channels that are mediated by the increment of intracellular calcium. On other hand, the middle part of the profile is likely mediated by the dynamics of voltage-gate potassium channels K_v and G protein-activated inward-rectifying potassium channels (Azanza et al. 2008; Granados-Fuentes et al. 2012; Zhou et al. 2012) up to

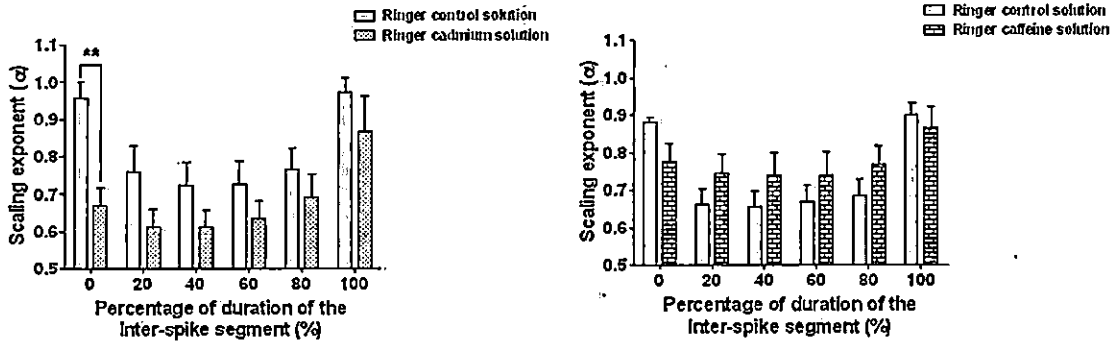


Fig. 4 The effect of Ringer cadmium solution in the profile of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment, $N = 5$. Two-way ANOVA was used to evaluate the scaling exponent α and the percentage of duration of the inter-spike segment ($P = 0.0005$). A significant profile reduction of the long-term correlations by cadmium was confirmed by a Bonferroni post hoc test in the first part of the inter-spike segment $P = 0.0001$ (left panel).

In the same way, we evaluated the effect of Ringer caffeine solution estimating a significant interaction between the scaling exponent α and the percentage of duration of the inter-spike segment ($P = 0.0001$). No significant reductions of the long-term correlations by caffeine were found by a Bonferroni post hoc test in the scaling exponent α of the voltage fluctuations $P > 0.05$ (right panel), $N = 5$

the point where the voltage-gate sodium and calcium channels (Na_v , L-type Ca^{2+} , N-type Ca^{2+}) become activated to trigger a further action potential (Brown et al. 1981; Bean 2007; Azanza et al. 2008), resulting in an increment of the scaling exponent α towards long-term correlations in the final part of the control profile.

In this sense, we perturbed the intracellular calcium handling by blocking about 60% of the calcium current with the use of a Ringer cadmium solution (Bal et al. 2000). The effect of the Ringer cadmium solution was to reduce the association of the inter-spike interval and the scaling exponent α of the voltage fluctuations. Furthermore, the exploration of the profile of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment shows a significant decrement in the first part of the profile and by a lesser degree also at the end. These effects are probably introduced by disrupting the dynamics of SK and Cav channels, respectively. Thus, the scaling exponent α seems to become a parameter that reflects the interplay of ionic channels underlying the voltage fluctuations.

Additionally, we used Ringer caffeine solution to release calcium from the intracellular compartments (Collins 1997; Thomas 2013), disrupting in this way its regulation, which induced an increment in the frequency of appearance of action potentials and also a decrement of the association among the inter-spike interval and the scaling exponent α of the voltage fluctuations. The inspection of the profile of the scaling exponent α of the voltage fluctuations in the inter-spike segment shows an increment in the scaling exponent α or continuation of the presence of long-term correlations throughout its duration. This increment is probably caused by the lack of inactivation of the SK channels, whose dynamics seemed here to be manifested over the whole length of the inter-spike segment.

Our study may be limited by the non-specific blocking of SK channels, which are known to mediate the neuronal excitability, yet, we considered that this mechanism was indeed disrupted indirectly and thus it provoked a weak relationship between the scaling exponent α of the inter-spike voltage fluctuations and the duration of the inter-spike interval, regarded as a transmission medium of information across the CNS (Robin et al. 2009).

In conclusion, the present approach provided evidence to consider that the behavior of the inter-spike voltage fluctuations in pacemaker neurons offer functional information about interactions underlying the neuronal electrical activity, which may even correspond to the manifestation of a self-organized critical-like behavior (Bak et al. 1987; Hopp and Peng 2000; Gollo et al. 2013). Thus, our results complement previous dynamical studies of the frequency of occurrence of action potentials, which have also revealed the presence of long-term correlations, thus considered as adapting and encoding neural information mechanisms (Benda et al. 2010; Schwalger and Lindner 2013).

Acknowledgements The first author acknowledges the Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapalapa and the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT) for supporting his studies (Grant 358414).

Compliance with Ethical Standards

Ethical standard The *H. aspersa* experiments were performed according to the guidelines for the use of animals of the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (Mexico City) and the "Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999." These guidelines are in accordance with those approved by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (revised 1996).

Appendix: Inter-Spike Voltage Fluctuations and Noise

We estimated the signal-to-noise ratio (SNR) to characterize and compare the noise generated by our recording setup with the inter-spike voltage fluctuations before and after introducing the electrode in the F1 neuron. 20 time series containing an average of 22000 ± 3000 samples of one specimen were considered (Fig. 5). See Appendix Figs. 5 and 6.

The mean of the SNR before the electrode was introduced in the F1 neuron was 0.732 ± 0.182 dB ([0.647 0.817] lower and upper confidence interval to 95%), 24.08 ± 0.086 dB ([24.04 24.12]) once introduced in the F1 neuron, and 0.312 ± 0.245 dB ([0.197 0.426]) after the electrode was extracted. Significant SNR differences were confirmed by one-way ANOVA test ($P = 0.0001$).

Additionally, we analyzed the behavior of the same data series with DFA, obtaining a median for the scaling exponent α before the electrode was introduced in the F1

neuron of 0.500 ([0.494 0.516] lower and upper quartiles), 1.034 ([1.014 1.053]) indicating long-term correlations once recording inter-spike voltage fluctuations, and 0.570([0.567 0.582]) after the electrode was extracted. Significant differences were similarly confirmed by the Kruskal–Wallis test ($P = 0.0001$), see (Fig. 5, panel a, b).

Detrending of the Inter-Spike Voltage Fluctuations

The detrended fluctuations analysis (DFA) is a useful method that identifies the presence of long-term correlations in time series (Peng et al. 1995); this analysis has the advantage of avoiding the detection of spurious long-term correlations that are a non-stationary artifacts (Hu et al. 2001). We present an example of the detrended inter-spike voltage fluctuations of the segment presented at the panel A of Fig. 5. This trend elimination is necessary for a reliable estimation of the root-mean-squared fluctuation $R(n)$ at the scale illustrated in Fig. 6.

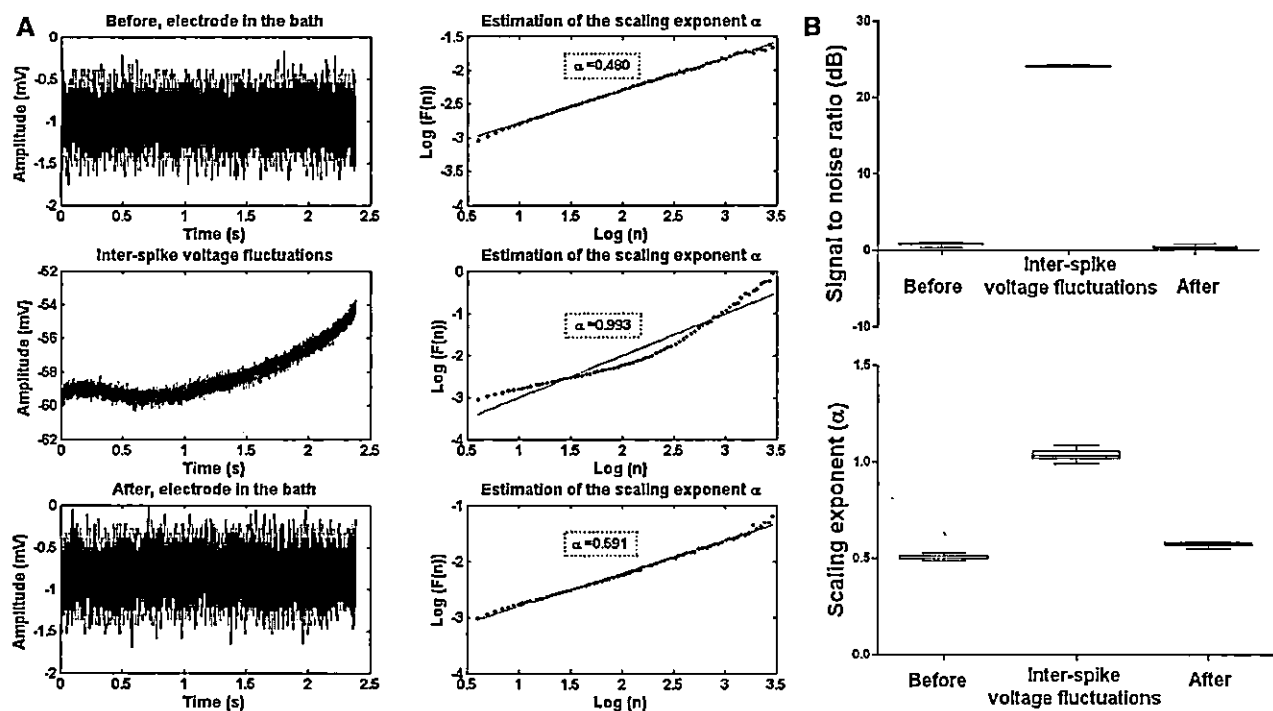


Fig. 5 The panel a shows a typical example of the inter-spike voltage fluctuations and the noise generated by our recording setup before and after introducing the electrode in the F1 neuron. Also depicted are the results obtained by the DFA analysis that provides the scaling exponent α . 20 time series containing an average of $22,000 \pm 3000$ samples of one specimen were considered. In addition, the panel

b shows the result obtained by estimating the SNR. (The assessment of the SNR for the inter-spike voltage fluctuations was performed once removing the ISI baseline drift or increasing trend to avoid an overestimation by using a detrending procedure similar to that illustrated in Fig. 6)

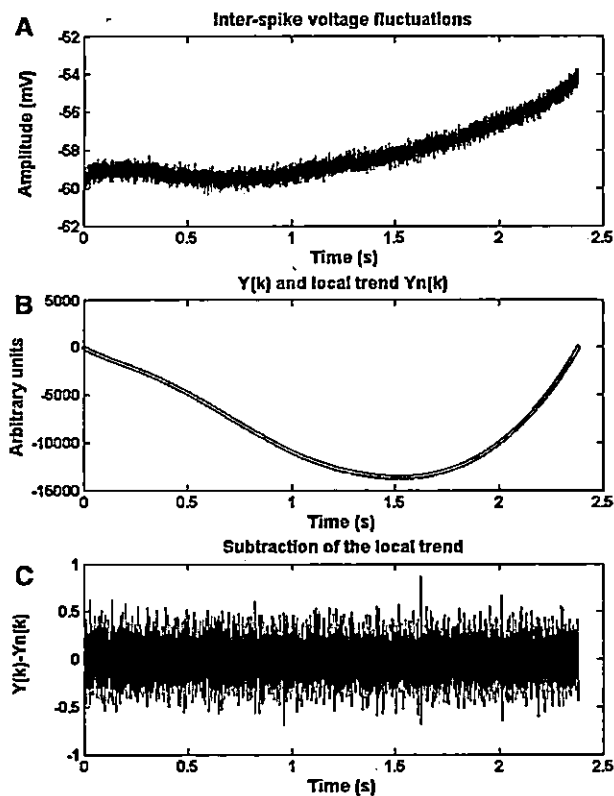


Fig. 6 The panel a shows a typical example of the inter-spike voltage fluctuations. The panel b depicts the integration (see “Detrended Fluctuation Analysis (DFA)” section) of the raw inter-spike voltage fluctuations (*Black line*, $Y(k)$). The time series $Y(k)$ were divided in non-overlapping segments or boxes of equal length $n = 10$ and for each box a least-square regression was used to obtain $Y_n(k)$ (*White line*). The local linear trends of $Y(k)$ can be removed by subtracting from each segment $Y_n(k)$ as appreciated in the panel c

References

- Adams DJ, Smith SJ, Thompson SH (1980) Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3:141–167
- Adelman JP, Maylie J, Sah P (2012) Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Ann. Rev. Physiol.* 74:245–269
- Azanza MJ, Pérez-Castejón C, Pes N, Peres-Bruzón RN, Aisa J, Junquera C, Maestri C, Lahoz M, Martínez-Ciriano C, Vera-Gil A, Del Moral A (2008) Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in *Helix aspersa* suboesophageal brain ganglia neurons. *Histol Histopathol* 23(4):397–406
- Bak P, Tang C, Wiesenfeld K (1987) Self-organized criticality: an explanation of $1/f$ noise. *Phys Rev Lett* 59(4):381–384
- Bal R, Janahmadi M, Green GG, Sanders DJ (2000) Effect of calcium and calcium channels blockers on transient outward current of F76 and D1 neuronal soma membranes in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *J Membr Biol* 173(3):179–185
- Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:451–465
- Benda J, Maler L, Longtin A (2010) Linear versus nonlinear signal transmission in neuron models with adaptation currents or dynamic thresholds. *J Neurophysiol* 104(5):2806–2820
- Berthouze L, Farmer SF (2012) Adaptive time-varying detrended fluctuation analysis. *J Neurosci Methods* 209(1):178–188
- Blesić S, Milošević S, Stratimirović D, Ljubisavljević M (1999) Detrended fluctuation analysis of time series of a firing fusiform neuron. *Physica A* 268:275–282
- Blesić S, Milošević S, Stratimirović D, Ljubisavljević M (2005) Detecting long-range correlations in time series of dorsal horn neuron discharges. *Ann NY Acad Sci* 1048:385–391
- Brown AM, Morimoto K, Tsuda Y, Wilson DL (1981) Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspersa*. *J Physiol* 320:193–218
- Campos de Oliveira RA, Barbosa CTF, Consoni LHA, Rodrigues ARA, Varanda WA, Nogueira RA (2006) Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. *Physica A* 364:13–22
- Chialvo DR (2010) Emergent complex neural dynamics. *Nat Phys* 6:744–750
- Churrilla AM, Gottschalke WA, Liebovitch LS, Selector LY, Todorov AT, Yeandle S (1996) Membrane potential fluctuations of human T-lymphocytes have fractal characteristics of fractional brownian motion. *Ann Biomed Eng* 24(1):99–108
- Collins R (1997) Effects of caffeine on snail (*Helix aspersa*) neurons. *Neurophysiology* 29:286
- Faber ES, Sah P (2003) Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 9(3):181–194
- Faber ES, Sah P (2007) Functions of SK channels in central neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(10):1077–1083
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117(1):109–128
- Gollo LL, Kinouchi O, Copelli M (2013) Single-neuron criticality optimizes analog dendritic computation. *Sci Rep* 3:3222
- Granados-Fuentes D, Norris AJ, Carrasquillo Y, Nerbonne JM, Herzog ED (2012) I(A) channels encoded by Kv1.4 and Kv4.2 regulated neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms in locomotor activity. *J Neurosci* 32(29):10045–10052
- Hopp B, Peng CK (2000) Fluctuations and fractal noise in biological membranes. *J Membr Biol* 177(3):177–185
- Hu K, Ivanov PC, Chen Z, Carpena P, Stanley HE (2001) Effect of trends on detrended fluctuations analysis. *Phys Rev E* 64(1):011114
- Jungle D, Moore GP (1966) Interspike interval fluctuations in alypsia pacemaker neurons. *Biophys J* 6(4):411–434
- Kerkut GA, Lambert JDC, Gayton RJ, Loker JE, Walker RJ (1975) Mapping of nerve cells in suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol* 50(1):1–25
- Kostyuk PG (1995) *Neurobiology of Invertebrates*. Springer, New York, pp 145–167
- Kretzberg J, Warzecha AK, Egelhaaf M (2001) Neural coding with graded membrane potential changes and spike. *J Comput Neurosci* 11(2):153–164
- Lan TH, Gao ZY, Abdalla AN, Cheng B, Wang S (2008) Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. *Cell Biol Int* 32(2):247–252
- Lang DG, Ritchie AK (1987) Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line. *Pflugers Arch* 410(6):614–622
- Lewis CD, Gebber GL, Larsen PD, Barman SM (2001) Long-term correlations in the spike trains of medullary sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 85(4):1614–1622
- Liebovitch LS, Todorov AT (1996) Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel proteins. *Crit Rev Neurobiol* 10(2):169–187

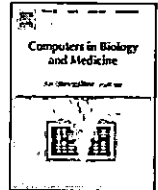
- Lüscher C, Slesinger PA (2010) Emerging concepts for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11(5):301–315
- Marzen SE, DeWeese MR, Crutchfield JP (2015) Time resolution dependence of information measures for spiking neurons: scaling and universality. *Front Comput Neurosci* 9:1–18
- Mazooni A, Broccard FD, Garcia-Perez E, Bonifazi P, Ruaro ME, Torre V (2007) On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks. *PLoS ONE* 2(5):e439
- Meech RW, Standen NB (1975) Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. *J Physiol* 249(2):211–239
- Musha T, Takeuchi H, Inoue T (1983) $1/f$ fluctuations in the spontaneous spike discharge intervals of a giant snail neuron. *IEEE Trans Biomed Eng* 30(3):194–197
- Neumcke B (1978) $1/f$ noise in membranes. *Biophys. Struct Mech* 4:179–199
- Peña MA, Echeverría JC, García MT, González-Camarena R (2009) Applying fractal analysis to short sets of heart rate variability data. *Med Biol Eng Comput* 47(7):709–717
- Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Golberger AL (1995) Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time-series. *Chaos* 5(1):82–87
- Ramirez J-M, Koch H, Garcia AJ, Doi A, Zanella S (2011) The role of spiking and bursting pacemakers in the neuronal control of breathing. *J Biol Phys* 37(3):241–261
- Robin K, Maurice N, Degos B, Deniau JM, Martinerie J, Pezard L (2009) Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: a case study for methodological comparison. *J Neurosci Methods* 179(1):142–149
- Schwalger T, Lindner B (2013) Patterns of interval correlations in neural oscillators with adaptation. *Front Comput Neurosci* 7:1–8
- Seseña-Rubfiaro A, Echeverría JC, Godínez-Fernández JR (2014) Fractal-like correlations of the fluctuating inter-spike membrane potential of a *Helix aspersa* pacemaker neuron. *Comput Biol Med* 53:258–264
- Shao YH, Gu GF, Jiang ZQ, Zhou WX, Sornette D (2012) Comparing the performance of FA, DFA, and MDA using different synthetic long-range correlations time series. *Sci Rep.* 2(835):1–5
- Sim CK, Forger DB (2007) Modeling the electrophysiology of suprachiasmatic nucleus neurons. *J Biol Rhythms* 22:445–453
- Stocker M (2004) Ca(2+)-activated K+ channels: molecular determinants and function of the sk family. *Nat Rev Neurosci* 10:758–770
- Thomas RC (2013) Calcium content of the endoplasmic reticulum of snail neurones releasable by caffeine. *Cell Calcium* 53(2):120–124
- Vandenberg RJ, Siebenga E, Debruin G (1977) Potassium-ion noise currents and inactivation in voltage-clamped node of ranvier. *Nature* 265(5590):177–179
- Verveen AA, Derksen HE, Schick KL (1967) Voltage fluctuations of neural membrane. *Nature* 216(5115):588–589
- West BJ (2010) Fractal physiology and fractional calculus: a perspective. *Front Physiol* 1(12):1–17
- Wiesenfeld K, Moss F (1995) Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature* 373(6509):33–36
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP (1995) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395(6701):503–507
- Yaniv Y, Ahmet I, Liu J, Lyashkov AE, Guiriba TR, Okamoto Y, Ziman BD, Lakatta EG (2014) Synchronization of sinoatrial node pacemaker cell clocks and its autonomic modulation impart complexity to heart beating intervals. *Heart Rhythm* 11(7):1210–1219
- Zhou H, Chisari M, Raehal KM, Kaltenbronn KM, Bohn LM, Mennerick SJ, Blumer KJ (2012) GIRK channel modulation by assembly with allosterically regulated RGS proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(49):19977–19982



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Computers in Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbm

Fractal-like correlations of the fluctuating inter-spike membrane potential of a *Helix aspersa* pacemaker neuron



Alberto Seseña-Rubfiaro^{*}, Juan Carlos Echeverría¹, Jose Rafael Godínez-Fernández²

Electrical Engineering Department, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 Iztapalapa, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2014

Accepted 10 August 2014

Keywords:

Neural dynamics
Complex behavior
Membrane potential modulation
Pacemaker neuron
Inter-spike-interval
Self-organized criticality

ABSTRACT

We analyzed the voltage fluctuations of the membrane potential manifested along the inter-spike segment of a pacemaker neuron. Time series of intracellular inter-spike voltage fluctuations were obtained in the current-clamp configuration from the F1 neuron of 12 *Helix aspersa* specimens. To assess the dynamic or stochastic nature of the voltage fluctuations these series were analyzed by Detrended Fluctuation Analysis (DFA), providing the scaling exponent α . The median α result obtained for the inter-spike segments was 0.971 ([0.963, 0.995] lower and upper quartiles). Our results indicate a critical-like dynamic behavior in the inter-spike membrane potential that, far from being random, shows long-term correlations probably linked to the dynamics of the mechanisms involved in the regulation of the membrane potential, thereby endorsing the occurrence of critical-like phenomena at a single-neuron level.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent decades, several efforts in the study of the dynamics of neural activity seeking to understand the interaction between the environment and the internal control mechanisms of neurons have been performed. A fractal-like behavior ($1/f$) in the temporal fluctuations for the occurrence of action potentials, or inter-spike time intervals, collected from extracellular recordings of spontaneous electrical activity of different types of neurons has been found; identifying, as well, that this behavior is linked to the dynamic frequency of depolarization [1–4], neural facilitation or plasticity, and signal transmission [5,6]. Also, a complex behavior of the membrane voltage fluctuations in nerve fibers has been detected and these fluctuations have been studied to assess encoded information by long-term memory processes [7,8].

Early studies suggested that intracellular recordings of the membrane voltage fluctuations in nerve fibers can be related to thermal movements generated by the flow of potassium and sodium ions through the plasma membrane [9,10]. Contrastingly, other experiments indicated that these fluctuations are rather due

to structural changes in the voltage-dependent potassium channels [11–13]. Furthermore, other authors have shown theoretically and experimentally that ionic channels show dynamic internal movements and continuous changes of conformational states with long-term memory [14–18]. Besides, the inter-spike membrane potential of neurons is modified by the activation of different mechanisms such as the synaptic transmission, the activation of ionic channels, and the modulation of cytoplasmic free calcium concentration [Ca^{2+}]_i, which all modulate the frequency of occurrence of action potentials [19,20]. Thus, we hypothesized that the intracellular voltage fluctuations of the inter-spike segment present non-random dynamics. Accordingly, in this research we analyzed the intracellular voltage fluctuations of the membrane potential manifested along the inter-spike segment of the *Helix aspersa* F1 pacemaker neuron, which is involved in the innervation of sensory organs like the osfradio [21]. Our results here indicate a critical-like dynamic behavior that, far from being random, shows fractal-like correlations probably as an expression of the dynamics of the mechanisms involved in regulating the membrane potential.

2. Materials and methods

2.1. Biological preparation

The subesophageal ganglion cell identified as F1 of the *H. aspersa* specimen was used in this study owing to its depolarization pattern,

^{*} Corresponding author. Tel.: +52 55 58046437; fax: +52 55 58044628.

E-mail addresses: seseru@xanum.uam.mx, rubfiaro@gmail.com (A. Seseña-Rubfiaro), jcea@xanum.uam.mx (J.C. Echeverría), gfr@xanum.uam.mx (J.R. Godínez-Fernández).

¹ Tel.: +52 55 58044600x1008; fax: +52 55 58044628.

² Tel.: +52 55 58046432; fax: +52 55 58044628.

topographical location and straightforward manipulation [22,23]. Some of the main mechanisms that generate its electrical activity are well known as it becomes the case for the calcium-dependent potassium channels (BK, SK), voltage-dependent potassium channels (Kv), sodium and chlorine channels (Na^+ , Cl^-) [24–30], voltage-gated calcium of L-type channels, HCN4 channels, and G protein-activated inwardly-rectifying potassium channels [31]. Furthermore, within the main mechanisms considered to involve in establishing the inter-spike membrane potential are SK channels, HCN4 channels, and G protein-activated inwardly-rectifying potassium channels [32–34]. In addition, the largest neurons of *H. aspersa* such as the F1 cell are known to present 8 synaptic inputs [59].

The ganglia used were exposed to type XIV protease (Sigma-Aldrich) in a concentration of 5 mg/10 ml for 8 min. Afterwards the action of the enzyme was stopped by washing the preparation with standard Ringer solution and the connective tissue sheath that covers the neurons was removed by mechanical microdissection.

2.2. Ringer solution and electrodes

Borosilicate based glass capillaries were used once stretched with a DKI 700-C puller device (2 mm diameter wall with filament). The electrodes were filled with 3 M KCl solution giving a resistance of 5–10 M Ω . The ganglia were perfused with the Ringer solution with the following composition: NaCl 75 mM, KCl 4 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 5 mM, Hepes 5 mM, and pH 7.5 was adjusted with NaOH to a concentration 1 M. All salts were provided by J.T. Baker brand.

2.3. Electrophysiological recordings

Intracellular recordings were performed in the current-clamp configuration using a Dagan 8500 amplifier, and the voltage tracings were monitored on a Tektronik oscilloscope. For the acquisition and visualization of the data a Digidata 1200 A/D interface (Axon Instruments) was employed. A sampling frequency of 1 kHz was used, and the signal to noise ratio (SNR) was estimated at 27.7 dB. This measure was obtained by dividing the root-mean-square (RMS) values of a typical inter-spike segment and the noise generated from the setup (Fig. 1).

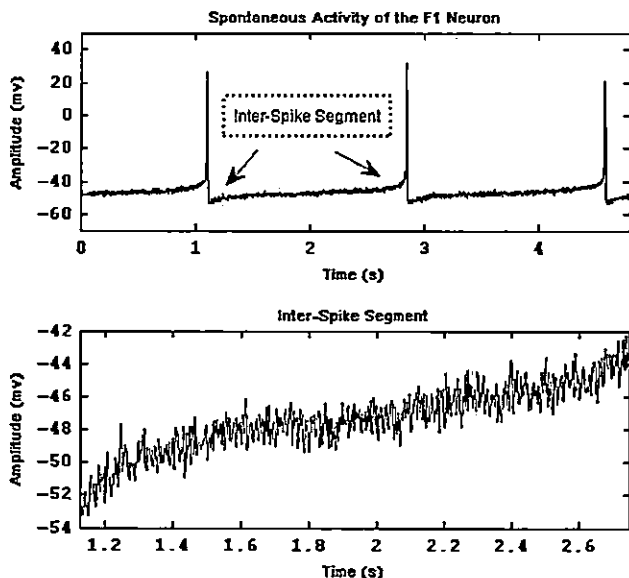


Fig. 1. Typical voltage fluctuations of the membrane potential manifested along the inter-spike segment of the F1 neuron which presents pacemaker type activity (27.7 dB SNR was estimated).

To characterize and compare the noise generated by our setup with the dynamics of the inter-spike segment, 10 data series containing an average of 340 ± 10 samples before (control) and after introducing the electrode into the F1 neuron of one specimen were obtained (Fig. 2, left).

To further study the voltage fluctuations in the membrane potential of the inter-spike segment, 12 additional specimens were used, and for each F1 neuron of these specimens all segments (from 16 to 20) containing an average of 340 ± 10 samples were considered (Fig. 3, left). The suitability of these numbers of samples is in accordance with previous studies estimating the scaling exponent from short segments of synthetic fractal-like data [35].

2.4. Inter-spike voltage fluctuations series and Detrended Fluctuation Analysis (DFA)

The inter-spike segments were then analyzed with DFA as described below to obtain the scaling exponent α . About 18 scaling exponents per neuron were obtained, which were averaged to obtain a representative scaling exponent of the dynamics present in the voltage fluctuations of the inter-spike segment. This procedure was performed for each of the 12 specimens studied.

Numerical control groups involving segments with approximately 340 samples were also constructed to compare the dynamics presented in the inter-spike segments; these groups were obtained using either random permutations of the same inter-spike segments or synthetic fractal-like data (1/f) generated by the spectral synthesis approximation [36]. The Kruskal–Wallis test was used for the statistical comparisons because the scaling exponents α obtained from the analysis of voltage fluctuations of the inter-spike segments did not present a normal distribution (significance level $P < 0.05$).

The Detrended Fluctuation Analysis (DFA) has proven useful to explore long-range correlations in time series [37]. This method provides a quantitative parameter called the scaling exponent α that is estimated as follows.

The original voltage fluctuations time series is numerically integrated and its mean subtracted.

$$y(k) = \sum_{i=1}^k x(i) - \bar{x}$$

The resulting time series $y(k)$ is divided in nonoverlapping boxes of equal length n and for each box or scale a least-square fit is used to obtain $y_n(k)$. The local linear trend of $y(k)$ is removed by subtracting $y_n(k)$ from each box and to compute the root mean square fluctuation $F(n)$ as

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2}$$

This computation is repeated over different n values to provide a relationship between $F(n)$ as a function of box size or time scale n .

$$F(n) \approx n^\alpha$$

A linear relationship is considered by applying a logarithmic operator on both sides of the previous equation; thereby, the fluctuations can be characterized by estimating the slope or scaling exponent α (within the scales $n=4$ to $n=N/4$) [37]. Roughly, if $\alpha=0.5$, the series has random fluctuations; if $\alpha \approx 1$, the series presents long-term or fractal-like correlations.

3. Results

3.1. Inter-spike data and experimental control groups

The median α results obtained with DFA for the voltage fluctuations of the noise before the electrode which were introduced

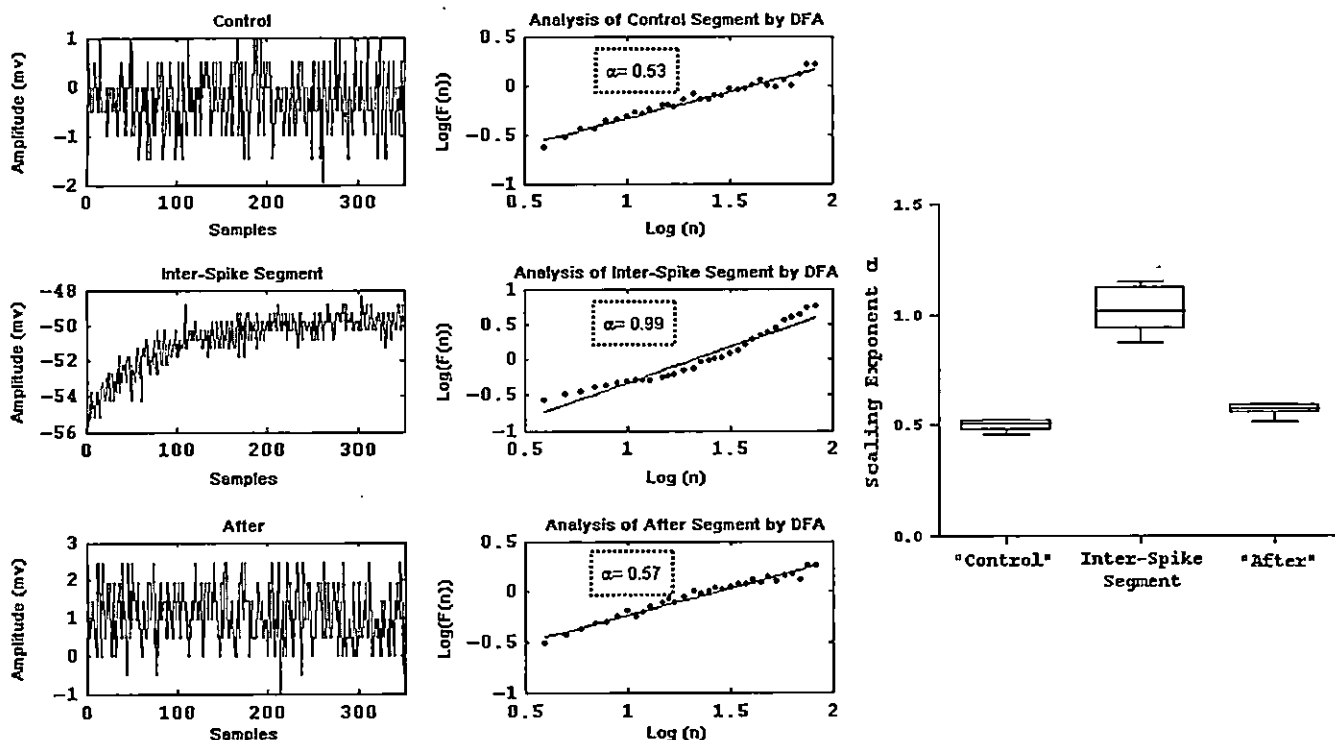


Fig. 2. (Left) Comparison of the voltage fluctuations and DFA results of the noise collected before (control) and after introducing the electrode into the cell, with the voltage fluctuations of the inter-spoke segment. (Right) Distributions of the scaling exponent α for the voltage fluctuations of noise and the inter-spoke segments ($N=10$) of one F1 neuron. The scaling exponent was estimated using 340 ± 10 samples of these segments.

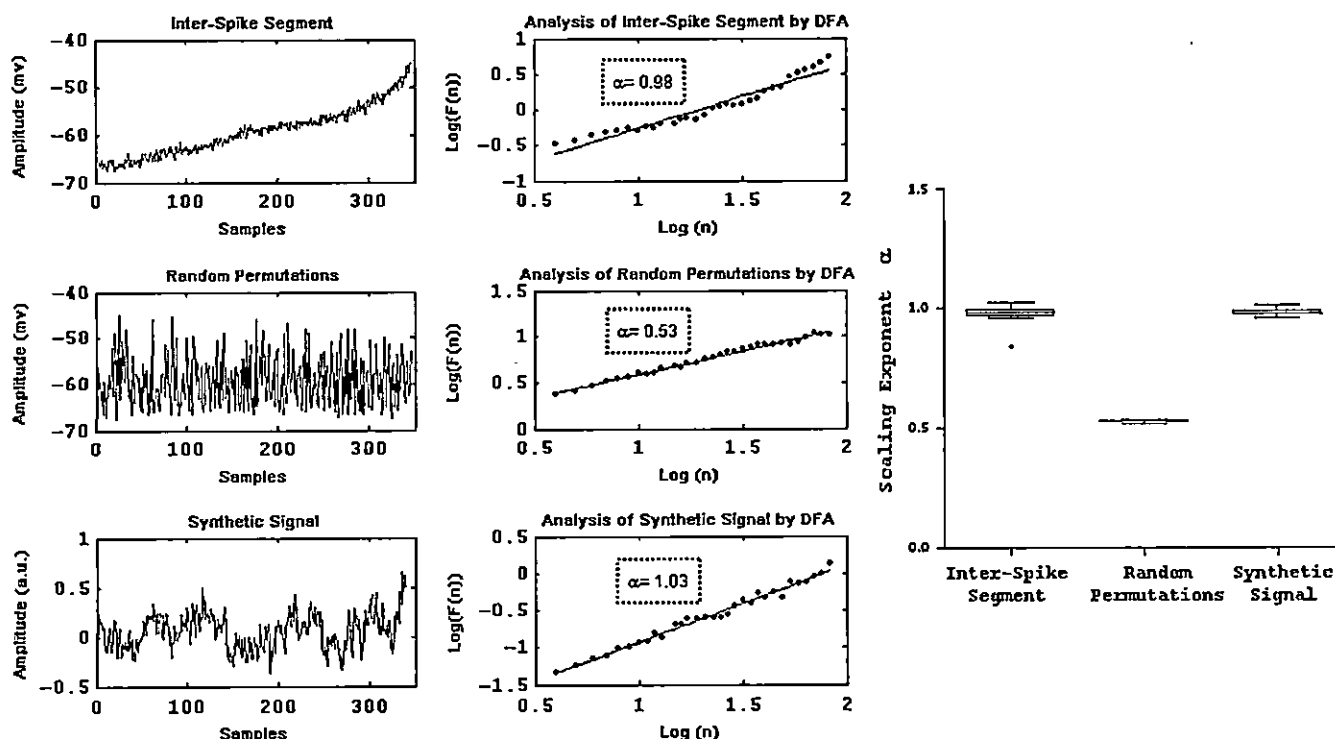


Fig. 3. (Left) Typical example of the voltage fluctuations and DFA results for an inter-spoke segment and its corresponding random permutations (a.u. stands for arbitrary units). (Right) Distributions of the scaling exponent α for the voltage fluctuations of the F1 neuron inter-spoke segments of 12 *Helix aspersa* specimens studied, their random permutations data, and segments with 340 ± 10 samples of synthetic fractal-like ($1/f$) data.

(control) into the cell were 0.506 ([0.459, 0.529] lower and upper quartiles), 1.015 ([0.871, 1.151]) for the inter-spoke segment, and 0.571 ([0.516, 0.598]) for the noise after the electrode was extracted. Significant differences were confirmed by the Kruskal–Wallis test

($P=0.0001$). Pairwise comparisons within groups by Dunn's test indicated that the dynamics of the inter-spoke segment was different from the dynamics of both the noise collected before introducing the electrode into the cell (control) and the noise

collected after extracting the electrode, but no differences were indicated between these last settings (Fig. 2, right).

3.2. Inter-spike data and numeric control groups

The median α results obtained with DFA for the voltage fluctuations of the inter-spike segments were 0.971 ([0.963, 0.995] lower and upper quartiles), 0.526 ([0.521, 0.529]) for the random permutations of the inter-spike segment and 0.978 ([0.969, 0.990]) for the synthetic fractal-like data. Significant differences were confirmed by the Kruskal–Wallis test ($P=0.0001$). Pairwise comparisons within groups by Dunn's test indicated that the dynamics of the random permutations were different from both the inter-spike segment data and the synthetic data. Accordingly, the voltage fluctuations of the inter-spike segment present long-term correlations. Notwithstanding that the analyzed inter-spike segments included 340 ± 10 samples; such correlations were possible to be identified as it becomes endorsed by the distributions and statistical results for permuted and synthetic data (Fig. 3).

3.3. The use of the Langevin equation and the generation of complexity cascades as explanatory models of the long-term correlations in the voltage fluctuations of the inter-spike segment

The use of the Langevin equation, adapted for ionic channels rather than synaptic inputs [54–56], and the generation of complexity cascades [57], by means of an ever increasing probability of cascade process, were selected for modeling and generating synthetic inter-spike voltage fluctuations data.

Two synthetic series with long-term correlations, as confirmed by their DFA scaling exponents (1.067 ± 0.03 and 0.982 ± 0.04 , respectively) are shown in Fig. 4. These series were obtained by either tuning the standard deviation of the Langevin equation stochastic term or by considering growth rates that exponentially

increase the connection among members that can propagate a cascade. Whereas for the use of the Langevin equation we found that it was possible to involve up to 10^5 coupled inputs (connectivity as 1), and for the complexity cascade the same number of system members was also feasible; see Appendix A for more details.

3.4. Sequence of inter-spike time intervals

The scaling exponent α of a typical sequence of inter-spike time intervals (ISI) that occurred during 26 min recording of a F1 neuron was 1.09 ± 0.03 , also indicating long-term correlations (Fig. 5).

4. Discussion

Our main finding is the existence of fractal-like or long-term correlations ($1/f$) as indicated by the scaling analysis of voltage fluctuations of the inter-spike membrane potential, suggesting the interaction of multiple levels of organization acting on different time scales [42,43]. Back et al. showed numerically that the ubiquitous $1/f$ noise emerges in interactive dissipative dynamical systems with many spatial degrees of freedom, evolving into self-organized critical structures of states that show a power-law scaling distribution [49]. Interestingly, this lack of characteristic scales is known to generate fluctuations spanning across time scales. Our results may then appear in accordance with other studies that provide evidence of critical-like phenomena occurring at the single-neuron level [50]. In fact, Gollo et al. have recently shown that criticality at the dendritic arbor optimizes the process for the incoming stimuli [51].

Furthermore, among different approaches for modeling a fractal long-term process ($1/f$) can also be modeled by the superposition of

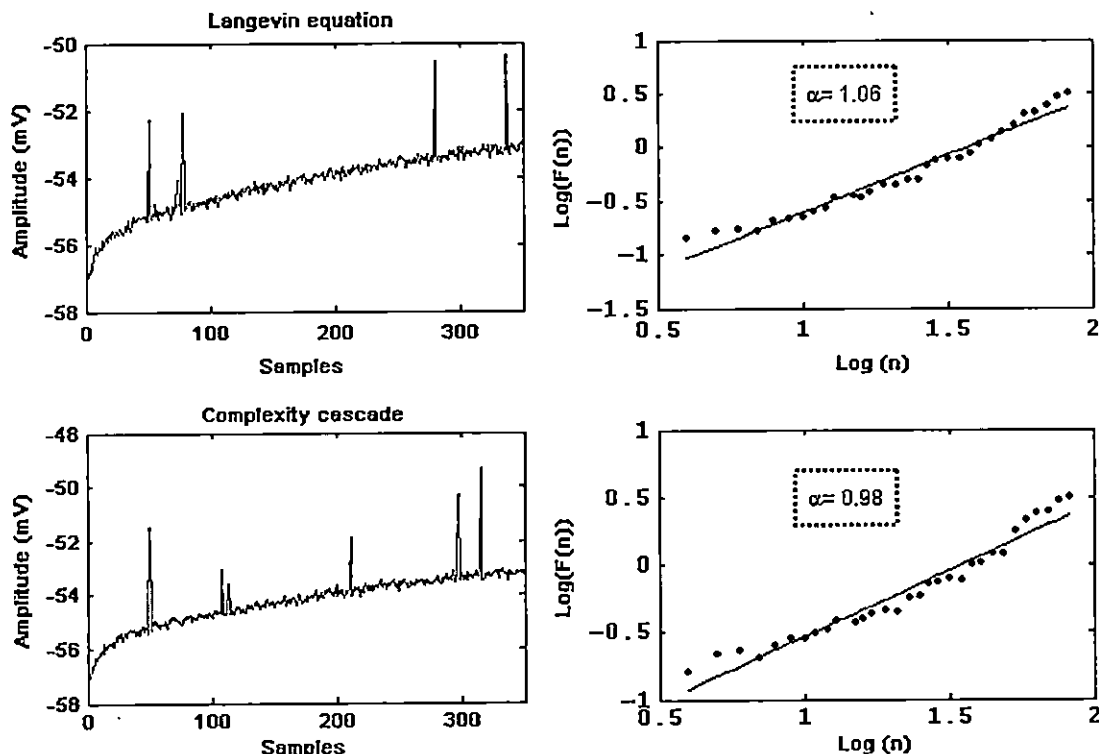


Fig. 4. Synthetic series with long-term correlations obtained by either tuning the standard deviation of the Langevin equation stochastic term, or by considering growth rates that exponentially increase the connection among members that can propagate a cascade. For the use of the Langevin equation, adapted for ionic channels, it was considered 1 as the connectivity and included 10^5 coupled inputs. The complexity cascade process was also generated using the same number of system members.

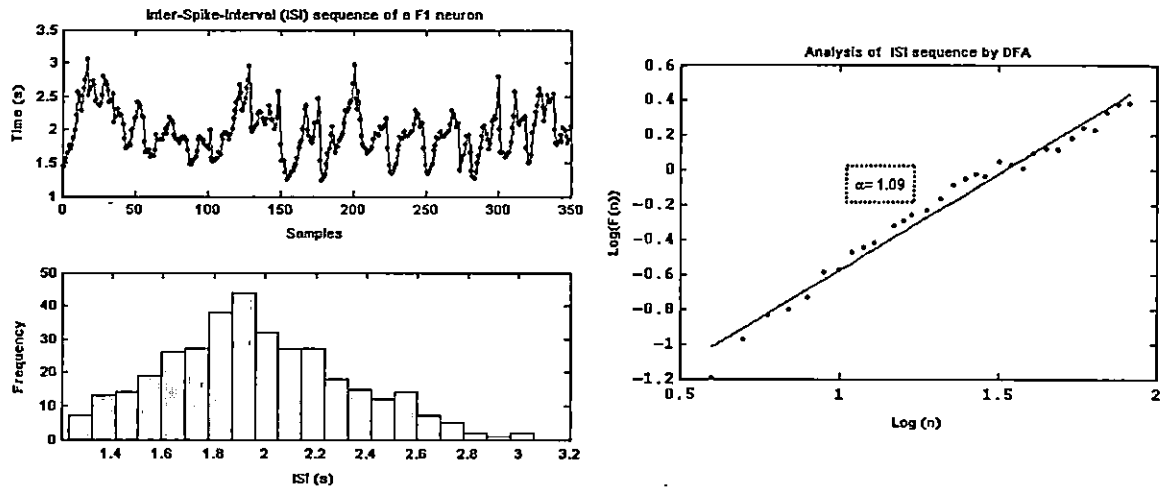


Fig. 5. (Left) Inter-spike time intervals (ISI) sequence for the F1 neuron representing 26 min of an intracellular recording. The figure also depicts the corresponding distribution of ISI and the DFA result for such sequence.

random first-order autoregressive series with different time constants [38,39]. Thus, the main mechanisms that may be involved in the modulation of membrane potential of voltage fluctuations through different time constants are the complex behavior in the spontaneous synaptic release of neurotransmitter molecules [20], the presence of long-term memory in conformational changes of different populations of ionic channels [15–18], and the modulation of cytoplasmic free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$. In particular, this last mechanism is reported as a signaling system involved in the regulation of numerous processes that affects membrane potential including synaptic transmission, membrane trafficking, modulation of ionic channels such as calcium-dependent potassium channels (BK, SK), and voltage-gated calcium of L-type channels [19,29,31,40,41,58].

The scaling analysis applied here may thus offer information about the dynamics of the mechanisms generating voltage fluctuations of the inter-spike membrane potential during spontaneous electrical activity, showing long-term correlations along different time scales. In conjunction with other dynamics, these voltage fluctuations could then be modulated by different populations of ionic channels embedded in the cell membrane; for instance, by the SK channels as well as HCN4 channels, well-known mediators of the frequency of depolarization [30,44]. In fact, the use of the Langevin equation [54–56] and the generation of complexity cascades [57] were suitable for modeling and generating synthetic inter-spike voltage fluctuations data with long-term correlations as a result of either involving up to 10^5 coupled inputs or the same number of system members, respectively (Fig. 4). This number seems consistent with previous findings for the largest neurons of *H. aspersa* such as the F1, having a typical $200 \mu\text{m}$ in diameter [59,22]. This would imply a density of 1 channel/ μm^2 . The Ca^{2+} channels density of chromaffin or *H. aspersa* neurons, for instance, have been reported in 5–15 channels/ μm^2 [60].

The results of this research should complement the studies of the neural inter-spike time intervals (ISI) fluctuations, which are also known to show long-term correlations that could be linked to the dynamic frequency of neural depolarization and information encoding [1–4,7,50,52,53]. As Fig. 5 illustrates, the *H. aspersa* F1 neuron, in addition to showing long-term correlations for the voltage fluctuations of the inter-spike segment, also seems to manifest ISI long-term correlations. It would then appear that the temporal correlations of the inter-spike time intervals are related to the long-term dynamics of the inter-spike voltage fluctuations.

Our study may be limited by the selected sampling frequency, yet similar results were obtained from one F1 neuron using a frequency of 4 kHz, though a lower dispersion of the scaling exponent (α) was obtained. Despite this limitation, we consider that it was possible, nonetheless, to incorporate the dynamic effects of different time constants of the mechanisms involved in the modulation of inter-spike segment, such as the time latency for the HCN4 channels' opening showing either duration or amplitude that increase in relation to the hyperpolarization [45], and the latency of the SK channels that presents a range of activation from 0.5 to 20 ms depending on the intracellular calcium concentration [46–48].

Finally, one would consider the voltage fluctuations of neural electrophysiological recordings as error measurements or as a trace of residual background noise. Thus, often these voltage fluctuations have been excluded before performing analysis, by deleting or filtering them, to focus on the mean values that are considered as the best descriptors of the system. Given the identification of fractal-like correlations, the present approach provides evidence to regard such voltage fluctuations as a useful expression of the intrinsic dynamics of the system providing information about its organization and its state [42,43], thereby endorsing the occurrence of critical-like phenomena at single-neuron level [51].

Summary

The inter-spike membrane potential of neurons is modified by the activation of different mechanisms such as the synaptic transmission, the activation of ionic channels, and the modulation of cytoplasmic free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$, which all modulate the frequency of occurrence of action potentials. Thus, we hypothesized that the intracellular voltage fluctuations of the inter-spike segment present non-random dynamics. Accordingly, in this research we analyzed the intracellular voltage fluctuations of the membrane potential manifested along the inter-spike segment of the *H. aspersa* F1 pacemaker neuron, which is involved in the innervation of sensory organs like the osfradio. To assess their dynamic or stochastic nature, such voltage fluctuations were analyzed by Detrended Fluctuation Analysis (DFA), providing the scaling exponent α . Our results indicate a critical-like dynamic behavior at a single-neuron level that, far from being random, shows long-term correlations leading to regard such voltage

fluctuations as a useful expression of the intrinsic dynamics of the mechanisms involved in regulating the membrane potential. In consequence, the results of this research should complement the studies of the temporal fluctuations for the occurrence of action potentials, which are also known to show a long-term correlated behavior that could be linked to the dynamic frequency of neural depolarization and encoding.

Ethical standard

Experiments were performed according to the guidelines for the use of animals of the Universidad Autónoma Metropolitana-Izt (Mexico City). These guidelines concur with those approved by the National Institutes of Health (Bethesda, USA) and with the recommendations of the Mexican Agency for the Environment and Natural Resources (SEMARNAT).

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgments

We express our sincere gratitude to Juan Bernal for the realization of this study; the first author acknowledges the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT) for supporting his studies (Grant 358414).

Appendix A

A.1. Self-organized critically (complex cascades)

According to the model by Brunt the probability P_{cc} of continuation of a complex cascade was modified to ionic channels as follows [57]:

$$P_{cc} = \frac{(n-r)^g}{N-r}$$

N is the total number of members of a system, n is the number of members capable of transmitting a cascade, and r is the number of members already taking part of a current cascade; g increments the connectivity among members [57].

- $N = 10^5$ number of participating ionic channels
- $r \leq n \leq N$ where n and r are the random numbers of channels
- $g = 7.5$ connectivity of ionic channels
- $V_{r \max} = 4 \text{ mV}$ maximum voltage change in the inter-spike segment from hyperpolarization to the firing threshold
- $V_{channel} = 0.00004 \text{ mV}$ voltage per channel contributing to the inter-spike segment
- $\Delta V = NP_{cc}V_{channel}$ voltage change of the membrane potential
- $V_r = A_1e^{-(t/\tau_1)} + A_2e^{-(t/\tau_2)} + A_3e^{-(t/\tau_3)} + Mt + C$ function fitting used for simulating the slow trend term of a typical inter-spike segment; where $A_1 = -9.20529$, $A_2 = 0.531773$, $A_3 = -1.45376$, $\tau_1 = -670.149$, $\tau_2 = -170.821$, $\tau_3 = 12.4987$, $M = 0.0243637$, and $C = -46.5285$

$V_m = V_r + \Delta V + \xi$ inter-spike voltage fluctuations with non-random dynamics where ξ is the random noise with a Gaussian distribution (0, 1).

A.2. The Langevin equation

The Langevin equation was also considered as the differential equation that governs the dynamics of inter-spike membrane potential V_m [54–56]

$$\frac{dV_m(t)}{dt} = L(V_m, t) + \Gamma_i(V_m, t)$$

where $L(V_m, t) = ((V_0 - V_m)/\tau_m)$ or $L(V_m, t) = A$ with A being a constant; in both cases the model responds in the same way with respect to random data. $\Gamma_i(V_m, t)$ is the Langevin stochastic parameter with a Gauss-distributed, delta-correlated stochastic process characterized by a mean μ and σ^2 [55,56].

The Fokker-Planck equation was used for the solution of the stochastic parameter of the Langevin equation [55]

$$\frac{\partial P(V_m, t)}{\partial t} = \frac{\sigma^2}{2} \frac{\partial^2 P(V_m, t)}{\partial V_m^2} - \left(\mu - \frac{(V_0 - V_m)}{\tau_m} \right) \frac{\partial P(V_m, t)}{\partial V} - \frac{1}{\tau_m} P(V_m, t)$$

where $V_0 = V_m$ for $t=0$, τ_m =membrane time constant, and $P(V_m, t)$ =function probability distribution.

The normalized solution of the function probability distribution for the stochastic parameter is [55,56]

$$P_N(V_m, t) = \frac{p}{2\sqrt{\pi} \varepsilon \alpha_0} \frac{e^{-tb_0}}{\sqrt{1-\gamma^2(t)}} \exp \left[-\frac{1}{1-\gamma^2(t)} \left(\frac{Pr_0}{2b_0\sqrt{\varepsilon}\alpha_0} - \gamma(t)Pz \right)^2 \right]$$

where $-57 \text{ mV} \leq V_m \leq -53 \text{ mV}$ are typical values of the voltage fluctuations in the inter-spike segment.

- τ_m , membrane time constant.
- C , connectivity of ionic channels.
- M , number of participating ionic channels.
- J , contribution to membrane potential by the population of ionic channels
- ν , opening frequency of ionic channels.
- ε , duration of a delta function.

$$\gamma(t) = e^{-tb_0} / (2b_0\sqrt{\varepsilon}\alpha_0)$$

$$\mu = CM\nu J$$

$$\sigma^2 = CM\nu J^2$$

$$b_0 = 1/\tau_m$$

$$a_0 = (\mu\tau_m - \nu_i)/\tau_m$$

$$a_0 = P^2 + 1/(4b_0^2\varepsilon)$$

$$P = 1/\sigma \times \sqrt{b_0}$$

$$z = a_0 + b_0V_m$$

$$\Delta V = P_V V_r \max$$

where P_V is a random value from $P_N(V_m, t)$.

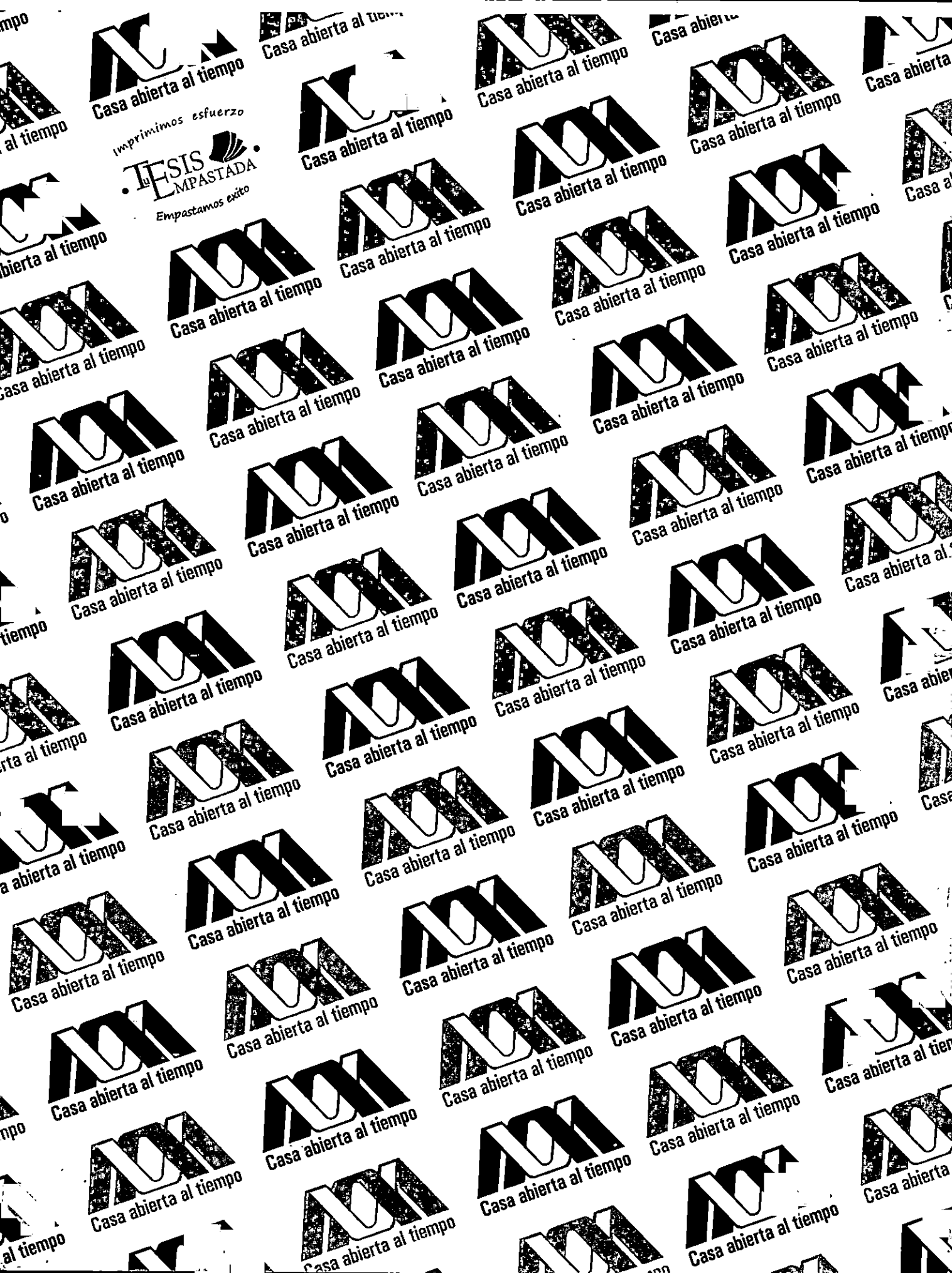
$$V_m = V_r + \Delta V + \xi$$

Inter-spike voltage fluctuations with non-random dynamics where ξ is the random noise with a Gaussian distribution (0, 1).

For simulation, the following values were used: $\varepsilon = 10^{-8} \text{ ms}$, $C = 1$, $M = 10^5$, $J = 0.1 \text{ mV}$, $\mu\tau_m = 45 \text{ mV}$, $\sigma^2\tau_m = 4.5 \text{ mV}^2$, and $\tau_m = 15 \text{ ms}$ [61].

References

- [1] T. Musha, H. Takeuchi, T. Inoue, $1/f$ Fluctuations in the spontaneous spike discharge intervals of a giant snail neuron, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 30 (1983) 194–197.
- [2] S. Blesić, S. Milošević, Dj. Stratimirović, M. Ljubisavljević, Detrended fluctuation analysis of time series of a firing fusimotor neuron, *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* 268 (1999) 275–282.
- [3] C.D. Lewis, G.L. Gebber, P.D. Larsen, S.M. Barman, Long-term correlations in the spike trains of medullary sympathetic neurons, *J. Neurophysiol.* 85 (2001) 1614–1622.
- [4] S. Blesić, S. Milošević, Dj. Stratimirović, M. Ljubisavljević, Detecting long-range correlations in time series of dorsal horn neuron discharges, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1048 (2005) 385–391.
- [5] J. Douglas, G.P. Moore, Interspike interval fluctuations in aplysia pacemaker neurons, *Biophys. J.* 6 (1966) 411–434.
- [6] K. Robin, N. Maurice, B. Degos, J.M. Deniau, J. Martinerie, L. Pezard, Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: a case study for methodological comparison, *J. Neurosci. Methods* 179 (2009) 142–149.
- [7] A.A. Verveen, H.E. Derksen, Fluctuations in membrane potential of axons and the problem of coding, *Kybernetik* 2 (1965) 152–160.
- [8] Y. Lass, M. Abeles, Transmission of information by the axon: I. Noise and memory in the myelinated nerve fiber of the frog, *Biol. Cybern.* 19 (1975) 61–67.
- [9] H.E. Derksen, A.A. Verveen, Fluctuations of resting neural membrane potential, *Science* 151 (1966) 1388–1389.
- [10] A.A. Verveen, H.E. Derksen, Fluctuation phenomena in nerve membrane, *Proc. IEEE* 56 (1968) 906–916.
- [11] R.J. Vandenberg, E. Siebenga, G. Debruin, Potassium-ion noise currents and inactivation in voltage-clamped node of ranvier, *Nature* 265 (1977) 177–179.
- [12] B. Neumcke, $1/f$ Noise in membranes, *Biophys. Struct. Mech.* 4 (1978) 179–199.
- [13] A.M. Churrilla, W.A. Gottschalk, L.S. Liebovitch, L.Y. Selector, A.T. Todorov, S. Yeandle, Membrane potential fluctuations of human T-lymphocytes have fractal characteristics of fractional brownian motion, *Ann. Biomed. Eng.* 24 (1996) 99–108.
- [14] L.S. Liebovitch, A.T. Todorov, Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel proteins, *Crit. Rev. Neurobiol.* 10 (1996) 169–187.
- [15] R.A. Campos de Oliveira, C.T.F. Barbosa, L.H.A. Consoni, A.R.A. Rodrigues, W.A. Varanda, R.A. Nogueira, Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics, *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* 364 (2006) 13–22.
- [16] T.H. Lan, Z.Y. Gao, A.N. Abdalla, B. Cheng, S. Wang, Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal, *Cell Biol. Int.* 32 (2008) 247–252.
- [17] Z.Y. Peng, T.H. Lan, L. Yang, H.C. Mei, J.H. Ping, X.Y. Jie, C.X. Lin, Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel, *Cell Biol. Int.* 36 (2012) 973–979.
- [18] L. Tong-Han, X. Huang, L. Jia-Rui, Correlation character of ionic current fluctuations: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel, *Biophys. Chem.* 117 (2005) 191–197.
- [19] A.P. Thomas, C.S. Bird, G. Hajnóczky, L.D. Robb-Gaspers, J.W. Putney Jr., Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling, *FASEB J.* 10 (1996) 1505–1517.
- [20] J. Lamanna, A. Malgaroli, S. Cerutti, M.G. Signorini, Detection of fractal behavior in temporal series of synaptic quantal release events: a feasibility study, *Comput. Intell. Neurosci.* 2012 (2012) 1–9.
- [21] R. Chase, Behavior and its Neural Control in Gastropod Molluscs, Oxford University Press, New York, 2002 (Chapter 3).
- [22] G.A. Kerker, J.D.C. Lambert, R.J. Gayton, J.E. Loker, R.J. Walker, Mapping of nerve-cells in subesophageal ganglia of *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.* 50 (1975) 1–25.
- [23] P.G. Kostyuk, *Neurobiology of Invertebrates*, Springer, US (1995) 145–167.
- [24] R.W. Meech, Calcium influx induces a post-tetanic hyperpolarization in aplysia neurones, *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 48 (1974) 387–395.
- [25] R.W. Meech, N.B. Standen, Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx, *J. Physiol.* 249 (1975) 211–259.
- [26] D.J. Adams, S.J. Smith, S.H. Thompson, Ionic currents in molluscan soma, *Ann. Rev. Neurosci.* 3 (1980) 141–167.
- [27] F.J. Alvarez-Leefmans, T.J. Rink, R.Y. Tsien, Free calcium ions in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes, *J. Physiol.* 315 (1981) 531–548.
- [28] D.G. Lang, A.K. Ritchie, Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line, *Pflüg. Arch.* 410 (1987) 614–622.
- [29] E.S. Faber, P. Sah, Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function, *Neuroscientist* 9 (2003) 181–194.
- [30] E.S. Faber, P. Sah, Functions of SK channels in central neurons, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (2007) 1077–1083.
- [31] M.J. Azanza, C. Pérez-Castejón, N. Pes, R.N. Perez-Bruzón, J. Aisa, C. Junquera, C. Maestró, M. Lahoz, C. Martínez-Ciriano, A. Vera-Gil, A. del Moral, Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in *Helix aspersa* subesophageal brain ganglia neurons, *Histol. Histopathol.* 23 (2008) 397–406.
- [32] G.A. Kerker, R.J. Walker, The resting potential and potassium levels of cells from active and inactive snails, *Comp. Biochem. Physiol.* 2 (1961) 76–79.
- [33] R.W. Meech, R.C. Thomas, Voltage-dependent intracellular pH in *Helix aspersa* neurones, *J. Physiol.* 390 (1987) 433–452.
- [34] C. Lüscher, P.A. Slesinger, Emerging concepts for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 301–315.
- [35] M.A. Peña, J.C. Echeverría, M.T. García, R. González-Camarena, Applying fractal analysis to short sets of heart rate variability data, *Med. Biol. Eng. Comput.* 47 (2009) 709–717.
- [36] D. Suape, P. Heinz-Otto, The Science of Fractal Images, Springer, New York, 1988 (Chapter 2).
- [37] C.K. Peng, S. Havlin, H.E. Stanley, A.L. Golberger, Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time-series, *Chaos* 5 (1995) 82–87.
- [38] J.M. Hausdorff, C.K. Peng, Multiscaled randomness: a possible source of $1/f$ noise in biology, *Phys. Rev. E* 54 (1996) 2154–2157.
- [39] L. Guzmán-Vargas, F. Angulo-Brown, Simple model of the aging effect in heart interbeat time series, *Phys. Rev. E* 67 (2003) 052901–1.
- [40] M.J. Berridge, Neuronal calcium signaling, *Neuron* 21 (1998) 13–26.
- [41] J.K. Foskett, C. White, K.H. Cheung, D.O. Mak, Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 593–658.
- [42] D. Delignieres, V. Marmelat, Fractal fluctuations and complexity: current debates and future challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 485–500.
- [43] B. Hoop, C.K. Peng, Fluctuations and fractal noise in biological membranes, *J. Membr. Biol.* 177 (2000) 177–185.
- [44] M. Biel, C. Wahl-Schott, S. Michalakakis, X. Zong, Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 847–885.
- [45] T.A. Simeone, J.M. Rho, T.Z. Baran, Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurones, *J. Physiol.* 568 (2005) 371–380.
- [46] B. Hirschberg, J. Maylie, J.P. Adelman, N.V. Marrion, Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K^{+} channels by calcium, *J. Gen. Physiol.* 111 (1998) 565–581.
- [47] B. Hirschberg, J. Maylie, J.P. Adelman, N.V. Marrion, Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons, *Biophys. J.* 77 (1999) 1905–1913.
- [48] X.M. Xia, B. Fakler, A. Rivard, G. Wayman, T. Johnson-Pais, J.E. Keen, T. Ishii, B. Hirschberg, C.T. Bond, S. Lutsenko, J. Maylie, J.P. Adelman, Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels, *Nature* 395 (1998) 503–507.
- [49] P. Bak, C. Tang, K. Wiesenfeld, Self-organized criticality: an explanation of $1/f$ noise, *Phys. Rev. Lett.* 59 (1987) 381–384.
- [50] J. Bhattacharya, J. Edwards, A.N. Mamelak, E.M. Schuman, Long-range temporal correlations in the spontaneous spiking of neurons in the hippocampal-amygdala complex of humans, *Neuroscience* 131 (2005) 547–555.
- [51] L.L. Gollo, O. Kinouchi, M. Copelli, Single-neuron criticality optimizes analog dendritic computation, *Sci. Rep.* 3 (2013) 3222.
- [52] A. Mazzoni, F.D. Broccard, On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks, *Plos One* 5 (2007) 1–12.
- [53] I.M. Parish, G.A. Worrell, S.D. Cranston, S.M. Stead, P. Pennell, B. Litt, Long-range temporal correlations in epileptogenic and non-epileptogenic human hippocampus, *Neuroscience* 125 (2004) 1069–1076.
- [54] K. Sekimoto, *Stochastic Energetics, Physics of Langevin Equation*, Lecture Notes in Physics, Springer, Berlin Heidelberg (2010) 3–66.
- [55] J.D. Derek, *Physics Research Notes on the Langevin Equation for a Neuronal Spiking Model*, University Tunku Abdul Rahman, Faculty of Engineering and Science, Malaysia (2008) 1–34.
- [56] J. Reutimann, M. Giugliano, S. Fusi, Even-driven simulation of spiking neurons with stochastic dynamics, *Neural Comput.* 15 (2003) 811–830.
- [57] G.G. Bruck, Understanding self-organized criticality as a statistical process, *Complexity* 5 (2000) 26–33.
- [58] A.M. Brown, K. Morimoto, Y. Tsuda, D.L. Wilson, Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspersa*, *J. Physiol.* 320 (1981) 193–218.
- [59] S. Ratté, R. Chase, Synapse distribution of olfactory interneurons in the procererebrum of the snail *Helix aspersa*, *J. Comp. Neurol.* 417 (2000) 366–384.
- [60] E.M. Fenwick, A. Marty, E. Neher, Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells, *J. Physiol.* 331 (1982) 599–635.
- [61] N. Fourcaud, N. Brunel, Dynamics of the firing probability of noisy integrate and fire neurons, *Neural Comput.* 14 (2002) 2057–2110.



Casa abierta al tiempo

Imprimimos esfuerzo

TESIS
EMPASTADA
Empastamos éxito

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo