



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Rol de la inhibición premotora en patrones motores rítmicos

Tesis presentada para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Martina Radice

Directora de tesis: Dra. Lidia Szczupak

Consejero de estudios: Dr. Fernando Locatelli

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias,
UBA-CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

RESUMEN

Título - Rol de la inhibición premotora en patrones motores rítmicos

Palabras clave - inhibición recurrente, control motor, generador de patrones centrales, patrón motor rítmico, comportamiento ficticio

La organización funcional de los sistemas motores sigue siendo en gran medida una incógnita, incluyendo la lógica subyacente a los circuitos neuronales responsables de generar la secuencia precisa y ordenada de activación de las motoneuronas durante la locomoción. Las sanguijuelas son un modelo útil para el estudio del control motor, dado que presentan comportamientos rítmicos robustos controlados por un sistema nervioso relativamente simple. En superficies sólidas, las sanguijuelas se desplazan mediante crawling, un patrón motor rítmico que puede ser evocado en el cordón nervioso aislado o incluso en ganglios individuales (crawling ficticio). Este trabajo tuvo como objetivo estudiar cómo la salida motora es modulada por señales premotoras concurrentes. Específicamente, evaluamos, mediante registros y manipulaciones electrofisiológicas, cómo una neurona premotora que no dispara potenciales de acción (NS) y que forma un circuito inhibitorio recurrente con las motoneuronas (análogo al que establecen las células de Renshaw en vertebrados) organiza el patrón motor de crawling. Este estudio incluyó un análisis cuantitativo de las unidades motoras activas durante los ciclos de crawling ficticio, mostrando que la salida motora rítmica registrada en ganglios aislados refleja la relación de fases que se observa in vivo. En conjunto, los resultados de este trabajo revelan que las neuronas premotoras NS, bajo el control del oscilador de un ganglio aislado, modulan el grado de excitación de las motoneuronas durante crawling ficticio de manera fase-específica.

ABSTRACT

Title - Role of Premotor Inhibition in Rhythmic Motor Patterns

Keywords - recurrent inhibition, motor control, central pattern generators, rhythmic motor pattern, fictive behavior

Understanding the functional organization of motor systems remains largely an open question, particularly regarding the logic underlying the neural circuits responsible for generating the precise and orderly sequence of motoneuron activation during locomotion. Leeches are a highly suitable model for studying motor control due to their well-characterized behaviors governed by a relatively simple nervous system. On solid surfaces, leeches display crawling, a rhythmic motor pattern that can be elicited in the isolated nerve cord or even in single isolated ganglia (fictive crawling). This study aimed to investigate how motor output is shaped by concurrent premotor signals. Specifically, we used electrophysiological recordings and manipulations to analyze how a premotor nonspiking (NS) neuron, which forms a recurrent inhibitory circuit with motoneurons (analogous to that formed by vertebrate Renshaw cells), modulates the leech crawling motor pattern. The study included a quantitative analysis of motor units active during fictive crawling cycles, showing that the rhythmic motor output recorded in isolated ganglia mirrored the phase relationships observed *in vivo*. Taken together, the results reveal that the premotor NS neurons, under the control of the segmental pattern generator, modulate the degree of excitation of motoneurons during fictive crawling in a phase-specific manner.

Por cosas como éstas me gusta la realidad:
porque si uno permanece allí el tiempo suficiente,
antes o después ella se ofrece, generosa, y nos premia con la flor jugosa del azar.

Leila Guerriero

El aire está repleto del arrullo de las palomas: cinco notas lastimeras
que se repiten una y otra vez. Me pregunto qué se estarán diciendo.

Al Alvarez

Agradezco (mucho) a mi directora, Lidia Szczupak. Por su manera de hacer ciencia y cuestionar las cosas tan inspiradora. Porque las charlas científicas siempre fueron interesantes, pero también porque fue siempre difícil hablar sólo de ciencia.

Agradezco a Violeta por haber estado para escucharme cada vez que lo necesité. Para discutir ciencia, incertidumbres, o datos insólitos. Gracias por el buen humor y el sentido común.

Gracias a Lidia y Violeta, juntas, por construir un espacio de seminarios y discusión increíble. Y gracias a todas las personas que forman parte tanto de la versión original como de la nueva versión mucho más eufórica de estos seminarios: laboratorios Szczupak, Medan, Belluscio y Marachlian. Gracias especialmente a mis compañeros de laboratorio: Grace, compañera desde el principio, y Ale, renovador de energía clave.

Muchas gracias al jurado por aceptar leer y discutir este trabajo. Muchas gracias al Comité de Seguimiento de Tesis.

Agradezco hacer ciencia en el IFIBYNE, rodeada de tanta gente absolutamente bárbara. Gracias especiales al laboratorio Locatelli, laboratorio por adopción, y al laboratorio Beckwith. Gracias a Luz.

Gracias a Beck por la escucha atenta, las preguntas asertivas, las explicaciones. Por un voto de confianza que representó muchísimo para mí.

Ser docente en Exactas es mi mayor desafío y por lo que más agradecida estoy. Gracias al equipo docente de Fisiología del Sistema Nervioso. Gracias por los seminarios perfectos en los que aprendí de ciencia y docencia más que en cualquier otro lado.

Agradezco haber tenido la oportunidad de explorar nuevas maneras de hacer ciencia. Gracias al Neurobiology Course, una experiencia transformadora a la que le sientan bien todos los clichés. Especialmente a Becky Piskorowski, a Ricardo Araneda y a Nati. Y gracias a la School of Ideas in Neuroscience de Nencki, como participante y como organizadora. A Mateusz, delirante e inspirador.

Muchas gracias a mis amigos y amigas que formaron parte de estos años repletos de entusiasmo e incertezas. Y a algunos un gracias un poquito más específico. A Candela, que siempre siempre tuvo las palabras justas, el consejo perfecto, la sensibilidad. A Martín, por ser siempre un ejemplo de cómo ver y hacer las cosas, un científico (y persona) genial. A Beck, por el entusiasmo, los cafés y por Marina y Toni, a quienes también agradezco mucho por tantos paseos y horas de charla. A Santi, por la incondicionalidad, los filtrados, la compañía de todos los días. A Lulo, amigo y compañero charlatán al que siempre le faltan más palabras. A Marto, a quien admiro mucho, mi amigo más divertido. A la Chancha, grupo un poco propio un poco adoptivo, siempre presente. A la Red de Estudiantes de Neurociencias, por la motivación y las ganas infinitas de discutir y mejorar las cosas, por todos los proyectos que concretamos y los que algún día quizás concretaremos. Gracias a mi compañera y amiga ideal de trayectoria científica y de la vida, Shuls. Ni siquiera creo que tenga sentido intentar explicar por qué, pero espero que todos los caminos nos lleven a más bagels, cafés, discusiones, a hacer ciencia (o cualquiera de los infinitos planes potenciales) juntas.

Gracias a la familia Duarte por la compañía, la generosidad. Gracias a Delfi Duarte por su perspectiva de las cosas.

Muchas gracias a mi familia. Mamá, papá, Efi. Porque están siempre en todo: en los detalles y en lo que parece imposible. Por convertir en tuyas mis emociones, mis desafíos y acompañarme en todo eso y mucho más. Por ser ejemplo de tantas cosas que no podría ni empezar a numerar. Por siempre ser el lugar tranquilo al que volver.

Muchas gracias a Lau. Compañero académico y de la cotidaneidad. Porque no hay nada mejor que unos mates juntos. Porque siempre sos más, mucho más, de lo que espero. Por tantas discusiones de ciencia, por intentar no hablar tanto de ciencia, por este camino que estamos construyendo gracias a animarnos mutuamente a siempre aceptar nuevos desafíos, nuevas aventuras.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y al CONICET. Por la educación pública, gratuita y de calidad y por la beca que posibilitaron mi formación académica.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados detallados en esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Radice, M., Merlinsky, A. S., Yulita, F., & Szczupak, L. (2025).

Phase-specific premotor inhibition modulates leech rhythmic motor output.

eLife, 14. <https://doi.org/10.7554/eLife.104921.2>

Kearney, G. I., Radice, M., Sanchez Merlinsky, A., & Szczupak, L. (2022).

Intersegmental Interactions Give Rise to a Global Network.

<https://doi.org/10.3389/fncir.2022.843731>

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	5
PUBLICACIONES	13
ÍNDICE	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Redes neuronales encargadas del control motor	25
2. Patrón motor rítmico y <i>Central Pattern Generators</i>	28
3. Comportamientos rítmicos ficticios.....	31
4. Mecanismos de inhibición premotora involucrados en redes neuronales de control motor.....	32
5. <i>Hirudo sp.</i> como modelo de estudio de control motor	33
6. Patrón motor rítmico de crawling	36
7. Inhibición premotora en crawling: el circuito de inhibición recurrente entre las motoneuronas y la neurona NS.....	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Animales.....	49
2. Preparación biológica.....	49
3. Registros electrofisiológicos.....	50
4. Análisis de registros extracelulares: identificación y clasificación de unidades .	51
5. Procesamiento de los datos de experimentos de electrofisiología	53
6. Experimentos comportamentales.....	56
7. Análisis estadístico	57
8. Comparación de matrices	58

9. Tinción de la neurona NS para análisis morfológico	59
RESULTADOS	61
Capítulo 1. ¿Cómo se comportan las neuronas premotoras NS durante crawling?	63
1.1. Caracterización de crawling ficticio en ganglio aislado.....	66
1.2. ¿Son similares entre sí los patrones rítmicos de ganglios de distintas partes del cordón nervioso?	69
1.3. Caracterización de NS durante <i>crawling</i>	70
1.4. ¿Cuál es el origen de las hiperpolarizaciones de NS durante <i>crawling</i> ?.....	72
1.5. ¿Existe durante el crawling un <i>input</i> presináptico en común que excita a la motoneurona DE-3 e hiperpolariza a la neurona premotora NS?	74
1.6. Discusión.....	76
Capítulo 2. ¿Cómo modula NS la salida motora durante el <i>crawling</i> ? Análisis de la actividad de la motoneurona DE-3.....	79
2.1. Efecto de de la neurona premotora NS sobre la actividad de la motoneurona DE-3 durante <i>crawling</i>	81
2.2. Discusión.....	86
Capítulo 3. Un análisis detallado del patrón motor de <i>crawling</i>	89
3.1. Registro e identificación de unidades motoras rítmicas.....	91
3.2. Clusterización algorítmica	93
3.3. Clusterización manual	95
3.4. Discusión.....	97
Capítulo 4. ¿Cómo modula la neurona NS la actividad motora	101
durante los ciclos de crawling ficticio?.....	101
4.1. Efecto de de la neurona premotora NS sobre la actividad de distintos tipos de unidades motoras durante <i>crawling</i>	103
4.2. Comparación del efecto de NS sobre unidades motoras excitatorias e inhibitorias.....	109

4.3. ¿Las neuronas premotoras NS están conectadas con el oscilador responsable del crawling?	113
4.4. ¿Existe un efecto de la despolarización de NS sobre la correlación de la actividad de los distintos grupos de unidades motoras durante crawling?.....	116
4.5. Discusión.....	120
Capítulo 5. Comparación entre el patrón motor en ganglios aislados y el comportamiento de crawling.....	125
5.1. ¿En qué medida la actividad registrada en ganglios aislados recapitula el crawling in vivo?	128
5.2. Discusión.....	134
DISCUSIÓN	137
Parte 1. Comportamiento ficticio de crawling en <i>Hirudo sp.</i>	139
Parte 2. Actividad de la neurona premotora NS durante <i>crawling</i>	146
Parte 3. Rol de la neurona premotora inhibitoria NS en la modulación del patrón motor rítmico de <i>crawling</i>	148
APÉNDICE.....	157
Tablas de estadística.....	157
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	165
S1. Resultados suplementarios del Capítulo 1	167
Caracterización de crawling ficticio en ganglio aislado	167
¿Son similares entre sí los patrones rítmicos de ganglios de distintas partes del cordón nervioso?	170
S2. Resultados suplementarios del Capítulo 2.....	171
S3. Resultados suplementarios del Capítulo 3.....	173
Clasificación de las unidades motoras en función del nervio en que fueron registradas.....	173
S4. Resultados suplementarios del Capítulo 4.....	175
S5. Resultados suplementarios del Capítulo 5.....	176

Comparación entre ganglios aislados perturbados mediante la despolarización de la neurona NS	176
Comparación entre secciones durante crawling in vivo.....	178
REFERENCIAS.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Nervio anteroanterior (*Anterior Anterior*)

AM - Ancho medio

CPG - Generador Central de Patrones (*Central Pattern Generator*)

NS - Neurona que no dispara potenciales de acción (*Non-spiking neuron*)

DE - Motoneurona excitatoria dorsal (*Dorsal Excitor*)

DI - Motoneurona inhibitoria dorsal (*Dorsal Inhibitor*)

DP - Nervio posterior dorsal (*Dorsal Posterior*)

EE - Error estándar

FDm - Frecuencia de disparo media

FDb - Frecuencia de disparo *binneada*

MA - Nervio medial anterior (*Median Anterior*)

PP - Nervio posteroposterior (*Posterior posterior*)

VE - Motoneurona excitatoria ventral (*Ventral Excitor*)

VI - Motoneurona inhibitoria ventral (*Ventral Inhibitor*)

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores desafíos de la neurobiología es comprender cómo se organiza y funciona el sistema nervioso para que la actividad neuronal se traduzca en comportamientos. En este sentido, el estudio de los comportamientos motores, y en particular de las redes neuronales encargadas del control motor, ofrece ventajas claras para abordar estas preguntas, ya que permite investigar los principios de organización, procesamiento de información y funcionamiento de los circuitos neuronales a partir de una medición directa de su salida: la actividad motora.

1. Redes neuronales encargadas del control motor

Los comportamientos motores rítmicos, como la natación, el vuelo o la locomoción terrestre, posibilitan el desplazamiento, la huida de predadores y la búsqueda de alimento, y son, por lo tanto, fundamentales para que los animales puedan interactuar con su entorno. Estos comportamientos son intrínsecamente complejos, dado que requieren la activación coordinada de numerosos músculos. Para lograrlo, la locomoción animal debe valerse de mecanismos de control que reduzcan los grados de libertad de un sistema compuesto por múltiples unidades, garantizando así la coordinación efectiva de los músculos involucrados (Dickinson et al., 2000).

Esta coordinación de la salida motora se encuentra bajo el control del sistema nervioso, específicamente, de las redes neuronales de control motor. Estas redes se caracterizan por estar ampliamente distribuidas en el cuerpo de los animales y por presentar una organización jerárquica (Büschges et al., 2011; Grillner & El Manira, 2015; Kristan et al., 2005), como se esquematiza en la Figura I1. En la cima de la jerarquía, la activación de un número reducido de neuronas, las neuronas comando, permite gatillar el inicio de patrones motores complejos y definir los aspectos globales del comportamiento (Brodghehrer & Friesen, 1986; Flood et al., 2013; Graziano et al., 2002). En la base de la jerarquía, se encuentran múltiples motoneuronas encargadas de comandar directamente la contracción de los músculos. Entre el comando y la ejecución se ubican circuitos neuronales, conformados por neuronas premotoras, cuya conectividad permite garantizar la ritmicidad del movimiento (Grillner et al., 1991). Mientras que las neuronas que operan en los niveles superiores suelen localizarse en

regiones cefálicas del sistema nervioso, las neuronas premotoras y las motoneuronas, vinculadas a los circuitos ejecutores que gobiernan los movimientos, se distribuyen a lo largo de la cadena de ganglios en invertebrados o en segmentos de la médula espinal en vertebrados. Esta distribución anatómica descentralizada de las redes neuronales ha dificultado el estudio detallado de la arquitectura funcional del sistema motor (Arber & Costa, 2018; Falgairolle et al., 2006).

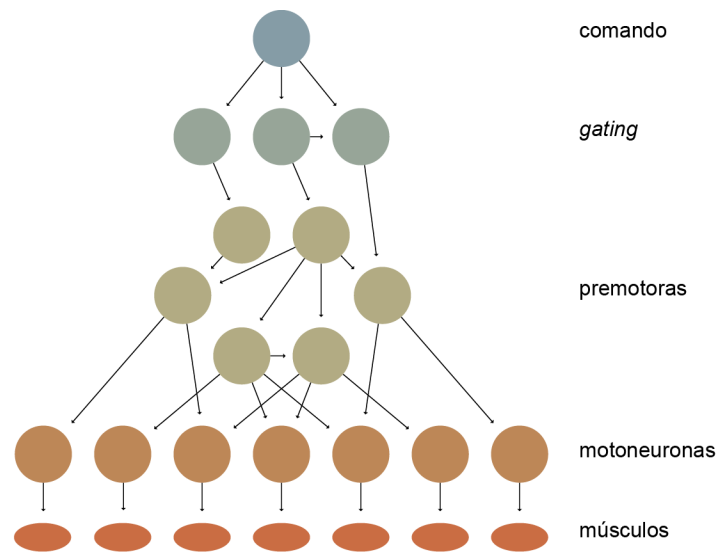


Figura 11. Esquema representativo de la organización jerárquica de las redes neuronales de control motor. Las neuronas comando envían las señales descendentes que activan los circuitos ejecutores en la cadena de ganglios o en la médula espinal. Las neuronas de *gating* se encuentran activas durante la ejecución de un programa motor específico. Las neuronas premotoras y las motoneuronas son activadas por las neuronas de *gating*, y su actividad controla los músculos involucrados en el comportamiento. Este esquema es una simplificación y sólo refleja las señales descendentes.

¿Cómo operan los circuitos ejecutores de comportamientos motores?

La organización funcional de los sistemas motores sigue siendo en gran medida una incógnita tanto en vertebrados como en invertebrados, incluyendo la lógica subyacente a los circuitos neuronales responsables de generar la secuencia precisa y ordenada de activación de las motoneuronas involucradas durante la locomoción (Arber & Costa, 2018; Barkan & Zornik, 2019; Calabrese & Marder, 2024; El Manira, 2023; Grätsch et al., 2019; Grillner & El Manira, 2020; Kiehn, 2016; Sengupta & Bagnall, 2023). En

este sentido, los mecanismos que operan a nivel de la médula espinal en vertebrados o a nivel de la cadena de ganglios en invertebrados resultan particularmente relevantes, dado que es allí donde se encuentran los circuitos ejecutores encargados de recibir las señales de las neuronas comando y gobernar la ejecución del comportamiento.

En vertebrados e invertebrados, la planificación e iniciación del comportamiento motor se generan en áreas jerárquicamente superiores, mientras que la producción precisa del ritmo y del patrón de la locomoción se encuentra localizada en neuronas del cordón nervioso (Kiehn, 2011; Marder et al., 2005). Estas neuronas reciben información descendente y son capaces de generar de manera autónoma tanto la ritmicidad como la secuencia del movimiento, que luego es transmitida a las motoneuronas encargadas de activar los músculos. Esta organización fue descrita inicialmente en gatos (Brown, 1911) y posteriormente confirmada en diversos modelos animales (Kiehn, 2016).

Es posible, entonces, pensar a las redes neuronales que controlan los comportamientos motores en términos de tres componentes principales que le confieren modularidad y flexibilidad al sistema. Primero, neuronas cuyas proyecciones se encuentran restringidas al cordón nervioso y que generan el ritmo y el patrón motor (Jankowska, 2001; Kiehn, 2011; G. N. Orlovsky et al., 1999). Segundo, circuitos del cordón nervioso que interactúan con áreas superiores, con las que se comunican de manera bidireccional (Grillner et al., 2005; G. N. Orlovsky et al., 1999). Tercero, sistemas de retroalimentación sensorial que monitorean constantemente las consecuencias de las acciones motoras (Brown, 1911; Rossignol et al., 2006; Windhorst, 2007). Esta organización modular y, como se mencionó, jerárquica garantiza un repertorio motor diverso, pero a la vez complejiza la tarea de estudiar la conectividad y el funcionamiento del sistema motor (revisado en Arber, 2012).

Tanto en vertebrados como en invertebrados, el análisis de la organización del sistema motor a través del estudio de diversos organismos, etapas del desarrollo y tipos de comportamiento ha aportado información valiosa sobre la arquitectura y función subyacentes al control motor. En particular, el estudio de las redes neuronales

de control motor se ha desarrollado históricamente en invertebrados, lo que ha permitido abordar preguntas fundamentales sobre cómo se organizan funcionalmente las redes locomotoras y cuán plásticas pueden ser frente a distintas perturbaciones (Marder & Bucher, 2001).

2. Patrón motor rítmico y *Central Pattern Generators*

A comienzos del siglo XX, se propuso que, durante la ejecución de un comportamiento motor rítmico, particularmente la locomoción terrestre, la alternancia entre músculos antagonistas se produce mediante la inhibición recíproca de neuronas que los controlan (Brown, 1911). Estos circuitos, denominados generadores centrales de patrones (CPGs, por sus siglas en inglés), se encuentran a nivel premotor y, debido a las propiedades intrínsecas de sus componentes y su conectividad, son capaces de generar una salida rítmica con un patrón similar al observado durante un determinado comportamiento (Grillner, 2003; Marder & Bucher, 2001). En la naturaleza, estos circuitos participan tanto en comportamientos locomotores (caminata, vuelo, nado) como no locomotores (respiración, latido cardíaco; Ayali & Lange, 2010; Grillner, 1975; Marder & Rehm, 2005).

¿Cómo se generan los patrones motores rítmicos?

Una característica central de los CPGs es que no requieren señales sensoriales ni *inputs* que aporten información temporal específica para generar su salida rítmica (Wilson, 1961). Así, los circuitos generadores de ritmo, ubicados a nivel premotor, convierten señales de entrada no rítmicas en señales rítmicas capaces de reclutar a las motoneuronas involucradas en el comportamiento. En otras palabras, los CPGs reciben señales comando desde niveles superiores, pero generan de manera autónoma la ritmicidad necesaria para la ejecución del movimiento, permitiendo que los sistemas nerviosos produzcan comportamientos motores robustos con ritmos y patrones característicos. El ritmo está determinado por la temporalidad o la regularidad de las oscilaciones neuronales o de la salida motora, mientras que el

patrón está dado por el reclutamiento coordinado y secuencial de los músculos involucrados (McLean & Dougherty, 2015).

Existen dos mecanismos generales mediante los cuales los CPGs pueden producir patrones rítmicos (Figura I2). En el primero, la actividad rítmica es impulsada por neuronas marcapasos. Las redes impulsadas por marcapasos se encuentran típicamente en circuitos cuya actividad rítmica es continua, como en el caso de la respiración en vertebrados o del latido cardíaco de sanguijuelas (Calabrese et al., 2016; Smith et al., 1991). En el segundo, el ritmo emerge como resultado de las conexiones sinápticas entre neuronas que, de forma aislada, no presentan ritmicidad intrínseca. El circuito más simple capaz de generar actividad rítmica a partir de interacciones sinápticas es el oscilador de inhibición recíproca (*half-center oscillator*). En este tipo de red, dos neuronas se inhiben recíprocamente y producen patrones alternantes de actividad en respuesta a una señal excitatoria inicial. Este modelo fue el propuesto originalmente para explicar la alternancia entre las etapas de extensión y flexión durante la locomoción en gatos (Brown, 1911).

Como en el caso de otras redes neuronales, la dinámica de los CPGs depende de la interacción entre las propiedades intrínsecas de las neuronas que los conforman y de las sinapsis que las conectan. Por lo tanto, tanto la relación de fase como la frecuencia de disparo de las motoneuronas asociadas al CPG están determinadas por una combinación de propiedades intrínsecas y sinápticas (Marder & Calabrese, 1996). Muchas de las interacciones sinápticas presentes en los CPGs son inhibitorias. En particular, en el caso de los *half-center oscillators* (Figura I2B), las neuronas disparan como resultado de un rebote posterior a la inhibición (*postinhibitory rebound*), mecanismo que determina con precisión el inicio de una nueva ráfaga de disparo (Getting, 1989; Marder et al., 2005).

Los CPGs han sido ampliamente estudiados tanto desde enfoques teóricos como experimentales (Marder & Bucher, 2001). Sin embargo, en las redes motoras, su actividad interactúa con otros componentes de la red, y la lógica que subyace a la generación de secuencias precisas y ordenadas durante la locomoción sigue sin estar completamente comprendida (Büschges et al., 2011; Goulding, 2009; Kiehn, 2011;

McLean & Dougherty, 2015; Miri et al., 2013). En particular, cómo se integra la actividad de los CPGs con la de otras neuronas premotoras para dar lugar a patrones motores coordinados sigue siendo un interrogante abierto.

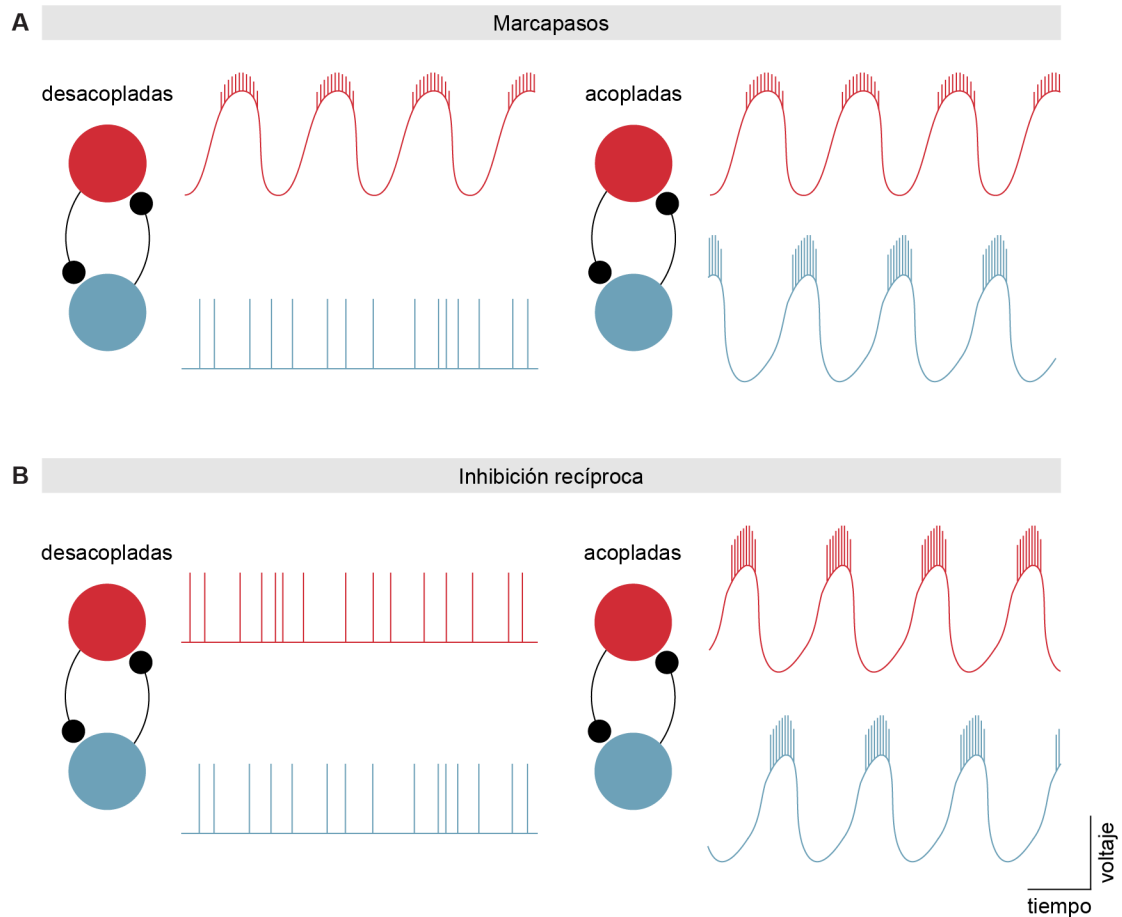


Figura I2. Mecanismos celulares subyacentes a la generación de patrones motores rítmicos. **A.** En redes controladas por marcapasos, una neurona marcapasos (en rojo) puede activar a su antagonista (en celeste), generando actividad alternada. **B.** El ejemplo más simple de una red osciladora consiste en dos neuronas que, si bien no son rítmicas en forma aislada, cuando se encuentran conectadas por sinapsis inhibitorias recíprocas, disparan ráfagas de manera alternada como resultado de dicha inhibición al recibir una señal excitatoria. (Adaptado de Marder y Bucher, 2001).

Un enfoque experimental relevante para investigar estos mecanismos, debido a que permite acceder y manipular los distintos componentes de la red en condiciones controladas, es el estudio de los comportamientos ficticios.

3. Comportamientos rítmicos ficticios

El argumento más sólido a favor de que los circuitos comprendidos en el cordón nervioso son capaces de generar patrones rítmicos de manera autónoma es el hecho de que es posible observar el patrón incluso cuando el circuito se extrae del organismo y se coloca en una cámara de registro con solución fisiológica. En estas condiciones, sin información sensorial ni señales temporales rítmicas externas, se registran patrones de actividad de las motoneuronas que, si los músculos estuvieran presentes, generarían los movimientos característicos del comportamiento (Marder & Bucher, 2001). Estos patrones se denominan comportamientos ficticios. Si bien estos CPGs producen actividad rítmica sin necesidad de recibir señales temporales rítmicas externas, su activación *ex vivo* suele requerir la aplicación de manera exógena de neuromoduladores que normalmente son provistos por vías descendentes (Grillner et al., 1991; Miller & Sigvardt, 2000).

El estudio de comportamientos ficticios constituye una herramienta poderosa para investigar los mecanismos circuitales involucrados en la generación de ritmos motores. Estas preparaciones permiten el acceso directo a las neuronas que componen la red, haciendo posible la manipulación selectiva y el análisis detallado de los factores que determinan la actividad secuencial y ordenada del circuito. Sin embargo, no es sencillo demostrar que un ritmo generado *ex vivo* corresponde exactamente al que subyace a un comportamiento específico. Para comprobarlo, se requieren comparaciones cuantitativas entre los patrones motores *ex vivo* e *in vivo*, como el periodo del ritmo o las relaciones de fase entre ambos contextos (Pearson & Wolf, 1987). Atribuir un comportamiento determinado a los ritmos observados en circuitos aislados no siempre resulta evidente, especialmente si las mismas neuronas participan en múltiples circuitos generadores de patrones motores (Marder & Bucher, 2001).

Además, los comportamientos motores requieren, en mayor o menor medida, correcciones ciclo a ciclo durante la ejecución del movimiento basadas en *inputs* sensoriales. Por lo tanto, evaluar diferencias en la frecuencia del ciclo, las relaciones de fase entre las motoneuronas activadas, la regularidad del ritmo (Richards et al.,

1999), así como la organización episódica de los patrones motores, incluyendo la duración de los episodios y los intervalos entre ellos, permite estimar la importancia relativa de la información sensorial en un comportamiento generado centralmente (O'Donovan, 1989).

4. Mecanismos de inhibición premotora involucrados en redes neuronales de control motor

Estudios sobre control motor en diversos organismos muestran que, en las etapas finales del procesamiento, la actividad de las motoneuronas es modulada por múltiples señales (El Manira, 2023; Rotstein et al., 2017; Zhen & Samuel, 2015). Específicamente, tanto en la cadena de ganglios de invertebrados como en la médula espinal de vertebrados, se han identificado circuitos premotores inhibitorios especializados que desempeñan un rol clave en la modulación de la actividad rítmica de los patrones motores.

En primer lugar, existen circuitos de comunicación entre *inputs* sensoriales propioceptivos y la salida motora mediados por inhibición premotora. Durante la ejecución de comportamientos motores, las motoneuronas reciben información propioceptiva acerca del grado de contracción muscular a través de circuitos de retroalimentación tanto directos como indirectos (Windhorst, 2007). Esta información sensoriomotora es modulada por interneuronas inhibitorias que actúan a nivel presináptico, ajustando las aferencias propioceptivas. Esta modulación dinámica del *feedback* sensorial resulta esencial para la correcta ejecución de los comportamientos motores y contribuye a la estabilidad del movimiento (Rudomin & Schmidt, 1999). Por otro lado, estudios en invertebrados han demostrado un mecanismo adicional: durante comportamientos motores rítmicos, neuronas propioceptivas que responderían al movimiento corporal son inhibidas por el oscilador central en fase con la contracción muscular que normalmente las activaría. De este modo se previene la generación espuria de señales sensoriales que podrían interferir con la salida motora (Alonso et al., 2020).

Además, la salida motora depende de la actividad de interneuronas inhibitorias localizadas en el cordón nervioso que regulan la respuesta de las motoneuronas a diversos *inputs* excitatorios (Arber, 2012). Estas interneuronas inhibitorias pueden actuar como líneas de retardo, modulando diferencialmente los efectos de las señales excitatorias y orquestando la secuencia de reclutamiento de distintos pools motores (Bagnall & McLean, 2014; Stepien et al., 2010; Sürmeli et al., 2011; Tripodi et al., 2011; Zwart et al., 2016).

Finalmente, un ejemplo paradigmático de inhibición premotora en redes neuronales de control motor es el circuito de inhibición recurrente formado por las células de Renshaw y las motoneuronas en la médula espinal de mamíferos. Estas interneuronas colinérgicas reciben *inputs* excitatorios directamente de las motoneuronas y modulan su actividad mediante un circuito local de inhibición recurrente (Alvarez & Fyffe, 2007). En otras palabras, cuando las motoneuronas disparan, excitan a las células de Renshaw, que a su vez inhiben la actividad de las primeras.

En conjunto, estos ejemplos ilustran cómo la inhibición premotora cumple funciones diversas en la modulación de la actividad motora durante la ejecución de comportamientos rítmicos: desde la alternancia en la actividad muscular hasta el reclutamiento fase-específico, la integración sensorial y el control de la estabilidad. En este sentido, el estudio de neuronas inhibitorias premotoras y de sus conexiones con las motoneuronas resulta importante para comprender cómo los patrones motores generados por los CPGs son modulados para garantizar una salida motora coordinada y precisa.

5. *Hirudo sp.* como modelo de estudio de control motor

Las sanguijuelas (*Hirudo sp.*) han sido sumamente útiles para el estudio del control motor, ya que presentan comportamientos motores rítmicos robustos ejecutados por un plan corporal relativamente simple y controlados por un sistema nervioso

igualmente sencillo (Friesen, et al., 1976; Friesen & Hocker, 2001; Puhl & Mesce, 2008).

Estos animales poseen un cuerpo segmentado y esta segmentación se ve reflejada en la arquitectura de su sistema nervioso, compuesto por una cadena de 21 ganglios altamente similares entre sí, flanqueados por los cerebros rostral y caudal (Figura I3A; Wagenaar, 2015). Cada uno de los ganglios contiene las neuronas sensoriales y motoras que inervan el segmento correspondiente (Muller et al., 1981). Además, la organización interna de los ganglios se encuentra altamente conservada y sólo un número reducido de células cumple cada una de las funciones específicas, lo que facilita el estudio funcional de neuronas individuales (Figura I3B-C; Nicholls & Van Essen, 1974). Cada ganglio contiene aproximadamente 350 neuronas que presentan morfología, tamaño, posición y patrones de ramificación característicos, lo que permite su identificación durante experimentos electrofisiológicos mediante su localización y propiedades eléctricas.

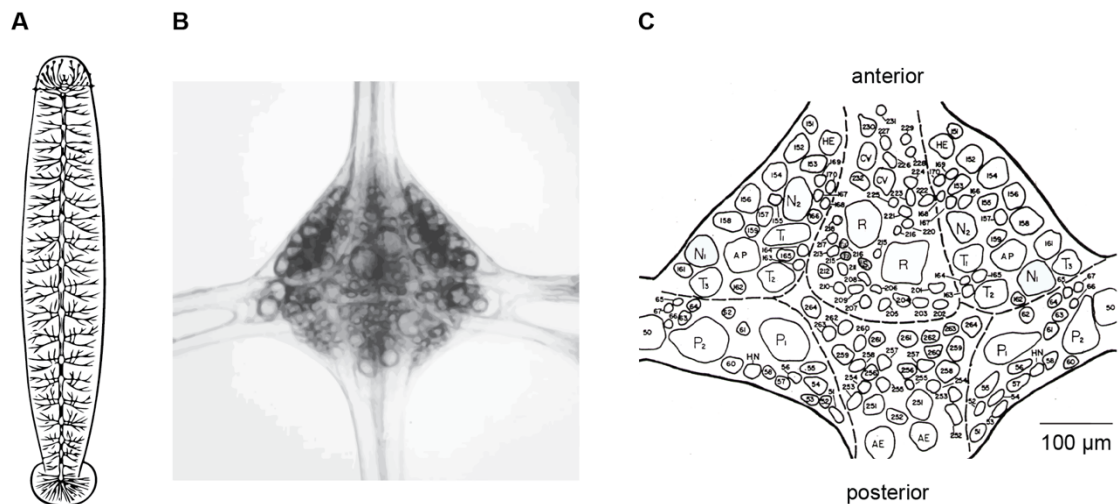


Figura I3. Sistema nervioso de *Hirudo* sp. **A.** Esquema del sistema nervioso de sanguijuela, compuesto por una cadena de 21 ganglios, junto con un cerebro rostral y otro caudal. Los ganglios medios están conectados entre sí a través de los nervios conectivos. Cada ganglio inerva un segmento corporal. **B.** Vista ventral de un ganglio medio. Se observan los somas de las neuronas, los nervios conectivos y los nervios (nerve roots), que contienen axones motores y sensoriales. Figura adaptada de Nicholls y Baylor, 1968. **C.** Mapa esquemático de la vista ventral de un ganglio medio de sanguijuela, con la numeración utilizada para designar los somas. Figura adaptada de Muller et al., 1981.

Los músculos responsables de la ejecución de los comportamientos motores en las sanguijuelas están organizados en tres capas principales (Figura I4). Justo por debajo de la piel se encuentran las fibras musculares circulares, cuya contracción provoca la reducción del diámetro del animal y por lo tanto elongación del cuerpo en el eje antero-posterior. Por debajo se disponen las fibras oblicuas, dispuestas en forma de cruz. La capa más profunda está formada por fibras longitudinales, responsables de la contracción y la flexión del cuerpo. Además de estas capas principales, existen músculos especializados que permiten a la sanguijuela aplanar su cuerpo o erector los anillos en que se subdivide la piel, alterando su superficie. Cada motoneurona inerva exclusivamente un grupo específico de estos músculos y, dentro de cada músculo, sólo una fracción de sus fibras (Nicholls & Van Essen, 1974). Las motoneuronas proyectan a la periferia a través de cuatro pares de nervios denominados raíces (*nerve roots*) y su influencia se limita al segmento que inervan.

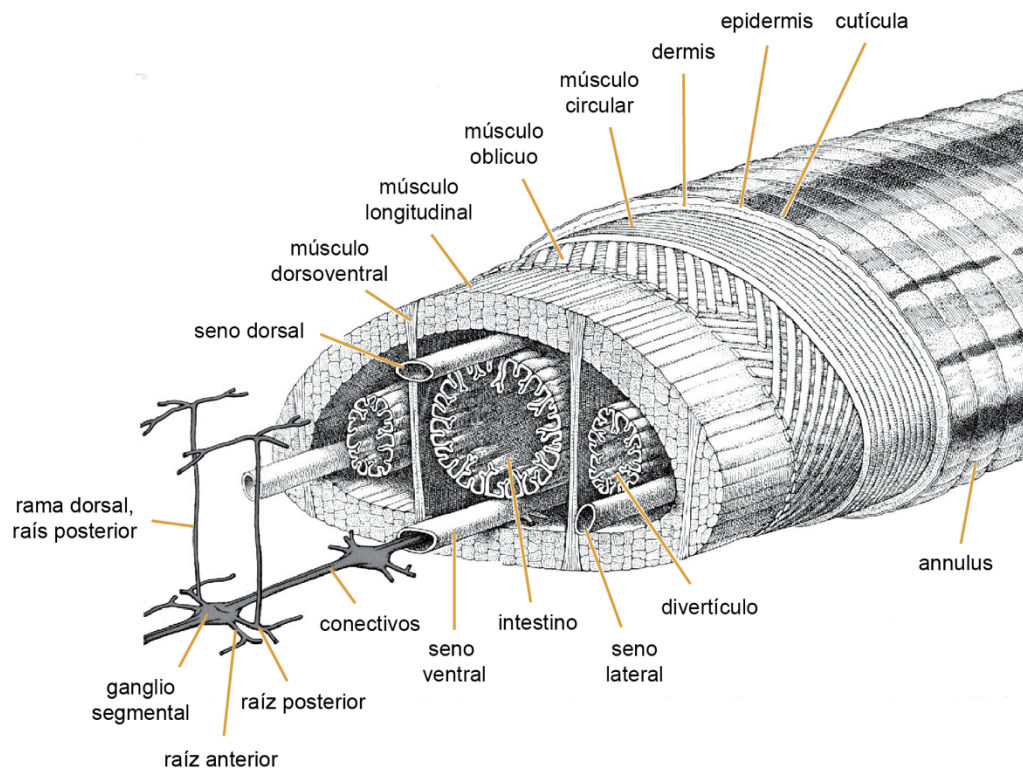


Figura I4. Esquema de un corte transversal de sanguijuela. El sistema nervioso de la sanguijuela se encuentra contenido dentro de un vaso sanguíneo. Los ganglios están conectados entre sí por pares de nervios conectivos, cada uno correspondiente a un lado del ganglio. Desde cada ganglio emergen nervios que se extienden por raíces laterales, inervando la piel y los músculos. La pared corporal contiene distintas capas musculares organizadas en vainas. La

contracción de los músculos circulares genera la elongación del animal, mientras que los músculos longitudinales y oblicuos permiten su acortamiento o flexión y los músculos dorsoventrales aplanan el cuerpo. Un individuo adulto mide, en promedio, unos 0,6 cm de ancho y entre 2,5 y 10 cm de largo, dependiendo en parte del momento de su última comida. (Adaptado de Nicholls y Van Essen, 1973).

Las sanguijuelas presentan dos programas principales de locomoción rítmica, natación y crawling, ambos controlados por redes centrales que involucran motoneuronas excitatorias e inhibitorias. Estas últimas inhiben tanto la actividad de músculos específicos como la de otras neuronas, contribuyendo a la alternancia de fases y a la coordinación intersegmental en estos patrones motores rítmicos (Granzow & Kristan, 1986). En el cordón nervioso aislado de sanguijuela es posible observar actividad neuronal compatible tanto con el patrón motor rítmico de natación como con el de crawling (Kristan & Calabrese, 1976; Puhl & Mesce, 2008). La natación es una forma de locomoción relativamente rápida, que no permite intervalos de exploración, y cuya red neuronal subyacente ha sido ampliamente estudiada (Kristan et al., 2005). En este trabajo, nos enfocamos en el estudio del patrón motor de crawling.

6. Patrón motor rítmico de crawling

En superficies sólidas, las sanguijuelas exhiben un patrón motor rítmico robusto conocido como crawling (Figura I5). Este comportamiento consiste en ondas de elongación y contracción que se desplazan a lo largo del eje antero-posterior del animal, mientras el animal se ancla a la superficie mediante las ventosas posterior y anterior, respectivamente (Stern-Tomlinson et al., 1986; Figura I5).

El crawling ficticio (*crawling*) puede ser registrado en el sistema nervioso aislado, lo que sugiere que es generado por CPGs que no requieren información sensorial (Eisenhart et al., 2000). Distintos estudios establecieron que cada ganglio contiene la red responsable de producir la actividad rítmica de motoneuronas compatible con el crawling, y que este comportamiento ficticio puede ser evocado mediante perfusión con dopamina en cordón nervioso aislado (Puhl & Mesce, 2008), en cadenas cortas de

ganglios (Kearney et al., 2022), y en ganglios aislados (Puhl & Mesce, 2008; Rodriguez et al., 2012).

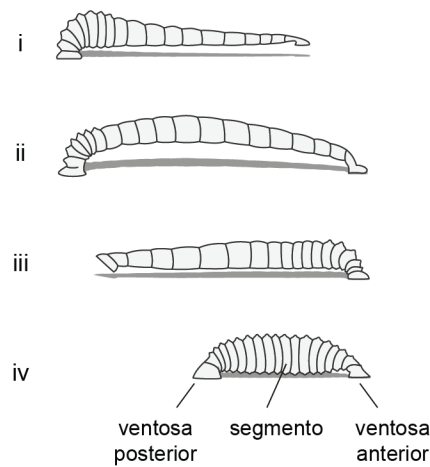


Figura I5. Comportamiento motor durante el crawling. Representación esquemática de un paso de crawling en la sanguijuela, generado por ondas coordinadas de elongación (i-ii) y contracción (iii-iv) del cuerpo, mientras el animal permanece fijado al sustrato mediante sus ventosas anterior y posterior.

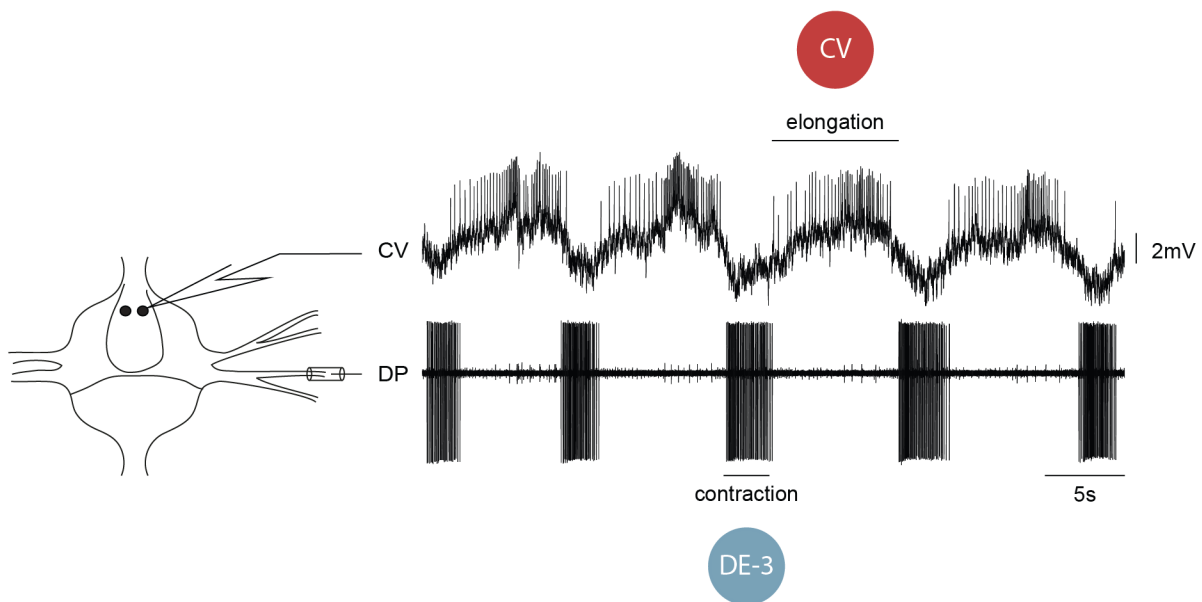


Figura I6. Registro de crawling ficticio. Registro intracelular de la motoneurona CV y registro extracelular de la motoneurona DE-3 en el nervio DP durante un episodio de crawling en ganglio aislado inducido por perfusión del tejido con dopamina. A la izquierda se muestra el diagrama del esquema de registro.

El patrón se caracteriza por la activación alternada de las motoneuronas que inervan los músculos circulares y longitudinales, como CV y DE-3 (Figura I6). Es posible entonces estudiar el comportamiento ficticio mediante registros intracelulares y extracelulares de interneuronas y motoneuronas cuya anatomía, posición en el ganglio y características electrofisiológicas han sido previamente identificadas (Baader, 1997; Baader & Kristan, 1992; Eisenhart et al., 2000). En particular, en los registros extracelulares del nervio DP es posible distinguir claramente las ráfagas de potenciales de acción de la motoneurona DE-3, que inerva la musculatura longitudinal y se encuentra activa durante la fase de contracción. La actividad de esta motoneurona ha sido históricamente utilizada como *proxy* del crawling ficticio (Puhl & Mesce, 2008).

7. Inhibición premotora en crawling: el circuito de inhibición recurrente entre las motoneuronas y la neurona NS

En la red neuronal encargada de formular el crawling existe un circuito de inhibición recurrente entre las motoneuronas y un par de neuronas premotoras inhibitorias denominadas NS (*nonspiking*, neuronas que no disparan potenciales de acción; Rela y Szczupak, 2003). Este circuito es funcionalmente análogo al que existe entre las células de Renshaw y las motoneuronas en la médula espinal de mamíferos. Como se mencionó, en ese caso, las células de Renshaw reciben señales excitatorias de las motoneuronas y, en consecuencia, transmiten señales inhibitorias proporcionales a su actividad. De este modo, forman un mecanismo de retroalimentación negativa dependiente de la actividad que regula la salida motora (Alvarez y Fyffe, 2007).

Neuronas que no disparan potenciales de acción: la neurona premotora NS

Se han identificado neuronas que no disparan potenciales de acción tanto en vertebrados como en invertebrados. En estos casos, la propagación de señales no depende de potenciales de acción y el *output*, ya sea químico o eléctrico, es una función graduada del potencial de membrana. Estas neuronas pueden codificar información

mediante la amplitud y la dinámica temporal de sus señales (Burrows & Siegler, 1978; Graubard, 1978; Iscla et al., 1999; Manor et al., 1997; Wadepuhl, 1989).

En el caso particular de las neuronas NS, si bien no disparan potenciales de acción dependientes de sodio, presentan conductancias de calcio voltaje dependientes con bajo umbral de activación (*low-threshold voltage-activated calcium conductances*, LTVACCs; Rela et al., 2009). Los canales se encuentran distribuidos en las ramas principales de la neurona (Yang et al., 2013), y las señales de calcio resultantes, que presentan una relación lineal con la frecuencia de disparo de la neurona presináptica, se propagan por el árbol dendrítico sin que la señal se atenúe significativamente (Carbó Tano et al., 2015).

El circuito de inhibición recurrente

Cada ganglio de la cadena nerviosa de sanguijuela contiene un par de neuronas NS, acopladas eléctricamente entre sí formando una unida funcional, que se encuentra en el centro de un circuito inhibitorio recurrente mediado por conexiones sinápticas químicas y eléctricas con prácticamente todas las motoneuronas excitatorias del ganglio (Figura I7; Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009). En este circuito, la actividad de las motoneuronas excitatorias evoca potenciales inhibitorios mediados por sinapsis químicas polisinápticas en la NS. A su vez, las neuronas NS están acopladas eléctricamente a las motoneuronas excitatorias a través de sinapsis eléctricas rectificantes.

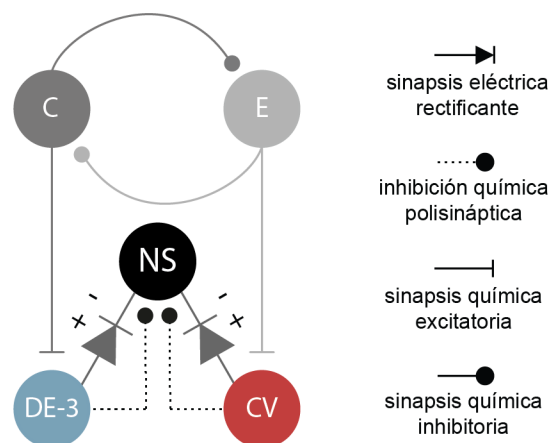


Figura I7. Circuito neuronal putativo subyacente al *crawling* y al circuito inhibitorio recurrente en un ganglio del cuerpo medio. Las unidades C y E corresponden a las unidades de contracción y elongación del oscilador, respectivamente. DE-3 y CV son ejemplos de motoneuronas activas durante cada una de estas fases. La neurona NS está conectada con DE-3 y CV mediante sinapsis químicas y eléctricas (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009); los símbolos + y – indican la polaridad en la que las sinapsis rectificantes permiten el paso de corriente.

Las sinapsis eléctricas rectificantes permiten el paso de corriente sólo en una dirección determinada, dependiendo del gradiente de voltaje entre las células conectadas (Furshpan & Potter, 1959; Marder, 2009; Szczupak, 2014, 2016; Figura I8). En el circuito estudiado en este trabajo, las sinapsis eléctricas rectificantes conducen corriente únicamente cuando el potencial de membrana NS-motoneurona es negativo. En condiciones fisiológicas, esto favorece la transmisión de señales inhibitorias desde NS a las motoneuronas cuando las motoneuronas se encuentran activas.

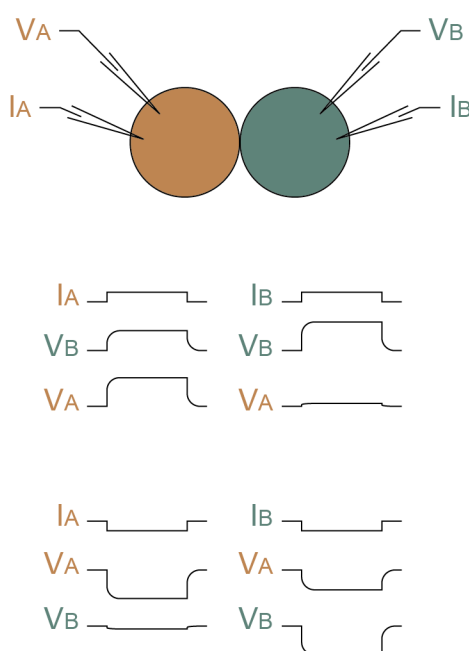


Figura I8. Esquema ilustrativo de una sinapsis eléctrica rectificante entre dos neuronas. La inyección de corriente despolarizante en la célula A genera una despolarización en A y, en menor medida, en B. En cambio, la hiperpolarización de A no se transmite a B. Por el contrario, cuando se inyecta corriente en B, su despolarización no afecta a A, pero la hiperpolarización sí genera un cambio en A. Este patrón asimétrico de conducción de corriente sugiere que los *gap junctions* que unen a las neuronas funcionan como rectificadores. En el marco de este trabajo, A representa a

una motoneurona mientras que B corresponde a la neurona premotora NS. Adaptado de Marder, 2009.

NS como neuromoduladora eléctrica el circuito

Además de estas conexiones, las motoneuronas excitatorias se encuentran acopladas entre sí eléctricamente (Ashaber et al., 2021; Fan et al., 2005; Ort et al., 1974). Las NS, por su parte, se conectan exclusivamente con las motoneuronas excitatorias y no con las motoneuronas inhibitorias, dado que no se ha observado paso de corriente negativa hacia estas motoneuronas ni recepción de *inputs* inhibitorios generados por ellas (Wadepuhl, 1989).

Estudios realizados en el laboratorio mostraron que el circuito de inhibición recurrente mediado por NS puede ocluir el acople eléctrico que existe entre las motoneuronas. Asimismo, las interneuronas que median la conexión inhibitoria entre las motoneuronas y NS resultan necesarias para esta función (Rela & Szczupak, 2003). Estos resultados sugieren que NS actúa como un neuromodulador eléctrico del ganglio, regulando dinámicamente el balance entre excitación e inhibición de las motoneuronas.

Por otro lado, la propagación de las señales inhibitorias, debido a que es electrotónica, está sujeta a atenuación y es posible que distintas regiones de las neuronas NS funcionen como subcompartimentos eléctricos relativamente independientes (Burrows, 1992; Kondoh & Hisada, 1986).

Morfología de la neurona NS

Mientras que la actividad de las motoneuronas se encuentra restringida a un ganglio, las premotoras NS extienden sus neuritas hacia ganglios adyacentes (Figura I9). Sin embargo, si bien es poco probable que las NS puedan transmitir señales de manera pasiva hacia ganglios adyacentes (resultados no publicados del laboratorio), las interneuronas que median el circuito de inhibición recurrente entre NS y las motoneuronas extienden proyecciones al menos a lo largo de cinco ganglios adyacentes (Rela & Szczupak, 2003). Por lo tanto, este circuito neuronal podría regular la

actividad motora a lo largo de los segmentos, y estar involucrado entonces, además, en la coordinación intersegmental.

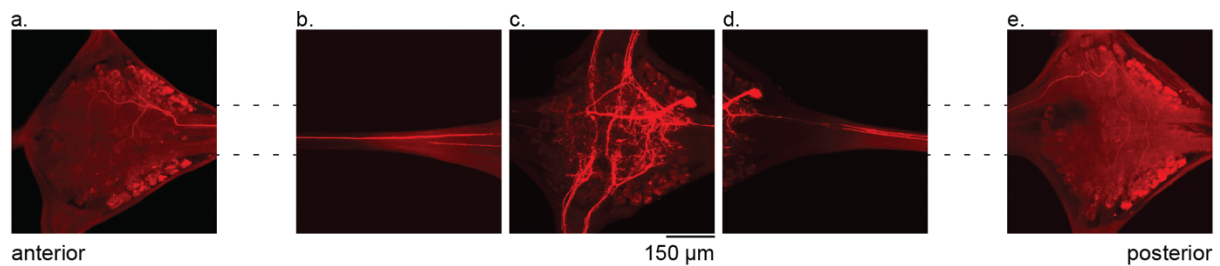


Figura I9. Morfología de una neurona premotora NS cuyas neuritas se extienden hacia los ganglios adyacentes. Para las reconstrucciones Z-stack de los paneles a, b, c, d y e se utilizaron 18, 20, 32, 18 y 16 planos focales espaciados por 2 μm , respectivamente. Los nervios conectivos que conectan los ganglios adyacentes miden 5 mm aproximadamente. Imagen tomada en el laboratorio.

En conjunto, estos antecedentes permiten postular a la neurona NS como un elemento regulador relevante para estudiar los mecanismos de inhibición premotora y su rol en la modulación fina del patrón motor de crawling, tanto a nivel de la organización del ritmo y del patrón, como a nivel de actividad de las motoneuronas involucradas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El circuito de inhibición recurrente entre la neurona premotora NS y las motoneuronas excitatorias juega un rol en la modulación del patrón motor rítmico de *crawling*¹, afectando la relación entre fases y la frecuencia de disparo de las motoneuronas involucradas.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar cómo el circuito inhibitorio recurrente premotor modula la salida motora durante el comportamiento de *crawling* tanto a nivel de la excitación de las motoneuronas como de la relación entre fases del patrón motor.

Objetivos específicos

1. Estudiar la actividad de la neurona premotora NS durante *crawling*.
2. Desarrollar una herramienta que permita realizar una descripción cuantitativa de la actividad de las motoneuronas reclutadas durante el comportamiento de *crawling*.
3. Evaluar cómo modula NS el patrón de actividad de las motoneuronas durante *crawling*.

¹ Nótese que a lo largo de este trabajo se usa *crawling* en itálica para denotar *crawling* ficticio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Los experimentos de esta tesis fueron realizados utilizando sanguijuelas *Hirudo sp.* de entre 1 y 3 gramos de peso. Los animales fueron comprados a las compañías *Niagara Leeches* (Cheyenne, WY, United States) y *Biopharm* (UK) y mantenidas en solución marina artificial a 20°C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Estos animales son hermafroditas.

2. Preparación biológica

El sistema nervioso de las sanguijuelas fue disecado en solución salina control (en mM: 115 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 Hepes, 10 glucose; pH 7.4). Los experimentos electrofisiológicos fueron realizados utilizando ganglios aislados pertenecientes a los segmentos medios entre 3 y 15, sin considerar los ganglios 5 y 6 correspondientes a segmentos reproductivos. En todos los casos los ganglios fueron disectados manteniendo intacto el nervio dorsal posterior (DP; Figura MM1). También fueron incluidos en el preparado los nervios posterior (PP), anterior (AA) y/o medial-anterior (MA).

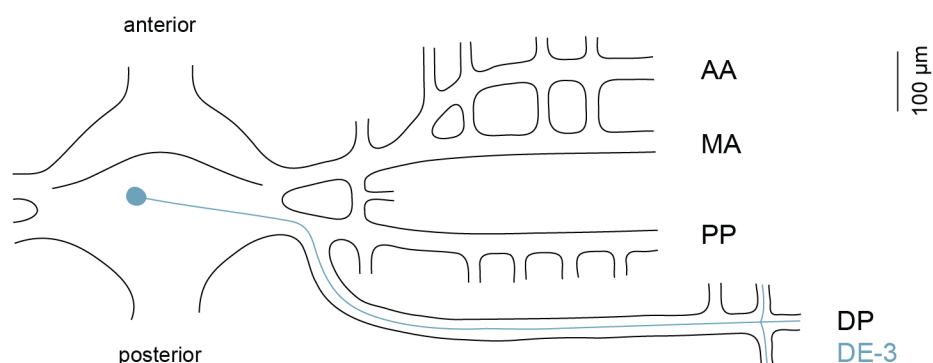


Figura MM1. Esquema de la vista ventral de un ganglio y los nervios anteriores (AA, MA) y posteriores (PP, DP). En celeste se indican el soma y el axón de DE-3. Figura adaptada de Ort et al., 1974.

Los ganglios fueron montados con la cara ventral hacia arriba en cámaras de registro cuya base contenía una capa de *Sylgard* (*Dow Corning*). Esta base permitió

fijar al ganglio utilizando minucias de acero inoxidable. Durante el experimento la preparación fue mantenida bajo perfusión constante con solución salina, a un flujo aproximado de 4 ml/minuto. La capa de tejido glial que cubría el ganglio fue eliminada quirúrgicamente, lo que permitió exponer los somas de las neuronas a la solución externa y facilitó tanto la inserción de los electrodos intracelulares como la difusión de las soluciones utilizadas.

3. Registros electrofisiológicos

Los microelectrodos intracelulares se construyeron a partir de capilares de borosilicato (*A-M Systems, Inc.*, Carlsborg, WA, United States) utilizando un estirador de micropipetas horizontal y fueron llenados con una solución de acetato de potasio 3 M (resistencia 20–40 M Ω).

Los electrodos fueron conectados a un amplificador *Axoclamp 2B* (*Axon Instruments*, Union City, CA, United States) operado en modo *bridge*. Los registros intracelulares y extracelulares fueron digitalizados mediante un conversor analógico-digital (*Digidata 1440*, *Axon Instruments*, Union City, CA, United States) y adquiridos con el programa comercial *Clampex 9.2* (*Axon Instruments*, Union City, CA, United States), con una frecuencia de adquisición de datos de 20 kHz.

La actividad extracelular de los nervios DP, PP, AA y MA se registró mediante electrodos de succión conectados a un amplificador diferencial a.c. (*Neuroprobe 1700*, *A-M Systems, Inc.*, Carlsborg, WA, United States). Las neuronas premotoras NS y las neuronas sensoriales T fueron identificadas mediante la ubicación del soma (Figura MM2) y sus propiedades electrofisiológicas (Burgin & Szczupak, 2003; Nicholls & Baylor, 1968; Rela et al., 2009), y registradas intracelularmente.

Para inducir *crawling* ficticio (*crawling*), los ganglios fueron perfundidos con clorhidrato de dopamina 75 μ M (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, United States), preparado al inicio de cada día experimental (Puhl & Mesce, 2008). Un único episodio de *crawling* fue evocado por ganglio. El patrón motor rítmico fue monitoreado a través

del registro extracelular del nervio DP, en el que los potenciales de acción de mayor tamaño corresponden a las motoneuronas DE-3, una de las motoneuronas que inervan los músculos longitudinales activos durante la fase de contracción (Ort et al., 1974).

En los experimentos en los que se estudió la función de la neurona premotora NS, se aplicaron pulsos de corriente despolarizante de entre +5 nA y +7 nA o hiperpolarizantes de -5 nA a través del electrodo intracelular impalado en el soma de la célula. Se obtuvieron entre cuatro y seis ciclos inalterados antes y después del pulso despolarizante (tiempos pre y post) que se utilizaron como etapas control.

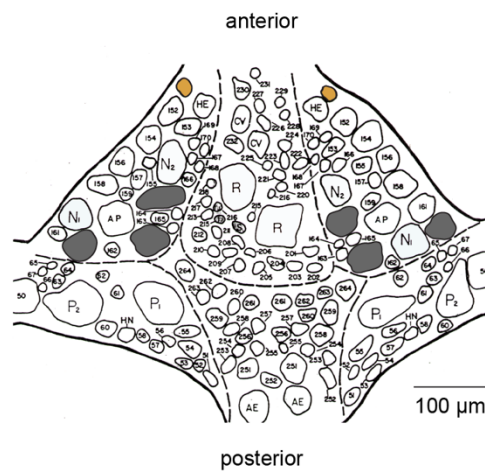


Figura MM2. Mapa esquemático de la vista ventral de un ganglio de sanguijuela. En color ocre se encuentran indicadas las neuronas premotoras NS y en color gris, las neuronas sensoriales T. Figura adaptada de Muller et al., 1981.

4. Análisis de registros extracelulares: identificación y clasificación de unidades

Los registros extracelulares fueron procesados para identificar los potenciales de acción provenientes de neuronas individuales. Para esto, se utilizó un algoritmo de *spike sorting* desarrollado en el laboratorio, basado en un método de coincidencia de formas de onda (Pouzat et al., 2002) e incorporando un modelo t-SNE (Maaten & Hinton, 2008; Pedregosa et al., 2011). El algoritmo fue implementado en lenguaje Python.

Este procedimiento comienza con la aplicación de un filtro Butterworth pasa-altos, tras lo cual se aplica un algoritmo de detección de umbral sobre la señal filtrada para identificar las espigas. Una vez detectados los eventos que superan el umbral, se extraen fragmentos de la señal centrados en cada espiga. Estos fragmentos contienen potenciales de acción putativos, de cuyas formas de onda se extraen los componentes principales que permiten clasificar los eventos en función de la similitud entre éstos. Esta primera etapa del procedimiento se realiza de manera automática mediante el algoritmo previamente mencionado.

Debido a que el *spike sorting* es sensible a errores de clasificación, los resultados fueron revisados manualmente para confirmar que cada clúster obtenido fuera consistente con la hipótesis de que correspondía a una única neurona (Hill et al., 2011). Durante la revisión manual, se evaluaron todos los clústeres de eventos de posibles picos. Los clústeres que contenían dos o más grupos bien definidos por sus formas de onda fueron divididos, y pares de clústeres con formas de onda similares y actividad temporalmente coordinada fueron fusionados. Los clústeres con formas de onda inconsistentes y que no pudieron dividirse en grupos de formas de onda bien definidas fueron descartados. Después de este procedimiento, cada clúster fue considerado una unidad motora individual (Figura MM3).

Una vez clasificadas las unidades motoras, se seleccionaron aquellas que presentaban actividad rítmica durante los registros de *crawling*. Para esto se realizaron análisis de autocorrelación considerando los primeros cuatro ciclos del *crawling* dados por cada unidad identificada. Las unidades cuyo autocorrelograma contenía al menos 2 picos con un coeficiente de correlación mayor a 0,25 fueron consideradas rítmicas.

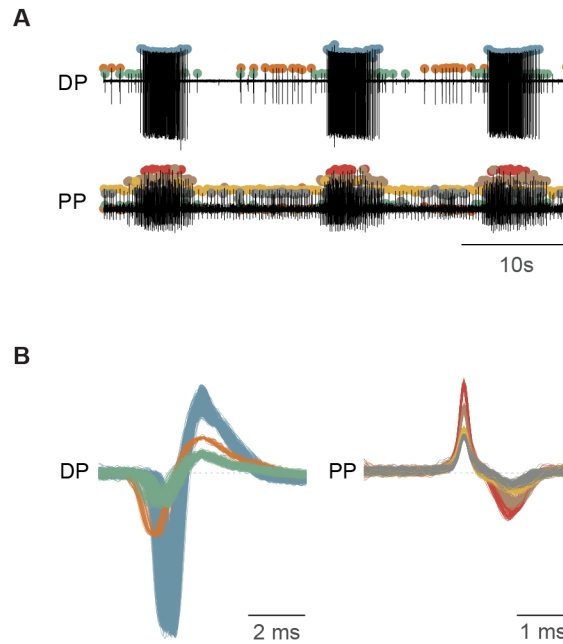


Figura MM3. Implementación de análisis de *spike sorting* para registros extracelulares.

A. Ejemplo representativo del análisis de *spike sorting* realizado en registros extracelulares pareados de los nervios DP y PP durante un episodio de *crawling*. Cada punto de color señala una unidad distinta a lo largo del registro, identificada a partir de la forma de la onda. **B.** Superposición de las ondas de potencial correspondientes a las espigas identificadas en los nervios DP y PP en A, respetando el código de color. La unidad señalada en azul en el nervio DP corresponde a la motoneurona DE-3.

5. Procesamiento de los datos de experimentos de electrofisiología

El procesamiento de los datos se realizó utilizando algoritmos de Python escritos *ad hoc*.

Los tiempos de disparo de la motoneurona DE-3 se obtuvieron a partir de los registros extracelulares del nervio DP mediante el algoritmo de *spike sorting* previamente descrito (Figura MM3). Esta unidad se utilizó para caracterizar el patrón de *crawling* calculando distintas variables, tal como se indica en la Figura MM4. Las ráfagas de disparo de DE-3 fueron consideradas como tales si incluían al menos 10 potenciales de acción con una frecuencia de disparo media de 8 Hz y dos potenciales de acción consecutivos tenían una máxima separación de 0,5 segundos.

La duración de las ráfagas se calculó como la diferencia entre el último y el primer potencial de acción de DE-3 de cada ráfaga. El periodo fue calculado de dos maneras distintas: como la diferencia entre los últimos (final-a-final) o primeros (inicio-a-inicio) potenciales de acción de ráfagas de DE-3 consecutivas, y en cada caso se aclaró según corresponda. El *duty cycle* se calculó como la relación entre la duración de la ráfaga y el periodo. Esta variable utilizó ambas formas de calcular el periodo. La frecuencia de disparo media (FDm) de cada ráfaga se calculó como la relación entre el número de potenciales de acción y la duración de la ráfaga. La frecuencia de disparo binneada (FDb) de DE-3, o de cualquier otra unidad motora, se calculó dividiendo el registro en intervalos de 0,05 s o 0,5 s, según se indica en las figuras correspondientes, y computando, para cada intervalo, la frecuencia de disparo.

Para los análisis de correlación cruzada de NS y DE-3, la FDb de DE-3 fue filtrada utilizando un filtro Gaussiano con sigma de 150 ms.

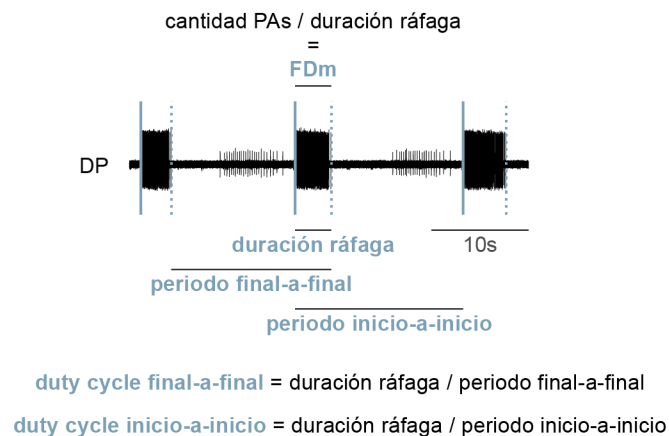


Figura MM4. Esquema de las variables calculadas a partir del registro extracelular del nervio DP. El registro fue segmentado en ciclos considerando la primera espiga (línea vertical azul) o la última (línea punteada vertical azul) en las ráfagas de DE-3, lo que permitió definir los periodos inicio-a-inicio o final-a-final, respectivamente. Dentro de cada periodo se calculó la duración de la ráfaga, lo que permitió estimar el duty cycle para cada tipo de periodo. La frecuencia de disparo media de DE-3 (FDm) se calculó como la cantidad de potenciales de acción (PAs) presentes en una ráfaga dividida por la duración de la ráfaga.

Para los análisis de correlación cruzada entre el potencial de membrana de NS y la frecuencia de disparo de DE-3, el registro intracelular de NS fue resampleado para

hacer coincidir la frecuencia de adquisición de datos de DE-3 con la FDb. Para determinar la amplitud de hiperpolarización de NS, se estableció un potencial de membrana basal utilizando un filtro Gaussiano con sigma equivalente a 5 s aplicado al trazo completo del registro. La amplitud se calculó como la diferencia entre el valor del potencial de NS así filtrado en el tiempo marcado por el inicio de la ráfaga de DE-3 y el mínimo valor de potencial de membrana alcanzado por la NS (en registros no filtrados) durante la ráfaga de DE-3 correspondiente (ver Capítulo 1, Figura R5A).

En los experimentos en los que se aplicaron pulsos despolarizantes a las neuronas NS, los ciclos al inicio y final del pulso de corriente fueron excluidos del análisis. Estos registros se dividieron en tres etapas: previa (pre), durante (test) y posterior (post) al pulso. Los experimentos control fueron tratados de manera equivalente, dividiendo los registros en tres etapas, excluyendo los ciclos que las separaban, y considerando para cada etapa una cantidad de ciclos comparable a la utilizada en los experimentos con despolarización.

Para el análisis de la actividad de las unidades identificadas mediante spike sorting, se calcularon los valores máximos de las curvas de FDb en función del ciclo, así como sus anchos relativos medidos a la mitad de dicho máximo. El tiempo fue normalizado según la duración del periodo de cada ciclo, y el valor resultante se expresó como ancho medio relativo (ancho medio relativo o AM relativo).

Para evaluar el efecto de NS sobre la actividad de las neuronas sensoriales T durante crawling, se identificaron los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) rítmicos registrados en T y se calculó la frecuencia entre ellos antes, durante y después de un pulso de corriente hiperpolarizante aplicado a NS. Para detectar los IPSPs, las señales de las células T fueron filtradas con un filtro Gaussiano pasa-bajos con sigma de 1 Hz, que se utilizó para sustraer las variaciones lentas de la línea de base. Los IPSPs fueron detectados mediante un algoritmo de detección de umbral que identificó los picos negativos cuya amplitud superaba el 40% de la amplitud máxima del IPSP en cada registro.

6. Experimentos comportamentales

Las sanguijuelas fueron anestesiadas colocándolas a -20°C entre 5 y 10 minutos. Luego la piel del animal fue secada y se pintaron nueve puntos a distancias regulares a lo largo de la línea longitudinal dorsal utilizando pintura al agua. Una vez que los animales se recuperaron, se los colocó sobre un papel milimetrado cubierto con plástico transparente. En estas condiciones los animales se desplazaron espontáneamente siguiendo el patrón de crawling.

El comportamiento fue filmado con una frecuencia de adquisición de 60 fps utilizando una cámara digital (*Sony ILCE-A6400*) colocada sobre la arena con un trípode. La posición de cada punto pintado sobre la piel de la sanguijuela fue traqueada utilizando *DeepLabCut version 2.3.5* (Insafutdinov et al., 2016; He et al., 2016; Mathis et al., 2018; Nath et al., 2019). Para automatizar la detección de los puntos, se seleccionaron al azar 338 imágenes correspondientes a 66 videos de 8 sanguijuelas y se etiquetaron manualmente las marcas realizadas en la línea media para entrenar una red neuronal ResNet_50-based. Estos experimentos fueron realizados por el Licenciado Federico Yulita en el marco de su Tesis de Licenciatura en Física (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Para caracterizar el crawling, el comportamiento del animal fue dividido en pasos considerando aquellos momentos del video en los que la suma algorítmica de las siguientes variables era mínima: 1) el largo total de la sanguijuela, 2) la velocidad del punto anterior y 3) la velocidad del punto posterior. Los pasos en los que *DeepLabCut* falló en la detección de alguno de los nueve puntos pintados en el animal fueron descartados. Después de dividir el desplazamiento del animal en pasos, se realizó un análisis cuantitativo de los cambios en la longitud de las distintas secciones del animal (delimitadas por cada par de puntos) a lo largo del tiempo. Específicamente, se seleccionaron las secciones delimitadas por los puntos 4-5 y 5-6 porque incluían el rango de ganglios utilizados en los estudios electrofisiológicos presentados en este trabajo (ganglios del 8 al 15). Los trazos de las variaciones de longitud a lo largo del tiempo de cada sanguijuela fueron filtrados utilizando un filtro Gaussiano (sigma de 0,25 s). La caracterización de los pasos se realizó midiendo la duración de las fases de

elongación y de contracción de cada sección. Estas fases fueron delimitadas utilizando la longitud máxima como límite entre ambas. El inicio de la elongación y el final de la contracción fueron determinados mediante la detección de los *knee points*, tal como se describe en el trabajo Satopaa et al. (2011; Figura MM5).

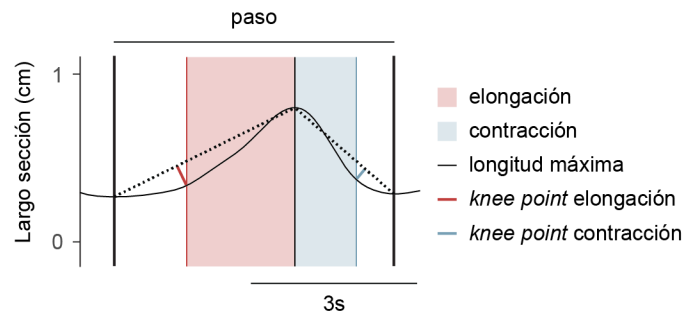


Figura MM5. Método para la caracterización de los pasos de crawling. Ejemplo representativo de la variación del largo de la sección 4-5 correspondiente a un paso de crawling. La longitud máxima se tomó como el límite entre la elongación y la contracción. El inicio de la elongación y el final de la contracción se identificaron a partir del método de detección de knee points. Las líneas punteadas unen el punto de máxima longitud con el inicio y el final del paso. Las líneas sólidas roja y azul indican los puntos de máxima distancia entre la curva de longitud y la línea punteada, antes y después del pico, respectivamente. Estos puntos fueron considerados como el inicio de la elongación y el final de la contracción.

7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando R (R Core Team, 2020). En cada análisis, la estructura de los factores aleatorios se modeló de la manera más completa posible. Los factores aleatorios específicos considerados en cada caso se detallan en las Tablas del Apéndice.

Para analizar la correlación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y diferentes características del *crawling* (Capítulo 1, Figura R6), se utilizó la función lmer del paquete lmerTest (Kuznetsova et al., 2017) para realizar modelos lineales mixtos (LMM), utilizando el experimento como un factor aleatorio.

Para analizar el efecto de la despolarización de NS sobre la actividad de las motoneuronas, los datos se analizaron utilizando modelos de efectos mixtos con dos factores fijos: etapa (pre, test, post) y tratamiento (control o ctrl, despolarización o depo). Todos los modelos incluyeron las unidades motoras y los ganglios como factores aleatorios. El efecto de la despolarización de NS se analizó realizando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) mediante la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017), o modelos lineales mixtos (LMM) mediante la función `lmer`. Para el GLMM, se utilizó una distribución t-student (`t_family`) con enlace de identidad o la familia Gamma con un enlace log, según se indica en las Tablas del Apéndice. La significancia de un factor se determinó mediante una prueba *likelihood-ratio* para el GLMM o una prueba F para el LMM. Esto se realizó comparando el modelo que incluía el factor con otro modelo que lo omitía. Los contrastes simples por pares se realizaron al interior del factor tratamiento y entre el factor de etapa utilizando el paquete `emmeans`, y se aplicó la corrección de Tukey para obtener los p valores.

Para analizar una posible deriva temporal en las características del *crawling*, se consideraron los datos de los experimentos control para realizar modelos de efectos mixtos con etapa (pre, test, post) como factor fijo y las unidades como factor aleatorio. Las Tablas del Apéndice detallan los modelos utilizados para cada análisis.

8. Comparación de matrices

Para realizar comparaciones entre matrices se calculó la distancia euclídea entre ellas. La distancia euclídea, definida como la raíz cuadrada de la suma de las diferencias cuadráticas normalizada por el número de elementos de cada matriz, proporciona una medida de disimilitud entre cada par de señales. Sólo se consideraron los elementos del triángulo superior de la matriz, excluyendo la diagonal, para evitar incluir los valores triviales de autocorrelación. La comparación se realizó entre matrices de Pearson, por lo que la medida varía entre 0, cuando las matrices son idénticas, y 2, cuando presentan diferencias máximas entre todas sus entradas. Por lo tanto, valores menores indican alta similitud entre las matrices, mientras que valores mayores sugieren mayor disimilitud.

9. Tinción de la neurona NS para análisis morfológico

Se aislaron cadenas compuestas por tres ganglios y se tiñó una de las neuronas NS del ganglio central mediante iontoforesis utilizando rodamina dextrano 10K. El tejido se incubó durante 24 horas a 18°C con medio L-15 para permitir la difusión del fluoróforo.

Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal utilizando un objetivo 20X. La reconstrucción Z-stack se realizó con planos focales espaciados por 2 μm .

RESULTADOS

Capítulo 1.

¿Cómo se comportan las neuronas premotoras NS durante crawling?

El circuito de inhibición recurrente entre las motoneuronas excitatorias y las neuronas premotoras NS sugiere que estas últimas podrían actuar como moduladoras de la actividad motora durante la ejecución del *crawling*. Esta modulación se explicaría porque la conexión eléctrica existente entre ambos tipos neuronales permite que cambios en el potencial de membrana de la neurona NS influyan en la actividad eléctrica de las motoneuronas (Figura I7).

Con el objetivo de explorar esta hipótesis, la primera parte de este trabajo se centró en estudiar la actividad de las neuronas NS durante la actividad rítmica de *crawling* *ex vivo* (*crawling*). Para ello, realizamos experimentos en ganglios aislados de sanguijuela perfundidos con dopamina (75 μ M), que activa la red neuronal encargada de formular el *crawling* (Puhl & Mesce, 2008), en los que evaluamos las variaciones del potencial de membrana de NS durante el comportamiento ficticio mediante registros intracelulares.

Para monitorear el patrón motor, registramos extracelularmente la actividad de las motoneuronas DE-3 (dorsal excitador 3), que inervan las fibras de los músculos longitudinales dorsales y, por lo tanto, reflejan la fase de contracción del patrón motor (Figura I6). Los potenciales de acción de las motoneuronas DE-3 son fácilmente identificables debido a que son las espigas de mayor amplitud en registros extracelulares del nervio DP, como se muestra en la Figura R1. Además, la actividad de las motoneuronas DE-3 resulta el *proxy* más robusto del *crawling* (Puhl & Mesce, 2008) y permite delimitar los ciclos del patrón rítmico.

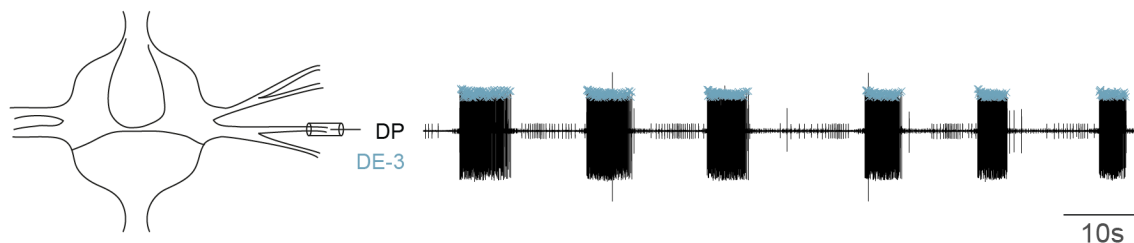


Figura R1. La motoneurona DE-3 presenta actividad rítmica durante el patrón motor de *crawling*. A la izquierda se observa el diagrama de registro; a la derecha, el registro extracelular del nervio DP durante un episodio de *crawling*. Las cruces celestes indican las espigas de la motoneurona DE-3.

1.1. Caracterización de crawling ficticio en ganglio aislado

Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo fue evaluar el rol de un circuito de inhibición recurrente en la modulación del patrón motor rítmico de crawling, el primer paso consistió en realizar una caracterización del comportamiento ficticio. Si bien existen descripciones previas detalladas de este patrón rítmico (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008), consideramos importante confirmar que nuestros resultados fueran comparables con los reportados en la literatura.

Para caracterizar el patrón motor en ganglios aislados perfundidos con dopamina, calculamos variables descriptivas del *crawling* a partir de la actividad rítmica de la motoneurona DE-3. Las variables analizadas fueron: duración de las ráfagas de disparo de la motoneurona, frecuencia de disparo durante las mismas, periodo y *duty cycle* (proporción de la duración de la ráfaga respecto al periodo). Se emplearon dos métodos para segmentar los ciclos y calcular el periodo tomando como referencia las ráfagas de disparo de DE-3: de inicio a inicio o de final a final (inicio-a-inicio o final-a-final, respectivamente; ver Materiales y Métodos, MM5, Figura MM4). Se utilizaron estos métodos de segmentación porque el inicio-a-inicio es el abordaje más común en la bibliografía, mientras que el final-a-final refleja con mayor fidelidad la secuencia temporal observada en el comportamiento in vivo.

La Figura R2 presenta la distribución de estas variables, junto con las medias obtenidas a partir del promedio por experimento y del total de ciclos analizados. La frecuencia de disparo media (FDm) y la duración media de las ráfagas de DE-3 observadas fueron $24,77 \pm 0,92$ Hz y $4,33 \pm 0,21$ s, respectivamente. Para cuantificar el periodo y el *duty cycle*, se contemplaron las dos maneras posibles de dividir el patrón motor en ciclos previamente mencionadas. Los periodos calculados de inicio a inicio y de final a final fueron $15,25 \pm 0,79$ s y $15,06 \pm 0,78$ s, respectivamente. Los *duty cycle* calculados de inicio a inicio fueron $0,31 \pm 0,01$, y los calculados de final a final fueron $0,30 \pm 0,01$.

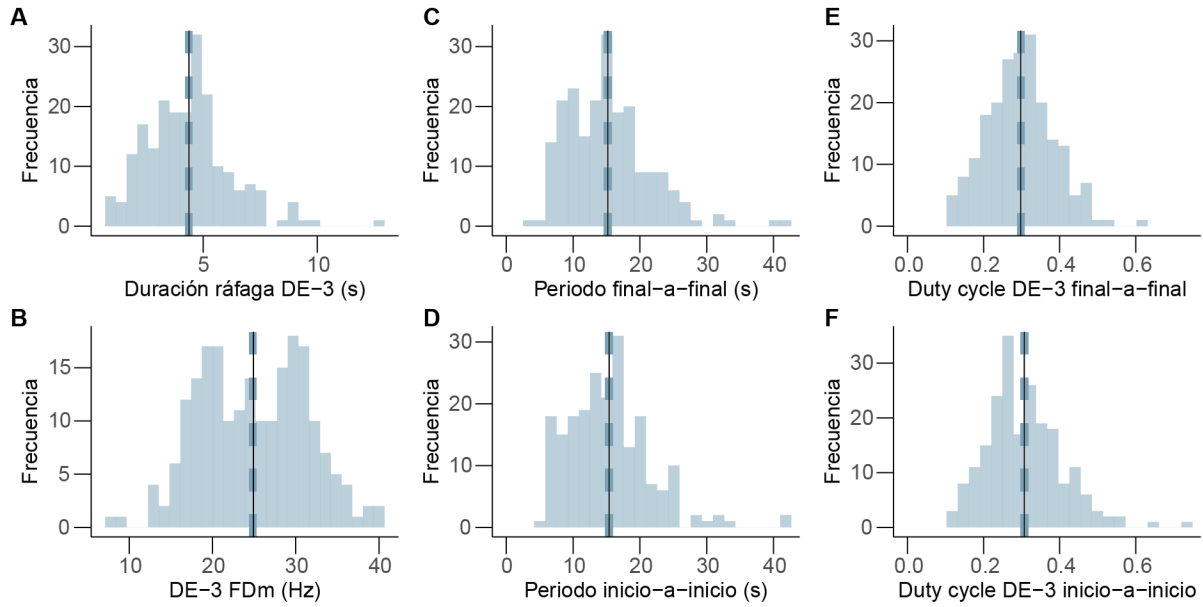


Figura R2. Descripción del crawling en ganglio aislado. **A.** Histograma de la duración de las ráfagas de DE-3 durante *crawling* en ganglio aislado. La línea punteada indica la media obtenida a partir de las medias de todos los experimentos. La línea sólida negra indica la media de todos los ciclos de todos los experimentos. **B.** Como en A, para la frecuencia de disparo media de las motoneuronas DE-3 durante las ráfagas. **C y D.** Como en A, para el periodo final-a-final de las ráfagas de DE-3 e inicio-a-inicio, respectivamente. **E y F.** Como en A, para del *duty cycle* considerando periodos final-a-final e inicio-a-inicio, respectivamente. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas en todos los casos).

Como se mencionó, la segmentación final a final refleja con mayor fidelidad la estructura del patrón motor, dado que el comportamiento in vivo se inicia con la fase de elongación. Al comparar los resultados obtenidos con las segmentaciones inicio-a-inicio y final-a-final, se observó que eran altamente similares. Por este motivo, en los análisis posteriores de esta sección se optó por utilizar los ciclos segmentados final-a-final, que resultan más parsimoniosos con la estructura esperada del comportamiento.

En la Figura R2B puede observarse que los valores de frecuencia de disparo de DE-3 presentan una distribución bimodal. El análisis de la frecuencia promedio en cada ganglio reveló que esta distribución se debe a la existencia de ganglios con frecuencias cercanas a 30 Hz y otros con valores alrededor de 20 Hz, y no a la coexistencia de ráfagas con frecuencias de disparo altas y bajas dentro de un mismo ganglio (Figura R3).

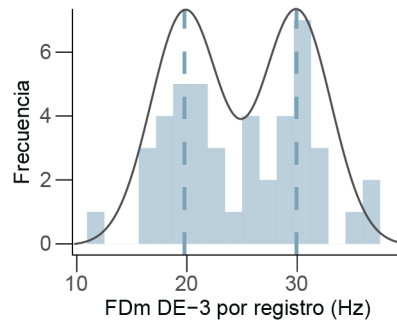


Figura R3. Frecuencia de disparo media de DE-3 por ganglio. A. Histograma de la frecuencia de disparo media (FDm) de las ráfagas de DE-3 durante *crawling* construido a partir del promedio obtenido de 45 ganglios. La línea punteada indica las medias estimadas mediante un ajuste bimodal considerando las medias de todos los experimentos. La distribución fue ajustada con un modelo de mezcla gaussiana (Mclust, dos componentes con la misma varianza). Las medias de los componentes fueron 19.75 Hz y 29.94 Hz, con proporciones de 49% y 51%, respectivamente. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas).

Nos preguntamos entonces si alguna variable podía explicar la presencia de ganglios con frecuencias de disparo distintas. No encontramos relación entre la frecuencia de disparo de DE-3 y el animal del que provenían los ganglios, ni con la posición del ganglio en la cadena (Figura S1). Tampoco se observó asociación con variables experimentales como el año, la estación, o la hora de realización del experimento (Figura S2A-C).

En algunos casos, una misma sanguijuela fue utilizada durante dos días consecutivos: el primer día se disecaba al animal y se comenzaban a extraer ganglios, y al día siguiente se continuaba la disección sobre el mismo individuo, mantenido a 8°C. Analizamos si la diferencia entre el día de disección y el momento del registro podía influir sobre la frecuencia de disparo, pero tampoco encontramos asociación (Figura S2).

Estos análisis de la distribución bimodal de la frecuencia de disparo de DE-3 se encuentran detallados en el Material Suplementario, S2.

Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados previamente en estudios de *crawling* en ganglio aislado (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008), lo que

indica que en nuestros experimentos se logró activar de manera consistente la red neuronal responsable del patrón motor ficticio, en concordancia con análisis previos.

1.2. ¿Son similares entre sí los patrones rítmicos de ganglios de distintas partes del cordón nervioso?

Al trabajar con ganglios aislados de sanguijuela, se asume que todos los ganglios son similares entre sí, con excepción de aquellos que inervan los segmentos 5 y 6, en los que se encuentran los aparatos reproductores (Nicholls & Baylor, 1968). Con el objetivo de evaluar si los osciladores encargados de formular el *crawling* en los distintos ganglios responden de manera similar a la perfusión con dopamina, cuantificamos las variables utilizadas para caracterizar el patrón motor (duración de la ráfaga de DE-3 y frecuencia de disparo de la motoneurona, periodo del *crawling*, *duty cycle*) en ganglios extraídos de distintos segmentos del cordón nervioso.

Para este análisis, seleccionamos los resultados obtenidos de ganglios de cuya posición en la cadena contábamos con al menos tres experimentos. Considerando esto, analizamos todos los ciclos correspondientes a experimentos realizados en ganglios aislados entre las posiciones 8 y 12, y no encontramos diferencias atribuibles a la identidad del ganglio para ninguna de las variables estudiadas (Figura R4). Los modelos estadísticos realizados en cada caso y los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1 del Apéndice.

Nos preguntamos si podían existir diferencias entre ganglios dentro de un mismo animal que no hubieran sido detectables al analizar los datos agrupados, sin considerar el origen de cada ganglio. Para evaluar esto, analizamos datos de experimentos en los que se utilizaron al menos cuatro ganglios provenientes de un mismo individuo. Tampoco en este caso encontramos, para ninguna de las variables estudiadas, una tendencia consistente en las diferencias entre ganglios dentro de cada animal que se replicara de manera robusta entre distintos individuos (Figura S3, Material Suplementario).

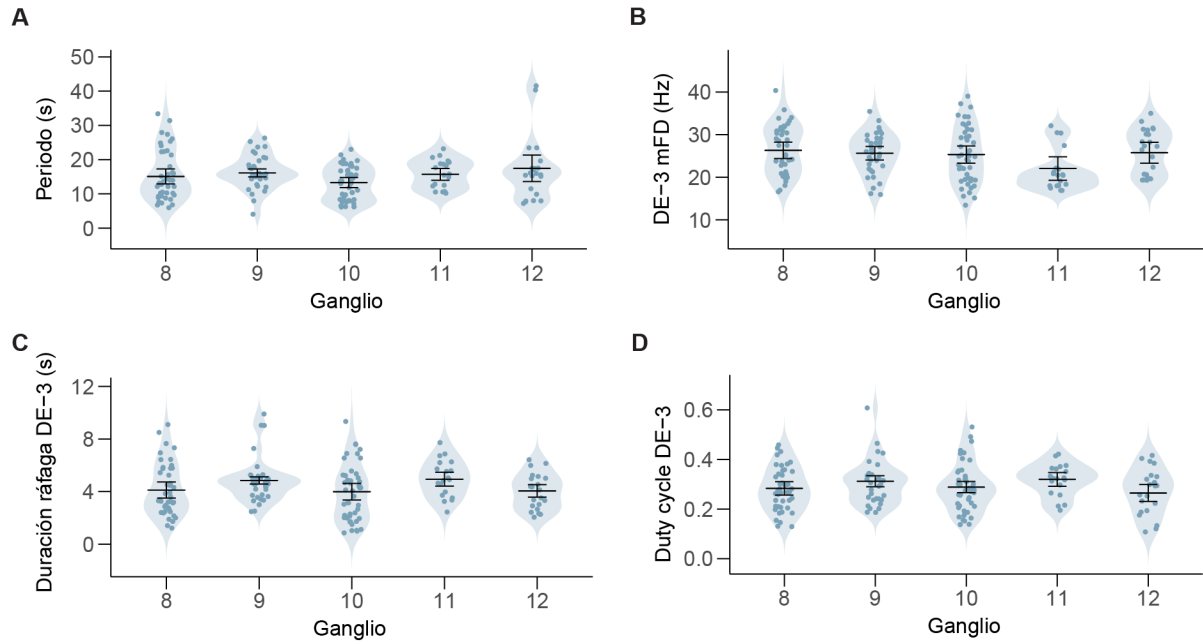


Figura R4. Comparación de características de crawling ficticio entre ganglios con distinta posición en la cadena nerviosa. **A.** Periodo del *crawling* (final-a-final) de experimentos realizados en ganglios con distinta posición en la cadena ($n = 9$ experimentos del ganglio 8; $n = 7$ experimentos del ganglio 9, $n = 10$ experimentos de ganglio 10, $n = 4$ experimentos del ganglio 11, $n = 5$ experimentos del ganglio 12; provenientes de 20 sanguijuelas). Cada punto corresponde al valor de cada ciclo de cada experimento individual. Se indican la media de medias $\pm$ EE. No se encontraron diferencias significativas entre ganglios. **B.** Como A pero para la FD media (FDm) de DE-3. **C.** Como A pero para la duración de las ráfagas de DE-3. **D.** Como A pero para el *duty cycle* de DE-3. **E.** Periodo del *crawling* (final-a-final) de experimentos realizados en ganglios aislados pertenecientes a un mismo animal. Cada punto corresponde al valor de cada ciclo de cada experimento individual. Las líneas sólidas conectan los valores de ganglios adyacentes en la cadena correspondientes a un mismo animal. Las líneas punteadas conectan los valores de ganglios no adyacentes correspondientes a un mismo animal. **F.** Como E pero para la FD media (FDm) de DE-3. **G.** Como E pero para la duración de las ráfagas de DE-3. **H.** Como E pero para el *duty cycle* de DE-3.

1.3. Caracterización de NS durante *crawling*

En experimentos en los que se registró la actividad de la neurona premotora NS mientras la motoneurona DE-3 exhibía el patrón rítmico de *crawling*, el potencial de membrana de NS mostró oscilaciones rítmicas sincronizadas con la actividad de la

motoneurona. Se observaron hiperpolarizaciones del potencial de membrana de NS que tenían lugar en coincidencia con las ráfagas de disparo de DE-3 y despolarizaciones de NS que ocurrían durante los momentos en los que DE-3 se encontraba silenciada (Figura R5A). En este estudio nos focalizamos en las hiperpolarizaciones periódicas de NS.

Para cuantificar el grado de correlación entre la actividad de NS y DE-3, se aplicó un análisis de correlación cruzada a fragmentos de registros que incluyeran cinco ciclos consecutivos de *crawling*. Las señales se filtraron y procesaron según lo indicado en Materiales y Métodos (MM5. Procesamiento de los datos de experimentos de electrofisiología). Este análisis reveló una marcada anticorrelación entre NS y DE-3, con un índice de correlación cruzada de $-0,61 \pm 0,03$ (media $\pm$ EE) y un *lag* cercano a cero segundos ($0,24 \pm 0,10$ s) (Figura R5B). Estos resultados confirman que la hiperpolarización de NS tiene lugar en fase con las ráfagas de disparo de DE-3.

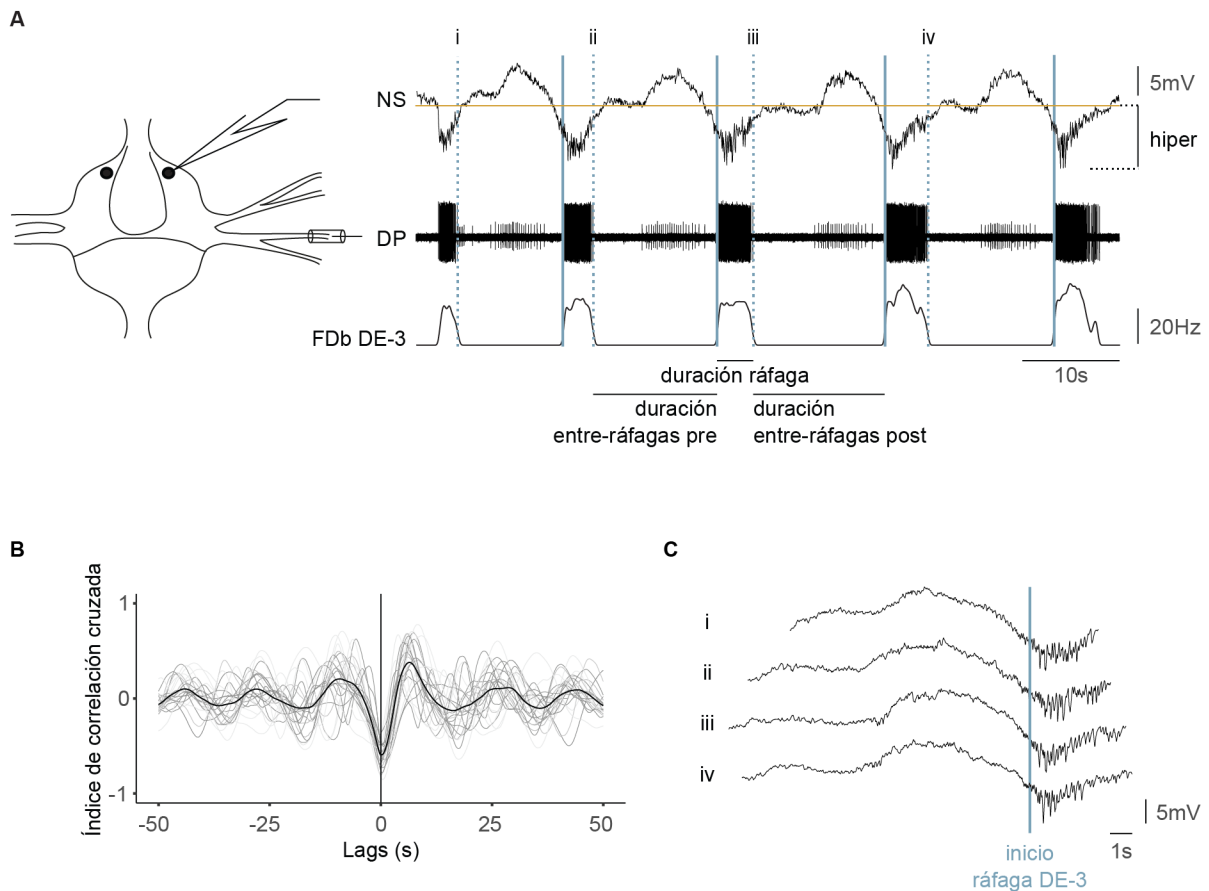


Figura R5. La actividad de NS correlaciona con el patrón motor de *crawling*. **A.** A la izquierda se observa el diagrama de registro; a la derecha, el registro intracelular de NS, el registro extracelular del nervio DP y la frecuencia de disparo *binneada* (FDb) durante un episodio de *crawling*. El registro de NS fue resampleado para tener la misma tasa de datos de la curva FDb de DE-3. Las líneas verticales azules marcan el inicio de cada ráfaga de DE-3 y las líneas verticales azules punteadas marcan el final. Se indican distintas características del *crawling* cuantificadas y la amplitud de la hiperpolarización de NS (hiper). **B.** Resultado de los análisis de correlación cruzada entre las curvas de FDb de DE-3 y los trazos *resampleados* de NS. Cada curva gris corresponde a un experimento individual. La curva negra corresponde al correlograma promedio. (n = 23 episodios de *crawling* que contienen 5 ciclos cada uno, obtenidos de 23 ganglios de 18 sanguijuelas). **C.** Ciclos sucesivos del registro intracelular de NS mostrado en el panel A, segmentados utilizando los momentos indicados por las líneas verticales punteadas y alineados a los tiempos indicados por las líneas azules sólidas indicadas en A.

1.4. ¿Cuál es el origen de las hiperpolarizaciones de NS durante *crawling*?

La descripción del circuito de inhibición recurrente previamente realizada en el laboratorio indica que NS es una neurona blanco de señales inhibitorias provenientes de motoneuronas excitatorias a través de sinapsis químicas polisinápticas (Rela & Szczupak, 2003; Figura I7). Por lo tanto, es posible hipotetizar que las hiperpolarizaciones de NS observadas durante el *crawling*, en fase con la actividad de la motoneurona DE-3, podrían resultar de señales originadas en esta motoneurona. Si esta hipótesis fuera correcta, el inicio de las ráfagas de disparo de DE-3 debería preceder al inicio de la hiperpolarización de NS. Como punto de partida para estudiar el origen de las hiperpolarizaciones de NS, nos propusimos evaluar esta hipótesis.

Debido a que los análisis de correlación cruzada se realizaron utilizando curvas de la frecuencia de disparo de DE-3 *binneadas* y trazos del potencial de NS *resampleados*, el pico del desfase reportado no proporciona una estimación adecuada, considerando los tiempos sinápticos, de la temporalidad relativa entre las dos señales. Para obtener una evaluación más precisa, consideramos y pusimos a punto distintas metodologías que permitieran cuantificar la relación temporal entre las señales. La dificultad principal radicó en la detección precisa del inicio de la hiperpolarización de NS.

En una primera aproximación, se optó por trabajar con la señal de NS aplicando distintos filtros pasa altos y pasa bajos, con el objetivo de obtener las ráfagas de potenciales postsinápticos inhibitorios individuales que componen su respuesta hiperpolarizante (Figura R5A). A partir de esta señal filtrada, se identificó el primer potencial inhibitorio en NS asociado a cada ráfaga de DE-3 y se cuantificó la diferencia temporal entre dicho evento y el primer potencial de acción de DE-3. Esta estrategia fue descartada porque no fue posible detectar de manera consistente el primer potencial inhibitorio individual de NS en todos los casos. Como segunda alternativa, se filtró la señal de NS utilizando un filtro pasa bajos para obtener la componente lenta de la dinámica del potencial de membrana y se calculó la derivada para identificar los puntos de inflexión correspondientes al inicio de la hiperpolarización. Esta aproximación tampoco garantizó una detección precisa y confiable en todos los registros. Por lo tanto, si bien fue posible analizar los experimentos y se observó que, en la mayoría de los casos, el inicio de la hiperpolarización precedía el comienzo de las ráfagas de disparo de DE-3, decidimos no reportar esta cuantificación debido a la falta de consistencia en la detección.

Decidimos entonces, para evaluar la relación temporal entre las señales, segmentar los registros intracelulares de NS en ciclos final-a-final (ver Materiales y Métodos, MM5) y alinearlos al instante en el que tuvo lugar el primer potencial de acción de la ráfaga de DE-3 contenida en dicho ciclo (Figura R5C). Tal como se mencionó, y se observa en este ejemplo, debido a las oscilaciones del potencial de membrana de NS, no es posible establecer con certeza el momento exacto en el que comienza su respuesta hiperpolarizante. No obstante, el ejemplo ilustra que el inicio de las ráfagas de disparo de DE-3 ocurrió después de que la hiperpolarización de NS hubiera iniciado. Este patrón es representativo de lo observado en todos los experimentos analizados y descarta la posibilidad de que la hiperpolarización de NS sea únicamente causada en respuesta a la actividad de DE-3. En cambio, sugiere que NS y DE-3 podrían estar recibiendo *inputs* rítmicos concurrentes de signo opuesto: *inputs* hiperpolarizantes en NS e *inputs* despolarizantes en DE-3.

En conclusión, los experimentos corroboran que el potencial de membrana de NS oscila durante el *crawling*. Los análisis confirmaron la correlación temporal entre las

hiperpolarizaciones de NS y las ráfagas de disparo de DE-3, y desestimaron que éstas fueran originadas por la actividad de las motoneuronas. Cabe aclarar que NS está conectada con otras motoneuronas cuya actividad podría explicar el inicio de su hiperpolarización. Esta posibilidad fue evaluada más adelante en el trabajo, una vez desarrollada la herramienta necesaria, y en todos los casos analizados no se encontró actividad motora que anticipara el inicio de la hiperpolarización de NS. Por último, los resultados permiten hipotetizar la existencia de *inputs* presinápticos concurrentes de signo opuesto a NS y DE-3.

1.5. ¿Existe durante el crawling un *input* presináptico en común que excita a la motoneurona DE-3 e hiperpolariza a la neurona premotora NS?

Para analizar en detalle la posibilidad de la existencia de señales concomitantes emitidas por el oscilador hacia NS y DE-3, evaluamos la correlación entre diferentes características de la actividad rítmica de ambas neuronas. Con el fin de ponderar la magnitud del *input* inhibitorio en NS, calculamos la amplitud máxima de la hiperpolarización (Figura R5A; ver Materiales y Métodos, MM5). Por otro lado, como medida de las señales emitidas por el oscilador, consideramos distintas características tanto de las ráfagas de disparo de DE-3 como del patrón de *crawling* en general.

Si NS y DE-3 recibieran señales del mismo elemento presináptico, sería esperable observar una relación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la frecuencia de disparo media de DE-3 durante las ráfagas. Sin embargo, los resultados no muestran correlación entre estas variables (Figura R6A). Sorprendentemente, observamos una alta correlación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la duración de las ráfagas de disparo de DE-3 (Figura R6B).

Dado que el oscilador controla tanto la actividad de DE-3 como la de las neuronas que disparan en antifase con esta motoneurona, este resultado nos llevó a examinar la relación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y el intervalo entre ráfagas de disparo de DE-3. Para cada evento de hiperpolarización de NS, se definieron dos

intervalos: uno que lo precedía (pre) y otro que lo seguía (post) (Figura R5A). Los datos muestran una correlación significativa entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y el intervalo entre ráfagas previo, pero no con el intervalo entre ráfagas posterior (Figura R6C-D).

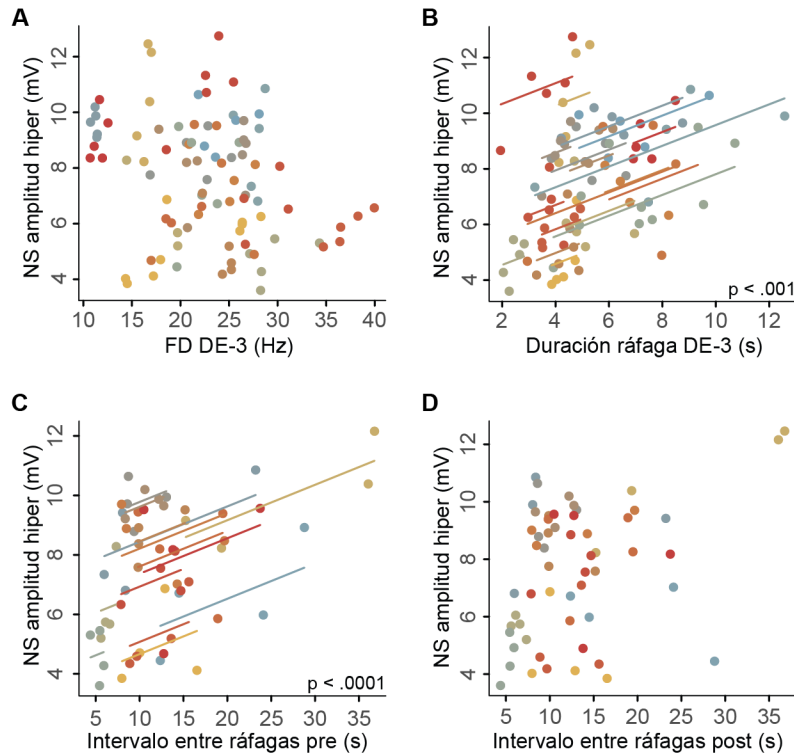


Figura R6. Correlaciones entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y distintas características del patrón motor ex vivo. **A.** Amplitud de la hiperpolarización de NS en función de la FD de las ráfagas de DE-3. Cada punto corresponde a un ciclo de crawling y los colores indican los distintos experimentos. **B.** Como en A, pero en función de la duración de las ráfagas de DE-3. **C.** Como en A, pero en función del intervalo entre ráfagas anterior a las ráfagas de DE-3. **D.** Como en A, pero en función del intervalo entre ráfagas posterior a las ráfagas de DE-3. Para paneles A-D, $n = 19$ episodios de *crawling*, con cinco ciclos cada uno. En A y D, $p > 0.05$. En B y C, $p < 0.05$. Las líneas corresponden a las regresiones obtenidas a partir de los modelos lineales de efectos mixtos. Los coeficientes obtenidos fueron 0.374 ± 0.089 mV/s para B y 0.122 ± 0.034 mV/s para C.

Para evaluar la relación entre las variables cuantificadas, realizamos modelos lineales mixtos, considerando la variable experimento como efecto aleatorio. En cada caso se modeló la relación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y alguna de las distintas variables del crawling controladas por el oscilador. Se evaluó si existía correlación entre las variables y si esta difería entre ganglios. En todos los casos se

observó que el modelo que mejor ajustaba los datos presentaba un único coeficiente para describir la pendiente.

Además de las variables presentadas en la Figura R6, evaluamos la relación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y el periodo (inicio-a-inicio o final-a-final) o el *duty cycle* de DE-3 (calculado a partir de estos mismos intervalos), sin encontrar correlación significativa. Tampoco se observó una correlación entre la amplitud de la hiperpolarización y la fase, dentro de la etapa de contracción, en que el potencial de membrana de NS alcanzaba su valor mínimo. Por último, tampoco encontramos relación entre la duración de la ráfaga de DE-3 y el intervalo entre ráfagas precedente ni con el periodo final-a-final (datos no mostrados).

1.6. Discusión

El análisis detallado de los experimentos de *crawling* en ganglio aislado reveló que los valores de distintas variables descriptivas del patrón rítmico fueron similares a los reportados en la literatura (Figura R2; Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008). Además, la comparación entre el *crawling* generado por osciladores aislados de ganglios ubicados en distintas posiciones a lo largo del cordón nervioso confirman el supuesto de que estos responden de manera similar a la perfusión con dopamina, por lo que los experimentos pueden realizarse utilizando indistintamente cualquiera de ellos (Figura R4).

NS durante el *crawling*

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo sugieren que, durante *crawling*, las neuronas NS reciben una señal inhibitoria sincronizada con la actividad de DE-3 (Figura R5). A diferencia de lo hipotetizado inicialmente, esta señal inhibitoria no parece originarse por la actividad de la motoneurona DE-3, sino que, tal como se esquematiza en la Figura R7, tendría el mismo origen que la corriente excitatoria que activa a las motoneuronas DE-3, aunque de signo opuesto. Esta conclusión es coherente con el hecho de que la amplitud de la hiperpolarización de NS

correlaciona con la duración de las ráfagas de DE-3 (Figura R6B). Sin embargo, resulta paradójico no encontrar una correlación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la frecuencia de disparo de DE-3 (Figura R6A). Una posible explicación para esta discrepancia es que, considerando el circuito de inhibición recurrente, DE-3 podría estar sujeta a dos efectos contrapuestos en la misma fase (ver Figura R7): una entrada excitatoria proveniente de la unidad C del oscilador y una entrada inhibitoria proveniente de la hiperpolarización concomitante NS, a través de las sinapsis eléctricas rectificantes. En consecuencia, cuanto mayor es el *input* excitatorio desde C, mayor es el *input* inhibitorio desde NS, balanceando en términos de magnitud la respuesta de DE-3, sin afectar la duración de la ráfaga. Experimentos que se describen más adelante evaluarán esta hipótesis.

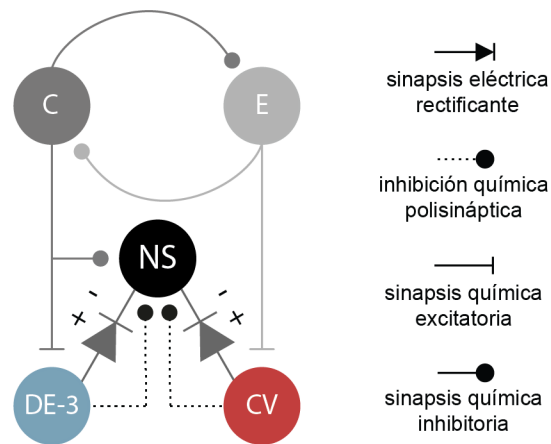


Figura R7. Circuito neuronal putativo subyacente al *crawling* y al circuito inhibitorio recurrente en un ganglio del cuerpo medio (versión actualizada). Tal como se esquematizó en la Figura I7, las unidades C y E corresponden, respectivamente, a las unidades de contracción y elongación del oscilador. La neurona NS está conectada con las unidades motoras mediante sinapsis químicas y eléctricas (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009); los símbolos + y – indican la polaridad en la que las sinapsis rectificantes permiten el paso de corriente. Considerando los resultados de este capítulo, proponemos que existe una inhibición química entre la unidad de contracción del oscilador y la neurona premotora NS.

El modelo propuesto en la Figura I7, en el que las unidades de contracción (C) y elongación (E) del oscilador se inhiben mutuamente, permitiría explicar por qué la duración de los intervalos entre ráfagas de DE-3 previos correlacionaron con la amplitud de las hiperpolarizaciones de NS (Figura R6C): una mayor duración de la

actividad de la unidad E implicaría la inhibición sostenida de la unidad C, lo que causaría un rebote post-inhibitorio mayor de la unidad C. Este rebote resultaría no sólo en una mayor hiperpolarización de NS, sino también en un aumento del *input* excitatorio hacia DE-3, afectando la duración de sus ráfagas de disparo (Figura R6B).

Propiedades electrofisiológicas de NS

En nuestros resultados observamos que la hiperpolarización máxima que exhiben las neuronas NS se alcanza al inicio de la ráfaga de actividad de DE-3 en cada ciclo (Figura R5). La dinámica temporal de esta respuesta hiperpolarizante ha sido descrita en relación con otros *inputs* inhibitorios que recibe NS, y nuestros resultados son consistentes con las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de esta neurona reportadas previamente (Marín-Burgin & Szczupak, 2000). En particular, se ha descrito que, en respuesta a la ráfaga de disparo de una neurona sensorial, NS presenta una despolarización que codifica la duración del estímulo y una hiperpolarización cuya amplitud máxima se alcanza durante los primeros potenciales del tren, aproximadamente luego de tres potenciales de acción.

Sin embargo, si bien se ha postulado que la hiperpolarización inicial de NS no es gradual y no refleja la intensidad del estímulo, sino que parecería codificar el onset de la señal (Wadepuhl, 1989), nuestros resultados sugieren que la amplitud de la hiperpolarización de NS presenta variaciones que correlacionan con la intensidad del estímulo inhibitorio que estaría recibiendo.

Capítulo 2.

¿Cómo modula NS la salida motora durante el *crawling*?

Análisis de la actividad de la motoneurona DE-3

A partir de los resultados descritos en el primer capítulo, es posible concluir que, durante *crawling*, las neuronas premotoras NS reciben *inputs* concomitantes y de signo opuesto con respecto a las excitaciones que reciben las motoneuronas DE-3. Además, los resultados sugieren que estos *inputs* provienen del oscilador encargado de generar el patrón motor (Figura R7). Teniendo en cuenta esta interpretación, la falta de correlación observada entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la frecuencia de disparo de DE-3 durante el *crawling* podría explicarse si DE-3 se encontrara sujeta a dos efectos contrapuestos durante la misma fase: una entrada excitatoria proveniente de la unidad del oscilador responsable de la fase de contracción y una entrada inhibitoria transmitida desde NS a través de las sinapsis eléctricas rectificantes. Por lo tanto, es plausible hipotetizar que la hiperpolarización de NS, independientemente de su origen, se transmite eléctricamente a DE-3 restringiendo su excitación. A partir de esta hipótesis, la segunda parte del trabajo se centró en evaluar si la inhibición observada en la neurona premotora NS tiene un impacto sobre la actividad de las motoneuronas DE-3.

2.1. Efecto de la neurona premotora NS sobre la actividad de la motoneurona DE-3 durante *crawling*

Una vez caracterizado el *crawling*, para evaluar si la señal inhibitoria rítmica registrada en NS se transmitía a las motoneuronas a través de las sinapsis eléctricas rectificantes, decidimos remover a las neuronas premotoras NS del circuito de manera específica y transitoria. Esto fue posible porque, considerando las propiedades de la sinapsis eléctrica rectificante entre NS y las motoneuronas, despolarizar las neuronas NS es funcionalmente equivalente a desconectarlas de la red (Rela & Szczupak, 2007; Figura I7).

Realizamos entonces una serie de experimentos similares a los descritos en el Capítulo 1: registros intracelulares de NS y extracelulares del nervio DP en ganglios aislados perfundidos con dopamina. La diferencia fue que, en este caso, se aplicaron pulsos de corriente despolarizante en NS, que abarcaron entre 5 y 7 ciclos durante el curso de los episodios de *crawling* (Figura R8A). Estos pulsos llevaron el potencial de

membrana de NS a valores más despolarizados que 100 mV, lo cual es significativamente mayor al potencial de membrana de las motoneuronas, aún durante las ráfagas de disparo, y provoca el cierre de las sinapsis eléctricas rectificantes.

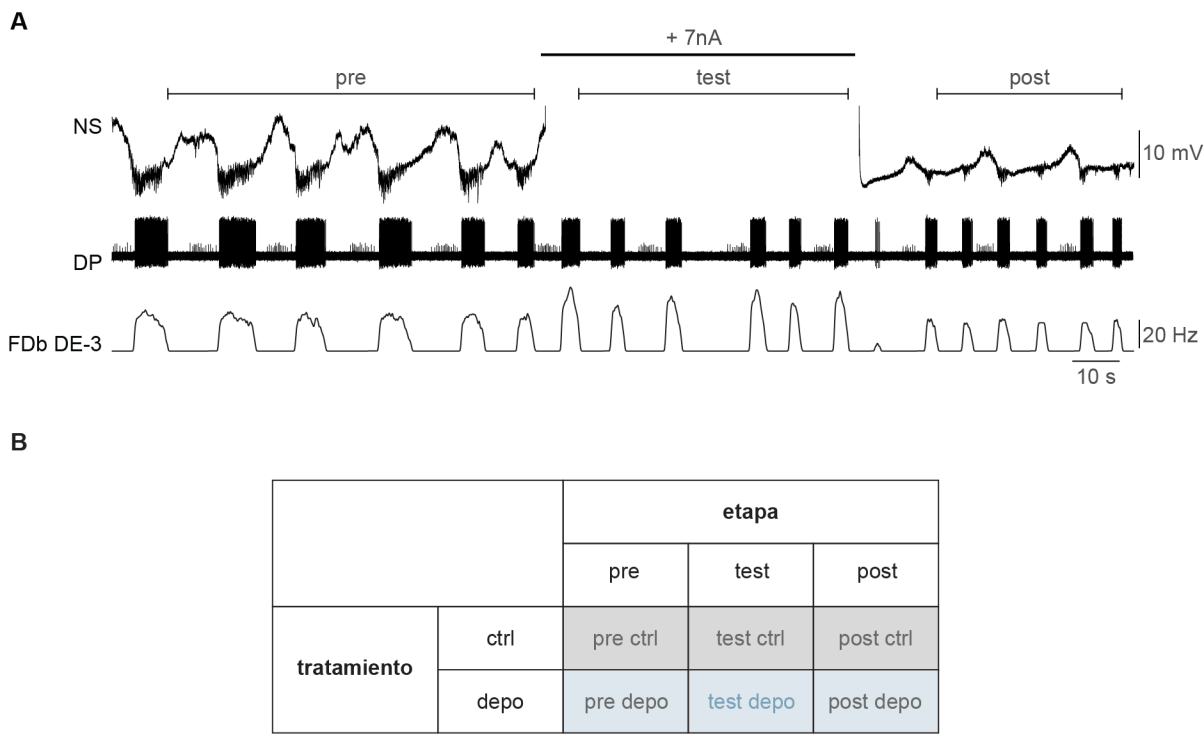


Figura R8. Manipulación del potencial de membrana de NS durante *crawling*. **A.** Registro intracelular de NS y registro extracelular del nervio DP durante un episodio de *crawling* inducido por dopamina en un ganglio aislado. El trazo inferior muestra la frecuencia de disparo *binneada* de DE-3 en el nervio DP. Un pulso de corriente de +7 nA fue inyectado en NS en el momento indicado por la línea horizontal gruesa. Los segmentos indican tres etapas del registro: antes (pre), durante (test) y después (post) del pulso. **B.** Diseño experimental de los registros electrofisiológicos de *crawling* en ganglio aislado para evaluar el efecto de la despolarización de NS sobre el circuito responsable del comportamiento.

Dado que a lo largo de registros como el presentado en la Figura R8A se observaban derivas temporales que podrían estar afectando distintas características del *crawling*, los estudios incluyeron dos series experimentales: una en la que durante la etapa test NS fue sometida a pulsos de corriente despolarizante (depo) y otra serie control en la que las neuronas no fueron despolarizadas (ctrl). Se evaluaron los cambios en el periodo (final-a-final), la frecuencia de disparo media de DE-3 durante las ráfagas

(FDm), la duración de las ráfagas de disparo y el *duty cycle* (final-a-final) para ambos tratamientos (depo y ctrl) a lo largo de las diferentes etapas de los experimentos (pre, test, post). La Figura R8B esquematiza el diseño experimental y los factores analizados.

Para analizar la significancia estadística de los resultados en función del tratamiento y la etapa experimental, realizamos modelos lineales mixtos o modelos lineales generalizados mixtos, considerando el tratamiento y la etapa como variables explicativas y evaluando la interacción entre estos factores. De esta manera fue posible evaluar si los cambios observados entre las etapas pre, test y post diferían entre los experimentos control y aquellos en los que se despolarizó la neurona NS.

Una interacción significativa entre tratamiento y etapa, entonces, indicaría que la despolarización de NS afecta la variable analizada. En esos casos, realizamos análisis de contrastes pareados entre las etapas (pre-test, test-post, pre-post) al interior de cada tratamiento. Por el contrario, la ausencia de una interacción significativa puede deberse a que la variable no cambió entre etapas en ninguno de los tratamientos, o a que hubo una deriva temporal similar en ambos.

Cuando no se detectó una interacción significativa, lo que indica que la despolarización de NS no afectó la variable cuantificada, realizamos nuevos modelos con el objetivo de evaluar si existieron cambios entre etapas atribuibles a una deriva temporal. En estos nuevos modelos se consideraron únicamente los datos provenientes de los tratamientos control. Estos análisis no informan directamente sobre el efecto de NS en el patrón de *crawling*, pero permiten caracterizar mejor la dinámica del patrón motor en condiciones basales.

La Figura R9 esquematiza y resume la lógica del análisis estadístico realizado.

Las despolarizaciones transitorias de las neuronas NS no tuvieron efecto sobre el periodo del *crawling* (medido en ciclos final-a-final; ver Materiales y Métodos, Figura MM4), ni sobre la duración de las ráfagas de DE-3, ni sobre el *duty cycle* (Figura

R10A). Sí se detectó, en cambio, un aumento del 60% de la frecuencia de disparo media de DE-3 (Figura R10A-B).

El análisis de las características del *crawling* a lo largo del tiempo mostró que el periodo del ciclo y la duración de la ráfaga de DE-3 disminuyeron a lo largo de las etapas, mientras que el *duty cycle* se mantuvo constante (Figura R10A).

Los modelos realizados y los estimadores obtenidos se encuentran detallados en la Tabla 2 del Apéndice.

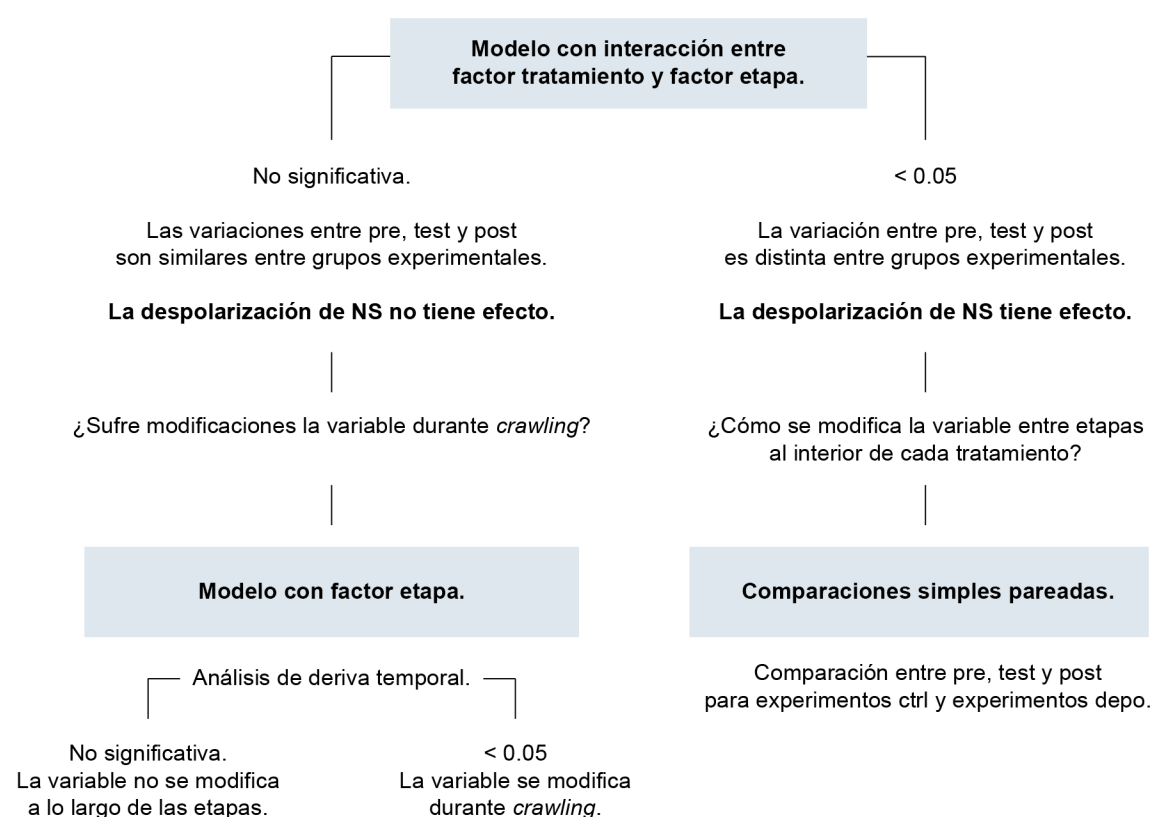


Figura R9. Esquema representativo del *pipeline* utilizado para los análisis estadísticos del efecto de NS sobre la actividad de DE-3 durante *crawling*.

Los mismos resultados fueron obtenidos al segmentar los ciclos de manera inicio-a-inicio (datos no mostrados). La Figura S4 (Material Suplementario, S4) muestra los histogramas construidos a partir de los resultados obtenidos de todos los ciclos cuantificados.

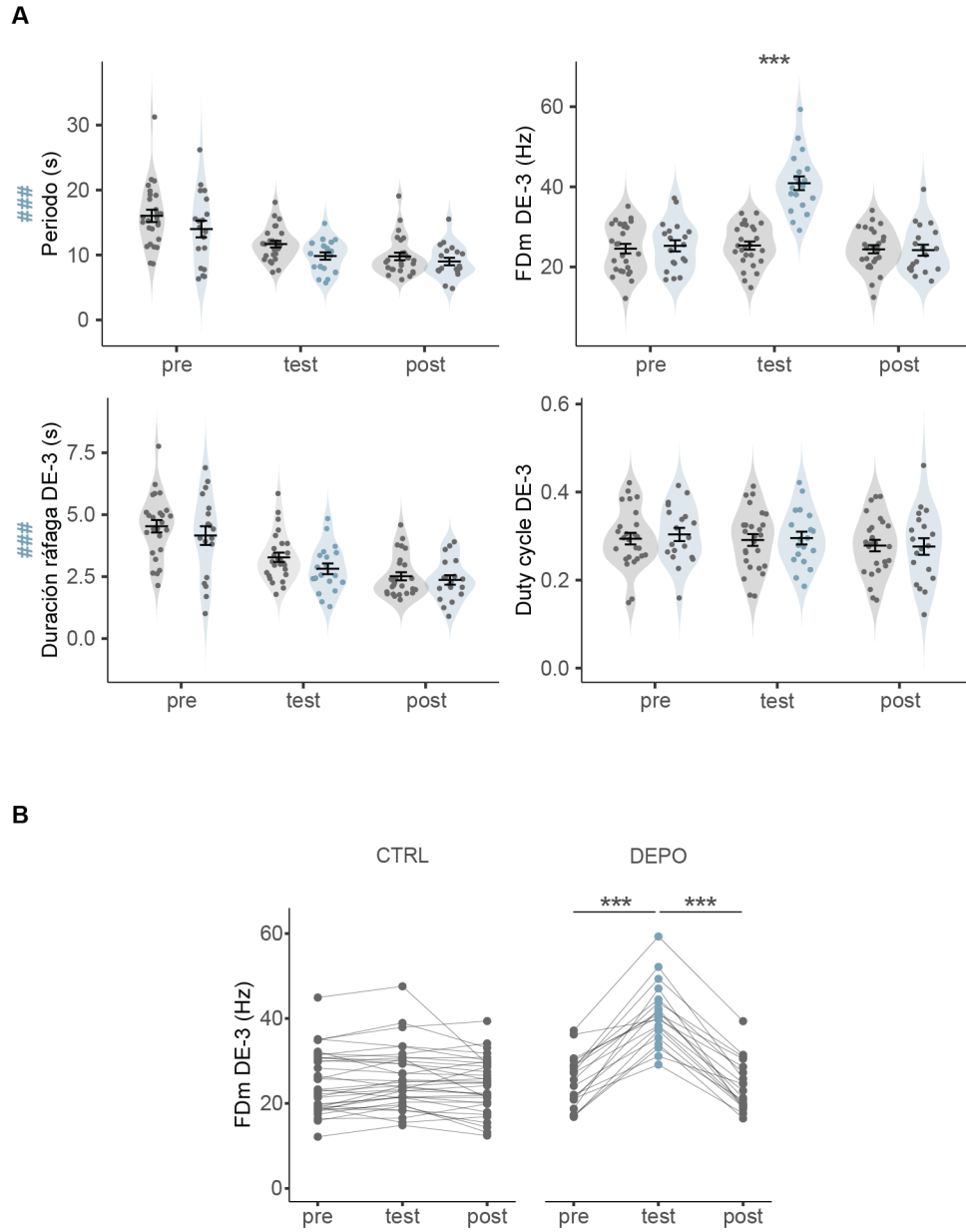


Figura R10. Efecto de NS sobre la actividad de la motoneurona DE-3 durante *crawling*.

A. Periodo del *crawling* (final-a-final), FD media (FDm), duración de las ráfagas y duty cycle de DE-3 en las tres etapas cuantificadas. Se muestran los resultados de experimentos control, en los que no se inyectó corriente en NS (violines grises, $n = 120$ ciclos de 26 episodios de 26 ganglios de 16 sanguijuelas), y experimentos en los que se despolarizó a NS mediante pulsos de corriente (violines celestes, $n = 92$ ciclos de 19 episodios de 19 ganglios de 15 sanguijuelas). Cada punto corresponde al valor medio para cada etapa en cada experimento individual. Se indican la media $\pm$ EE. *** $p < 0,001$ (interacción entre los factores etapa y experimento) y ### $p < 0,001$ (factor etapa).

B. FDm de DE-3 media para cada etapa de cada experimento individual, en condición control (ctrl) y cuando se despolarizó a NS (depo). Las líneas unen los puntos correspondientes al mismo experimento. *** $p < 0,001$ (contrastes simples pareados, $\Delta_{\text{pre-test}} = -15,591 \pm 1,037$ Hz y $\Delta_{\text{test-post}}$

= $16,648 \pm 0,919$ Hz). Los modelos realizados y los estimadores obtenidos se encuentran detallados en la Tabla 2 del Apéndice.

2.2. Discusión

Efecto de NS sobre la actividad de la motoneurona DE-3

Estos resultados apoyan la hipótesis, planteada a partir del circuito previamente descrito (Figura I7) y de los resultados del Capítulo 1, que sostiene que las señales inhibitorias rítmicas que recibe NS durante el *crawling* contrarrestan las señales excitatorias que reciben las motoneuronas DE-3 del oscilador. NS actuaría, entonces, como un modulador, limitando la frecuencia de disparo de la motoneurona (Figura R10A-B). Sin embargo, la remoción de NS del circuito no afectaría variables relacionadas con la ritmicidad del patrón motor, como el periodo, la duración de la fase de contracción (entendida como la duración de la ráfaga de disparo de DE-3), ni el *duty cycle* (Figura R10A).

Es importante destacar que estudios previos realizados en el laboratorio (Rodriguez et al., 2012) arrojaron resultados en la misma dirección que los hallazgos presentados en este capítulo. No obstante, si bien ese trabajo también partía de la hipótesis de que las señales inhibitorias recibidas por NS eran transmitidas a las motoneuronas, carecía de un control fundamental: únicamente se realizaron experimentos en los que la neurona NS fue despolarizada. En el presente estudio, en cambio, la despolarización de NS durante *crawling* se compara con una serie control que permite examinar adecuadamente la hipótesis.

Deriva temporal del patrón motor de crawling ficticio

El análisis de las características del *crawling* en función del tiempo reveló que tanto el periodo de los ciclos como la duración de las ráfagas de DE-3 disminuyeron a lo largo del experimento, mientras que el *duty cycle* se mantuvo constante (Figura R10A). Estos resultados sugieren que durante la perfusión con dopamina el patrón motor registrado se aceleró sin alterar la proporción relativa de las fases del ciclo. En

conjunto, estos hallazgos indican que el periodo del crawling y la duración de las ráfagas exhibieron una deriva temporal, mientras que el *duty cycle* constituyó una característica robusta que el oscilador responsable del crawling mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo.

La aceleración del patrón motor podría explicarse por, al menos, dos mecanismos posibles. Por un lado, la perfusión, difusión y/o degradación de la dopamina durante el experimento podrían generar un efecto dependiente del tiempo que afecte la actividad rítmica. Alternativamente, el desarrollo del patrón rítmico podría reflejar cambios en el reclutamiento de componentes del oscilador involucrados en esta característica del crawling como consecuencia del uso de preparaciones de ganglio aislado. Estos dos mecanismos no son mutuamente excluyentes, sino que podrían incluso ser interdependientes.

Si bien este estudio no ha abordado los mecanismos subyacentes a la aceleración del *crawling*, el diseño experimental utilizado permitió observar que la deriva temporal no afecta la modulación que ejerce NS sobre la frecuencia de disparo de la motoneurona DE-3. Esto sugiere que, cuando se modifica el engranaje responsable de generar el patrón motor, también se ajusta de manera concordante la conectividad de NS dentro del circuito, y la forma en que regula la actividad motora.

Agradezco a la Licenciada Julieta Laurino por todas las discusiones sobre estadística que enriquecieron los análisis presentados en esta Tesis.

Capítulo 3.

Un análisis detallado del patrón motor de *crawling*

Como se mencionó previamente, la actividad de la motoneurona DE-3 ha sido históricamente utilizada como *proxy* de la actividad rítmica de *crawling* debido a la posibilidad de identificar sus potenciales de acción fácilmente en registros extracelulares (Puhl & Mesce, 2008). Sin embargo, centrar el análisis del comportamiento de *crawling* exclusivamente en una única motoneurona, cuya actividad está acotada a una fase específica del comportamiento, limita el estudio de este patrón motor. El objetivo de este capítulo de la Tesis fue realizar una descripción cuantitativa más detallada y completa de las distintas unidades motoras que se activan durante el *crawling* inducido por dopamina. Para ello, realizamos experimentos en los que, además de registrar extracelularmente la actividad de DE-3 en DP, registramos extracelularmente los nervios PP, AA o ambos, identificando las distintas unidades motoras activas durante el comportamiento ficticio y caracterizando su actividad a lo largo de los ciclos.

3.1. Registro e identificación de unidades motoras rítmicas

Para identificar potenciales de acción provenientes de neuronas únicas en los registros extracelulares de cada nervio, utilizamos un algoritmo de *spike sorting* establecido en el laboratorio por el Licenciado Agustín Sanchez Merlinsky (ver Materiales y Métodos, MM4, Figura MM3). Esto permitió cuantificar la actividad de las unidades activas en los distintos nervios registrados.

En total, a partir de los resultados de 46 experimentos de *crawling* en ganglio aislado, se identificaron 395 unidades cuyos patrones de disparo se expresaron como frecuencia de disparo *binneada* (FDb; ver Materiales y Métodos, MM5). El panel A de la Figura R11 muestra un ejemplo representativo de los registros extracelulares realizados y el B, los perfiles de actividad de las unidades motoras identificadas en ese experimento. El trazo superior, en azul, corresponde a la actividad de la motoneurona DE-3, utilizada en todos los registros como referencia para definir los ciclos del patrón motor. Los otros trazos muestran la actividad de unidades registradas en los nervios DP y PP, que exhiben tanto patrones rítmicos como no rítmicos, y cuya activación puede ocurrir en fase o en antifase con respecto a DE-3.

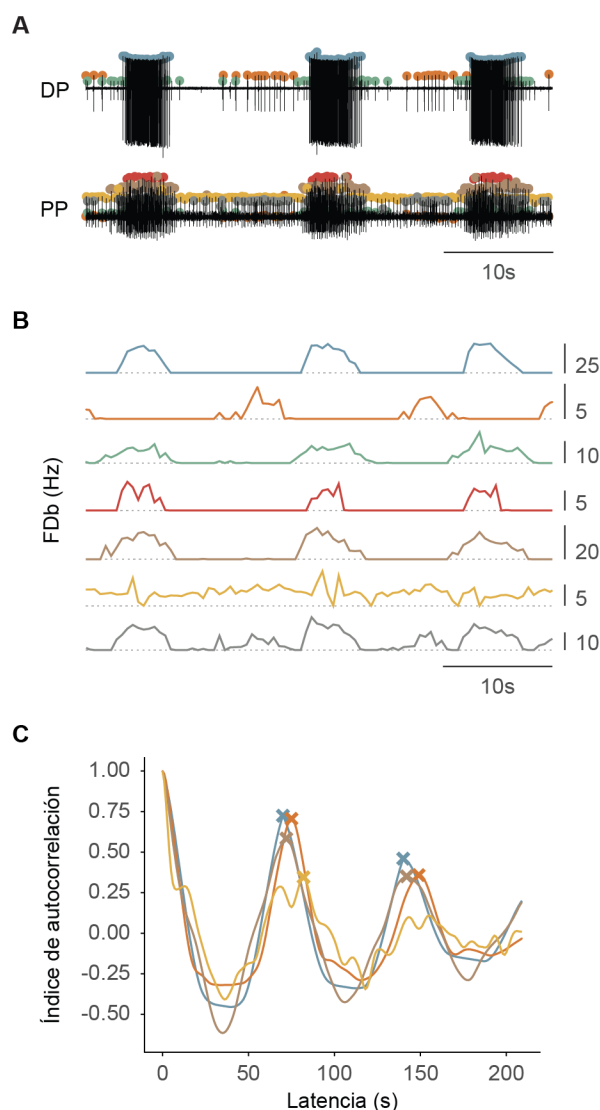


Figura R11. Identificación de unidades rítmicas a partir de registros de *crawling*. **A.** Ejemplo representativo del análisis de *spike sorting* realizado en registros extracelulares pareados de los nervios DP y PP durante un episodio de *crawling*. Cada punto de color señala una unidad distinta a lo largo del registro, identificada a partir de la forma de la onda. **B.** Frecuencia de disparo binneada (FDb) calculada para cada unidad identificada, respetando el código de color. Las líneas punteadas horizontales indican FDb = 0 Hz. A la derecha se muestran las escalas en Hz. El trazo superior, en azul, corresponde a la motoneurona DE-3. **C.** Resultado de los análisis de autocorrelación para cuatro unidades identificadas durante el *crawling*. Cada curva representa un ejemplo de una de las unidades mostradas en A. Las cruces marcan los picos cuyo valor de índice de autocorrelación supera 0,25. Las unidades cuyos trazos presentaron más de dos picos fueron clasificadas como rítmicas (azul, naranja, marrón) y las que no, como no rítmicas (amarillo).

Esperando que las motoneuronas que participan del *crawling* manifestaran una actividad consistente con el ritmo demarcado por DE-3, seleccionamos sólo aquellas

unidades que presentaban actividad rítmica. Para ello, realizamos análisis de autocorrelación sobre las curvas de FDb de cada unidad, considerando los primeros cuatro ciclos del comportamiento ficticio delimitados a partir de la actividad de DE-3. Basándonos en estos análisis, identificamos los picos en los autocorrelogramas y cuantificamos los coeficientes de autocorrelación. Clasificamos como rítmicas a aquellas unidades cuyos autocorrelogramas presentaban, además del pico en $t = 0$, al menos dos armónicos con un coeficiente de correlación superior a 0,25, como se ejemplifica en la Figura R11C. Este umbral fue elegido a partir de la evaluación de experimentos en los que se identificaron múltiples unidades motoras, validando cuál permitía discernir con mayor claridad entre unidades rítmicas y no rítmicas, según clasificaciones realizadas manualmente. Como resultado, de las 395 unidades identificadas, 206 fueron clasificadas como rítmicas y seleccionadas para los análisis posteriores.

Una vez identificadas, las unidades rítmicas fueron clasificadas en función de su perfil de actividad durante el ciclo de *crawling*, utilizando como referencia la actividad de la motoneurona DE-3, que delimita la etapa de contracción. Para esto, se implementaron dos estrategias: una clusterización algorítmica y una clusterización manual. Dado que el ritmo de *crawling* presenta ciclos de duración variable, los trazos correspondientes a cada unidad motora de cada registro fueron segmentados en ciclos definidos por el primer potencial de acción de cada ráfaga de la motoneurona DE-3 (inicio-a-inicio, ver Materiales y Métodos, MM5), y su duración fue reescalada a un rango entre 0 y 1.

3.2. Clusterización algorítmica

Para la clusterización algorítmica, se evaluó la correlación entre todas las unidades rítmicas identificadas. Se utilizaron los trazos reconstruidos a partir de las curvas de FDb correspondientes a cuatro ciclos reescalados, y se realizaron análisis de correlación de Pearson entre las 206 unidades rítmicas identificadas, generando una matriz de correlaciones sobre la cual se aplicó el algoritmo de clustering K-means (MacQueen, 1967). Este algoritmo de aprendizaje automático no supervisado permite

dividir los datos en un número específico de grupos (k) de manera tal que los objetos dentro de un mismo cluster sean lo más similares entre sí y, al mismo tiempo, lo más disímiles posible respecto a los objetos de otros clusters. La cantidad de grupos a obtener (k) se define manualmente, pero existen métodos para determinar el número óptimo de grupos evaluando el *Within-Cluster Sum of Squares* (WCSS), un valor que refleja cuán homogéneos son los datos dentro de cada cluster. Se evaluaron los WCSS para diferentes valores de k , y se observó que el valor óptimo de k se encontraba entre 3 y 4.

Utilizando $k = 3$, se identificaron dos clusters formados por unidades altamente correlacionadas dentro de cada grupo y anticorrelacionadas con las unidades del otro grupo, y un tercer cluster compuesto por unidades que no mostraron una correlación o anticorrelación marcada ni con los otros grupos, ni entre sí. Al aumentar el número de clusters ($k \geq 4$) con el objetivo de identificar nuevos grupos que reflejaran diferencias en el patrón de actividad de las unidades, se observó que los clusters robustos simplemente se dividían en subgrupos similares entre sí. La Figura R12A muestra la matriz de correlaciones de Pearson organizada según la clusterización realizada con $k = 4$, y la Figura R12B muestra la actividad promedio de cada unidad motora a lo largo de un ciclo, siguiendo el orden presentado en la matriz. La matriz revela que tanto el primer grupo (filas superiores) como el último (filas inferiores) agrupan motoneuronas con patrones de actividad similares, entre ellas las motoneuronas DE-3. El segundo grupo, conformado por valores de correlación de Pearson cercanos a 0, corresponde a unidades que no presentan correlación ni entre sí ni con los otros grupos. Finalmente, el tercer grupo está compuesto por unidades que disparan en antifase con respecto al primer y al último grupo, es decir, en antifase con respecto a DE-3.

El enfoque algorítmico sugiere la existencia de dos grupos principales: uno compuesto por DE-3 y otras unidades en fase, y otro formado por unidades en antifase. Para complementar este análisis, optamos por realizar una clasificación manual de los distintos tipos de unidades motoras registradas.

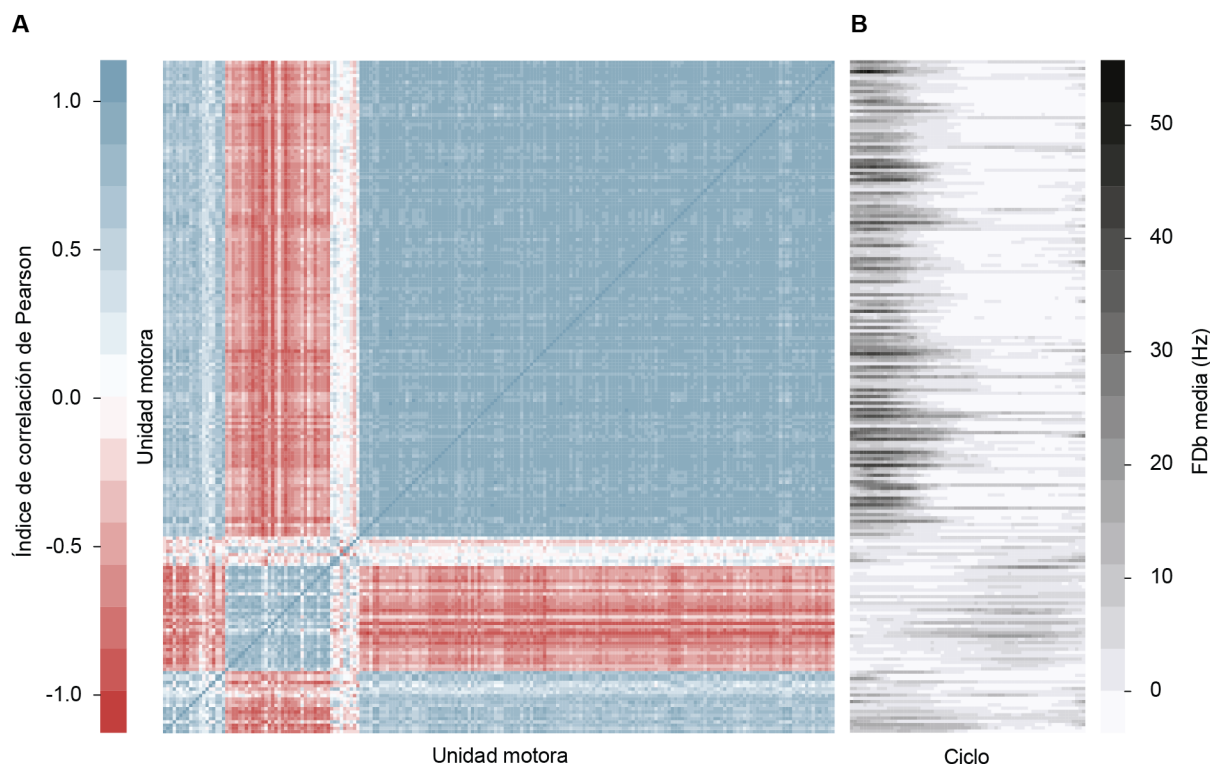


Figura R12. Clusterización algorítmica de las unidades motoras durante *crawling*. **A.** Matriz de correlaciones de Pearson, ordenada según un algoritmo K-means con $k = 4$. **B.** *Raster plot* indicando la actividad promedio a lo largo de un ciclo, delimitado por el primer potencial de acción de una ráfaga de disparo de DE-3 hasta el primer potencial de acción correspondiente a la siguiente ráfaga. Los valores corresponden al promedio de 4 ciclos de *crawling* para cada unidad. Cada fila corresponde a la unidad considerada en la matriz de correlaciones. ($n = 206$ unidades rítmicas identificadas en los nervios DP, PP y AA de 46 ganglios de 24 sanguijuelas).

3.3. Clusterización manual

Para la clasificación manual del comportamiento de las unidades rítmicas, analizamos la actividad promedio a lo largo de un ciclo de *crawling* tal como se explicó anteriormente (Figura R12B). En cada experimento, comparamos la actividad de las unidades motoras rítmicas identificadas con la de la motoneurona DE-3 del mismo ganglio. En algunos experimentos fue posible clasificar todas las unidades, mientras que en otros observamos que algunas unidades rítmicas no manifestaban un perfil de actividad claro a lo largo del ciclo o entre ciclos, como se había observado en el caso de

las unidades del cluster de baja correlación identificado mediante la clusterización algorítmica (Figura R12).

Es importante destacar que, al analizar manualmente la actividad de las motoneuronas en fase con DE-3, observamos algunas diferencias en sus patrones que la clusterización algorítmica no logró capturar: algunas unidades motoras, a simple vista, comenzaban a disparar anticipando la actividad de DE-3.

Basándonos, entonces, en el perfil de actividad relativo a DE-3, identificamos tres grupos: En-Fase, Anti-Fase y En-Fase-Adelantadas (Figura R13A). Las unidades En-Fase disparan simultáneamente con DE-3; las unidades Anti-Fase disparan entre el final de la ráfaga de DE-3 y el fin del ciclo; y las unidades En-Fase-Adelantadas están activas en fase con DE-3, pero comienzan a disparar antes del fin del ciclo (Figura R13A-B). Siguiendo este procedimiento de clusterización manual, se clasificaron un total de 147 unidades motoras rítmicas. En el Capítulo 5 de este trabajo se presenta una comparación entre el comportamiento ficticio y el comportamiento in vivo realizada con el objetivo de validar esta clasificación.

Si bien las unidades rítmicas fueron clasificadas según su perfil de actividad, no es posible determinar con certeza su identidad celular. No obstante, dado que las motoneuronas proyectan a los músculos a través de nervios específicos (Ort et al., 1974), se puede inferir su identidad probable a partir de esta información y de su patrón de actividad. Por este motivo, y con el fin de estimar en qué nervios es más probable encontrar cada tipo de unidad motora, realizamos una clasificación basada en el nervio en el que fueron registradas. Los resultados de este análisis se presentan en el Material Suplementario, S4.

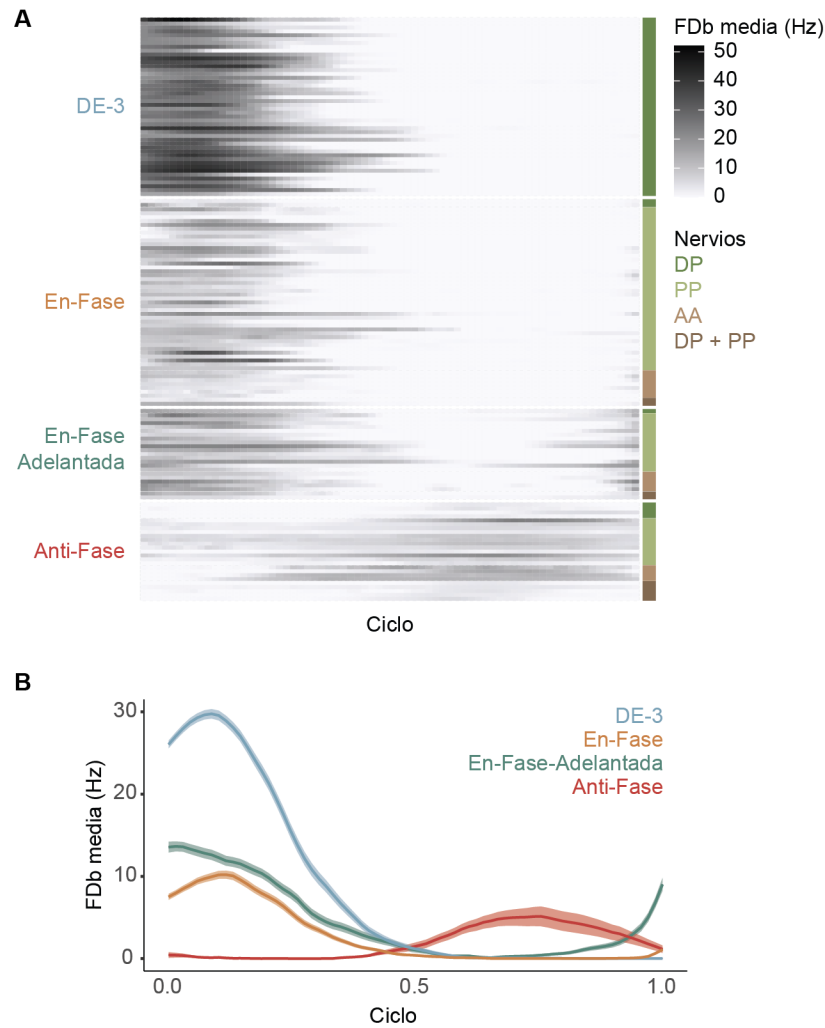


Figura R13. Perfil de actividad de las motoneuronas durante *crawling*. **A.** *Raster plot* indicando la FDb promedio de cada unidad a lo largo de un ciclo, delimitado por el primer potencial de acción de una ráfaga de disparo de DE-3 hasta el primer potencial de acción correspondiente a la siguiente ráfaga. Datos obtenidos de 147 unidades rítmicas identificadas en los nervios DP, PP y AA ($n = 46$ ganglios de 24 animales). Los valores corresponden al promedio de 4 ciclos de *crawling* para cada unidad. Las unidades fueron clasificadas en cuatro grupos indicados a la izquierda. El nervio en el que cada unidad fue registrada está indicado a la derecha. La escala de grises indica la FDb. **B.** FDb promedio para cada grupo de unidades. Las áreas sombreadas indican el EE.

3.4. Discusión

Estudios previos sobre el *crawling* de sanguijuela combinaron registros intracelulares de neuronas específicas con registros extracelulares de DE-3 en el nervio DP, con el objetivo de refinar la caracterización del patrón motor (Eisenhart et al., 2000; Puhl et

al., 2012; Puhl & Mesce, 2008). Sin embargo, estos trabajos presentaron un único registro intracelular junto con el registro extracelular del nervio DP, lo cual limita el análisis de coordinación entre múltiples unidades. Aunque es técnicamente posible realizar hasta tres o cuatro registros intracelulares simultáneos, mantenerlos estables durante periodos prolongados, y además registrar y manipular otra neurona del circuito, representa un desafío. Por ello la implementación de registros extracelulares múltiples, combinados con análisis de spike sorting (Figura R11), resulta una estrategia novedosa que posibilita una caracterización cuantitativa de la dinámica motora durante el *crawling*.

Los resultados presentados en este capítulo constituyen el primer análisis cuantitativo de la actividad de múltiples unidades motoras activas a lo largo de un ciclo. El análisis permitió identificar diferentes fases de activación, lo que sugiere distintos roles durante la ejecución del comportamiento (Figura R12 y Figura R13). Se espera que las unidades En-Fase controlen la fase de contracción mediante la excitación de los músculos longitudinales o la inhibición de los músculos circulares. Cabe señalar que la distinción entre DE-3 y motoneuronas En-Fase que excitan a los músculos longitudinales se debe únicamente a aspectos metodológicos, dado que pertenecen a un mismo grupo funcional. Por su parte, las unidades Anti-Fase estarían involucradas en la fase de elongación, excitando los músculos circulares o inhibiendo a los longitudinales. Finalmente, las unidades En-Fase-Adelantadas cumplirían un rol similar al de las unidades En-Fase. La Figura R14 muestra el circuito neuronal putativo que subyace al *crawling* (presentado en la Introducción, Figura I7), incorporando los grupos de unidades motoras descritos en este capítulo.

Validez de los registros extracelulares para el análisis de la actividad motora

Los potenciales registrados en nervios periféricos han sido validados como representativos de motoneuronas específicas (Ort et al., 1974) y numerosos trabajos han respaldado su uso para el estudio de patrones motores ficticios (Eisenhart et al., 2000; Shaw & Kristan, 1997; Wittenberg & Kristan, 1992). En este trabajo, para asegurar la especificidad del análisis, sólo se incluyeron en la descripción realizada

unidades cuya actividad estuviera acoplada al ritmo de DE-3, descartando toda señal no rítmica.

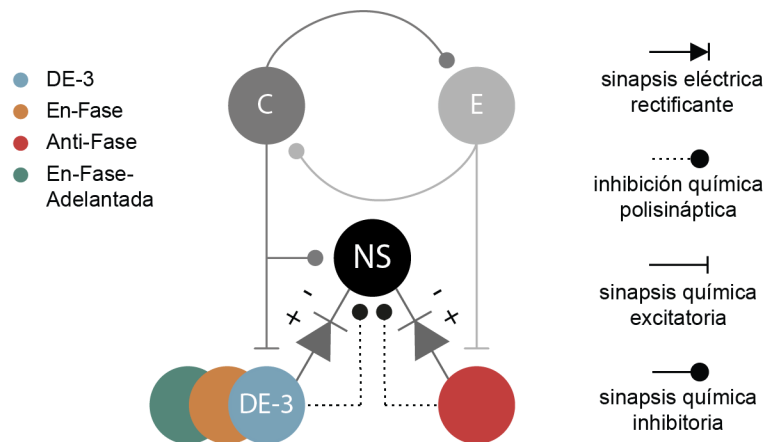


Figura R14. Circuito neuronal putativo subyacente al *crawling* y al circuito inhibitorio recurrente en un ganglio del cuerpo medio (versión actualizada). Tal como se explicó en las Figura I7 y Figura R7, las unidades C y E corresponden, respectivamente, a las unidades de contracción y elongación del oscilador. Considerando la caracterización de las distintas unidades motoras realiza en este capítulo, se espera que las unidades motoras En-Fase y En-Fase-Adelantadas se activen durante la fase de contracción junto con DE-3, mientras que las unidades motores Anti-Fase, entre las que se encuentra la motoneurona CV mencionada anteriormente, lo hagan durante la elongación. La neurona NS está conectada con las unidades motoras mediante sinapsis químicas y eléctricas (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009); los símbolos + y – indican la polaridad en la que las sinapsis rectificantes permiten el paso de corriente. Esta conexión entre NS y las unidades motoras se da siempre que estas sean excitatorias y no inhibitorias, independientemente de la fase en la que se activen.

Si bien los nervios periféricos contienen axones tanto de neuronas motoras como de neuronas sensoriales (Muller et al., 1981), dado que la preparación se encuentra privada de entradas sensoriales periféricas, no se espera detectar actividad de neuronas mecanosensoriales en estos registros extracelulares. Por lo tanto, estos experimentos se realizaron bajo la premisa de que la actividad inducida por dopamina registrada en los nervios corresponde exclusivamente a neuronas motoras excitatorias o inhibitorias involucradas en el patrón de *crawling*. Además, estudios previos han demostrado que las neuronas mecanosensoriales se mantienen silentes durante el *crawling* (Alonso et al., 2020). En particular, se ha observado que las células sensoriales T son inhibidas en fase con las ráfagas de DE-3 y los potenciales

inhibitorios de NS (Kearney et al., 2022), y que su activación puede alterar el patrón motor (Alonso et al., 2020), lo que destaca la importancia funcional de su silenciamiento durante este comportamiento.

Capítulo 4.

¿Cómo modula la neurona NS la actividad motora
durante los ciclos de crawling ficticio?

Teniendo en cuenta los resultados presentados en las secciones anteriores, que confirman que NS modula la excitación de la motoneurona DE-3, y habiendo realizado una descripción detallada del *crawling*, nos propusimos evaluar la influencia de la neurona premotora NS sobre otras unidades motoras, activas en distintas fases del *crawling* (Figura R13). Las principales preguntas que nos planteamos fueron: ¿Afecta la despolarización de NS la actividad de otras unidades en fase con DE-3? ¿Cómo se ven afectadas las unidades Anti-Fase por esta maniobra experimental?

Considerando que las hiperpolarizaciones de NS ocurren durante la etapa de contracción, mientras que en la elongación NS permanece despolarizada (Figura R5A), nuestra hipótesis postulaba que, si NS inhibe la actividad de las motoneuronas a través de las sinapsis eléctricas rectificantes, entonces dicha inhibición estaría restringida a las motoneuronas que disparan en la contracción (DE-3, En-Fase y En-Fase-Adelantadas), pero no a aquellas que disparan durante la elongación (Anti-Fase).

4.1. Efecto de la neurona premotora NS sobre la actividad de distintos tipos de unidades motoras durante *crawling*

Para responder las preguntas planteadas, utilizamos los registros presentados en el capítulo anterior, en los que registramos intracelularmente a NS y extracelularmente a DP junto a otros nervios (PP, AA o ambos) en ganglios aislados perfundidos con dopamina (Figura R15). El diseño experimental fue el mismo que el detallado en el Capítulo 2 (Figura R8B): experimentos control y experimentos depo, en los que NS no fue afectada o fue funcionalmente removida mediante la inyección de corriente despolarizante durante la actividad rítmica, respectivamente. De todos los experimentos obtuvimos la FDb de las distintas unidades motoras a lo largo de cada uno de los ciclos que conformaban las distintas etapas: pre, test y post. Finalmente, considerando la clasificación de las unidades motoras, analizamos cómo se veía afectado cada tipo de unidad al remover a NS del circuito. Los resultados fueron analizados utilizando las herramientas estadísticas explicadas anteriormente (Figura R9).

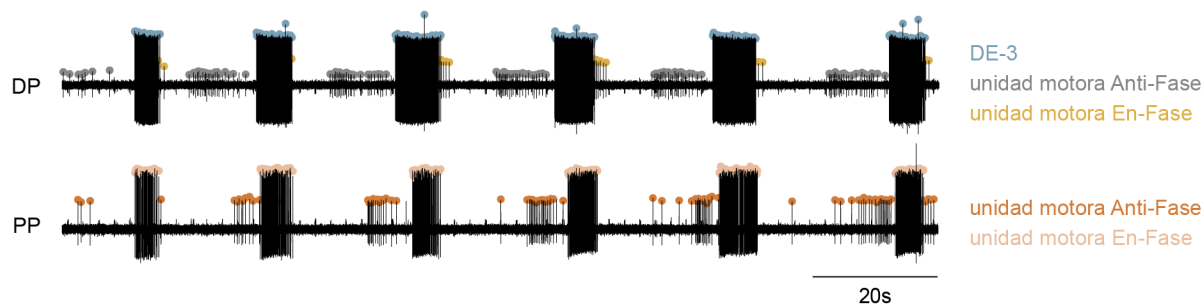


Figura R15. Identificación de los potenciales de acción de distintos tipos de unidades motoras clasificadas según su actividad durante *crawling*. Ejemplo de registros extracelulares pareados de los nervios DP y PP durante un episodio de *crawling*, sobre los que se realizó el análisis de *spike sorting*. Cada punto de color señala una unidad distinta a lo largo del registro, identificada a partir de la forma de la onda. Las espigas azules de mayor tamaño en el nervio DP corresponden a DE-3. A la derecha se indica la clasificación que recibió cada unidad motora en función de su actividad (Figura R13).

A partir de las curvas FDb de cada unidad motora a lo largo de cada ciclo, se obtuvieron dos variables de la actividad de las motoneuronas. Por un lado, como medida de la excitación de las motoneuronas, calculamos la frecuencia de disparo máxima alcanzada durante el ciclo (FDb máx). Por otro lado, como medida del *duty cycle*, calculamos el ancho medio relativo a la mitad de la frecuencia máxima de la curva FDb (AM relativo). Los datos correspondientes a DE-3 fueron reanalizados de esta manera para permitir su comparación con los otros grupos de unidades motoras identificadas.

Como muestra la Figura R16, la despolarización de NS generó un aumento en la FDb máx de DE-3 de aproximadamente un 60% (similar a la obtenida en la medición de FDM, Figura R10), mientras que esta variable se mantuvo estable en los experimentos control. No se observaron efectos de la despolarización de NS sobre el AM relativo (Figura R16C), de manera consistente con los resultados observados para el análisis del *duty cycle* en los experimentos previos (Figura R10).

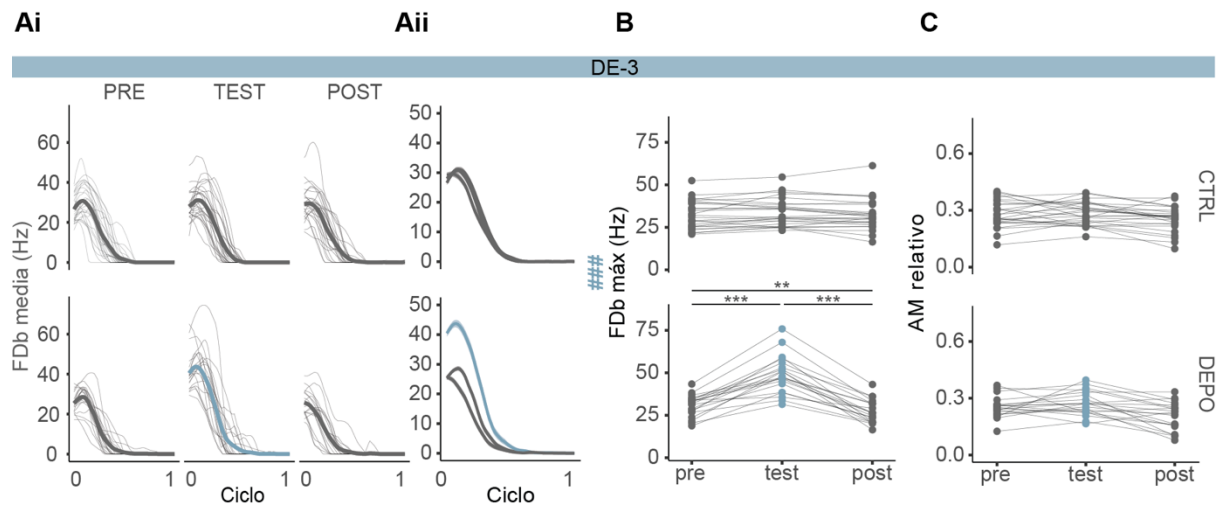


Figura R16. Efecto de NS sobre los ciclos de actividad de DE-3. A.i. FDb para los ciclos correspondientes a las etapas pre, test y post. Los gráficos de la fila superior corresponden a los experimentos control, en los que no se inyectó corriente en NS, y en la fila inferior se muestran los experimentos depo, en los que durante el test se inyectaron pulsos de corriente de entre 5 y 7 nA en la neurona NS. Las líneas finas corresponden a la FDb media (incluyendo entre 4 y 6 ciclos) de cada experimento, las líneas gruesas muestran la media de todos los experimentos. A.ii. Superposición de la FDb media de todos los experimentos para cada una de las tres etapas. Las áreas sombreadas indican el EE. B y C. Máxima FDb (FDb máx) y ancho medio relativo (AM relativo) medido para cada motoneurona. Las líneas conectan los valores medios para cada etapa dentro del mismo experimento. Se realizaron modelos de efectos mixtos con dos factores fijos; a la izquierda de los paneles B y C, # indica una interacción significativa entre los factores tratamiento y etapa; * indica diferencias significativas para los análisis de contrastes simples pareados entre etapas, dentro de cada tratamiento. *, ** y *** o # indican $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. La Tabla 3 del Apéndice detalla los modelos estadísticos utilizados. $n = 26$ ganglios control y 20 ganglios depo.

Al igual que lo observado para DE-3, las unidades En-Fase mostraron un aumento de la FDb máx de aproximadamente un 50% con la despolarización de NS (Figura R17B). Sin embargo, a diferencia de DE-3, estas unidades mostraron una disminución significativa de la FDb máx a lo largo del experimento en condiciones control. Dada esta deriva temporal observada, es probable que el aumento medido durante la despolarización de la NS esté subestimado.

La despolarización de NS no afectó la FDb máx de las unidades En-Fase-Adelantadas (Figura R17B).

Las unidades motoras Anti-Fase también mostraron una disminución de la FDb máx a lo largo del tiempo en condiciones control y en este caso el efecto de la despolarización de NS se limitó a contrarrestar esta disminución (Figura R17B). Mientras que en condiciones control la FDb máx de las unidades motoras Anti-Fase mostró una caída de aproximadamente 15% entre las etapas pre y test, no se observaron diferencias entre las etapas pre y test correspondientes a los experimentos depo.

En cuanto al AM relativo, la despolarización de NS sólo tuvo efecto sobre las unidades En-Fase. Los resultados muestran que el valor del AM relativo de estas unidades tendió a disminuir a lo largo de las etapas en la condición control, y que en la condición depo la liberación de la despolarización de NS acentuó esta tendencia (Figura R17C). En los experimentos control, el AM relativo disminuyó aproximadamente un 15% entre las etapas test y post, mientras que en los experimentos depo esta disminución fue de aproximadamente un 40%. Esto sugiere que la despolarización de NS redujo la deriva temporal de la duración de las ráfagas de estas unidades.

Los análisis estadísticos realizados para estos resultados y los ratios entre etapas estimados se detallan en la Tabla 3 del Apéndice.

Cabe destacar que, una vez clasificadas las distintas unidades motoras, se evaluó nuevamente, como en la Figura R5 (Capítulo 1), si el inicio de sus ráfagas de disparo anticipaba la hiperpolarización de NS. Al igual que en el caso de DE-3, se observó que la hiperpolarización de NS comienza antes, y por lo tanto esta respuesta no puede explicarse únicamente por el circuito de inhibición recurrente entre ella y las motoneuronas. Ejemplos representativos de este análisis se presentan en el Material Suplementario, S4.

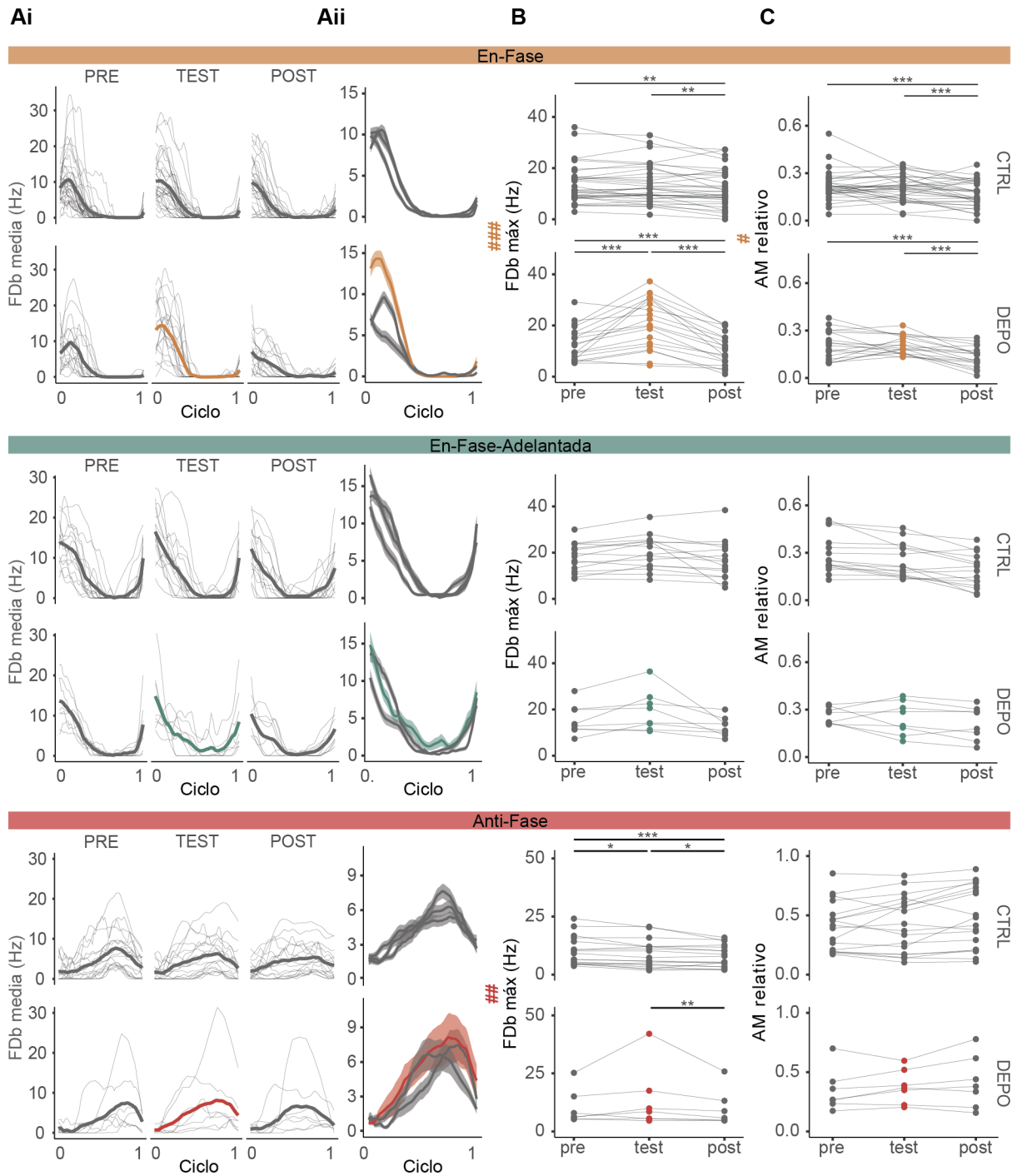


Figura R17. Efecto de NS sobre las diferentes fases del *crawling*. A.i. FDb para los ciclos correspondientes a las etapas pre, test y post para cada una de las unidades correspondientes a los grupos de unidades descritos en la Figura R13. Para cada tipo de unidad los gráficos de la fila superior corresponden a los experimentos control, en los que no se inyectó corriente en NS, y en la fila inferior se muestran los experimentos depo, en los que durante el test se inyectaron pulsos de corriente de entre 5 y 7 nA en la neurona NS. Las líneas finas corresponden a la FDb media (incluyendo entre 4 y 6 ciclos) de cada experimento, las líneas gruesas muestran la media de todos

los experimentos. **A.ii.** Superposición de la FDb media dada por todos los experimentos para las tres etapas. Las áreas sombreadas indican el EE. **B y C.** Máxima FDb (FDb máx) y ancho medio relativo (AM relativo) medido para cada unidad motora. A-C están graficados para cada uno de los grupos de unidades. Las líneas conectan los valores medios para cada etapa dentro del mismo experimento. Se realizaron modelos de efectos mixtos con dos factores fijos, a la izquierda de los paneles B y C, # indica una interacción significativa entre los factores tratamiento y etapa; * indica diferencias significativas para los análisis de contrastes simples pareados entre etapas, dentro de cada tratamiento. *, ** y *** o # indican $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. La Tabla 3 detalla los modelos estadísticos utilizados. Para En-Fase, $n = 38$ unidades control y 21 unidades depo, de 30 ganglios; para Anti-Fase, $n = 18$ unidades control y 7 unidades depo, de 22 ganglios; y para En-Fase-Adelantada, $n = 15$ unidades control y 8 unidades depo, de 23 ganglios.

En resumen, la hiperpolarización de NS durante la etapa de contracción sería capaz de limitar selectivamente la actividad de algunas de las unidades motoras que se encuentran activas en esta fase. Este efecto selectivo resalta el papel de NS como moduladora de una fase específica del patrón motor sin modificar la coordinación general de las etapas de elongación y contracción. Cabe destacar que el hecho de que la frecuencia de disparo de las unidades motoras Anti-Fase no se haya visto afectada por la despolarización de la neurona NS indica que esta manipulación experimental no causó un efecto generalizado sobre la actividad motora, sino que eliminó temporalmente el efecto de la hiperpolarización rítmica de la NS, tal como se había planteado.

Por otro lado, el hecho de que la actividad de las unidades En-Fase-Adelantadas tampoco se haya visto afectada por la despolarización de NS confirma que estas unidades constituyen efectivamente un grupo distinto al de las unidades En-Fase. Además, esto sugiere que estas unidades podrían ser motoneuronas inhibitorias que no están conectadas a la NS a través del circuito de inhibición recurrente (Rela & Szczupak, 2003; Wadepuhl, 1989).

En conjunto, estos resultados sugieren un efecto inhibitorio fase-específico de NS sobre el patrón motor (Figura R16 y Figura R17). Si bien NS está conectada con todas las motoneuronas excitatorias a través del mismo circuito de inhibición recurrente, el efecto modulador sólo se manifiesta durante la fase de contracción, cuando NS recibe

inputs hiperpolarizantes y, por lo tanto, las sinapsis eléctricas rectificantes NS-motoneuronas permiten el paso de corriente. El carácter fase-específico de esta modulación aporta más evidencia a favor de la hipótesis de que este efecto estaría mediado por la vía eléctrica rectificante entre NS y las motoneuronas.

Por otro lado, el efecto de la remoción de NS sobre la deriva que experimenta el FDb de las motoneuronas en Anti-Fase, así como sobre el AM de las unidades motoras En-Fase, sugiere que la remoción de NS del circuito podría estabilizar la actividad de las motoneuronas durante el patrón rítmico. Este efecto estabilizador indica que NS podría influir en la actividad motora no sólo a través de las sinapsis eléctricas rectificantes que la conectan con las motoneuronas, sino también mediante una posible conexión con el oscilador responsable del patrón motor. Para confirmar que el efecto modulador fase-específico sobre la excitación de las unidades motoras observado se debe específicamente a la presencia de las sinapsis eléctricas rectificantes entre NS y las motoneuronas, evaluamos el impacto de la despolarización de NS comparando motoneuronas excitatorias (conectadas con NS) y motoneuronas inhibitorias (no conectadas con NS).

4.2. Comparación del efecto de NS sobre unidades motoras excitatorias e inhibitorias

En las sanguijuelas, las motoneuronas inhibitorias juegan un papel esencial en comportamientos motores rítmicos como el *crawling* o la natación, dado que inhiben tanto la actividad de músculos específicos como la de otras neuronas contribuyendo a la alternancia de fases y a la coordinación intersegmental en estos patrones motores rítmicos (Granzow & Kristan, 1986). En los experimentos realizados, las unidades motoras se clasificaron únicamente según su perfil de actividad con respecto a la actividad de DE-3 durante *crawling*, considerando la fase del ciclo en la que se encuentran activas, sin discernir si se trataba de motoneuronas excitatorias o inhibitorias. Sin embargo, esta distinción resulta relevante porque, como se mencionó anteriormente, las motoneuronas conectadas con NS mediante sinapsis eléctricas rectificantes son exclusivamente excitatorias (Rela & Szczupak, 2003; Wadepuhl,

1989). Por lo tanto, es plausible suponer que el efecto de la despolarización de NS a través de las sinapsis eléctricas rectificantes se limita a las motoneuronas excitatorias. En consecuencia, planteamos la hipótesis de que la despolarización de NS debería afectar únicamente a este tipo de motoneuronas. Por el contrario, un efecto sobre las motoneuronas inhibitorias indicaría que NS influye sobre ellas de forma indirecta, posiblemente a través de una conexión con el oscilador responsable del patrón motor.

Para poner a prueba esta hipótesis, utilizamos parte de los resultados de los experimentos detallados previamente, centrándonos únicamente en el análisis de la actividad de las unidades motoras En-Fase y diferenciando entre unidades motoras excitatorias e inhibitorias. En este análisis no se incluyeron experimentos control, ya que, habiendo comprobado previamente el efecto de la despolarización de NS sobre las unidades motoras En-Fase, únicamente consideramos los resultados provenientes de experimentos en los que se removió a NS del circuito (Figura R17A).

Para clasificar las unidades motoras como excitatorias o inhibitorias, se aplicó un pulso de corriente hiperpolarizante de -5 nA sobre NS al final del protocolo experimental, cuando el patrón rítmico había comenzado a desarmarse. Aplicar corriente hiperpolarizante sobre NS induce la hiperpolarización de las motoneuronas excitatorias, mientras que la actividad de las motoneuronas inhibitorias no se ve afectada (Rela & Szczupak, 2003, 2007).

La Figura R18 muestra un experimento representativo que corresponde al mismo registro presentado en la Figura R15 en el que, al inhibir a la neurona NS, es posible observar el efecto de esta intervención sobre la actividad de las unidades motoras durante el *crawling*: algunas unidades motoras, como DE-3, dejan de disparar, mientras que otra unidad motora dispara durante toda la hiperpolarización de NS. En experimentos en los que se hiperpolarizó a NS tal como se muestra en este ejemplo, aquellas unidades motoras que dejaron de disparar fueron clasificadas como excitatorias, y las que continuaron disparando durante la hiperpolarización fueron clasificadas como inhibitorias. Es importante destacar que, en todos los casos, tal como se mencionó, la corriente hiperpolarizante se aplicó al final del experimento, cuando

la mayoría de las unidades motoras no presentan una actividad rítmica robusta. No obstante, aún es posible discernirlas y referirlas a la etapa en que el patrón se mostraba consolidado.

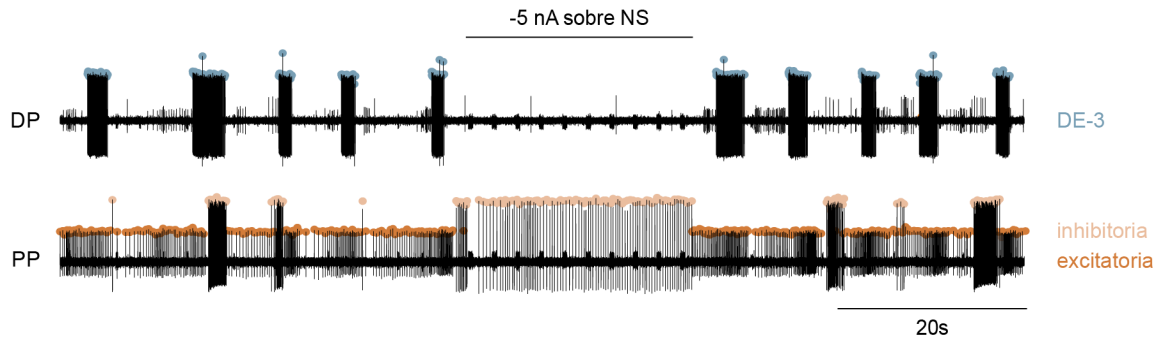


Figura R18. Identificación de unidades motoras excitatorias e inhibitorias en función de su respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante sobre NS durante *crawling*. Ejemplo representativo de un registro de *crawling* en ganglio aislado en el que se aplicó un pulso de corriente hiperpolarizante a la neurona NS. Se muestran los registros de los nervios DP y PP en los que se identificaron, mediante *spike sorting*, la motoneurona DE-3 y dos tipos de unidades motoras. La unidad motora putativamente excitatoria se silencia al hiperpolarizar a NS, efecto que también se observa en la actividad de DE-3, mientras que la unidad motora putativamente inhibitoria no es silenciada. Es importante señalar que la hiperpolarización se aplicó hacia el final del registro, cuando la actividad rítmica comenzaba a desorganizarse. Aunque en este ejemplo se presentan tanto una unidad En-Fase como una unidad Anti-Fase, los análisis realizados consideraron exclusivamente la actividad de unidades motoras En-Fase.

Una vez realizada la clasificación de tipo putativo de unidad motora, analizamos los datos correspondientes a las etapas pre, test y post, comparando las respuestas de los grupos de unidades excitatorias e inhibitorias a la despolarización de NS. El análisis estadístico realizado para evaluar estos resultados fue similar al explicado anteriormente, pero en este caso los factores fijos considerados fueron etapa (pre, test, post) y tipo de unidad motora putativo (excitatoria, inhibitoria) tal como se indica en la Figura R19A.

Se encontró una interacción significativa entre los factores etapa y tipo de unidad motora para la variable FDb máx. Los contrastes simples pareados al interior de cada tipo de unidad motora mostraron que la despolarización de NS generó un incremento de la FDb máx en ambos casos. Sin embargo, este aumento fue de aproximadamente

un 24% en las unidades inhibitorias, mientras que en las unidades excitatorias alcanzó alrededor del 87% (Figura R19B), lo que indica que la despolarización de NS no afecta por igual la excitación de ambos tipos de unidades.

La Tabla 4 del Apéndice indica los análisis estadísticos realizados y los resultados obtenidos.

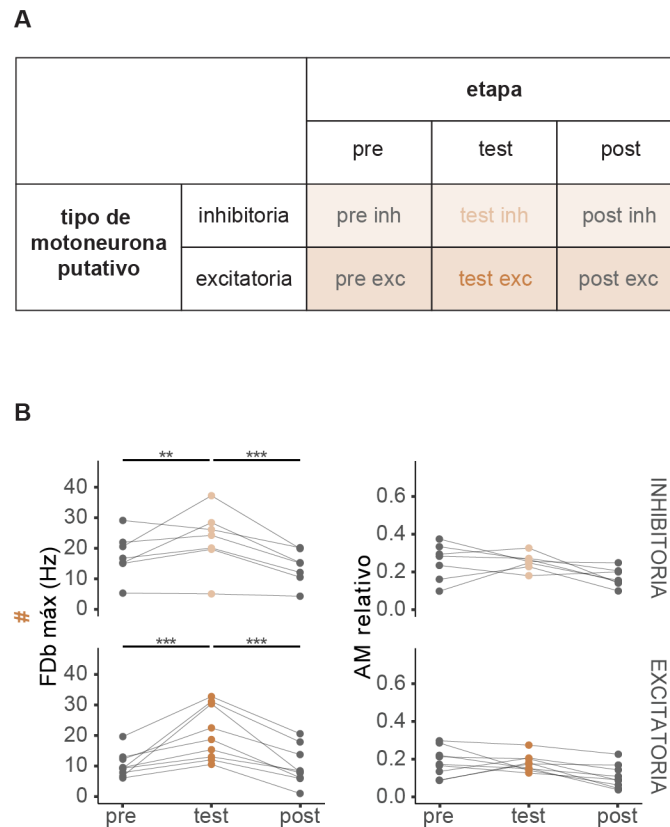


Figura R19. Comparación del efecto de NS sobre unidades motoras En-Fase excitatorias e inhibitorias durante *crawling*. **A.** Diseño del análisis estadístico de los registros electrofisiológicos de *crawling* en ganglio aislado para evaluar el efecto de la despolarización de NS sobre unidades motoras En-Fase excitatorias e inhibitorias. **B.** Máxima FDb (FDb máx) y ancho medio relativo (AM relativo) medido para cada tipo de unidad motora. Las líneas conectan los valores medios para cada etapa dentro del mismo experimento. Se realizaron modelos de efectos mixtos con dos factores fijos, a la izquierda de los paneles, # indica una interacción significativa entre los factores tipo de unidad motora y etapa; * indica diferencias significativas para los análisis de contrastes simples pareados entre etapas, dentro de cada tipo de unidad motora. *, ** y *** (o #) indican $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. La Tabla 4 del Apéndice detalla los modelos estadísticos utilizados. ($n = 7$ unidades inhibitorias y 9 unidades excitatorias, provenientes de 9 ganglios).

Considerando que la despolarización de NS tuvo un efecto más de un 60% mayor sobre las unidades excitatorias que sobre las inhibitorias, los resultados sugieren que su acción moduladora durante la contracción se debe, al menos en gran medida, a las sinapsis eléctricas rectificantes con las motoneuronas. Por otro lado, el hecho de que la remoción de NS del circuito afectara la actividad de las unidades motoras inhibitorias también sugiere la existencia de una conexión indirecta entre NS y este tipo de motoneuronas, posiblemente mediada por el oscilador. A partir de este resultado, y de los resultados descritos en el primer capítulo que indican que NS recibe señales del oscilador durante *crawling* (Figura R5 y Figura R6), nos propusimos evaluar si también existen *outputs* desde NS hacia el oscilador. Para ello, analizamos si la manipulación del potencial de membrana de NS afecta exclusivamente a las unidades motoras o si también influye sobre otras neuronas con las que no se encuentra conectada directamente, lo que revelaría una conexión entre NS y el oscilador.

4.3. ¿Las neuronas premotoras NS están conectadas con el oscilador responsable del crawling?

Como se explicó anteriormente, hiperpolarizar a NS durante el *crawling* induce el silenciamiento de las motoneuronas excitatorias a través de las sinapsis eléctricas rectificantes. Para evaluar si este efecto se debía exclusivamente a la conexión eléctrica rectificante de NS con las motoneuronas, o si esta neurona premotora está conectada con el oscilador, se realizaron registros de neuronas sensoriales cuyo potencial de membrana oscila durante el *crawling*: las neuronas mecanosensoriales T, que no están conectadas directamente con las neuronas NS.

Los circuitos neuronales que controlan los comportamientos motores orquestan múltiples tareas, incluida la actividad de señales propioceptivas. En el laboratorio se demostró que las células T, sensibles a los cambios topológicos de la piel causados por la contracción muscular durante la fase de contracción del *crawling*, reciben inhibiciones rítmicas sincronizadas con la actividad de las motoneuronas excitadas en esa fase (Alonso et al., 2020). Esto indica que el oscilador del *crawling* envía señales

inhibitorias reaferentes a las células T, contrarrestando la excitación que produciría la contracción al activar los mecanorreceptores que se encuentran en la piel del animal y que tienen la capacidad de alterar el patrón motor.

Estas descargas corolarias rítmicas en las células T pueden utilizarse como un marcador indirecto de la actividad del oscilador. Dado que las T no están conectadas en forma directa con las neuronas premotoras NS, cualquier efecto de NS sobre la actividad de T durante el *crawling* debería estar mediado por una conexión entre NS y el oscilador. En otras palabras, si NS estuviera conectada con el oscilador que controla el patrón motor de *crawling*, se esperaría que la hiperpolarización de NS aboliera no sólo las ráfagas de DE-3, sino también los IPSPs rítmicos en las células T.

Para evaluar el efecto de NS sobre la actividad de las células T, realizamos experimentos en los que hiperpolarizamos a NS mientras registrábamos extracelularmente el nervio DP e intracelularmente a las neuronas T. La Figura R20A muestra que, durante el patrón de *crawling*, las células T exhibieron IPSPs rítmicos en fase con las ráfagas de DE-3 y con las hiperpolarizaciones registradas en NS. En el ejemplo mostrado, es posible observar que al aplicar un pulso hiperpolarizante de -5 nA en NS, los IPSPs de la neurona T se suprimieron casi por completo, sin que se observara un cambio evidente en la línea de base del potencial de membrana de la célula sensorial. Específicamente, observamos que los pulsos hiperpolarizantes aplicados sobre NS inhibieron de manera reversible, en aproximadamente un 95%, la actividad del oscilador registrada a través de los IPSPs (Figura R20B), sugiriendo que NS está conectada con el oscilador que controla el patrón motor. El hecho que el potencial de membrana de la neurona T no se haya modificado durante la inyección de corriente en NS corrobora que estas neuronas no están conectadas directamente entre sí via sinapsis eléctricas.

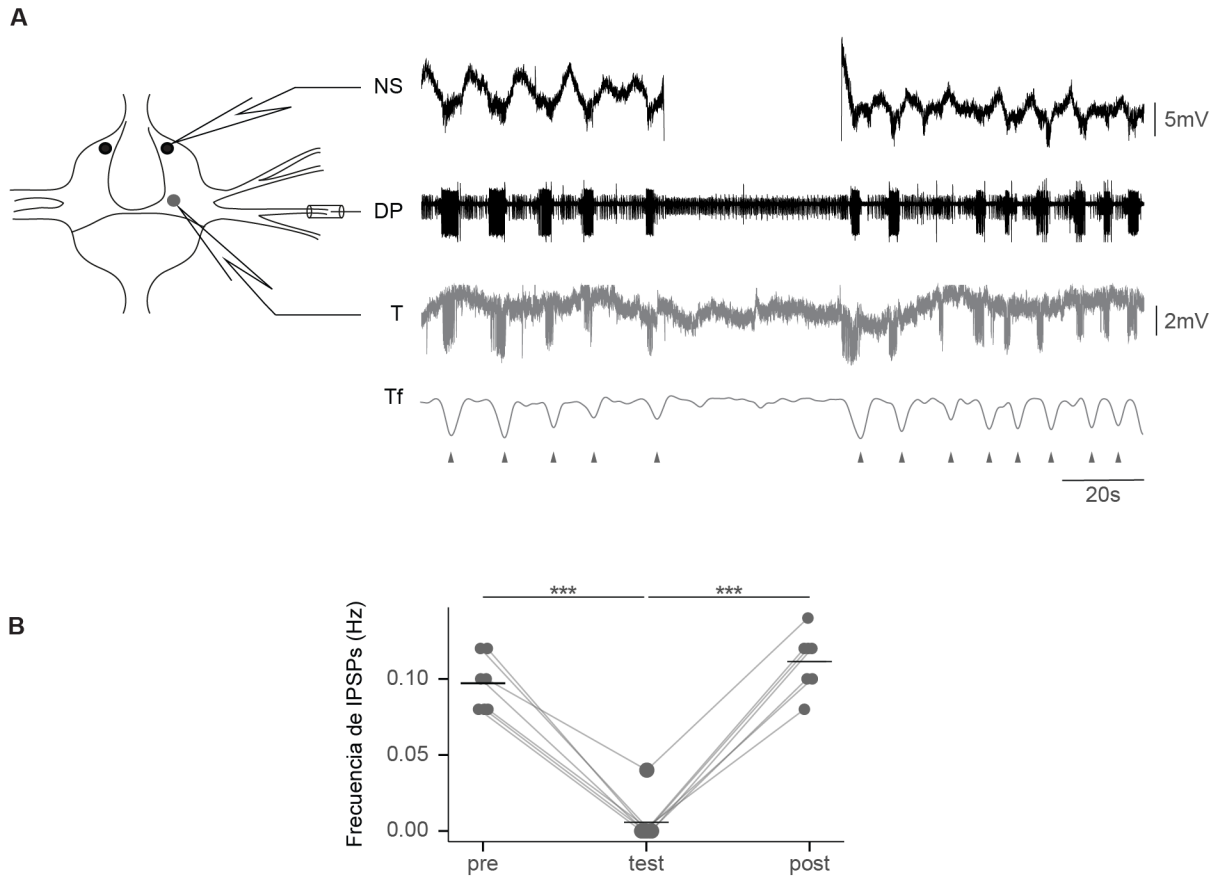


Figura R20. Efecto de NS sobre las inhibiciones rítmicas que reciben las neuronas T durante *crawling*. **A.** Registro extracelular del nervio DP y registros intracelulares de las neuronas NS y T en ganglio aislado. Un pulso cuadrado de corriente de -5 nA fue inyectado en NS durante la actividad rítmica. El trazo inferior (Tf) corresponde a la señal de T filtrada para la detección de los IPSPs, indicados con triángulos. **B.** Frecuencia de los IPSPs en la neurona T cuantificada antes, durante y después de la hiperpolarización de NS (pre, test y post, respectivamente; ver Materiales y Métodos). *** $p < 0,001$ (contrastes simples pareados luego de realizar un modelo lineal mixto considerando a los experimentos como efecto aleatorio, $\Delta_{\text{pre-test}} = 0,091 \pm 0,008$ Hz y $\Delta_{\text{test-post}} = -0,106 \pm 0,008$ Hz. $n = 7$ pulsos en 5 registros de 5 ganglios correspondientes a 4 sanguijuelas).

4.4. ¿Existe un efecto de la despolarización de NS sobre la correlación de la actividad de los distintos grupos de unidades motoras durante crawling?

En conjunto, los resultados demuestran que, durante *crawling*, NS modula la excitación de las unidades motoras de manera fase-específica, afectando sólo a aquellas que disparan durante la etapa de contracción, en concomitancia con la hiperpolarización de su potencial de membrana. Además, esta modulación de la excitación está mediada, al menos en parte, por las sinapsis eléctricas rectificantes entre NS y las motoneuronas. Estas conclusiones se desprenden de experimentos en los que estudiamos cada grupo de unidades motoras por separado. Nos preguntamos entonces si la remoción de NS del circuito afecta la coordinación de la actividad de los distintos grupos de motoneuronas. Para ello, evaluamos si existían diferencias en las correlaciones de actividad entre los distintos grupos de unidades motoras antes y durante la despolarización de NS.

Para este análisis utilizamos datos de las etapas pre y test de los experimentos control y depo, y calculamos la correlación de Pearson entre todas las unidades identificadas (Figura R13). Las correlaciones se obtuvieron a partir de las FDb de cuatro ciclos cuya temporalidad fue normalizada (ver Materiales y Métodos, MM5), y se construyeron matrices organizadas por tipo de unidad motora (Figura R21A-B). Estas matrices muestran los índices de correlación de Pearson para cada grupo de unidades en las etapas pre y test de los experimentos control y depo. Llamó nuestra atención el hecho de que, a simple vista, las matrices pre y test correspondientes a los experimentos depo parecieran mostrar una mayor diferencia entre sí, lo que sugiere que la correlación entre algunos grupos de unidades motoras, tanto dentro del mismo grupo como entre distintos grupos, podría modificarse al remover a NS del circuito.

Para evaluar si efectivamente la correlación entre las señales de los distintos grupos de unidades motoras variaba más entre las etapas de los experimentos depo, calculamos la distancia euclídea entre las matrices como medida de disimilitud (ver Materiales y Métodos, MM8). Valores menores de distancia euclídea indican alta similitud entre las matrices, mientras que valores mayores sugieren mayor

disimilitud, reflejando cambios en los valores de correlación entre etapas, con límites posibles entre 0 y 2.

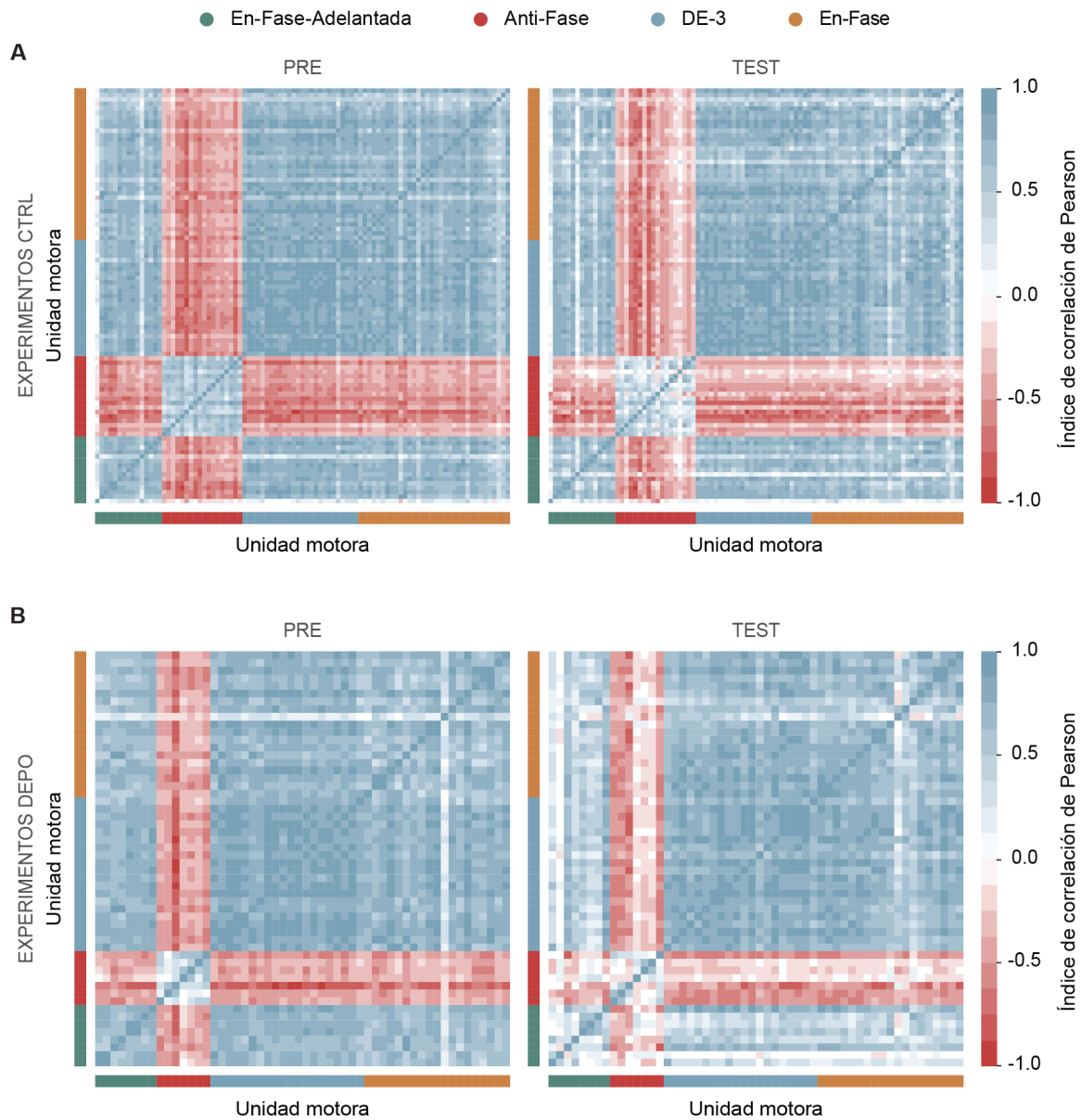


Figura R21. Análisis del efecto de la despolarización de NS sobre la coordinación de fases. **A.** Matrices de correlación de Pearson de la FDb de todas las unidades motoras, para las etapas pre y depo en experimentos control sin inyección de corriente despolarizante sobre NS. Las matrices están organizadas considerando los distintos grupos de unidades motoras. La escala a la derecha indica los valores de correlación de Pearson ($n = 93$ unidades motoras de 26 experimentos). **B.** Igual que en A, pero para experimentos depo, en los que se inyectó corriente despolarizante en NS durante la etapa depo ($n = 54$ unidades motoras de 20 experimentos). (Para A y B: DE-3, $n = 26$ ganglios control y 20 ganglios depo; En-Fase, $n = 38$ unidades control y 21 unidades depo, de 30

ganglios; Anti-Fase, $n = 18$ unidades control y 7 unidades depo, de 22 ganglios; En-Fase-Adelantada, $n = 15$ unidades control y 8 unidades depo, de 23 ganglios. Los detalles de las unidades motoras utilizadas en cada caso se indican en la Table 3 del Apéndice.

Al comparar las matrices de correlaciones de Pearson entre etapas (pre y test) dentro de cada tipo de experimento (control y depo), observamos que, mientras que en el grupo control la distancia euclídea entre las etapas fue de 0,17, en el grupo depo fue de 0,24. Esto sugiere una mayor disimilitud entre las etapas pre y test en los experimentos con despolarización de NS, en comparación con el grupo control, tal como habíamos observado a simple vista. Para evaluar en qué medida cada grupo de unidades motoras contribuía a este efecto, comparamos los valores de correlación correspondientes a cada tipo de unidad motora dentro de las matrices.

Para analizar qué grupos de unidades motoras son más afectados por la despolarización de NS, evaluamos todas las comparaciones posibles entre grupos (Figura R22A-B). Para esto, calculamos las distancias euclídeas dentro de cada grupo experimental: comparar las matrices control nos permitió evaluar si hubo un efecto de la deriva temporal, y comparar las matrices depo, el impacto de la despolarización de NS. Luego, la comparación entre las distancias euclídeas indica qué grupos de unidades motoras presentan diferencias entre los experimentos control y depo (Figura R22C).

Las distancias euclídeas obtenidas para el grupo control presentaron valores similares en todos los casos, con excepción de los correspondientes a las comparaciones de las motoneuronas DE-3 y las unidades motoras Anti-Fase, que presentaron un valor menor y mayor, respectivamente. Estos resultados sugieren que la deriva temporal impacta sobre la correlación de las unidades Anti-Fase contra sí mismas, mientras que las motoneuronas DE-3 presentan un valor de distancia euclídea bajo, lo que indica una actividad robusta y estable durante el registro (Figura R22A). Cabe destacar que el grupo de DE-3 es el único conformado por una motoneurona cuya identidad se conoce, mientras que los otros están conformados por distintas unidades motoras.

Dentro de los resultados de los experimentos con despolarización de NS, las mayores distancias euclídeas corresponden a comparaciones que incluyen al grupo En-Fase-Adelantada (Figura R22B) y al grupo Anti-Fase contra sí mismas.

Al comparar los valores entre grupos experimentales (control y depo) para evaluar el efecto neto de la despolarización de NS sobre la correlación entre unidades (Figura R22C), se observa que las unidades En-Fase, DE-3 y Anti-Fase presentan distancias euclídeas cercanas a cero, lo que sugiere que no presentan diferencias en la correlación contra sí mismas entre condiciones control y depo, lo que indica que la despolarización de NS no afectó la correlación interna dentro de estos grupos. En contraste, la correlación de las unidades motoras En-Fase-Adelantada contra sí mismas disminuyó durante la remoción de NS del circuito, y este efecto se extendió a sus correlaciones con los otros tres grupos.

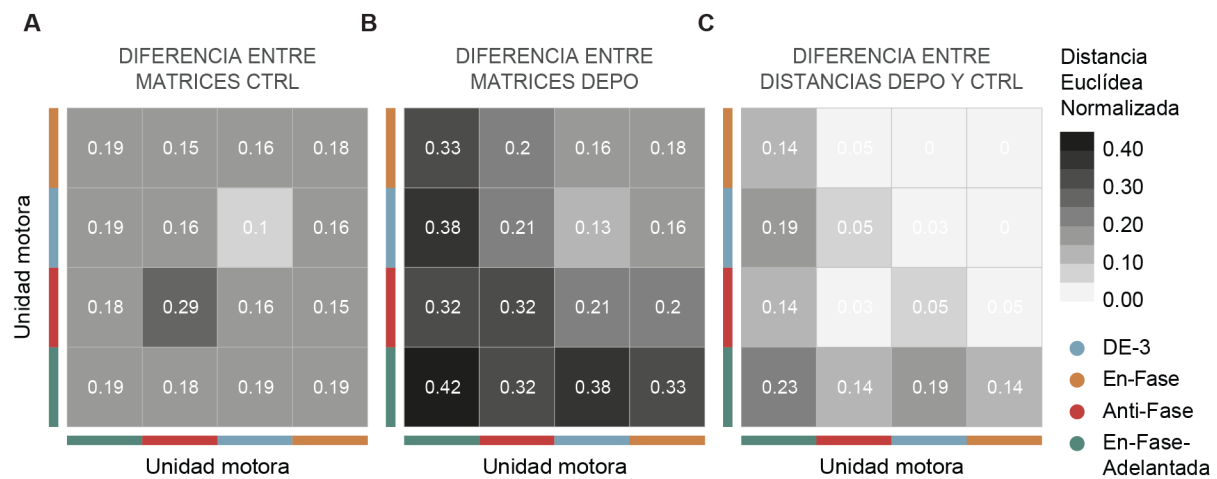


Figura R22. Análisis del efecto de la despolarización de NS sobre la coordinación de la actividad de los distintos grupos de unidades motoras. **A.** Distancias euclídeas calculadas a partir de las matrices de correlación de Pearson de las FDb de todas las unidades motoras, comparando las matrices depo y pre de experimentos control (Figura R21A). La escala de la derecha indica los valores de la Distancia Euclídea Normalizada obtenidos para cada comparación entre grupos. Los ejes X e Y indican los distintos grupos de unidades motoras. **B.** Como en A, pero para experimentos depo (Figura R21B). **C.** Diferencia entre las matrices de distancias euclídeas entre los grupos experimentales depo y control (Matriz B - Matriz A).

En resumen, los resultados indican que la remoción de NS del circuito afecta la dinámica temporal de las unidades motoras En-Fase-Adelantadas durante el

crawling. Los resultados previos mostraron que la despolarización de NS no tenía un efecto sobre la FDb máx ni el AM relativo de este tipo de unidad motora (Figura R13). Sin embargo, al analizar la dinámica de la frecuencia de disparo durante los ciclos (Figura R17Ai), se observa que, al remover a NS del circuito, este tipo de unidad motora presenta potenciales de acción durante la fase de elongación del ciclo. Esto no ocurre en el caso de las otras unidades motoras que disparan durante la contracción, DE-3 y unidades En-Fase, cuya actividad es afectada únicamente en el momento del ciclo al que se encuentra restringida su actividad. La marcada diferencia en el efecto sobre las unidades En-Fase y En-Fase-Adelantadas refuerza la idea de que se trata de grupos neuronales distintos.

Finalmente, los resultados confirman que los valores de distancias euclídeas bajas obtenidas al analizar la actividad de las motoneuronas DE-3 y En-Fase en condiciones control sugieren que estos grupos exhiben una deriva temporal menor que la de las unidades Anti-Fase, implicadas en la fase de elongación, algo que también puede observarse cualitativamente al realizar los experimentos.

4.5. Discusión

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo respaldan la hipótesis planteada: las hiperpolarizaciones de NS, sincronizadas con la fase de contracción, modulan la actividad de las motoneuronas activas en ese momento del ciclo del patrón motor. Remover a la neurona NS del circuito genera un aumento de al menos el 50% de la frecuencia de disparo de las motoneuronas DE-3 y las unidades motoras En-Fase (Figura R16 y Figura R17), mientras que esto no ocurre en el caso de las unidades motoras Anti-Fase, que disparan durante la fase de elongación, cuando el potencial de membrana de NS permanece cercano a su valor de reposo o se encuentra apenas despolarizado (Figura R17). Cabe destacar que el hecho de que la frecuencia de las unidades motoras Anti-Fase no se vea afectada por la despolarización de NS indica que esta manipulación experimental no provoca un cambio generalizado en la actividad de las motoneuronas.

Por otro lado, el hecho de que la frecuencia de disparo máxima de las unidades motoras En-Fase-Adelantadas no se vea afectada por la despolarización de NS (Figura R17) confirma que estas unidades motoras constituyen un grupo distinto al de las unidades En-Fase. Además, sugiere que estas unidades podrían ser motoneuronas inhibitorias que no están conectadas con NS a través del circuito de inhibición recurrente (Rela y Szczupak, 2003; Wadeuhl, 1989). Esta hipótesis es coherente con la dinámica temporal que exhiben estas unidades, que sugiere que podrían anticiparse al inicio de disparo de las motoneuronas DE-3 inhibiendo las motoneuronas activas durante la elongación (Figura R17).

Los resultados subrayan que conocer la conectividad entre las neuronas no es suficiente para deducir su funcionamiento y que la interacción dinámica entre ellas resulta clave para comprender su papel fisiológico. Considerando no sólo las conexiones entre las neuronas que subyacen al patrón motor de *crawling*, sino también los resultados detallados a lo largo de esta Tesis, se propone que el circuito de inhibición recurrente entre NS y las motoneuronas durante *crawling* parece tener relevancia únicamente en el caso de las unidades activas durante la fase de contracción, tal como se esquematiza en la Figura R23.

Rol del circuito de inhibición recurrente en la modulación de la excitación de las motoneuronas durante *crawling*

Los resultados detallados en este trabajo llevaron a rechazar la hipótesis inicial con la que se inició esta investigación, que proponía que las neuronas NS modulaban la actividad de las motoneuronas durante *crawling* mediante los circuitos de inhibición recurrente, y a proponer que, además de la existencia de esos circuitos, durante el patrón motor las NS reciben *inputs* inhibitorios rítmicos desde el oscilador.

El circuito tendría, por lo tanto, dos maneras de modular la actividad de las motoneuronas: una mediada directamente por el circuito inhibitorio recurrente entre NS y las motoneuronas, que además permitiría limitar la actividad de las motoneuronas independientemente del programa motor que esté siendo ejecutado por

el animal, y otro correspondiente específicamente al patrón motor de *crawling*, del que participa el oscilador que lo genera.

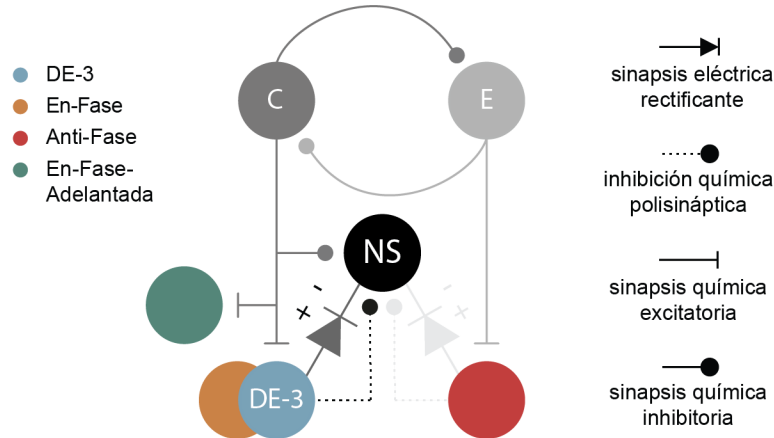


Figura R23. Circuito neuronal putativo subyacente al *crawling* y al circuito inhibitorio recurrente en un ganglio del cuerpo medio (versión actualizada). Tal como se explicó en las Figura I7, Figura R7 y Figura R14, las unidades C y E corresponden, respectivamente, a las unidades de contracción y elongación del oscilador. Considerando la caracterización de las distintas unidades motoras realiza en este capítulo, se espera que las unidades motoras En-Fase y En-Fase-Adelantadas se activen durante la fase de contracción junto con DE-3, mientras que las unidades motores Anti-Fase, entre las que se encuentra la motoneurona CV mencionada anteriormente, lo hagan durante la elongación. La neurona NS está conectada con las unidades motoras mediante sinapsis químicas y eléctricas (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009); los símbolos + y – indican la polaridad en la que las sinapsis rectificantes permiten el paso de corriente. Este circuito de inhibición recurrente no estaría activo durante el *crawling* en el caso de las unidades motoras Anti-Fase (circuito gris claro). Esta conexión entre NS y las unidades motoras se da siempre que estas sean excitatorias y no inhibitorias, independientemente de la fase en la que se activen. Nuestros resultados proponen que las unidades motoras En-Fase-Adelantadas no se encontrarían conectadas con la neurona NS.

Conexión de NS con el oscilador

Nuestros resultados de los experimentos de registros intracelulares pareados de NS y T durante *crawling* (Figura R20) sugieren que NS, además de recibir *inputs* inhibitorios rítmicos, envía señales al oscilador que controla el patrón motor. Específicamente, inyectar corriente hiperpolarizante a NS silencia las señales

inhibitorias rítmicas que reciben las neuronas sensoriales T durante *crawling*. No es posible detallar cuál es la vía que media esta conexión, aunque es posible descartar una conexión eléctrica entre NS y T debido a que el potencial de membrana de T no se vio afectado por manipulación de NS (Figura R20A). Además, las motoneuronas no excitan a las neuronas sensoriales T (Alonso et al., 2020), por lo que el efecto observado no está vinculado con su silenciamiento.

Por otro lado, aunque NS no está conectada con las motoneuronas inhibitorias mediante circuitos de inhibición recurrente, su remoción del circuito impacta en las unidades motoras putativamente inhibitorias. Si bien este efecto es significativamente menor que sobre la frecuencia de disparo de las unidades motoras En-Fase excitatorias (Figura R19), sugiere que la despolarización de NS afecta al oscilador. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la remoción de NS del circuito contrarresta la deriva temporal tanto en las unidades En-Fase como en las Anti-Fase (Figura R17).

Efecto de NS sobre el ritmo y el patrón de *crawling*

Tal como se había observado al analizar el efecto de la remoción de NS sobre el *duty cycle* de DE-3 (Figura R10), y se ratificó en este capítulo (Figura R16), nuestros resultados indican que esta manipulación no aumenta la amplitud media relativa (una variable medida para estimar el *duty cycle*) en ninguno de los grupos de unidades motoras estudiados (Figura R17). Esto sugiere que NS no produjo una modulación sustancial ni de la ritmicidad ni de la relación de fases del *crawling* ficticio. En el caso de las unidades En-Fase, en el que remover a NS del circuito redujo el impacto de la deriva temporal sobre el ancho medio relativo (Figura R17C), es posible que el aumento de la excitación de las unidades motoras haya influido en la duración de la ráfaga.

Correlación de la actividad de los distintos grupos de unidades motoras

El análisis de correlación de Pearson sugiere, en cuanto a los registros de *crawling* control, que DE-3 presenta la actividad más robusta, dado que la diferencia en la

correlación de estas unidades motoras es la que menos se modifica con el paso del tiempo. Como se mencionó, este resultado también podría verse influido por el hecho de que el grupo DE-3 está conformado por una única motoneurona. Las unidades cuya correlación se modifica más son las Anti-Fase, esto probablemente se explique por el hecho de que este grupo incluye unidades que presentan mayor diversidad (Figura R17).

Al remover a NS del circuito, sólo se observa un cambio en la correlación de las unidades motoras En-Fase-Adelantadas, tanto en su relación interna como con otros grupos (Figura R22). Estas neuronas aumentaron su frecuencia de disparo durante la etapa de elongación, en la que normalmente permanecen silenciadas (Figura R17). Dado que NS no modula la excitación de las unidades En-Fase-Adelantada durante la contracción, lo que es consistente con que se trate de motoneuronas inhibitorias, sería interesante evaluar si el circuito recluta de manera diferencial a motoneuronas excitatorias e inhibitorias.

Agradezco a la Doctora Luz Bavassi por las discusiones sobre los análisis de matrices presentados en este capítulo.

Capítulo 5.

Comparación entre el patrón motor en ganglios aislados
y el comportamiento de crawling

Los circuitos neuronales encargados de generar patrones rítmicos (CPGs, por sus siglas en inglés), responsables tanto de comportamientos locomotores como de otros tipos de comportamientos, han sido ampliamente estudiados debido a que presentan salidas motoras fácilmente cuantificables, lo que posibilita conectar su función con la estructura y mecanismos subyacentes (Marder & Calabrese, 1996). Muchas de las preparaciones más utilizadas para estudiar los CPGs son aquellas que, aisladas *in vitro*, conservan su funcionalidad esencial, generando patrones motores ficticios cuyas dinámicas se asemejan a las observadas *in vivo*. Estas preparaciones permiten registrar y manipular fácilmente los distintos elementos que las componen, como en el caso de las preparaciones de ganglio aislado de sanguijuela utilizadas en este trabajo.

Como se mencionó previamente, numerosos estudios establecieron que cada ganglio contiene la red responsable de producir la actividad rítmica de motoneuronas compatible con el *crawling* y que es posible evocar el comportamiento ficticio mediante perfusión con dopamina tanto en cordón nervioso aislado como en cadenas cortas de ganglios y ganglios aislados (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008; Rodriguez et al., 2012). En este trabajo, estudiamos el comportamiento ficticio a nivel de ganglios aislados, en los que es posible detectar la actividad rítmica de las motoneuronas que controlan los músculos involucrados en el comportamiento motor y que, en la preparación utilizada, mantienen una relación de fases apropiada (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008). Sin embargo, la actividad ficticia registrada en ganglios aislados presenta diferencias importantes con respecto al comportamiento motor *in vivo*. En primer lugar, esta configuración experimental no considera la coordinación intersegmental, mientras que trabajos del laboratorio han demostrado que, como consecuencia de la coordinación entre tres ganglios, surge una red con propiedades emergentes que posee menos grados de libertad que la de los ganglios por separado (Kearney et al., 2022). En segundo lugar, nuestros resultados muestran que al trabajar con ganglios aislados perfundidos con dopamina algunas características del patrón motor de *crawling* presentan deriva temporal (Figura R10). Como era esperable, el tipo de deriva que manifiesta la red segmental no ocurre durante el comportamiento *in vivo* (resultados del laboratorio no publicados, manuscrito en preparación). Esto podría deberse a que la dopamina no recluta ciertos elementos que

están activos durante el comportamiento in vivo o a la ausencia, en el oscilador aislado, de componentes involucrados en el comportamiento in vivo. Finalmente, está reportado que existen diferencias entre la velocidad del comportamiento ficticio y el crawling (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008).

Considerando los experimentos realizados en ganglio aislado, el objetivo de este capítulo fue comparar las características del comportamiento ficticio con las del crawling in vivo y evaluar en qué medida la actividad generada en los ganglios aislados recapitula el patrón motor observado in vivo.

5.1. ¿En qué medida la actividad registrada en ganglios aislados recapitula el crawling in vivo?

Suponer que la descripción detallada de la actividad de las distintas unidades motoras que participan en el crawling ficticio (Figura R13) representa el correlato neuronal del comportamiento requiere una validación cuantitativa. Para ello, estudiamos el comportamiento de sanguijuelas intactas durante el crawling, con el objetivo de comparar algunas características del comportamiento in vivo con el patrón motor ficticio.

Como se explicó anteriormente, el crawling de sanguijuela está dado por sucesivas ondas de elongación y contracción que se propagan a lo largo del eje antero-posterior del animal, mientras la ventosa posterior o anterior sirven de ancla, respectivamente (Stern-Tomlinson et al., 1986; Figura I7). Para estudiar el comportamiento, se analizaron filmaciones de sanguijuelas ejecutando el comportamiento de crawling, a partir de las cuales se cuantificaron los cambios en la longitud corporal. Para ello, se rastreó una serie de nueve puntos pintados a lo largo de la línea media dorsal longitudinal de cada animal (Figura R24A, ver 6. Experimentos comportamentales). A partir de los datos obtenidos, calculamos las variaciones de longitud de cada sección delimitada por las marcas pintadas, así como del largo total del animal. Los experimentos comportamentales fueron realizados en el laboratorio por el estudiante Federico Yulita en el marco de su Tesis de Licenciatura. Parte de los resultados

obtenidos a partir de estos experimentos fueron utilizados para realizar un análisis comparativo con los estudios ex vivo desarrollados en esta Tesis.

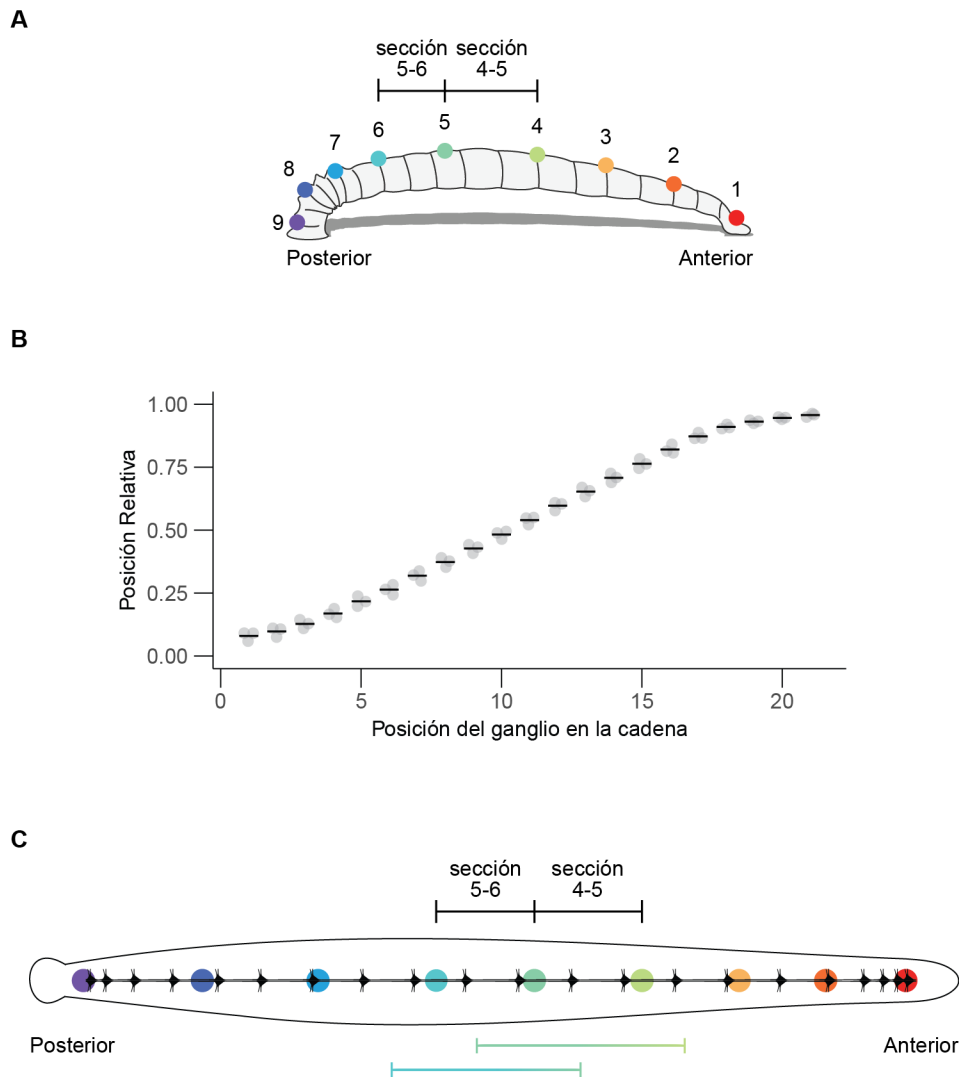


Figura R24. Posiciones relativas de los ganglios a lo largo del eje antero-posterior del animal para el análisis del comportamiento in vivo. **A.** Representación esquemática de una sanguijuela con nueve puntos tal como fueron pintados en la línea medial dorsal del animal para los experimentos. **B.** Posición relativa de los ganglios medios 1-21 para tres sanguijuelas. Se indica el promedio ($n = 3$). En las secciones 4-5 y 5-6 Los ganglios 8 a 15, que fueron utilizados para los experimentos de electrofisiología, se encuentran en las secciones 4-5 y 5-6 marcadas en A. **C.** El esquema representa el contorno de una sanguijuela y la posición de la cadena de ganglios medios. Los puntos de colores indican la posición promedio de cada punto trackeado con *DeepLabCut*. Los segmentos en negro indican las secciones estudiadas en el animal promedio. Los segmentos de color muestran las secciones ampliadas que abarcan todo el rango de posiciones observadas en la muestra, incluyendo regiones más anteriores y posteriores que las presentes en ese animal.

Para comparar el comportamiento in vivo con los registros electrofisiológicos de ganglios aislados, decidimos estudiar las secciones del animal inervadas por los ganglios utilizados en los experimentos de *crawling*. Dado que en el estudio comportamental lo que se analizó fue el movimiento de una secuencia de 9 puntos marcados a lo largo de la línea media dorsal (Figura R24A, ver Materialies y Métodos, MM6), en primer lugar fue necesario evaluar si era posible inferir la posición de los ganglios a lo largo de dicho eje. Para ello, tres animales (de 9,3 cm, 9,8 cm y 14,1 cm de longitud) fueron disecados a lo largo de la línea media dorsal, exponiendo todo el cordón nervioso, y se cuantificó la posición relativa de los 21 ganglios medios de la cadena. Los resultados mostraron que la ubicación relativa se encuentra altamente conservada en animales de distintas longitudes (Figura R24B). Con esta información, inferimos qué ganglios estaban incluidos dentro de las ocho secciones definidas en los experimentos comportamentales, tal como se muestra en la Figura R24C, y nos centramos en el análisis de las secciones delimitadas por los puntos 4-5 y 5-6, que corresponden al rango de ganglios incluidos en los estudios ex vivo (ganglios 8 a 15) (Figura R24A-B).

Así como en los experimentos de electrofisiología descritos en los capítulos anteriores se utilizó como marco de análisis el ciclo de actividad rítmica delimitado por DE-3, en los datos de comportamiento, los pasos de *crawling* fueron segmentados considerando la secuencia elongación-contracción (ver Material y Métodos, MM6). La Figura R25A muestra un ejemplo representativo de la variación de la longitud total del cuerpo del animal durante el *crawling* (calculada como la suma de las longitudes de todas las secciones cuantificadas), junto con la segmentación en pasos realizada y la variación de la longitud de la sección delimitada por los puntos 4 y 5.

En cada paso de *crawling* se identificaron cuatro fases en las secciones analizadas (Figura R25A): elongación (caracterizada por el incremento de la longitud de la sección), contracción (marcada por una disminución de la longitud de la sección) y dos fases isométricas que flanquean las fases dinámicas. La Figura R25B muestra la variación de la longitud de la sección a lo largo de distintos pasos de un mismo animal, normalizada por la duración del paso correspondiente. Estos resultados ilustran la variabilidad en la longitud máxima alcanzada entre los pasos.

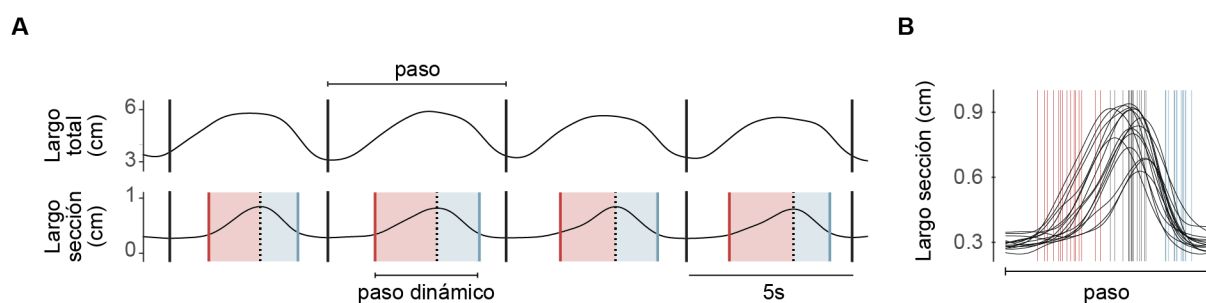


Figura R25. Variación de la longitud del cuerpo de sanguijuela durante crawling in vivo.

A. Ejemplo representativo de los cambios en el largo total y en el largo de la sección 4-5 de una sanguijuela ejecutando el comportamiento de crawling durante cuatro pasos. Los límites de cada paso están indicados por las líneas negras verticales. Las líneas verticales rojas y azules indican el inicio de la elongación y el final de la contracción, respectivamente. Las líneas negras punteadas indican el máximo largo de la sección para cada paso. Los sombreados rojos y azules indican las fases de elongación y contracción, respectivamente. Ver Materiales y Métodos, MM6. **B.** Superposición de curvas de variaciones del largo de la sección 4-5 correspondientes a pasos seleccionados de manera aleatoria ($n = 15$ pasos de un total de 76 pasos dados por el animal) de una misma sanguijuela.

¿El crawling ficticio reproduce la dinámica temporal del crawling in vivo?

Con el objetivo de realizar una comparación cuantitativa de los experimentos in vivo y ex vivo, se evaluaron los periodos y los *duty cycles* de las fases de elongación y contracción en ambos tipos de experimentos. En los experimentos comportamentales, se consideró la duración de cada fase como se detalla en la Figura R25A; y en los experimentos ex vivo (Figura R15), la duración de las ráfagas de las motoneuronas DE-3 para la contracción y de las unidades Anti-Fase para la elongación. Para ello, se tomaron en cuenta únicamente los experimentos en los que se contaba con ambos tipos de unidades.

Mientras que el periodo promedio del crawling ficticio (final-a-final) registrado en ganglios aislados fue de $15,22 \pm 3,21$ s ($n = 6$), la duración promedio del paso de sanguijuela fue de $7,49 \pm 0,50$ s ($n = 8$, Figura R26A).

Como se mencionó, los pasos del comportamiento in vivo incluyen momentos en los que las secciones analizadas del animal no se elongan ni se contraen. Estos momentos, a los que llamamos fases isométricas, no tienen un correlato claro en los registros electrofisiológicos de las motoneuronas en los ganglios aislados. Asumiendo que las fases isométricas son específicas de la conducta en el animal con aferencias sensoriales e interacción axial de información neuronal, definimos el “paso dinámico” como aquella porción del paso compuesta exclusivamente por la sucesión elongación-contracción. La duración promedio del paso dinámico fue de $4,34 \pm 0,26$ s ($n = 8$, Figura R26A).

Para comparar la estructura de los patrones rítmicos, resulta natural correlacionar la actividad de las motoneuronas Anti-Fase y En-Fase o DE-3 de los estudios ex vivo con las fases de elongación y contracción del comportamiento in vivo. Para analizar el *duty cycle* ex vivo se consideró la duración de los ciclos, y para el comportamental se consideró la duración de “paso dinámico”, excluyendo las fracciones isométricas del paso (Figura R26A).

Medido de esta manera, el *duty cycle* promedio de la fase de elongación in vivo fue de $0,65 \pm 0,01$ y el de la contracción fue de $0,35 \pm 0,01$ (Figura R26B); el *duty cycle* promedio de las unidades Anti-Fase fue $0,64 \pm 0,07$ y el de las motoneuronas DE-3 fue de $0,32 \pm 0,03$ (Figura R26B) medidos en los ganglios aislados.

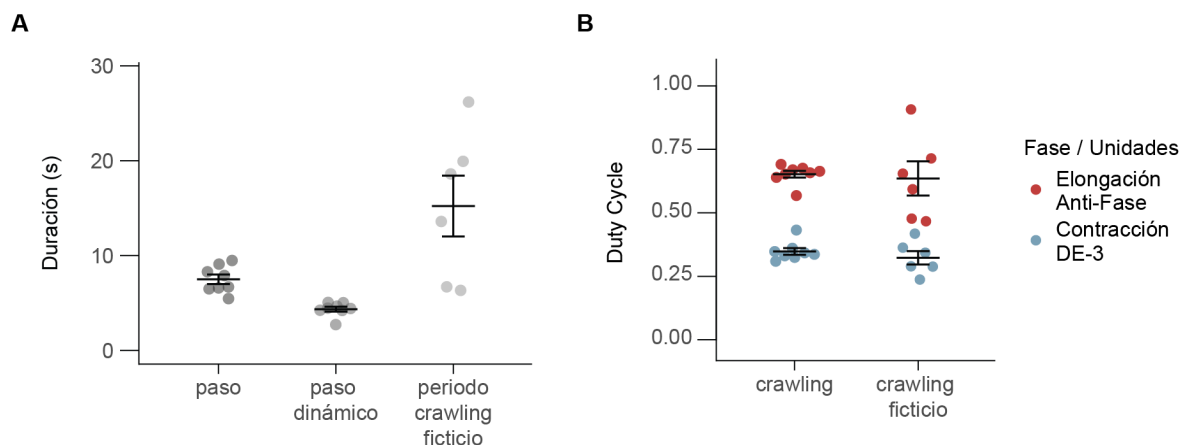


Figura R26. Comparación de la duración de los pasos y *duty cycles* de experimentos in vivo y ex vivo. A. Duración de los pasos, pasos dinámicos y ciclos medidos durante el comportamiento o el crawling ficticio para los experimentos analizados en esta comparación. Las

variables correspondientes al comportamiento fueron calculadas considerando el paso completo (paso) o la duración de la sucesión elongación-contracción (paso dinámico). El ciclo ficticio, definido como el período (final-a-final), se calculó a partir de la actividad de la motoneurona DE-3. Los puntos representan la media correspondiente a cada sanguijuela o ganglio, se indican media $\pm$ EE para todas las sanguijuelas ($n = 8$ sanguijuelas con un total de 249 pasos en los experimentos comportamentales; $n = 4$ ciclos correspondientes a 6 ganglios de 6 sanguijuelas). **B.** Duty cycle de las fases de elongación y contracción medidas durante el comportamiento o el crawling ficticio. Las variables correspondientes al comportamiento fueron calculadas como la duración de cada fase relativa a la suma de las fases de elongación y contracción (paso dinámico en C), excluyendo las fases isométricas. Los puntos representan la media correspondiente a cada sanguijuela, se indican media $\pm$ EE para todas las sanguijuelas ($n = 8$ sanguijuelas con un total de 249 pasos). Para el duty cycle de las motoneuronas DE-3 y las unidades Anti-Fase, los puntos corresponden a la media de cada ganglio, se indican también media $\pm$ EE para todos los ganglios ($n = 4$ ciclos de cada DE-3 o Anti-Fase, 6 ganglios, 6 sanguijuelas).

¿Existen diferencias en la relación de fases a lo largo del eje antero-posterior de la sanguijuela?

Al realizar la caracterización de crawling en ganglio aislado y comparar el patrón motor generado por ganglios extraídos de distintas regiones del cordón nervioso no encontramos diferencias (Capítulo 1, Figura R4). Este análisis se realizó utilizando resultados provenientes de experimentos control. Sin embargo, dado que en algunos casos las diferencias entre circuitos se revelan únicamente tras una perturbación (Calabrese & Marder, 2024), repetimos el análisis en ganglios en los que inyectamos corriente despolarizante. En este caso tampoco encontramos diferencias en las características descriptivas del *crawling* en función de la posición del ganglio en la cadena.

No obstante, considerando que en condiciones in vivo los osciladores se reclutan de manera metacrónica y que no necesariamente todas las secciones presentan un comportamiento uniforme, nos propusimos evaluar si existían diferencias en la duración de la fase de contracción, equivalente a la duración de la ráfaga de disparo de DE-3, entre las secciones estudiadas. Nuestros resultados revelaron que existe una

diferencia significativa entre las duraciones de las etapas entre las secciones, mientras que no existen diferencias entre los *duty cycles*.

Estos resultados se detallan en el Material Suplementario, S5.

5.2. Discusión

En conjunto, los resultados muestran que, aunque con ciertas diferencias cuantitativas, los patrones motores in vivo y ex vivo son similares, validando que la red neuronal estudiada ex vivo representa el plan motor que se constata en el comportamiento.

El valor promedio de duración del paso de sanguijuela en nuestros experimentos comportamentales es similar al reportado en estudios previos (Figura R26A; Stern-Tomlinson et al., 1986; Baader y Kristan, 1992). Estos resultados, comparados con el periodo observado en los experimentos ex vivo, muestran que en el animal intacto la actividad rítmica es aproximadamente dos veces más rápida que en el ganglio aislado. En otros animales, se ha descrito que las señales periféricas pueden acelerar el comportamiento rítmico (Fushiki et al., 2016; Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008; Pulver et al., 2015). Además, no se puede descartar que, si bien la activación con dopamina recluta un mecanismo básico esencial para la generación del patrón motor, existan otros elementos que contribuyan a establecer el periodo y que no estén siendo activados.

Estos resultados sugieren que el patrón dinámico descrito por múltiples motoneuronas registradas en ganglios aislados (Figura R13) refleja la relación de fases observada en la sección corporal correspondiente durante el comportamiento in vivo (Figura R26). Además, los resultados indican que el *duty cycle* está cableado de manera robusta en los ganglios aislados, dado que las variaciones en la duración de cada etapa y en los periodos no afectaron esta variable (Figura R26). En otras palabras, más allá de la diferencia encontrada entre las velocidades del comportamiento, la relación entre fases se mantiene presente a nivel del ganglio

aislado. Esto es cierto también al comparar el *duty cycle* entre secciones del cuerpo del animal durante crawling (Tabla 5 del Apéndice): a pesar de que existen diferencias en la duración de la fase entre ganglios, la relación de fases se conserva.

Con respecto a las fases isométricas observadas durante el comportamiento, que no presentan un correlato en los experimentos en ganglio aislado, es importante considerar que el movimiento rítmico de los segmentos sucesivos a lo largo del eje anteroposterior del animal requiere una señal de retraso que permita la propagación adecuada de la onda de manera metacronal (Puhl et al., 2012). Esta señal probablemente esté ausente en el ganglio aislado.

DISCUSIÓN

Parte 1.

Comportamiento ficticio de crawling en *Hirudo sp.*

El estudio de las redes neuronales encargadas del control motor ofrece una ventaja clara: la posibilidad de medir de manera directa el *output* generado por la red. Además, el análisis de comportamientos motores ficticios permite investigar los mecanismos involucrados en la generación de patrones rítmicos facilitando el acceso a los distintos componentes de la red, su manipulación y la evaluación de su actividad. Esta aproximación constituye una herramienta valiosa para analizar cómo está determinada la coordinación de la actividad que caracteriza a un patrón motor (Marder & Bucher, 2001). En esta Tesis, utilizamos como modelo de estudio el comportamiento ficticio de crawling (*crawling*) en ganglios aislados de sanguijuela.

Estudiar comportamientos locomotores ficticios implica aislar los circuitos correspondientes a los CPGs encargados de organizar el ritmo y el patrón (Marder & Calabrese, 1996), uno de los módulos presentes en las redes neuronales responsables del control motor (ver Introducción, I1). Estos estudios de circuitos aislados reflejan una aproximación *bottom-up* (Rosas et al., 2025) y ponen en evidencia tanto las limitaciones de un abordaje reduccionista como problemas generales de la neurociencia de sistemas y la neuroetología, como la dificultad de vincular la actividad neuronal con el comportamiento (Carandini, 2015; Krakauer et al., 2017). No obstante, este enfoque reduccionista permite formular preguntas que resultarían inaccesibles en preparaciones más complejas y ha llevado a descubrir conceptos fundamentales sobre la organización y el funcionamiento de los circuitos.

Al trabajar con comportamientos ficticios es imprescindible evaluar sus similitudes y diferencias con los patrones motores observados in vivo. En el caso de la sanguijuela, en el que las motoneuronas involucradas en el crawling también participan en la natación, esta consideración adquiere particular relevancia (Friesen & Kristan, 2007). Si bien en muchos sistemas existe una notable correspondencia entre patrones in vivo e in vitro, también se han documentado diferencias importantes (Pearson & Wolf, 1987), lo que resalta la necesidad de interpretar con cautela los patrones ficticios y de

acompañar su análisis con comparaciones funcionales que permitan estimar con mayor precisión su relevancia biológica.

Descripción del crawling ficticio

El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de un circuito de inhibición recurrente en la modulación del patrón motor de *crawling*. Para ello, realizamos primero un análisis detallado del comportamiento ficticio (Capítulo 1, secciones 1.1. y 1.2.) y nuestros resultados confirmaron descripciones previamente reportadas en la literatura (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008). Estos análisis iniciales se basaron exclusivamente en la actividad de la motoneurona DE-3, históricamente utilizada como *proxy* del patrón motor ficticio de *crawling*.

Sin embargo, estudiar el patrón motor exclusivamente a partir de una única motoneurona resulta limitado, dado que durante el *crawling* se reclutan múltiples unidades motoras que actúan de forma alternada, excitando los músculos circulares durante la elongación y los músculos longitudinales durante la contracción, además de motoneuronas inhibitorias que modulan tanto la musculatura como la actividad de otras motoneuronas (Wadepuhl, 1989). Con el objetivo de enriquecer la descripción del patrón motor y poder evaluar las consecuencias de manipular al circuito realizamos una caracterización detallada de distintas unidades motoras involucradas.

El registro simultáneo de distintos nervios, la implementación de una herramienta de *spike sorting* y el posterior análisis de la actividad de las unidades identificadas permitieron clasificar a unidades motoras en tres grupos según su actividad durante los ciclos de *crawling*. Considerando la actividad de DE-3, se identificaron unidades En-Fase, Anti-Fase y En-Fase-Adelantadas, que definieron dos etapas de actividad motora en correspondencia con las etapas de elongación y contracción de la conducta del animal. Si bien esta descripción no abarca la totalidad de las motoneuronas involucradas, constituye un marco sólido para comprender el circuito y para futuros estudios.

Aunque tradicionalmente en el análisis del comportamiento de crawling in vivo se describen estas dos etapas, no era posible predecir con certeza cuántas reflejaría la actividad de las distintas unidades motoras registradas en simultáneo. En la locomoción en cuadrúpedos, por ejemplo, al evaluar inicialmente el comportamiento también se propusieron dos etapas (flexión y extensión), pero estudios posteriores revelaron, al analizar la actividad muscular mediante electromiogramas, la existencia de etapas adicionales (Engberg & Lundberg, 1969).

Nuestra descripción podría refinarse realizando una clasificación más taxativa de las unidades motoras entre inhibitorias y excitatorias, considerando todos los grupos de unidades motoras estudiados. Además, se podrían incluir unidades no rítmicas; por ejemplo, durante la natación, las motoneuronas encargadas de aplanar el cuerpo del animal se encuentran activas todo el comportamiento (Friesen & Kristan, 2007). Por otro lado, también se podrían modificar los métodos de análisis, cambiando las ventanas de *binning* o no normalizando los ciclos de actividad (ver Materiales y Métodos, MM5). Esto posibilitaría detectar sutilezas en la dinámica dentro de cada ciclo o, alternativamente, en relación con la duración del ciclo y la deriva temporal.

Finalmente, resulta importante destacar que en los registros extracelulares la capacidad de detectar la actividad de una neurona depende del tamaño de la espiga en relación al ruido. En nuestro estudio registramos sólo ramas principales de las raíces, y en ellas los axones de ciertas neuronas pueden generar espigas demasiado pequeñas como para ser detectadas. En el futuro, el estudio podría ampliarse registrando ramificaciones de estas raíces principales.

Posible identidad de las unidades motoras registradas

En este trabajo no se clasificaron las unidades extracelulares registradas en términos de identidad celular, algo que en sanguijuela sería posible mediante registros intracelulares y extracelulares simultáneos. Para lograrlo, habría sido necesario registrar múltiples motoneuronas, muchas de las cuales se encuentran en la cara dorsal del ganglio, y manipular la neurona NS, localizada en la cara ventral.

No obstante, realizamos una caracterización de las unidades motoras registradas según la fase de su actividad y el nervio a través del cual proyectan hacia la periferia (Material Suplementario, S3). Según la descripción clásica de Ort et al. (1974), las unidades que disparan en fase con DE-3 registradas en el nervio PP probablemente correspondan a VE-4 (excitatoria ventral 4), DE-5, DE-7 y VE-8, mientras que aquellas registradas en AA probablemente correspondan a DE-107 y VE-108.

Por otro lado, en el trabajo de Rodriguez et al. (2012) se presentaron registros intracelulares de las motoneuronas AE y CV en conjunto con NS, y su actividad mostró la correlación esperada con lo descrito en este estudio.

Aunque el objetivo de este trabajo fue registrar múltiples motoneuronas en simultáneo, un futuro paso, a partir de la descripción presentada en el Capítulo 3, podría ser identificar las unidades motoras activas en las distintas etapas mediante registros extracelulares e intracelulares combinados.

Comparación crawling ficticio y crawling in vivo: periodo y relación de fases

El análisis cuantitativo de la actividad de múltiples unidades motoras activas a lo largo de un ciclo de *crawling* fue validado mediante una comparación con el comportamiento in vivo. Dado que se trata de la primera descripción de este tipo resultaba relevante evaluar su correspondencia con el patrón conductual. Si bien se realizaron previamente comparaciones entre el comportamiento ficticio y el comportamiento in vivo (Kearney et al., 2022; Puhl & Mesce, 2008), estos trabajos consideraron el cuerpo entero del animal. Nuestro análisis, por el contrario, se centró en las secciones del cuerpo correspondientes al rango de segmentos utilizados en los experimentos ex vivo.

i. Periodo del patrón motor

Nuestros resultados mostraron diferencias claras en el periodo del patrón motor: la actividad rítmica del ganglio aislado muestra un periodo que es aproximadamente el doble que el que exhibe un animal intacto (Capítulo 5, Figura R26). Esta diferencia en

los valores del periodo coincide con las reportadas en estudios seminales de este comportamiento (Puhl & Mesce, 2008 en estudios de ganglio aislado; Baader & Kristan, 1992; Puhl & Mesce, 2008; Stern-Tomlinson et al., 1986, en estudios de animales intactos). Si se evalúa la duración del paso del comportamiento a partir de la duración de la porción dinámica del paso, la diferencia entre el comportamiento in vivo y el ficticio es aún mayor.

Estas diferencias pueden explicarse por la influencia de señales descendentes del cerebro rostral o caudal, de *inputs* propio sensoriales y de señales provenientes de otros segmentos sobre el comportamiento. Si bien un CPG puede producir un patrón complejo por sí mismo, durante la locomoción todos estos factores pueden jugar un rol importante dependiendo del circuito (Grillner & El Manira, 2020). Experimentos de crawling ficticio realizados con cadenas aisladas de tres ganglios, en los que participan señales de coordinación intersegmental, no mostraron diferencias en el periodo del patrón rítmico en comparación con los periodos evocados en ganglios aislados (Kearney et al., 2022), lo que sugiere que o bien son necesarios más ganglios para que se modifique la velocidad del patrón, o que la coordinación segmental no está necesariamente involucrada.

ii. Relación de fases: robustez del *duty cycle* durante crawling

Mientras que en el crawling inducido por dopamina, la actividad rítmica de las motoneuronas está dada por la alternancia entre unidades DE-3 y En-Fase con unidades Anti-Fase, a nivel de comportamiento las etapas de elongación y contracción estaban flanqueadas por etapas isométricas. Esta diferencia resulta esperable considerando que en el animal las ondas de elongación y contracción tienen que propagarse de manera metacronal y coordinada a lo largo del eje antero-posterior, lo que requiere señales de retardo entre segmentos. Por lo tanto, en nuestros análisis de secciones diferenciamos las etapas dinámicas de las estáticas, en las que el animal no mostraba cambios en la longitud de su cuerpo durante el paso.

Considerando las etapas dinámicas de la conducta, nuestros resultados revelaron que la relación de fases descrita en ganglio aislado coincidía con la observada en las

secciones del animal inervadas por esos ganglios (Capítulo 5, Figura R26). Esto sugiere que el oscilador segmental opera en un marco temporal (el periodo) que puede ser modificado por diversas señales, pero que, en sí, controla el *duty cycle* de cada etapa.

El *duty cycle* de DE-3, que refleja la relación de fases del *crawling*, no presentó deriva temporal en el comportamiento de ganglio aislado (Capítulo 1, Figura R10), ni presentó diferencias entre el comportamiento ex vivo y el comportamiento in vivo (Capítulo 5, Figura R26), ni entre secciones del animal durante el *crawling*, a pesar de que sí existieran diferencias entre las duraciones de la contracción (Material Suplementario, Figura S8). En conjunto, estos resultados sugieren que esta característica del patrón motor se encuentra cableada de manera robusta en los osciladores.

iii. Generación del patrón y generación del ritmo

Como se detalló en la Introducción (I2. Patrón motor rítmico y *Central Pattern Generators*), los CPGs controlan tanto el ritmo como el patrón del movimiento rítmico (Kiehn, 2011). Mientras que el ritmo está determinado por la temporalidad o la regularidad de las oscilaciones neuronales o de la salida motora, el patrón surge del reclutamiento coordinado y secuencial de los músculos involucrados. En el caso del *crawling*, el oscilador aislado parece ser suficiente para generar la relación de fases, pero otros elementos serían necesarios para establecer el periodo que se observa in vivo.

Esta separación entre la generación del patrón y la generación del ritmo se ha reportado en otros sistemas y representa una clara ventaja adaptativa, dado que mantener la relación de fases ante cambios en la periodicidad es crítico para que los animales puedan producir un patrón relativamente constante en un rango de distintas velocidades (Calabrese & Marder, 2024; Hooper, 1997).

Conclusión

La comparación mostró dos diferencias principales. Por un lado, el periodo del ritmo del comportamiento animal fue la mitad del medido en el comportamiento ficticio en ganglios aislados. Por otro lado, las etapas de elongación y contracción del comportamiento estaban flanqueadas por etapas isométricas, mientras que en el *crawling* inducido por dopamina la actividad rítmica de las motoneuronas estuvo dada por la alternancia entre unidades DE-3 y En-Fase con unidades Anti-Fase, sin referencias claras para las fases isométricas.

La ausencia de señales cerebrales descendentes y de aferencias periféricas son factores importantes en la determinación del periodo del ciclo. Sin embargo, dejando de lado las etapas isométricas, la relación temporal entre las fases fue notablemente similar entre el comportamiento in vivo y el ficticio. Esto sugiere que la red activada en el ganglio aislado subyace al comportamiento motor.

Parte 2.

Actividad de la neurona premotora NS durante *crawling*

Origen de la inhibición rítmica de NS durante *crawling*

Durante el *crawling*, el potencial de membrana de la neurona premotora NS osciló de manera sincronizada con la actividad de las motoneuronas (Capítulo 1, Figura R5A). En particular, su potencial de membrana presentó una marcada anticorrelación con la motoneurona DE-3, activa durante la fase de contracción (Capítulo 1, Figura R5B), indicando que NS recibe señales inhibitorias en fase con las señales excitatorias que recibe DE-3. La neurona premotora NS opera dentro de un circuito de inhibición recurrente con todas las motoneuronas excitatorias del ganglio (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009), y por lo tanto la hipótesis inicial de este trabajo proponía que sus hiperpolarizaciones estaban dadas por este circuito. Sin embargo, los resultados indican que la señal inhibitoria no se originó, en principio, a nivel de las motoneuronas, sino en el oscilador.

En primer lugar, la hiperpolarización de NS suele preceder el inicio de las ráfagas de disparo de DE-3 (Capítulo 1, Figura R5C) y de unidades motoras En-Fase (Material Suplementario, S4). Además, el hecho de que NS reciba señales despolarizantes durante la etapa de elongación también sugiere que el oscilador modula su potencial de membrana durante *crawling*, dado que considerando el circuito de inhibición recurrente NS debería disparar siempre que disparan las motoneuronas excitatorias.

En segundo lugar, la marcada correlación temporal entre la actividad de las motoneuronas DE-3 y la hiperpolarización de NS sugiere que las señales excitatorias hacia las motoneuronas y las inhibitorias hacia NS provienen de un elemento presináptico compartido, posiblemente la unidad del oscilador que regula la fase de contracción. Esta interpretación se refuerza por la correlación existente entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la duración de la ráfaga de disparo de DE-3 (Capítulo 1, Figura R6B).

Finalmente, la amplitud de la hiperpolarización de NS correlaciona con la duración entre-ráfagas (representativa de la etapa de elongación) que la precede, pero no con la duración de la etapa siguiente (Capítulo 1, Figura R6C). Considerando la arquitectura del circuito responsable del patrón motor de *crawling* (Figura I7), esta correlación podría explicarse porque una elongación de mayor duración implica una mayor inhibición sobre la unidad de contracción del *half-center oscillator*, generando un rebote post inhibitorio más intenso que se refleja en la amplitud de la hiperpolarización de NS.

El único hallazgo que resulta contradictorio con la idea de un *input* presináptico en común que excita a DE-3 e inhibe a NS es la ausencia de correlación entre la amplitud de la hiperpolarización de NS y la frecuencia de disparo de DE-3 (Capítulo 1, Figura R6). Nuestros resultados sugieren que esta aparente contradicción se puede explicar por el hecho de que NS modula la actividad de DE-3 durante *crawling* mediante hiperpolarizaciones vía las sinapsis eléctricas rectificantes (Figura R10). En otras palabras, DE-3 recibe simultáneamente tanto una excitación desde el oscilador como una inhibición por parte de NS.

Conclusión

La Figura R23 presenta, a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis, una actualización del esquema mostrado en la Figura I7 (ver Introducción), que resume las interacciones del oscilador que subyace al patrón motor de *crawling* con el circuito de inhibición recurrente entre NS y los distintos grupos de unidades motoras. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de un *input* concomitante que excita a las motoneuronas e inhibe a las neuronas premotoras inhibitorias con las que se encuentran conectadas a través del circuito de inhibición recurrente (Capítulo 1, Figura R7). Este mecanismo refuerza la analogía entre las neuronas NS de la sanguijuela y las células de Renshaw en vertebrados, las cuales también reciben señales tanto desde las motoneuronas como desde elementos premotores rítmicos (Nishimaru et al., 2006).

Parte 3.

Rol de la neurona premotora inhibitoria NS en la modulación del patrón motor rítmico de *crawling*

NS modula la actividad motora durante *crawling* de manera fase-específica

Nuestros resultados muestran que la neurona premotora NS envía señales inhibitorias que modulan el nivel de excitación de algunas de las motoneuronas activas durante la fase de contracción del *crawling*. Este efecto es fase-específico: no se observaron cambios en las motoneuronas que participan en la elongación, y la modulación se restringió a la motoneurona DE-3 y a algunas unidades motoras En-Fase (Figura R16 y Figura R17). Proponemos que esta modulación es generada por el oscilador de *crawling* vía la neurona NS. El oscilador envía a las motoneuronas responsables de la contracción dos señales concurrentes de signo opuesto: una señal excitatoria directa, que produce las ráfagas de disparo rítmicas, y una señal inhibitoria mediada por NS (Figura R23). En coherencia con esta interpretación, las unidades Anti-Fase no mostraron influencia de la señal inhibitoria durante *crawling*.

Interpretación funcional de las señales contrapuestas que modulan la salida de las motoneuronas

Caracterizaciones previas de las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas de sanguijuela demostraron que DE-3 puede alcanzar frecuencias de disparo superiores a 100 Hz (Bernardo Perez-Etchegoyen et al., 2012). Sin embargo, la tensión muscular máxima que la motoneurona puede evocar se alcanza alrededor de los 25 Hz (Mason & Kristan, 1982). La acción de NS limita la señal excitatoria que recibe la motoneurona, evitando que supere lo necesario para activar la musculatura. Esto sugiere un esquema en el que la excitación se asegura en exceso y otro circuito se encarga de regularla. La existencia de excitación e inhibición concurrentes como un factor de equilibrio también ha sido descrita en redes motoras de vertebrados (Kishore et al., 2014; Parkis et al., 1999; Petersen et al., 2014).

Por otro lado, las motoneuronas que activan a fibras del mismo grupo muscular están acopladas eléctricamente entre sí, lo cual favorece una excitación mutua (Ashaber et al., 2021; Fan et al., 2005; Ort et al., 1974). Como consecuencia, cuando las motoneuronas que activan los músculos longitudinales se excitan durante la fase de contracción, estas excitaciones podrían propagarse a través de las sinapsis eléctricas, generando un *runaway* de la actividad motora (Hennequin et al., 2017). La señal inhibitoria proveniente de NS, que es capaz de extenderse a todas las motoneuronas simultáneamente (Rela & Szczupak, 2003; Rodriguez et al., 2009; Wadeuhl, 1989), ofrecería un mecanismo para limitar esta sobreexcitación y mantener el control sobre el rango dinámico de la contracción.

Trabajos previos han demostrado que las motoneuronas de la sanguijuela están sujetas a una inhibición generalizada mediada por GABA (Baca et al., 2008), mientras que la inhibición eléctrica vía NS es específica de fase. En consonancia con nuestros resultados, experimentos realizados en *zebrafish* mostraron que existe una inhibición fase-específica originada en un conjunto de neuronas premotoras que incluyen las células de Renshaw (Callahan et al., 2019).

El modelo de sanguijuela ofrece la ventaja particular de permitir la manipulación eléctrica de neuronas individuales en adultos, donde pueden ser fácilmente identificadas por sus características anatómicas y electrofisiológicas. En este contexto, este trabajo ofrece evidencia clara de la señal dual que reciben las motoneuronas durante el *crawling* gracias a la presencia de elemento premotor claramente identificado.

NS no modula ni el ritmo ni la relación de fases

La hipótesis inicial de este trabajo era que NS, a través del circuito de inhibición recurrente, podía modular no sólo la excitación de las motoneuronas, sino también la relación de fases. Esta hipótesis estaba basada en distintos antecedentes sobre la conectividad de la neurona NS (Ver Introducción, Figura I7).

Por un lado, si bien las motoneuronas excitatorias del ganglio se encuentran acopladas eléctricamente entre sí, el circuito de inhibición con NS permite desacoplarlas (Rela & Szczupak, 2003). Entonces, una posibilidad era que NS mediara el acople y desacople entre distintas unidades motoras y que, al removerla del circuito, se observara un aumento del acople eléctrico entre motoneuronas excitatorias, con un efecto generalizado sobre todas las unidades motoras y sobre la relación de fases del patrón motor. Sin embargo, nuestros resultados muestran que remover a NS no afecta ni el periodo ni la relación de fases del *crawling* (Capítulo 1, Figura R10; Capítulo 4, Figura R16 y Figura R17).

La refutación de la hipótesis original demuestra que la descripción detallada de un circuito estudiado en condiciones basales no resulta suficiente para predecir su funcionamiento en el marco de un determinado comportamiento. En el contexto de *crawling*, NS tendría entonces un rol modulador únicamente sobre la excitación de las motoneuronas activas en una fase específica. Esto no excluye la posibilidad de que, en otros estados de la red, el mismo circuito pueda actuar como un reseteador de la actividad, silenciando a las motoneuronas y preparando al sistema para iniciar un nuevo patrón, por ejemplo en respuesta a la activación de las neuronas sensoriales que responden a la presión (Burgin & Szczupak, 2003).

Conexión de NS con el oscilador

Nuestros resultados también sugieren que NS no sólo recibe señales del oscilador durante *crawling*, sino que puede influir sobre él, como demuestran los resultados del estudio de las oscilaciones de las neuronas sensoriales T en el marco de *crawling* (Figura R20). Estos resultados sugieren que NS está conectada a algún elemento del oscilador mediante sinapsis eléctricas, tal como ocurre con las motoneuronas.

Esta conectividad podría explicar por qué, al remover a NS del circuito, las motoneuronas En-Fase que son putativamente inhibitorias, y por lo tanto no se encontrarían conectadas con NS, mostraron un aumento de su frecuencia de disparo (Figura R19). Si bien las motoneuronas putativas excitatorias, que forman parte del circuito de inhibición recurrente con NS, resultaron alteradas en mayor medida que

las inhibitorias, el hecho de que despolarizar a NS afecte a unidades motoras que no se encontrarían conectadas con ella mediante el circuito de inhibición recurrente indica que la manipulación de NS impactaría sobre el oscilador. En otras palabras, las unidades motoras excitatorias serían moduladas por NS de manera directa y vía el oscilador, mientras que las unidades motoras inhibitorias serían afectadas sólo por señales mediadas por el oscilador.

Estudios previos y observaciones no documentadas en esta Tesis mostraron que la inyección de corriente despolarizante en NS cuando el crawling ficticio comienza a desarmarse permite rearmar el patrón. La interacción putativa de NS con el oscilador permite sugerir que la remoción del efecto inhibitorio de NS revigorizaría el funcionamiento del oscilador. Sin embargo, no puede descartarse que, en ese estado del circuito, la eliminación de la influencia de NS permita revelar señales excitatorias débiles que permanecían restringidas por la inhibición mediada por NS.

Rol de NS más allá de la configuración de ganglio aislado

Cabe preguntarse en qué medida el rol de la neurona NS descrito en este trabajo persistiría en otras configuraciones de la red, dado que nuestro estudio se realizó en ganglios aislados mientras que del comportamiento participan veintiún CPGs coordinados intersegmentalmente entre sí.

Experimentos realizados en el laboratorio demostraron que, en cadenas de tres ganglios perfundidas con dopamina, emerge un circuito con ciertas propiedades que difieren de las observadas en un único ganglio aislado (Kearney et al., 2022). En ese contexto, la hiperpolarización de NS no genera un silenciamiento de las motoneuronas excitatorias, como sí ocurre en ganglio aislado (Capítulo 4, Figura R18), lo que sugiere que las señales de coordinación intersegmental proveen cierta redundancia al circuito. Sin embargo, sí se observa una marcada disminución de la frecuencia de disparo de la motoneurona DE-3 conectada con la NS en la que se inyecta corriente hiperpolarizante (Kearney et al., 2022). Esto permite hipotetizar que más allá de los cambios observados en la red, el circuito de inhibición recurrente seguiría jugando un rol en la modulación de la actividad de las motoneuronas a nivel local.

Conexión de la motoneurona DE-3 con el oscilador responsable del *crawling*

Si bien la organización de los circuitos que controlan comportamientos motores rítmicos es marcadamente jerárquica (Introducción, sección 1. Redes neuronales encargadas), diversos estudios han cuestionado si las motoneuronas, clásicamente definidas como meros elementos de salida del circuito, participan activamente de la generación del patrón motor. Distintos trabajos en invertebrados han establecido que las motoneuronas pueden integrar las redes neuronales que generan los patrones rítmicos (Friesen et al., 1978; Kristan & Calabrese, 1976; Maynard & Selverston, 1975; Poon et al., 1978; Selverston & Moulins, 1985; Staras et al., 1998). También se describieron estos casos en vertebrados (Song et al., 2016).

En el caso de *crawling* de sanguijuela, la motoneurona CV, activa durante la fase de elongación, está conectada con el circuito que genera el patrón rítmico (Rotstein et al., 2017). Específicamente, un circuito de retroalimentación positiva entre esta motoneurona y la unidad encargada de la elongación del *half-center oscillator* estaría involucrado en la relación de fases que exhibe el comportamiento.

Los resultados de este trabajo muestran que el marcado aumento de la frecuencia de disparo de DE-3 al remover a NS del circuito (Figura R10) no produce cambios en la relación de fases ni en la ritmicidad del patrón, permitiendo descartar que la motoneurona DE-3 esté conectada con el oscilador. Esto se extiende a todas las unidades motoras En-Fase que presentaron el mismo efecto al despolarizar a NS durante *crawling* (Figura R17).

Rol de la inhibición premotora en control motor

Tanto en la cadena de ganglios de invertebrados como en la médula espinal de vertebrados, se han identificado circuitos premotores inhibitorios especializados que desempeñan un rol clave en la transformación de señales descendentes en comportamientos motores específicos.

Considerando el circuito de inhibición recurrente de las células de Renshaw, como se mencionó, nuestros resultados refuerzan la analogía entre este circuito y el conformado por las neuronas NS de la sanguijuela. Las células de Renshaw reciben señales tanto desde las motoneuronas como desde elementos premotores rítmicos (Nishimaru et al., 2006) y en el caso de la NS, si bien ya se había descrito que recibe señales de las motoneuronas, nuestros resultados sugieren que también recibe señales desde el oscilador. Por otro lado, las células de Renshaw median la inhibición recíproca de músculos antagonistas (Alvarez & Fyffe, 2007). En el caso del circuito de inhibición recurrente estudiado, la neurona premotora NS, a pesar de estar conectada con motoneuronas que inervan músculos antagonistas, durante crawling ejerce una modulación fase-específica sobre la actividad motora, regulando únicamente unidades motoras que activan el mismo grupo muscular. Además, a diferencia de las células de Renshaw, NS no está conectada con motoneuronas inhibitorias, lo que sugiere que su influencia sobre la excitación de otros elementos del circuito es indirecta y mediada por el oscilador.

Finalmente, en vertebrados, donde los circuitos responsables de los movimientos corporales que residen en la médula espinal fueron tradicionalmente considerados simplemente un medio de la salida motora, investigaciones recientes han revelado una notable complejidad y una lógica precisa en su arquitectura (Arber, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que los circuitos que controlan músculos funcionalmente opuestos están organizados en submódulos espinales espacialmente separados en ratones, y que en peces cebra las neuronas pueden especializarse según la velocidad de nado (Ampatzis et al., 2014; Sürmeli et al., 2011; Tripodi et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que los microcircuitos especializados de la médula espinal constituyen un sustrato clave para transformar las señales comando descendentes en una amplia variedad de comportamientos motores. Sería interesante evaluar si, en cadenas de ganglios donde la red gana complejidad, el circuito de inhibición recurrente entre NS y las motoneuronas adquiere otra relevancia, o si cumple un papel en el procesamiento de información descendente proveniente del cerebro rostral.

Conclusión

El estudio de neuronas inhibitorias premotoras y de sus conexiones con las motoneuronas resulta relevante para comprender cómo la actividad rítmica generada por los CPGs se organiza en patrones motores coordinados y cómo se regula con precisión la salida motora. En este trabajo nos preguntamos acerca del rol de la inhibición premotora en la modulación de patrones motores rítmicos, estudiando en particular un circuito de inhibición recurrente premotor en la modulación del crawling de sanguijuela.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que señales inhibitorias fase-específicas, originadas en el oscilador que genera el patrón motor y mediadas por la neurona premotora NS, modulan el grado de excitación de las motoneuronas excitatorias responsables de la etapa de contracción del crawling.

Los resultados de este trabajo refuerzan la idea de que conocer la conectividad entre las neuronas no es suficiente para deducir su funcionamiento, y que la dinámica de sus interacciones es altamente relevante para comprender su rol fisiológico.

APÉNDICE

Tablas de estadística

Tabla 1. Modelos estadísticos realizados para evaluar diferencias entre ganglios para distintas variables descriptivas del *crawling*. En todos los casos se utilizó un Modelo Lineal Mixto (LMM), se indica la estructura de los factores aleatorios.

Análisis de características del crawling en osciladores aislados de diferentes ganglios		
DE-3 (n unidades = 31 / n ciclos = 164 / n sanguijuelas = 20)		
(n ganglio 8 = 9 / ganglio 9 = 7 / ganglio 10 = 10 / ganglio 11 = 4 / ganglio 12 = 5)		
Variable	Modelo y factores aleatorios	p valor - factor ganglio
Periodo (s)	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.5986
Duración (s)	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.6967
Frecuencia de disparo (Hz)	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.7601
<i>Duty cycle</i>	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.2017

Tabla 2. Evaluación estadística del efecto de la despolarización de NS sobre características del crawling y la actividad de DE-3 durante el comportamiento ficticio. Para cada variable analizada se especifica si se utilizó un Modelo Lineal Mixto (LMM) o un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), junto con la estructura de los factores aleatorios. En el caso de los GLMMs, se detalla también la distribución utilizada y la función de enlace correspondiente. Para cada modelo se reportan los niveles de significancia, los p valores y los *ratios* o valores estimados.

Efecto de la despolarización de NS sobre <i>crawling</i>					
DE-3 (n unidades = 26 ctrl, 19 depo / n leeches = 16 ctrl, 15 depo)					
Variable	Modelo y factores aleatorios	p valor - interacción	Contrastes simples pareados		
			comparación	ratio estimado	p valor
Frecuencia de disparo (Hz)	LMM intercepto - unidad motora pendiente - etapa	<.0001	ctrl		
			depo / pre	1.04	0.6345
			post / pre	1	0.9815
			post / depo	0.96	0.4654
			depo		
			depo / pre	1.62	<.0001
			post / pre	0.96	0.3909
			post / depo	0.59	<.0001
Duración (s)	GLMM - Gamma family, log link intercepto - unidad motora pendiente - etapa	0.3077	-	-	-
Periodo (s)	GLMM - Gamma family, log link intercepto - unidad motora	0.2107	-	-	-
<i>Duty cycle</i>	LMM intercepto - unidad motora pendiente - etapa	0.8309	-	-	-
Efecto de la deriva temporal durante <i>crawling</i>					
DE-3 (n unidades = 26 ctrl, 19 depo / n sanguijuelas = 16 ctrl, 15 depo)					
Variable	Modelo y factores aleatorios	p valor - factor etapa	Efectos fijos		
			etapas	estimador	p valor
Duración (s)	GLMM - Gamma family, log link intercepto - unidad motora	<.0001	pre (intercept)	4.40	<.0001
			depo	3.16	<.0001
			post	2.44	<.0001
Periodo (s)	GLMM - Gamma family, log link intercepto - unidad motora	<.0001	pre (intercept)	15.45	<.0001
			depo	11.45	<.0001
			post	9.47	<.0001
<i>Duty cycle</i>	LMM intercepto - unidad motora	0.1623	-	-	-

Tabla 3. Modelos estadísticos realizados para evaluar el efecto de la despolarización de NS sobre diferentes grupos de unidades motoras durante *crawling*. Para cada variable analizada se especifica si se utilizó un Modelo Lineal Mixto (LMM) o un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), junto con la estructura de los factores aleatorios. En el caso de los GLMMs, se detalla también la distribución utilizada y la función de enlace correspondiente. Para cada modelo se reportan los niveles de significancia, los p valores y los *ratios* o valores estimados.

Efecto de la despolarización de NS sobre la actividad de los distintos grupos de unidades motoras durante *crawling*

Variable	Modelo, factores aleatorios	p valor interacción	Contrastes simples pareados		
			comparación	ratio estimado	p valor
DE-3					
(n unidades = 26 ctrl, 20 depo / n ciclos = 110 ctrl, 99 depo / n sanguijuelas = 16 ctrl, 16 depo)					
FDb máx (Hz)	LMM intercepto - unidad motora pendiente - tratamiento y etapa	<.0001	ctrl depo / pre post / pre post / depo depo depo / pre post / pre post / depo	1.04 1 0.96 1.59 0.89 0.56	0.5512 0.9995 0.5406 <.0001 0.0066 <.0001
AM relativo	LMM intercepto - unidad motora pendiente - tratamiento y etapa	0.1596	-	-	-
En-Fase					
(n unidades = 34 ctrl, 19 depo / n ciclos = 149 ctrl, 93 depo / n experimentos = 17 ctrl, 11 depo / n sanguijuelas = 13 ctrl, 8 depo)					
FDb máx (Hz)	GLMM - t_family, identity link intercepto - experimento/ unidad motora	<.0001	ctrl depo / pre post / pre post / depo depo depo / pre post / pre post / depo	1.01 0.92 0.91 1.52 0.86 0.56	0.9628 0.0046 0.0014 <.0001 0.0005 <.0001
AM relativo	GLMM - t_family, identity link intercepto - experimento/ unidad motora	0.0149	ctrl depo / pre post / pre post / depo depo depo / pre post / pre post / depo	0.93 0.78 0.84 0.99 0.60 0.61	0.1788 <.0001 0.0007 0.9840 <.0001 <.0001
En-Fase-Adelantada					
(n unidades = 15 ctrl, 8 depo / n ciclos = 66 ctrl, 45 depo / n experimentos = 12 ctrl, 5 depo / n sanguijuelas = 11 ctrl, 5 depo)					
FDb máx (Hz)	LMM intercepto - experimento/ unidad motora	0.0891	-	-	-
AM relativo	GLMM - t_family, identity link intercepto - experimento/ unidad motora	0.1730	-	-	-
Anti-Fase					
(n unidades = 18 ctrl, 7 depo / n ciclos = 78 ctrl, 34 depo / n experimentos = 15 ctrl, 7 depo / n sanguijuelas = 12 ctrl, 7 depo)					
FDb máx (Hz)	GLMM - t_family, identity link intercepto - experimento/ unidad motora	0.0015	ctrl depo / pre post / pre post / depo depo depo / pre post / pre post / depo	0.91 0.82 0.90 1.10 0.94 0.85	0.0104 <.0001 0.0180 0.0505 0.4132 0.0025
AM relativo	GLMM - t_family, identity link intercepto - experimento/ unidad motora	0.9791	-	-	-

Tabla 4. Modelos estadísticos realizados para evaluar el efecto de la despolarización de NS sobre diferentes tipos putativos de unidades motoras En-Fase (excitatorias o inhibitorias) durante *crawling*. Para cada variable analizada se especifica si se utilizó un Modelo Lineal Mixto (LMM) o un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), junto con la estructura de los factores aleatorios. En el caso de los GLMMs, se detalla también la distribución utilizada y la función de enlace correspondiente. Para cada modelo se reportan los niveles de significancia, los p valores y los *ratios* o valores estimados.

Efecto de la despolarización de NS sobre la actividad de unidades motoras En-Fase durante <i>crawling</i> : comparación entre unidades inhibitorias y excitatorias					
Variable	Modelo y efectos aleatorios	p valor - interacción	Contrastes simples pareados		
			comparación	ratio estimado	p valor
En-Fase (n unidades = 16 depo)					
(n unidades = 7 inh, 9 exc / n ciclos = 33 inh, 43 exc / n sanguijuelas = 4 inh, 8 exc)					
FDb máx (Hz)	LMM	<.03148	inhibitoria		
	intercepto - unidad motora		depo / pre	1.24	0.0018
	pendiente - tipo de unidad y etapa		post / pre	0.85	0.0763
			post / depo	0.85	<.0001
			excitatoria		
			depo / pre	1.87	<.0001
	post / pre		0.90	0.5141	
	post / depo		0.48	<.0001	
AM relativo	LMM	0.8581	-	-	-
	intercepto - unidad motora				
	pendiente - tipo de unidad y etapa				

Tabla 5. Modelos estadísticos realizados para evaluar diferencias entre las duraciones de las fases y el duty cycle en función de dos secciones analizadas durante *crawling*. En todos los casos se utilizó Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) y se indica la estructura de los factores aleatorios. Se detalla también la distribución utilizada y la función de enlace correspondiente.

Análisis del <i>crawling</i> en función de dos secciones analizadas		
(n = 249 pasos correspondientes a 8 sanguijuelas)		
Variable	Modelo y efectos aleatorios	p valor - sección
Duración de la contracción (s)	GLMM - t_family, identity link intercepto - sanguijuela	<.0001
Duración de la elongación (s)	GLMM - t_family, identity link intercepto - sanguijuela	<.0001
<i>Duty cycle</i> de la contracción	GLMM - t_family, identity link intercepto - sanguijuela	0.2522
<i>Duty cycle</i> de la elongación	GLMM - t_family, identity link intercepto - sanguijuela	0.2522

Tabla 6. Modelos estadísticos realizados para evaluar diferencias entre ganglios para distintas variables descriptivas del *crawling* durante la despolarización de NS. Para cada variable analizada se especifica si se utilizó un Modelo Lineal Mixto (LMM) o un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), junto con la estructura de los factores aleatorios. En el caso de los GLMMs, se detalla también la distribución utilizada y la función de enlace correspondiente.

Análisis de características del crawling en osciladores aislados de diferentes ganglios: comparación entre experimentos control y experimentos en los que NS fue despolarizada		
DE-3 (n units = 22 ctrl, 13 depo / n cycles = 100 ctrl, 66 depo / n leeches = 15 ctrl, 11 depo)		
(n ganglio 8 = 7 ctrl, 2 depo / ganglio 9 = 4 ctrl, 3 depo / ganglio 10 = 6 ctrl, 4 depo / ganglio 11 = 2 ctrl, 2 depo / ganglio 12 = 3 ctrl, 2 depo)		
Variable	Modelo y factores aleatorios	p valor - factor ganglio
Periodo (s)	GLMM- Gamma family, log link intercepto - sanguijuela/ganglio	0.8728
Duración (s)	LMM - Gamma family, log link intercepto - sanguijuela/ganglio	0.5652
Frecuencia de disparo (Hz)	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.9061
<i>Duty cycle</i>	LMM intercepto - sanguijuela/ganglio	0.6928

MATERIAL SUPLEMENTARIO

S1. Resultados suplementarios del Capítulo 1

Caracterización de crawling ficticio en ganglio aislado

Habiendo observado que la frecuencia de disparo de DE-3 presenta una distribución bimodal (Figura R2B y Figura R3), nos preguntamos si alguna variable podría explicar la presencia de ganglios con frecuencias de disparo diferentes.

En primer lugar, evaluamos si existía una correlación entre la frecuencia de disparo de los ganglios y el animal del cual provenían. Para ello, consideramos únicamente aquellas sanguijuelas de las que se había registrado más de un ganglio, y observamos que, de 13 animales, 7 animales presentaban ganglios que contribuían a ambos picos de la distribución bimodal (Figura S1A). Estos resultados sugieren que la distribución bimodal se manifiesta dentro de un mismo individuo y que, en aproximadamente la mitad de los casos, no es posible asociar frecuencias altas o bajas de disparo de DE-3 con el animal del que provienen los ganglios.

En segundo lugar, analizamos si la frecuencia de disparo media podría depender de la posición de los ganglios dentro de la cadena nerviosa. Encontramos que, para las posiciones de las que se registraron múltiples ganglios, las frecuencias de disparo cubrieron todo el rango de la distribución bimodal, con la excepción de los ganglios correspondientes al segmento medio tres (Figura S1B). Cabe recordar que no se realizaron experimentos con los ganglios correspondientes a las posiciones 5, 6 y 7 de la cadena porque estos ganglios inervan segmentos del animal que presentan características distintas.

Finalmente, evaluamos si la distribución bimodal podía explicarse por el año, la estación o la hora en que se realizaron los experimentos (Figura S2A-C). En ninguno de estos casos se encontró una relación con la frecuencia de disparo de DE-3, y en todos los casos en que se realizó un número suficiente de experimentos la distribución interna continuó siendo bimodal.

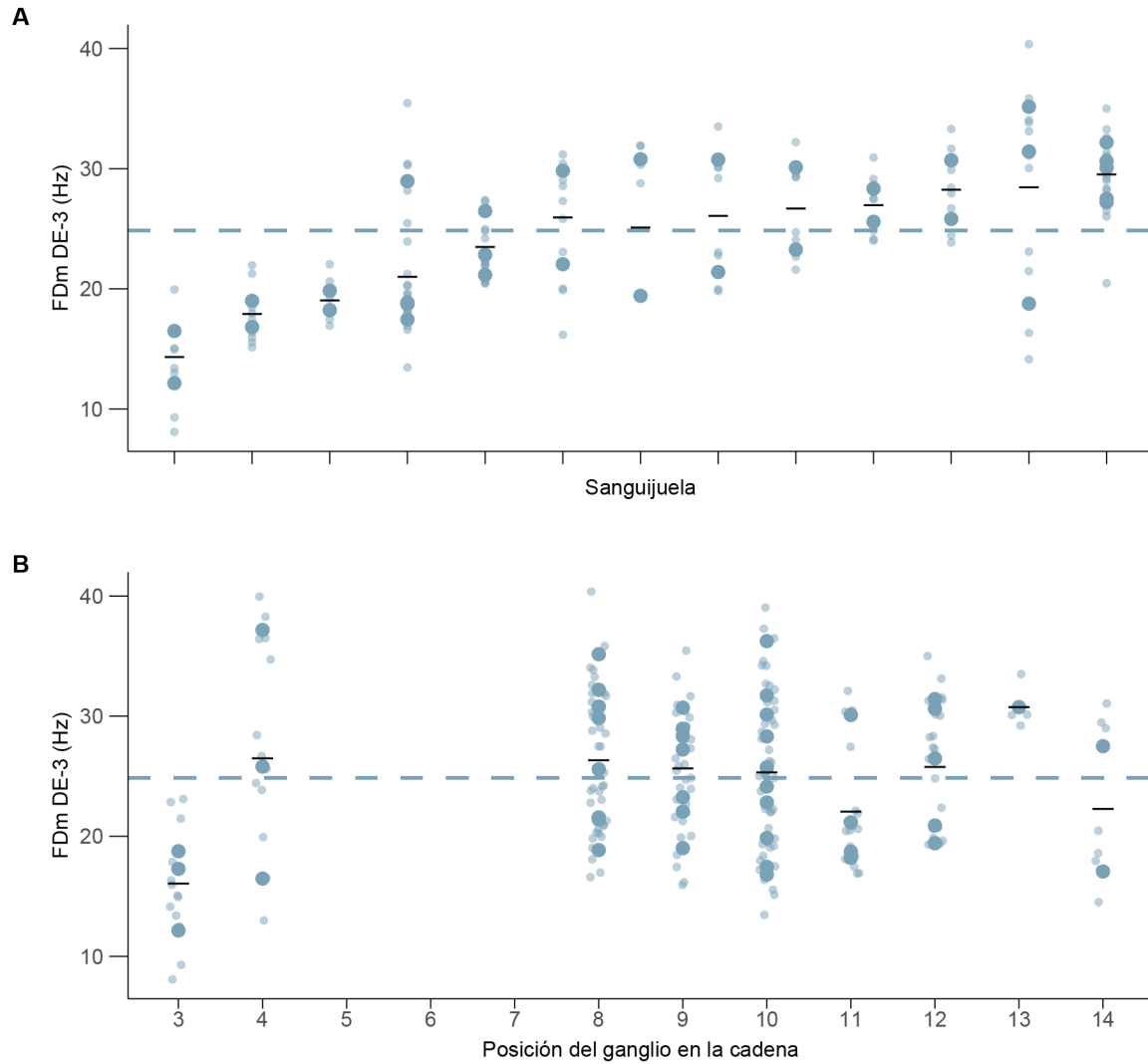


Figura S1. Frecuencia de disparo de DE-3 durante *crawling* en función del animal del que provienen los ganglios y de la posición del ganglio en la cadena. A. Frecuencia de disparo media (FDm) de DE-3 en función del animal del que provienen los ganglios. Los puntos claros y pequeños indican la FDm por ciclo y los puntos grandes indican el promedio de la FDm por ganglio. Las barras horizontales indican el promedio obtenido por animal. La línea azul punteada indica la media de medias obtenida a partir de todos los experimentos realizados, tal como se muestra en la Figura R3. (n = 156 ciclos de 31 ganglios obtenidos de 13 sanguijuelas en todos los casos). **B.** Como en A, pero para la posición del ganglio en la cadena. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas).

Durante algunos experimentos, una misma sanguijuela se utilizó durante dos días consecutivos: el primer día se disecaba al animal y se comenzaban a extraer ganglios, y al día siguiente se continuaba la disección sobre el mismo individuo mantenido a 8°C. Analizamos entonces si la diferencia entre el día de disección y el momento de

realización del registro podía influir sobre la frecuencia de disparo, pero tampoco se observó una asociación, es decir, la distribución bimodal se mantuvo tanto si el registro se realizaba el mismo día de la disección como al día siguiente (Figura S2D).

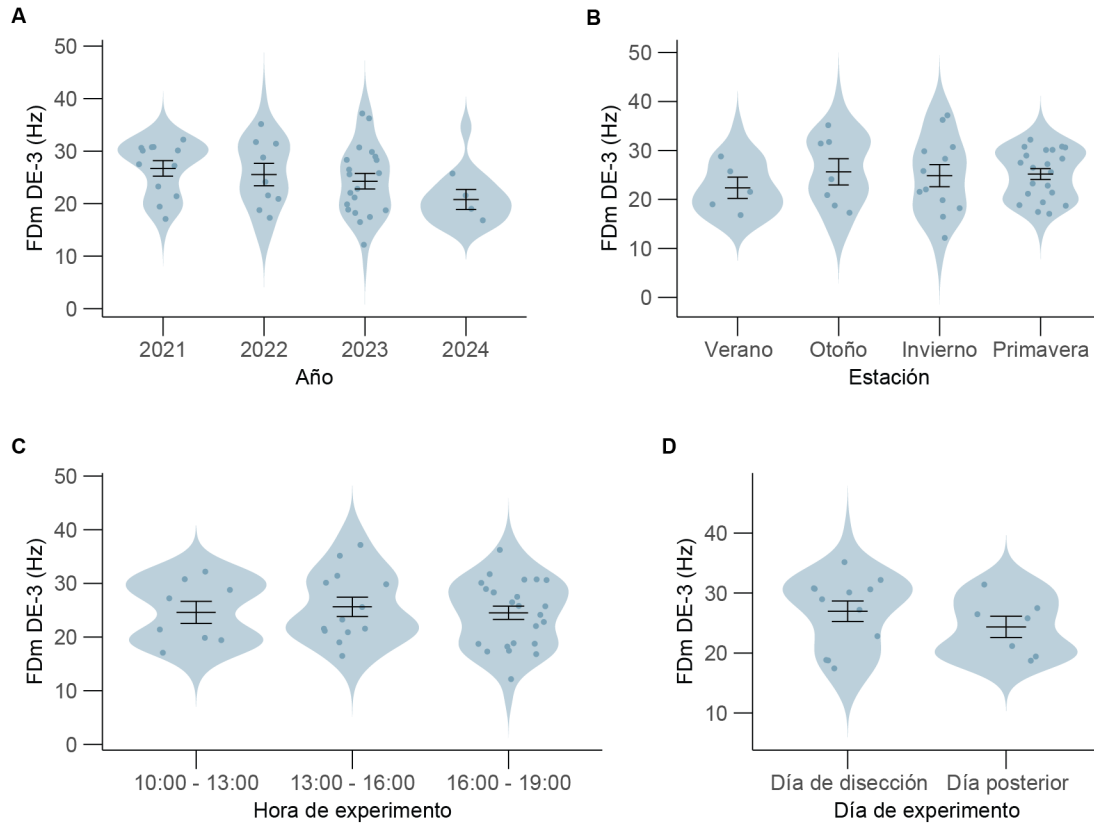


Figura S2. Frecuencia de disparo de DE-3 durante *crawling* en función de distintas características de los experimentos. **A.** Frecuencia de disparo media (FDm) de DE-3 en función del año en el que se realizaron los experimentos. Los violines están contruidos a partir de los valores de FDm por ciclo y los puntos indican el promedio de la FDm por ganglio. Se indican media y EE para cada violín. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas). **B.** Como en A, pero para la estación del año en la que fue realizado el experimento. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas). **C.** Como en A, pero para la hora del día en la que fueron realizados los experimentos. (n = 210 ciclos de 45 ganglios obtenidos de 32 sanguijuelas). **D.** Como en A, pero considerando si el ganglio fue utilizado el día en el que la sanguijuela fue sacrificada o al día siguiente. (n = 88 ciclos de 19 ganglios obtenidos de 6 sanguijuelas en todos los casos).

¿Son similares entre sí los patrones rítmicos de ganglios de distintas partes del cordón nervioso?

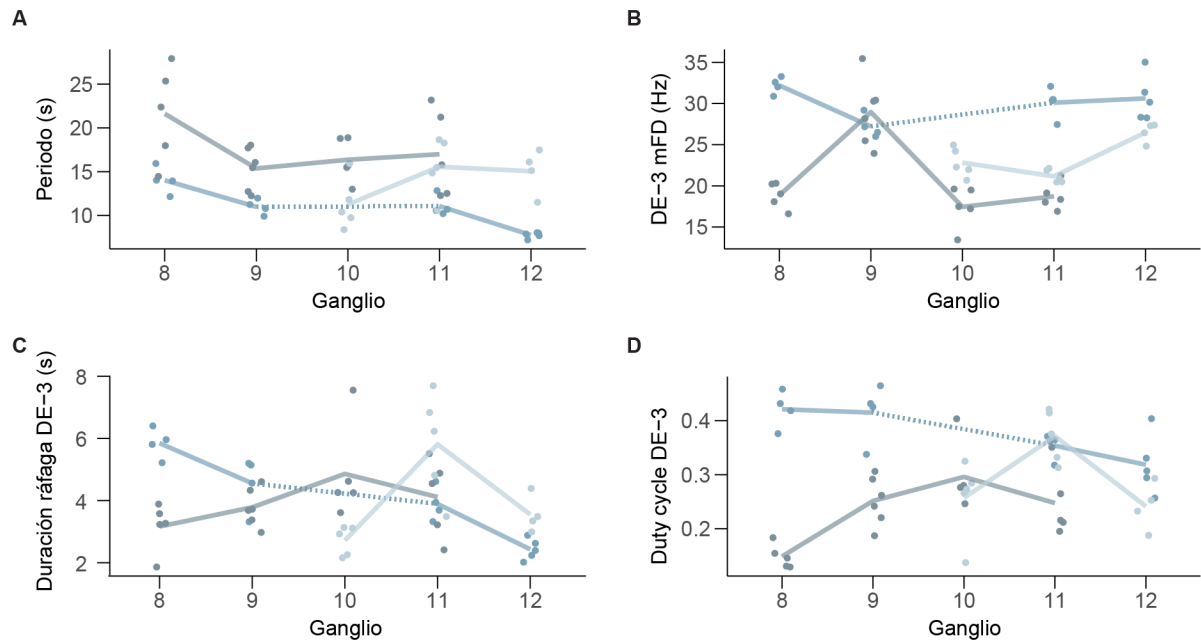


Figura S3. Comparación de características de crawling ficticio entre ganglios con distinta posición en la cadena nerviosa pertenecientes a un mismo animal. **A.** Periodo del *crawling* (final-a-final) de experimentos realizados en ganglios con distinta posición en la cadena, correspondientes a un mismo animal (n = 2 experimentos del ganglio 8, 2 experimentos del ganglio 9, 2 experimentos de ganglio 10, 3 experimentos del ganglio 11, 2 experimentos del ganglio 12; provenientes de 3 sanguijuelas). Cada punto corresponde al valor de un ciclo. Cada color indica un animal distinto y las líneas unen ganglios pertenecientes a un mismo animal. Las líneas sólidas conectan ganglios adyacentes en la cadena; la línea punteada conecta ganglios separados por uno intermedio no registrado. **B.** Como A pero para la FD media (FDm) de DE-3. **C.** Como A pero para la duración de las ráfagas de DE-3. **D.** Como A pero para el *duty cycle* de DE-3.

S2. Resultados suplementarios del Capítulo 2

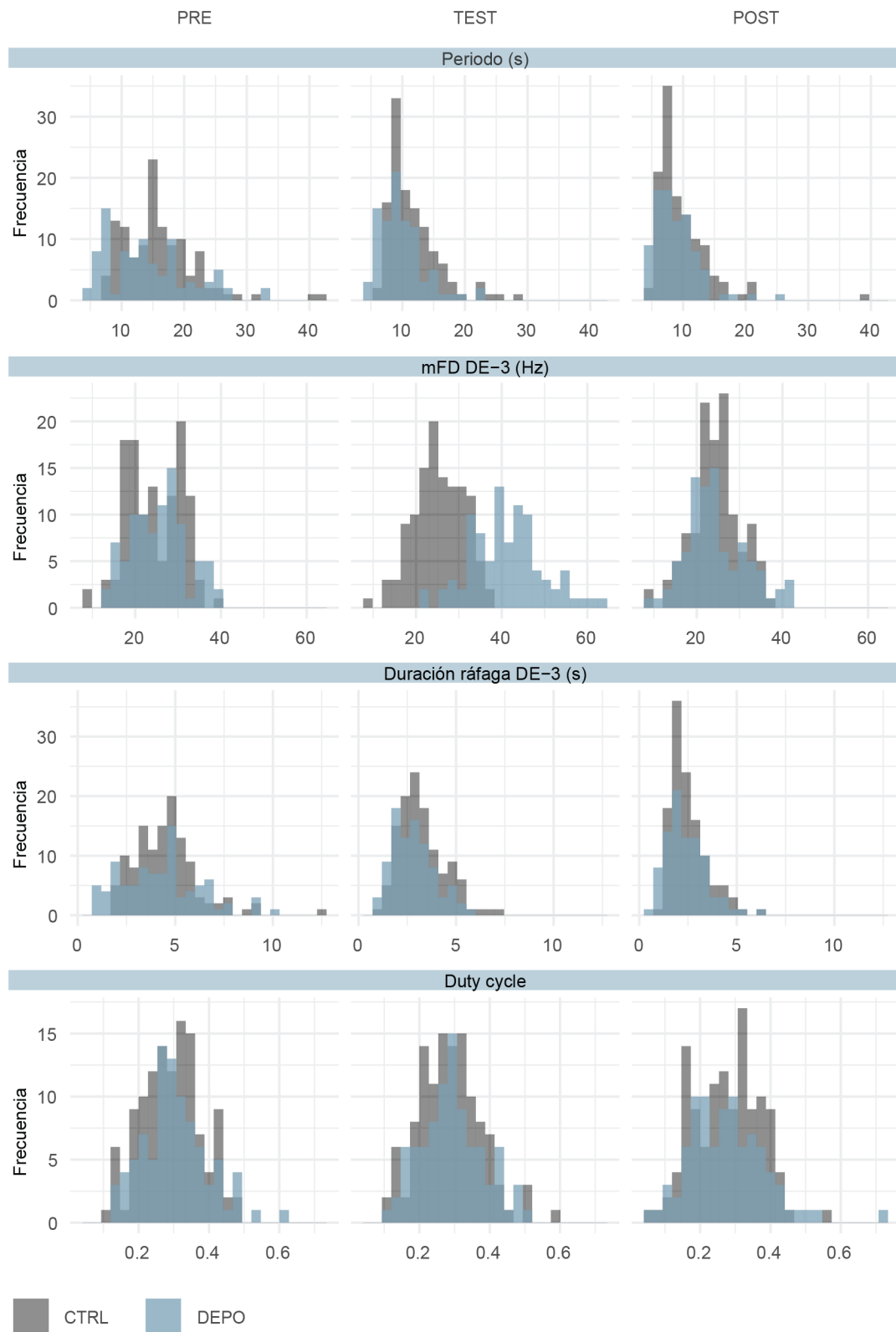


Figura S4. Crawling en ganglio aislado: comparación entre experimentos control y depo.

A. Histograma de periodos final-a-final de *crawling* durante las etapas pre, test y post en experimentos control (gris) y depo (celeste). Construido a partir de todos los ciclos registrados. **B.** Como en A, para la frecuencia de disparo media de las motoneuronas DE-3 durante las ráfagas. **C.** Como en A, para la duración de las ráfagas de DE-3. **D.** Como en A, para del *duty cycle* calculado a partir de los periodos final-a-final. (n control = 120 ciclos de 26 episodios de 26 ganglios de 16 sanguijuelas. n depo = 92 ciclos de 19 episodios de 19 ganglios de 15 sanguijuelas).

S3. Resultados suplementarios del Capítulo 3

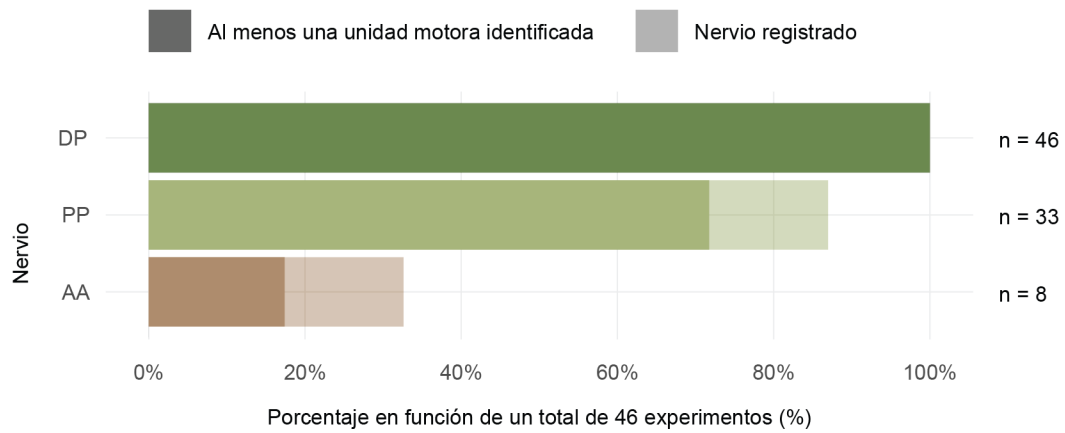
Clasificación de las unidades motoras en función del nervio en que fueron registradas

En primer lugar, cabe señalar que existe un sesgo experimental que explica la diferencia en la cantidad de unidades registradas entre los distintos nervios (Figura R13), ya que en todos los experimentos se disecó y registró el nervio DP. Esto se debe a que el registro de la motoneurona DE-3, indispensable como referencia de la actividad rítmica, era un requisito para llevar a cabo el estudio, mientras que otros nervios fueron registrados con menor frecuencia. La Figura S5A muestra la proporción de casos en los que fue posible obtener al menos una unidad rítmica en cada uno de los nervios y la Figura S5B, el porcentaje de tipos de unidades observadas en cada nervio.

La principal conclusión es que los nervios AA y PP resultan más adecuados para estudiar unidades que disparan en Anti-Fase o En-Fase-Adelantadas, en comparación con el nervio DP, que mostró una mayor prevalencia de unidades En-Fase.

Es importante mencionar que, aunque el nervio MA fue registrado en algunos casos, solo en cinco de ellos fue posible realizar el *spike sorting*, y no se logró clasificar ninguna unidad motora rítmica. Esto se debió a que el nervio MA presenta una mayor densidad de axones, lo que dificulta la clasificación de las espigas.

A



B

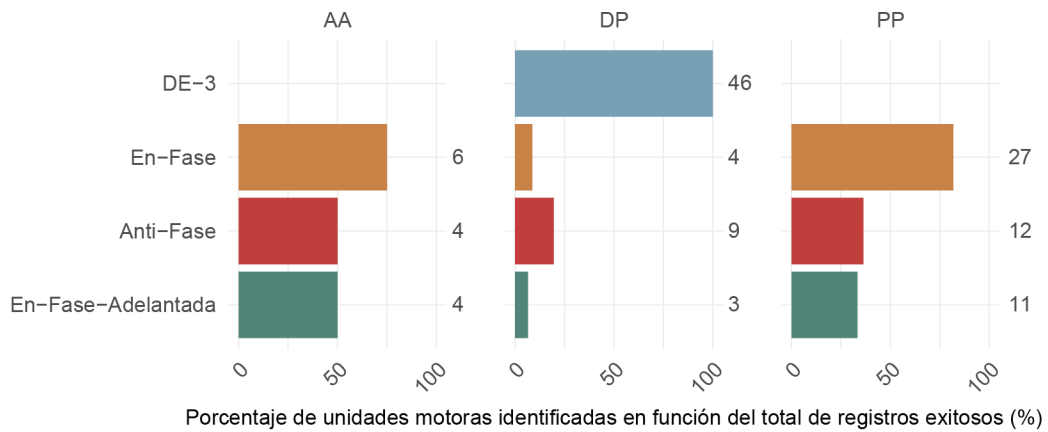


Figura S5. Identidad y clasificación de las unidades motoras rítmicas identificadas. A. Porcentaje de veces en las que se registró extracelularmente cada nervio en función de la cantidad de experimentos totales realizados. **B.** Porcentaje de unidades motoras de cada clase relativa al total de registros obtenidos en cada nervio. (n = 147 unidades rítmicas identificadas en los nervios DP, PP y AA, 46 ganglios de 24 animales).

S4. Resultados suplementarios del Capítulo 4

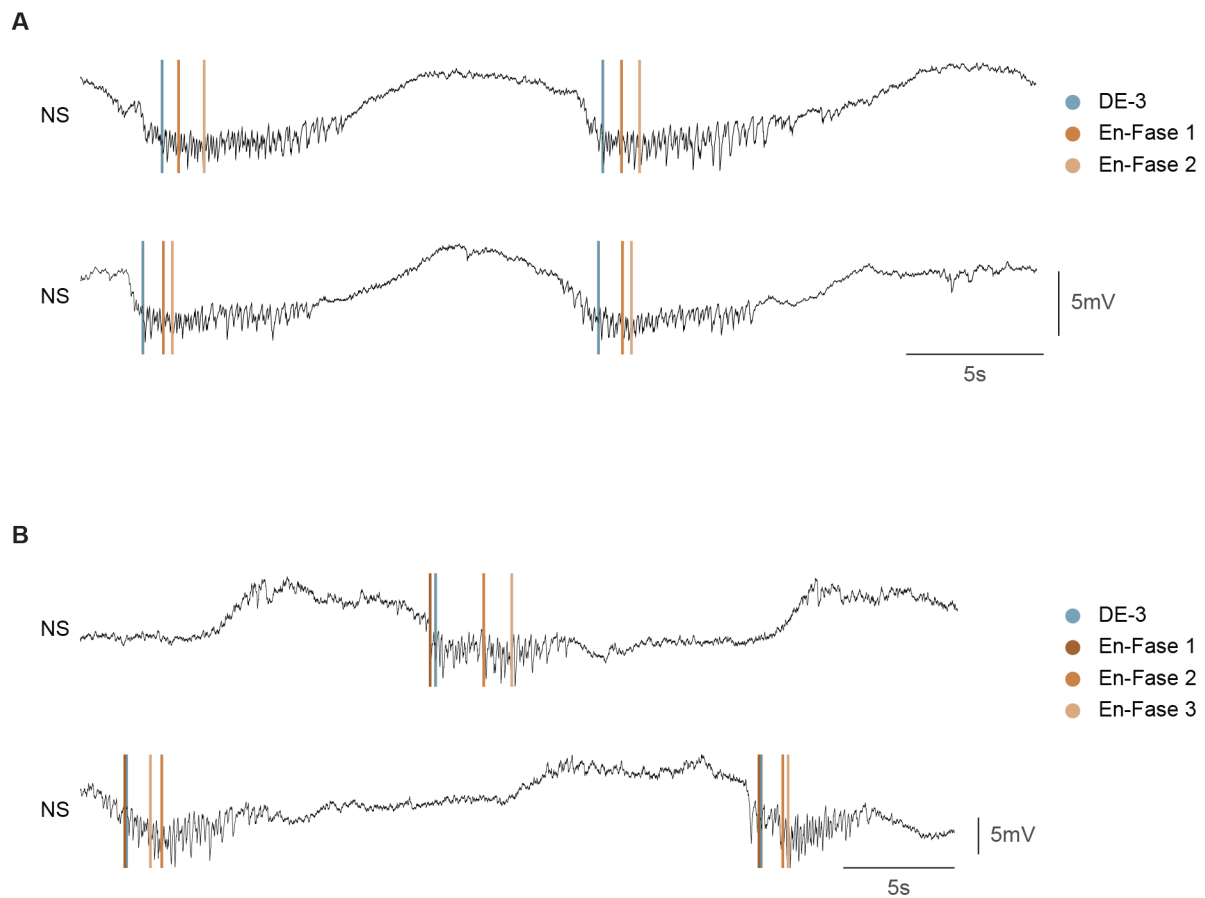


Figura S6. La actividad de las unidades motoras no anticipa las hiperpolarizaciones que exhibe NS durante *crawling*. **A.** Trazos sucesivos del registro intracelular de NS. Las líneas celestes indican el inicio de las ráfagas de disparo de la motoneurona DE-3. Las líneas en tonos naranjas indican el inicio de las ráfagas de disparo de distintas unidades En-Fase, tal como se indica a la derecha. **B.** Como en A, pero para otro ejemplo representativo.

S5. Resultados suplementarios del Capítulo 5

Comparación entre ganglios aislados perturbados mediante la despolarización de la neurona NS

Así como el estudio de los CPGs presenta ventajas previamente mencionadas, como la posibilidad de identificar y registrar electrofisiológicamente los distintos elementos que lo componen, algunas de las características que los hacen funcionalmente estables y resilientes también introducen ambigüedades que dificultan su estudio. Una de estas ambigüedades es la llamada "*degeneracy*". Este concepto implica que múltiples combinaciones de células y parámetros de circuito pueden generar dinámicas muy similares entre sí (Prinz, 2017; Prinz et al., 2004). Por ejemplo, estudios sobre el CPG que controla el latido cardíaco en la sanguijuela han demostrado que distintas combinaciones de fuerzas sinápticas y elementos del circuito pueden producir el mismo patrón motor (Roffman et al., 2012). En la naturaleza, la ventaja de esta degeneración es que diferentes animales, o incluso la misma neurona tras varios meses, pueden presentar, por ejemplo, un conjunto distinto de conductancias máximas sin que esto afecte el comportamiento estable del circuito. Por otro lado, una consecuencia de esto es que neuronas y circuitos que funcionan de manera similar pueden responder de forma muy diferente a perturbaciones, por ejemplo, circuitos que a priori son similares entre sí pueden presentar distintas respuestas a un mismo tratamiento farmacológico (Calabrese & Marder, 2024).

Considerando esto como punto de partida, decidimos evaluar si los experimentos en los que perturbamos los osciladores mediante la inyección de corriente despolarizante en NS permitían detectar diferencias entre los osciladores que no pudieron ser detectadas en condiciones normales. Para esto realizamos los mismos análisis que los reportados en la Figura R4 (Capítulo 1), pero utilizando datos provenientes de ciclos en los que inyectamos corriente despolarizante.

En este caso, seleccionamos los resultados de los experimentos sobre el efecto de la despolarización de NS en DE-3 correspondientes a los ganglios 8 a 12 y a la etapa test,

aquella en la que se despolariza o no a NS (Figura R8, Capítulo 2). El objetivo era evaluar si existían diferencias entre ganglios, por lo que analizamos, de forma similar a lo reportado en la Figura R8, Capítulo 2, si había una interacción entre la identidad del ganglio y el tipo de experimento para las distintas variables estudiadas. En ningún caso se observó una interacción significativa entre estas variables, lo que indica que no se revelan diferencias entre ganglios al remover a NS del circuito, es decir, al perturbar los osciladores. Los resultados detallados de este análisis se presentan en la Tabla 6, mientras que la Figura S7 muestra los valores correspondientes a los ganglios perturbados por la despolarización de NS.

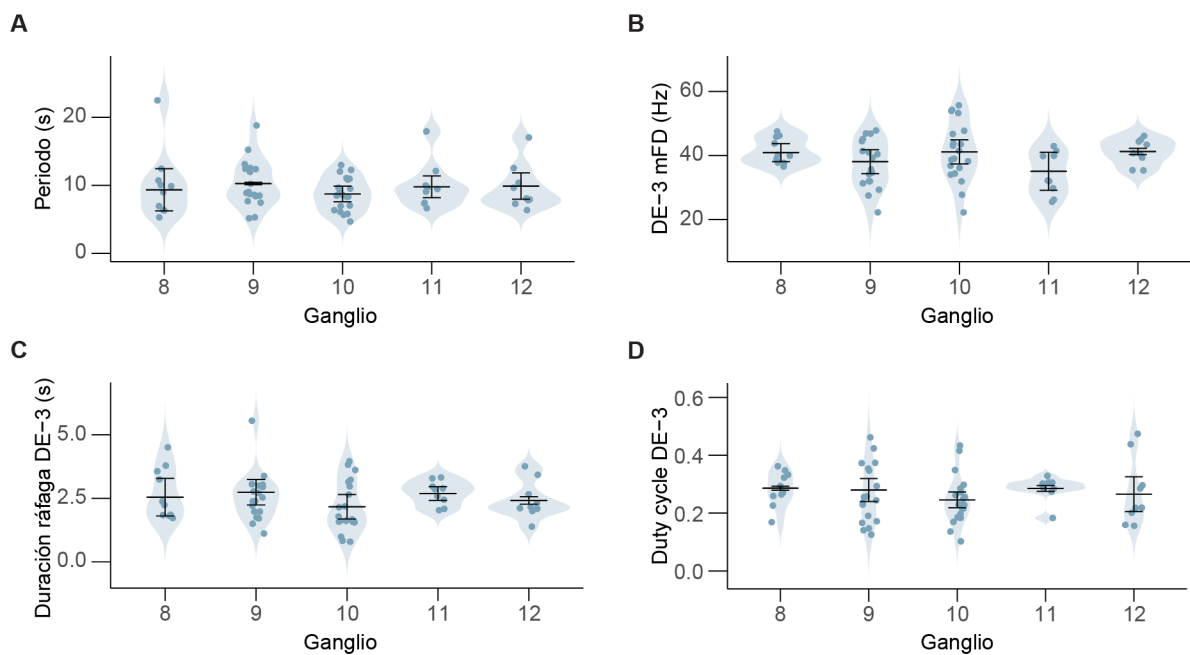


Figura S7. Comparación de características de crawling ficticio entre ganglios sometidos a una inyección de corriente despolarizante sobre NS con distinta posición en la cadena nerviosa. **A.** Periodo del *crawling* (final-a-final) de experimentos realizados en ganglios con distinta posición en la cadena (n = 2 experimentos del ganglio 8, 3 experimentos del ganglio 9, 4 experimentos de ganglio 10, 2 experimentos del ganglio 11, 2 experimentos del ganglio 12; provenientes de 13 sanguijuelas). Cada punto corresponde al valor de cada ciclo de cada experimento individual. Se indican la media de medias $\pm$ EE. No se encontraron diferencias significativas entre ganglios. **B.** Como A pero para la FD media (FDm) de DE-3. **C.** Como A pero para la duración de las ráfagas de DE-3. **D.** Como A pero para el *duty cycle* de DE-3.

Comparación entre secciones durante crawling in vivo

En la sección 3-4, la duración promedio de la contracción fue de $1,12 \pm 0,06$ s, mientras que en la sección 4-5 fue de $1,00 \pm 0,04$ s (Figura S8A-B). El análisis estadístico reveló una diferencia significativa entre las duraciones de la fase entre las secciones, mientras que no se encontraron diferencias entre los *duty cycles* de esta fase entre secciones. Los detalles de los modelos estadísticos realizados se indican en la Tabla 5 del Apéndice. Este resultado, teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias en las duraciones de las ráfagas de disparo de DE-3 entre los ganglios que inervan las secciones estudiadas, sugiere que existe una modulación de la actividad del oscilador dada por la coordinación intersegmental, las señales provenientes de la cabeza y las señales sensoriales.

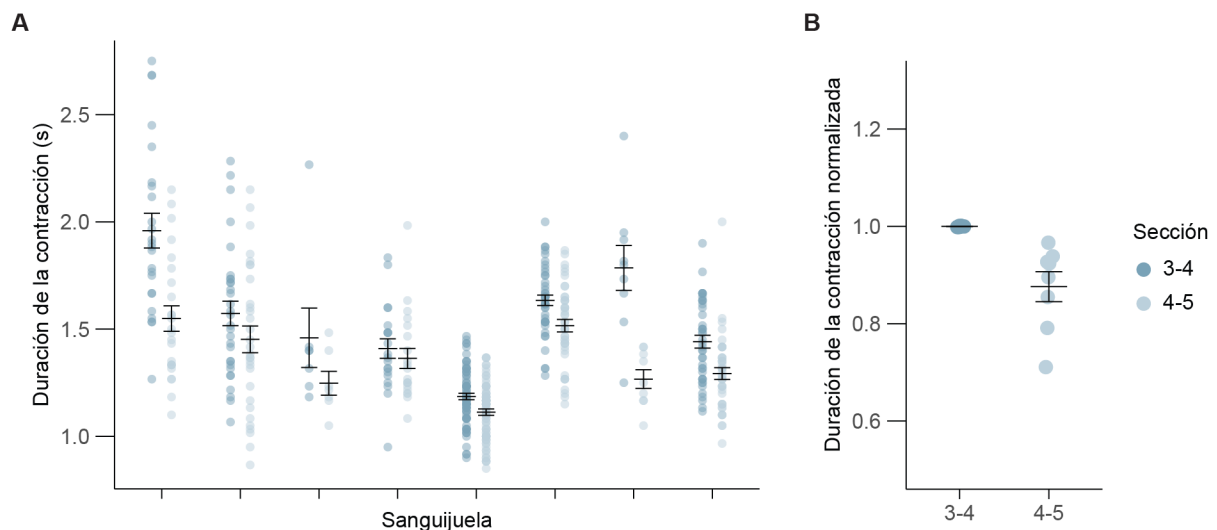


Figura S8. Duración de las etapas de contracción y elongación de las secciones 3-4 y 4-5 durante crawling in vivo. **A.** Duración de la contracción cuantificada considerando la variación de la longitud de las secciones 3-4 y 4-5. La fase de contracción se delimitó como se muestra en la Figura R25. Los puntos corresponden a distintos pasos evaluados en distintas secciones, se indican media $\pm$ EE para cada sección de cada sanguijuela. **B.** Como en A, pero para la duración promedio de cada sección de cada animal, normalizada a la duración de la sección 3-4 promedio para cada animal. (n = 249 pasos correspondientes a 8 sanguijuelas).

REFERENCIAS

- Alonso, I., Sanchez Merlinsky, A., & Szczupak, L. (2020). Phase-Specific Motor Efference during a Rhythmic Motor Pattern. *The Journal of Neuroscience*, 40(9), 1888–1896. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1201-19.2020>
- Alvarez, F. J., & Fyffe, R. E. W. (2007). The continuing case for the Renshaw cell. *The Journal of Physiology*, 584(Pt 1), 31–45. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.136200>
- Ampatzis, K., Song, J., Ausborn, J., & El Manira, A. (2014). Separate microcircuit modules of distinct v2a interneurons and motoneurons control the speed of locomotion. *Neuron*, 83(4), 934–943. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.018>
- Arber, S. (2012). Motor Circuits in Action: Specification, Connectivity, and Function. *Neuron*, 74(6), 975–989. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.011>
- Arber, S. (2017). Organization and function of neuronal circuits controlling movement. *EMBO Molecular Medicine*, 9(3), 281–284. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607226>
- Arber, S., & Costa, R. M. (2018). Connecting neuronal circuits for movement. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6396), 1403–1404. <https://doi.org/10.1126/science.aat5994>
- Ashaber, M., Tomina, Y., Kassraian, P., Bushong, E. A., Kristan, W. B., Ellisman, M. H., & Wagenaar, D. A. (2021). Anatomy and activity patterns in a multifunctional motor neuron and its surrounding circuits. *eLife*, 10, e61881. <https://doi.org/10.7554/eLife.61881>
- Ayali, A., & Lange, A. B. (2010). Rhythmic behaviour and pattern-generating circuits in the locust: Key concepts and recent updates. *Journal of Insect Physiology*, 56(8), 834–843. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.015>
- Baader, A. P. (1997). Interneuronal and motor patterns during crawling behavior of semi-intact leeches. *The Journal of Experimental Biology*, 200(Pt 9), 1369–1381. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.9.1369>
- Baader, A. P., & Kristan, W. B. (1992). Monitoring neuronal activity during discrete behaviors: A crawling, swimming and shortening device for tethered leeches.

- Journal of Neuroscience Methods*, 43(2), 215–223. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(92\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(92)90031-8)
- Baca, S. M., Marin-Burgin, A., Wagenaar, D. A., & Kristan, W. B. (2008). Widespread inhibition proportional to excitation controls the gain of a leech behavioral circuit. *Neuron*, 57(2), 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.028>
- Bagnall, M. W., & McLean, D. L. (2014). Modular organization of axial microcircuits in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6167), 197–200. <https://doi.org/10.1126/science.1245629>
- Barkan, C. L., & Zornik, E. (2019). Feedback to the future: Motor neuron contributions to central pattern generator function. *The Journal of Experimental Biology*, 222(Pt 16), jeb193318. <https://doi.org/10.1242/jeb.193318>
- Bernardo Perez-Etchegoyen, C., Alvarez, R. J., Rodriguez, M. J., & Szczupak, L. (2012). The activity of leech motoneurons during motor patterns is regulated by intrinsic properties and synaptic inputs. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 198(3), 239–251. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0704-z>
- Brodgheuer, P. D., & Friesen, W. O. (1986). Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. I. Output connections of Tr1 and Tr2. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 159(4), 489–502. <https://doi.org/10.1007/BF00604169>
- Brooks, M., Kristensen, K., Benthem, K. van, Magnusson, A., Berg, C., Nielsen, A., Skaug, H., Mächler, M., & Bolker, B. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*. <https://digitalcommons.unl.edu/r-journal/675>
- Brown, A. G. (1911). *Organization in the Spinal Cord: The Anatomy and Physiology of Identified Neurones*. Springer Science & Business Media.
- Burgin, A. M., & Szczupak, L. (2003). Network interactions among sensory neurons in the leech. *Journal of Comparative Physiology A*, 189(1), 59–67. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0377-8>
- Burrows, M. (1992). Local circuits for the control of leg movements in an insect. *Trends in Neurosciences*, 15(6), 226–232. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90040-f](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90040-f)
- Burrows, M., & Siegler, M. V. (1978). Graded synaptic transmission between local interneurons and motor neurones in the metathoracic ganglion of the locust.

- The Journal of Physiology*, 285, 231–255.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012569>
- Büschges, A., Scholz, H., & El Manira, A. (2011). New Moves in Motor Control. *Current Biology*, 21(13), R513–R524. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.029>
- Calabrese, R. L., & Marder, E. (2024). Degenerate Neuronal and Circuit Mechanisms Important for Generating Rhythmic Motor Patterns. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2024>
- Calabrese, R. L., Norris, B. J., & Wenning, A. (2016). The neural control of heartbeat in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 41, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.08.004>
- Carandini, M. (2015). From Circuits to Behavior: A Bridge Too Far? In G. Marcus & J. Freeman (Eds.), *The Future of the Brain* (pp. 177–185). Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400851935-022>
- Carbó Tano, M., Vilarchao, M. E., & Szczupak, L. (2015). Graded boosting of synaptic signals by low-threshold voltage-activated calcium conductance. *Journal of Neurophysiology*, 114(1), 332–340. <https://doi.org/10.1152/jn.00170.2015>
- DeeperCut: A Deeper, Stronger, and Faster Multi-person Pose Estimation Model* | SpringerLink. (n.d.). Retrieved August 8, 2025, from https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-46466-4_3
- Dickinson, M. H., Farley, C. T., Full, R. J., Koehl, M. A., Kram, R., & Lehman, S. (2000). How animals move: An integrative view. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5463), 100–106. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.100>
- Eisenhart, F. J., Cacciatore, T. W., & Kristan Jr, W. B. (2000). A central pattern generator underlies crawling in the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology A*, 186(7), 631–643. <https://doi.org/10.1007/s003590000117>
- El Manira, A. (2023). Modular circuit organization for speed control of locomotor movements. *Current Opinion in Neurobiology*, 82, 102760. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102760>
- Engberg, I., & Lundberg, A. (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiologica Scandinavica*, 75(4), 614–630. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1969.tb04415.x>

- Falgairolle, M., de Seze, M., Juvin, L., Morin, D., & Cazalets, J.-R. (2006). Coordinated network functioning in the spinal cord: An evolutionary perspective. *Journal of Physiology-Paris*, 100(5), 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.003>
- Fan, R.-J., Marin-Burgin, A., French, K. A., & Otto Friesen, W. (2005). A dye mixture (Neurobiotin and Alexa 488) reveals extensive dye-coupling among neurons in leeches; physiology confirms the connections. *Journal of Comparative Physiology A*, 191(12), 1157–1171. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0047-8>
- Flood, T. F., Iguchi, S., Gorczyca, M., White, B., Ito, K., & Yoshihara, M. (2013). A single pair of interneurons commands the *Drosophila* feeding motor program. *Nature*, 499(7456), 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature12208>
- Friesen, W. O., & Hocker, C. G. (2001). Functional analyses of the leech swim oscillator. *Journal of Neurophysiology*, 86(2), 824–835. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.2.824>
- Friesen, W. O., & Kristan, W. B. (2007). Leech locomotion: Swimming, crawling, and decisions. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(6), 704–711. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.006>
- Friesen, W. O., Poon, M., & Stent, G. S. (1976). An oscillatory neuronal circuit generating a locomotory rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(10), 3734–3738. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3734>
- Friesen, W. O., Poon, M., & Stent, G. S. (1978). Neuronal Control of Swimming in the Medicinal Leech: IV. Identification of A Network of Oscillatory Interneurones. *Journal of Experimental Biology*, 75(1), 25–43. <https://doi.org/10.1242/jeb.75.1.25>
- Furshpan, E. J., & Potter, D. D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *The Journal of Physiology*, 145(2), 289–325. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006143>
- Fushiki, A., Zwart, M. F., Kohsaka, H., Fetter, R. D., Cardona, A., & Nose, A. (2016). A circuit mechanism for the propagation of waves of muscle contraction in *Drosophila*. *eLife*, 5, e13253. <https://doi.org/10.7554/eLife.13253>
- Getting, P. A. (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.001153>

- Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: Moving in a new direction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(7), 507–518. <https://doi.org/10.1038/nrn2608>
- Granzow, B., & Kristan, W. B. (1986). Inhibitory connections between motor neurons modify a centrally generated motor pattern in the leech nervous system. *Brain Research*, 369(1), 321–325. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90543-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90543-3)
- Grätsch, S., Büschges, A., & Dubuc, R. (2019). Descending control of locomotor circuits. *Current Opinion in Physiology*, 8, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.007>
- Graubard, K. (1978). Synaptic transmission without action potentials: Input-output properties of a nonspiking presynaptic neuron. *Journal of Neurophysiology*, 41(4), 1014–1025. <https://doi.org/10.1152/jn.1978.41.4.1014>
- Graziano, M. S. A., Taylor, C. S. R., & Moore, T. (2002). Complex movements evoked by microstimulation of precentral cortex. *Neuron*, 34(5), 841–851. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00698-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00698-0)
- Grillner, S. (1975). Locomotion in vertebrates: Central mechanisms and reflex interaction. *Physiological Reviews*, 55(2), 247–304. <https://doi.org/10.1152/physrev.1975.55.2.247>
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: From ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(7), 573–586. <https://doi.org/10.1038/nrn1137>
- Grillner, S., & El Manira, A. (2015). The intrinsic operation of the networks that make us locomote. *Current Opinion in Neurobiology*, 31, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.003>
- Grillner, S., & El Manira, A. (2020). Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion. *Physiological Reviews*, 100(1), 271–320. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2019>
- Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K., & Wikström, M. A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs – roles for the striatum and pallidum. *Trends in Neurosciences*, 28(7), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.05.004>
- Grillner, S., Wallén, P., Brodin, L., & Lansner, A. (1991). Neuronal Network Generating Locomotor Behavior in Lamprey: Circuitry, Transmitters,

- Membrane Properties, and Simulation. *Annual Review of Neuroscience*, 14, 169–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.001125>
- He, K., Zhang, X., Ren, S., & Sun, J. (2016). *Deep Residual Learning for Image Recognition*. 770–778. https://openaccess.thecvf.com/content_cvpr_2016/html/He_Deep_Residual_Learning_CVPR_2016_paper.html
- Hennequin, G., Agnes, E. J., & Vogels, T. P. (2017). Inhibitory Plasticity: Balance, Control, and Codependence. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 557–579. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031005>
- Hill, D. N., Mehta, S. B., & Kleinfeld, D. (2011). Quality Metrics to Accompany Spike Sorting of Extracellular Signals. *Journal of Neuroscience*, 31(24), 8699–8705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0971-11.2011>
- Hooper, S. L. (1997). Phase maintenance in the pyloric pattern of the lobster (*Panulirus interruptus*) stomatogastric ganglion. *Journal of Computational Neuroscience*, 4(3), 191–205. <https://doi.org/10.1023/a:1008822218061>
- Iscla, I., Arini, P. D., & Szczupak, L. (1999). Differential channeling of sensory stimuli onto a motor neuron in the leech. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 184(2), 233–241. <https://doi.org/10.1007/s003590050321>
- Jankowska, E. (2001). Spinal interneuronal systems: Identification, multifunctional character and reconfigurations in mammals. *The Journal of Physiology*, 533(1), 31–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0031b.x>
- Kearney, G. I., Radice, M., Sanchez Merlinsky, A., & Szczupak, L. (2022). *Intersegmental Interactions Give Rise to a Global Network*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.843731>
- Kiehn, O. (2011). Development and functional organization of spinal locomotor circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.09.004>
- Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(4), 224–238. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.9>
- Kishore, S., Bagnall, M. W., & McLean, D. L. (2014). Systematic Shifts in the Balance of Excitation and Inhibition Coordinate the Activity of Axial Motor Pools at

- Different Speeds of Locomotion. *Journal of Neuroscience*, 34(42), 14046–14054.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-14.2014>
- Kondoh, Y., & Hisada, M. (1986). Distribution and ultrastructure of synapses on a premotor local nonspiking interneuron of the crayfish. *The Journal of Comparative Neurology*, 254(2), 259–270.
<https://doi.org/10.1002/cne.902540209>
- Krakauer, J. W., Ghazanfar, A. A., Gomez-Marin, A., MacIver, M. A., & Poeppel, D. (2017). Neuroscience Needs Behavior: Correcting a Reductionist Bias. *Neuron*, 93(3), 480–490. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.041>
- Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, 76(5), 279–327.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.004>
- Kristan, W. B., JR., & Calabrese, R. L. (1976). Rhythmic Swimming Activity in Neurones of the Isolated Nerve Cord of the Leech. *Journal of Experimental Biology*, 65(3), 643–668. <https://doi.org/10.1242/jeb.65.3.643>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82, 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Maaten, L. van der, & Hinton, G. (2008). Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, 9(86), 2579–2605.
- Maaten: Visualizing data using t-SNE - Google Académico. (n.d.). Retrieved August 8, 2025, from https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Visualizing+data+using+t-SNE&author=L.+Van+der+Maaten&author=G.+Hinton&publication_year=2008
- MacQueen, J. (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Statistics: Vol. 5.1* (pp. 281–298). University of California Press. <https://projecteuclid.org/ebooks/berkeley-symposium-on-mathematical-statistics-and-probability/Proceedings-of-the-Fifth-Berkeley-Symposium-on-Mathematical-Statistics-and/chapter/Some-methods-for-classification-and-analysis-of-multivariate-observations/bsmsp/1200512992>

- Manor, Y., Nadim, F., Abbott, L. F., & Marder, E. (1997). Temporal Dynamics of Graded Synaptic Transmission in the Lobster Stomatogastric Ganglion. *The Journal of Neuroscience*, 17(14), 5610–5621. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05610.1997>
- Marder, E. (2009). Electrical Synapses: Rectification Demystified. *Current Biology*, 19(1), R34–R35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.008>
- Marder, E., & Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology: CB*, 11(23), R986–996. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00581-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00581-4)
- Marder, E., Bucher, D., Schulz, D. J., & Taylor, A. L. (2005). Invertebrate Central Pattern Generation Moves along. *Current Biology*, 15(17), R685–R699. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.022>
- Marder, E., & Calabrese, R. L. (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological Reviews*, 76(3), 687–717. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.687>
- Marder, E., & Eisen, J. S. (1984). Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to same physiological inputs and neurotransmitters. *Journal of Neurophysiology*, 51(6), 1362–1374. <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.6.1362>
- Marder, E., & Rehm, K. J. (2005). Development of central pattern generating circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.011>
- Marín-Burgin, A., & Szczupak, L. (2000). Processing of sensory signals by a non-spiking neuron in the leech. *Journal of Comparative Physiology A*, 186(10), 989–997. <https://doi.org/10.1007/s003590000152>
- Mason, A., & Kristan, W. B. (1982). Neuronal excitation, inhibition and modulation of leech longitudinal muscle. *Journal of Comparative Physiology*, 146(4), 527–536. <https://doi.org/10.1007/BF00609449>
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., & Bethge, M. (2018). DeepLabCut: Markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>

- Maynard, D. M., & Selverston, A. I. (1975). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *Journal of Comparative Physiology*, 100(2), 161–182. <https://doi.org/10.1007/BF00613967>
- McLean, D. L., & Dougherty, K. J. (2015). Peeling back the layers of locomotor control in the spinal cord. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.001>
- Miller, W. L., & Sigvardt, K. A. (2000). Extent and Role of Multisegmental Coupling in the Lamprey Spinal Locomotor Pattern Generator. *Journal of Neurophysiology*, 83(1), 465–476. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.1.465>
- Miri, A., Azim, E., & Jessell, T. M. (2013). Edging toward Entelechy in Motor Control. *Neuron*, 80(3), 827–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.049>
- Nath, T., Mathis, A., Chen, A. C., Patel, A., Bethge, M., & Mathis, M. W. (2019). Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nature Protocols*, 14(7), 2152–2176. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0176-0>
- Nicholls, J. G., & Baylor, D. A. (1968). Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology*, 31(5), 740–756. <https://doi.org/10.1152/jn.1968.31.5.740>
- Nicholls, J. G., & Van Essen, D. (1974). The nervous system of the leech. *Scientific American*, 230(1), 38–48. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0174-38>
- Nishimaru, H., Restrepo, C. E., & Kiehn, O. (2006). Activity of Renshaw Cells during Locomotor-Like Rhythmic Activity in the Isolated Spinal Cord of Neonatal Mice. *Journal of Neuroscience*, 26(20), 5320–5328. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5127-05.2006>
- O'Donovan, M. J. (1989). Motor activity in the isolated spinal cord of the chick embryo: Synaptic drive and firing pattern of single motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 9(3), 943–958. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-03-00943.1989>
- Orlovsky, G. N., Deliagina, T. G., & Grillner, S. (1999). General conclusions. In G. Orlovsky, T. G. Deliagina, & S. Grillner (Eds.), *Neuronal Control of Locomotion: From Mollusc to Man* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198524052.003.0020>

- Ort, C. A., Kristan, W. B., & Stent, G. S. (1974). Neuronal control of swimming in the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology*, 94(2), 121–154. <https://doi.org/10.1007/BF00617838>
- Parkis, M. A., Dong, X.-W., Feldman, J. L., & Funk, G. D. (1999). Concurrent Inhibition and Excitation of Phrenic Motoneurons during Inspiration: Phase-Specific Control of Excitability. *The Journal of Neuroscience*, 19(6), 2368–2380. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02368.1999>
- Pearson, K. G., & Wolf, H. (1987). Comparison of motor patterns in the intact and deafferented flight system of the locust. *Journal of Comparative Physiology A*, 160(2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/BF00609731>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., & Cournapeau, D. (n.d.). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *MACHINE LEARNING IN PYTHON*.
- Petersen, P. C., Vestergaard, M., Jensen, K. H. R., & Berg, R. W. (2014). Premotor Spinal Network with Balanced Excitation and Inhibition during Motor Patterns Has High Resilience to Structural Division. *Journal of Neuroscience*, 34(8), 2774–2784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3349-13.2014>
- Poon, M., Friesen, W. O., & Stent, G. S. (1978). Neuronal Control of Swimming in the Medicinal Leech: V. Connexions Between the Oscillatory Interneurons and the Motor Neurons. *Journal of Experimental Biology*, 75(1), 45–63. <https://doi.org/10.1242/jeb.75.1.45>
- Pouzat, C., Mazar, O., & Laurent, G. (2002). Using noise signature to optimize spike-sorting and to assess neuronal classification quality. *Journal of Neuroscience Methods*, 122(1), 43–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00276-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00276-5)
- Puhl, J. G., Masino, M. A., & Mesce, K. A. (2012). Necessary, Sufficient and Permissive: A Single Locomotor Command Neuron Important for Intersegmental Coordination. *Journal of Neuroscience*, 32(49), 17646–17657. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2249-12.2012>
- Puhl, J. G., & Mesce, K. A. (2008). Dopamine activates the motor pattern for crawling in the medicinal leech. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(16), 4192–4200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0136-08.2008>

- Pulver, S. R., Bayley, T. G., Taylor, A. L., Berni, J., Bate, M., & Hedwig, B. (2015). Imaging fictive locomotor patterns in larval *Drosophila*. *Journal of Neurophysiology*, 114(5), 2564–2577. <https://doi.org/10.1152/jn.00731.2015>
- Rela, L., & Szczupak, L. (2003). Coactivation of Motoneurons Regulated by a Network Combining Electrical and Chemical Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 23(2), 682–692. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00682.2003>
- Rela, L., & Szczupak, L. (2007). In Situ Characterization of a Rectifying Electrical Junction. *Journal of Neurophysiology*, 97(2), 1405–1412. <https://doi.org/10.1152/jn.00973.2006>
- Rela, L., Yang, S. M., & Szczupak, L. (2009). Calcium spikes in a leech nonspiking neuron. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(2), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0393-4>
- Richards, K. S., Miller, W. L., & Marder, E. (1999). Maturation of lobster stomatogastric ganglion rhythmic activity. *Journal of Neurophysiology*, 82(4), 2006–2009. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.4.2006>
- Rodriguez, M. J., Alvarez, R. J., & Szczupak, L. (2012). Effect of a nonspiking neuron on motor patterns of the leech. *Journal of Neurophysiology*, 107(7), 1917–1924. <https://doi.org/10.1152/jn.01070.2011>
- Rodriguez, M. J., Perez-Etchegoyen, C. B., & Szczupak, L. (2009). Premotor nonspiking neurons regulate coupling among motoneurons that innervate overlapping muscle fiber population. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(5), 491–500. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0426-7>
- Rosas, F. E., Luppi, A. I., Mediano, P. A. M., Kringelbach, M. L., Pessoa, L., & Turkheimer, F. (2025). Top-down and bottom-up neuroscience: Overcoming the clash of research cultures. *Nature Reviews Neuroscience*, 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41583-025-00946-x>
- Rossignol, S., Dubuc, R., & Gossard, J.-P. (2006). Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiological Reviews*, 86(1), 89–154. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2005>
- Rotstein, H. G., Schneider, E., & Szczupak, L. (2017). Feedback Signal from Motoneurons Influences a Rhythmic Pattern Generator. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(38), 9149–9159. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0756-17.2017>

- Rudomin, P., & Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research*, 129(1), 1–37. <https://doi.org/10.1007/s002210050933>
- Satopaa, V., Albrecht, J., Irwin, D., & Raghavan, B. (2011). Finding a “Kneedle” in a Haystack: Detecting Knee Points in System Behavior. *2011 31st International Conference on Distributed Computing Systems Workshops*, 166–171. <https://doi.org/10.1109/ICDCSW.2011.20>
- Selverston, A. I., & Moulins, M. (1985). Oscillatory neural networks. *Annual Review of Physiology*, 47, 29–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.47.030185.000333>
- Sengupta, M., & Bagnall, M. W. (2023). Spinal Interneurons: Diversity and Connectivity in Motor Control. *Annual Review of Neuroscience*, 46(Volume 46, 2023), 79–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-083122-025325>
- Shaw, B. K., & Jr, W. B. K. (1997). The Neuronal Basis of the Behavioral Choice between Swimming and Shortening in the Leech: Control Is Not Selectively Exercised at Higher Circuit Levels. *Journal of Neuroscience*, 17(2), 786–795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-02-00786.1997>
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., & Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region that May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. *Science*, 254(5032), 726–729. <https://doi.org/10.1126/science.1683005>
- Song, J., Ampatzis, K., Björnfors, E. R., & El Manira, A. (2016). Motor neurons control locomotor circuit function retrogradely via gap junctions. *Nature*, 529(7586), 399–402. <https://doi.org/10.1038/nature16497>
- Staras, K., Kemenes, G., & Benjamin, P. R. (1998). Pattern-Generating Role for Motoneurons in a Rhythmically Active Neuronal Network. *Journal of Neuroscience*, 18(10), 3669–3688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03669.1998>
- Stepien, A. E., Tripodi, M., & Arber, S. (2010). Monosynaptic Rabies Virus Reveals Premotor Network Organization and Synaptic Specificity of Cholinergic Partition Cells. *Neuron*, 68(3), 456–472. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.019>
- Stern-Tomlinson, W., Nusbaum, M. P., Perez, L. E., & Kristan, W. B. (1986). A kinematic study of crawling behavior in the leech, *Hirudo medicinalis*. *Journal*

- of *Comparative Physiology A*, 158(4), 593–603.
<https://doi.org/10.1007/BF00603803>
- Sürmeli, G., Akay, T., Ippolito, G., Tucker, P. W., & Jessell, T. M. (2011). Patterns of Spinal Sensory-Motor Connectivity Prescribed by a Dorsoventral Positional Template. *Cell*, 147(3), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.012>
- Szczupak, L. (2014). Recurrent inhibition in motor systems, a comparative analysis. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2–3), 148–154.
<https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.004>
- Szczupak, L. (2016). Functional contributions of electrical synapses in sensory and motor networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 41, 99–105.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.08.005>
- The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. (1911). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(572), 308–319. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0077>
- The Neurobiology of the Leech. Edited by K. J. Muller, J. G. Nicholls and G. S. Stent. (Pp. 320; illustrated; \$43.20.) Cold Spring Harbor Laboratory: New York. 1981.
- (1982). *Psychological Medicine*, 12(3), 687–687.
<https://doi.org/10.1017/S0033291700056312>
- Tripodi, M., Stepien, A. E., & Arber, S. (2011). Motor antagonism exposed by spatial segregation and timing of neurogenesis. *Nature*, 479(7371), 61–66.
<https://doi.org/10.1038/nature10538>
- Wadepuhl, M. (1989). Depression of Excitatory Motoneurons by A Single Neurone in the Leech Central Nervous System. *Journal of Experimental Biology*, 143(1), 509–527. <https://doi.org/10.1242/jeb.143.1.509>
- Wagenaar, D. A. (2015). A classic model animal in the 21st century: Recent lessons from the leech nervous system. *Journal of Experimental Biology*, 218(21), 3353–3359. <https://doi.org/10.1242/jeb.113860>
- Wilson, D. M. (1961). The Central Nervous Control of Flight in A Locust. *Journal of Experimental Biology*, 38(2), 471–490. <https://doi.org/10.1242/jeb.38.2.471>
- Windhorst, U. (2007). Muscle proprioceptive feedback and spinal networks. *Brain Research Bulletin*, 73(4–6), 155–202.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.03.010>

- Wittenberg, G., & Kristan, W. B. (1992). Analysis and modeling of the multisegmental coordination of shortening behavior in the medicinal leech. I. Motor output pattern. *Journal of Neurophysiology*, 68(5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.5.1683>
- Yang, S. M., Vilarchao, M. E., Rela, L., & Szczupak, L. (2013). Wide propagation of graded signals in nonspiking neurons. *Journal of Neurophysiology*, 109(3), 711–720. <https://doi.org/10.1152/jn.00934.2012>
- Zhen, M., & Samuel, A. D. (2015). *C. elegans* locomotion: Small circuits, complex functions. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.009>
- Zwart, M. F., Pulver, S. R., Truman, J. W., Fushiki, A., Fetter, R. D., Cardona, A., & Landgraf, M. (2016). Selective Inhibition Mediates the Sequential Recruitment of Motor Pools. *Neuron*, 91(3), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.031>