



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESTADOS CEREBRALES EN EL ACOCIL”

T E S I S

que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Presenta:

KARINA MENDOZA ANGELES

Comité Tutorial:

Jesús Hernández Falcón

Fidel Ramón Romero

Thalía Harmony Baillet

Facultad de Medicina



Febrero, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jesús Hernández Falcón su dedicación, compromiso e infinita paciencia al dirigir éste proyecto de tesis.

Mi gratitud también a los doctores Fidel Ramón y Thalía Harmony, miembros de mi comité tutorial, por todas las aportaciones y sugerencias que hicieron al proyecto.

El análisis matemático de los registros no hubiera sido posible sin la asesoría del Dr. Agustín Cabrera Llanos, miembro honorario de mi comité tutorial.

Agradezco también a mis padres, Antonio Mendoza y Graciela Ángeles su confianza incondicional y constante y a mis hermanas, Marisol, Alma y Brenda por su apoyo.

Finalmente agradezco a todos los que con su amistad y compañía lograron que no perdiera el equilibrio mental durante el doctorado. Los de siempre: José Luis, Lorena, Mónica, Isela, Consuelo, Eli, Martha y Sra. Modesta. Los nuevos amigos: Tere, Manuel, Alejandro, Santiago, Roberto y Jesús.

**El siguiente trabajo fue parcialmente financiado
por Facultad de Medicina-UNAM. Proyecto DGAPA IN202207-3**

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Abstract	5
3. Introducción	7
3.1. Estados cerebrales	7
3.2. Actividad eléctrica del cerebro	8
3.3. Vigilia y sueño	11
3.4. Actividad eléctrica en el cerebro del acocil	16
3.5. Sueño en el acocil	17
3.6. Análisis en tiempo-frecuencia	20
3.6.1. Transformada de Fourier en corto tiempo	20
3.6.2. Transformada Gabor	21
3.6.3. Transformada wavelet	21
3.7. Anatomía del sistema nervioso del acocil	22
4. Hipótesis	26
5. Diseño Experimental	28
6. Material y Métodos	29
6.1. Material biológico	29
6.2. Identificación de estados cerebrales	29
6.2.1. Preparación biológica	29
6.2.2. Registros conductuales y electrofisiológicos	29
6.2.3. Análisis de los registros conductuales	30
6.2.4. Análisis de los registros de actividad eléctrica cerebral	30
6.3. Mapeo cerebral	33
6.3.1. El electrodo	33
6.3.2. Preparación biológica	33
6.3.3. Registros electrofisiológicos	34
6.3.4. Análisis de los registros	35
6.4. Comparación entre preparaciones	35
6.5. Bloqueo de las entradas sensoriales	36
6.5.1. Preparación biológica	36
6.5.1.1. Bloqueo del sistema visual	37
6.5.1.2. Bloqueo del sistema olfatorio	37
6.5.2. Registros conductuales y electrofisiológicos	37
6.5.3. Análisis de los registros conductuales y electrofisiológicos	38

7. Resultados	39
7.1. Identificación de estados cerebrales	39
7.1.1. Análisis de los registros conductuales	39
7.1.2. Análisis de los registros eléctricos	41
7.1.2.1. Análisis tiempo-frecuencia	43
7.1.2.2. Análisis de las transiciones de posición	51
7.1.2.3. Análisis de agrupamientos	53
7.2. Mapeo cerebral	56
7.2.1. Registros	57
7.2.2. Transformada wavelet	63
7.2.3. Conteo de espigas	64
7.3. Comparación entre las preparaciones	66
7.4. Bloqueo de entradas sensoriales	73
7.4.1. Bloqueo de entradas visuales	73
7.4.2. Bloqueo de entradas olfatorias	76
8. Discusión	80
8.1. Identificación de estados cerebrales	80
8.1.1. Análisis con transformada wavelet	82
8.1.2. Análisis de agrupamientos	84
8.2 Mapeo Cerebral	85
8.2.1. Preparación de acocil suspendido	85
8.2.2. Secuencia de sincronización del cerebro durante el sueño	86
8.3. Origen de las ondas lentas	87
8.3.1. El complejo central como oscilador y centro de relevo	88
8.4. El sueño en el acocil como un proceso pasivo	89
9. Conclusiones	92
10. Referencias	94
11. Anexos	101
11.1. Anexo 1: Principio de incertidumbre de Heisenberg	101
11.2. Anexo 2: K-Means	103
11.3. Anexo 3: Redes Competitivas	106
11.4. Anexo 4: Publicaciones derivados de ésta tesis	111

1. RESUMEN

Desde el punto de vista de la neuroetología se define un estado cerebral como la conjunción de una conducta especie-específica claramente identificable acompañada de un patrón de actividad eléctrica cerebral característico. En el acocil se han descrito dos estados cerebrales: sueño y vigilia. El estado de sueño se caracteriza por una posición estereotípica (de lado en la superficie del agua), un incremento en el umbral a estímulos mecánicos, ausencia de señales eléctricas de procesos cognitivos (potenciales al estímulo omitido y potenciales evocados visuales) y una actividad eléctrica cerebral específica compuesta por ondas lentas con frecuencias en el intervalo de 15 a 20 Hz. En el acocil alerta, deambulante o parado el registro de la actividad eléctrica del cerebro muestra numerosas espigas de diferentes tamaños sobrepuestas a una línea de base plana.

El objetivo de este trabajo fue aplicar técnicas de análisis tiempo-frecuencia en el estudio, identificación y caracterización de estados cerebrales en el acocil. Para ello registré de manera simultánea la posición y la actividad eléctrica cerebral de acociles con electrodos implantados crónicamente en regiones cerebrales claramente identificadas. Para el análisis tiempo-frecuencia utilicé inicialmente técnicas convencionales (transformada rápida de Fourier y transformada Gabor), los resultados mostraron que, como la señal originada en el cerebro no es de carácter estacionario, estas técnicas no describen por completo la actividad eléctrica cerebral. Por ello, apliqué un análisis con transformada Wavelet que me permitió caracterizar los estados cerebrales. En el estado de vigilia se encuentra potencia elevada y homogénea en todas las frecuencias exploradas (0 - 60 Hz); el estado de sueño se caracteriza por una reducción en la potencia de la banda de 30 - 45 Hz, que se presenta unos dos minutos después de que el animal se pone de lado y desaparece cuando adquiere la posición de vigilia.

Una vez identificados y caracterizados los estados cerebrales de vigilia y sueño, determiné de dónde provienen las ondas lentas de sueño y en qué secuencia ocurren los cambios en la actividad eléctrica cerebral. Para ello obtuve un mapa de

la actividad eléctrica cerebral durante el sueño. Los resultados sugieren que las ondas lentas se generan en el complejo central del cerebro del acocil. La comparación entre el animal deambulante y el mapeo cerebral, mediante un algoritmo que usa transformada wavelet y redes neuronales, me permitió comprobar que la actividad generada en el complejo central es igual a la actividad de ondas lentas que aparece en otras áreas del cerebro del acocil durante el sueño. Esto puede significar que la sincronización de las áreas cerebrales es un proceso pasivo que resulta del cese en el procesamiento de las entradas sensoriales. Para verificar esta posibilidad bloqueé la visión y la olfacción. Los resultados de este análisis sugieren que el complejo central del cerebro del acocil funciona como centro de relevo de señales visuales y olfatorias que son bloqueadas por esta región durante el sueño y, que el sueño en el acocil parece ser un proceso pasivo que se desencadena con el bloqueo de las entradas sensoriales en o cerca del complejo central del cerebro.

2. ABSTRACT

Neuroethology defines a brain state as the conjunction of a clearly identifiable species-specific behavior and a pattern of brain electrical activity. In crayfish, two brain states have been described: awake and sleep. Sleep state is characterized by a stereotypical position (lying on one side at the surface of the water), an increase in the threshold to mechanical stimuli, the absence of electrical signals of cognitive processes (omitted stimulus potentials and visual evoked potentials) and a specific brain electrical activity composed by slow waves with frequencies between 15 and 20 Hz. Brain electrical activity from alert crayfish shows numerous spikes of different sizes superimposed on a flat base line.

The aim of this work was to apply a time-frequency analysis to the identification and characterization of crayfish brain states. I recorded simultaneously position and brain electrical activity from crayfish with electrodes chronically implanted on brain regions clearly identified. For the time-frequency analysis I initially used conventional techniques (Fast Fourier and Gabor Transforms). Because the brain electrical activity is non stationary, these techniques did not describe completely the brain electrical activity. Therefore, I used a wavelet transform analysis that allowed me to characterize awake and sleep states. The awake state is characterized by high and homogenous power for the explored frequencies (0 - 60 Hz); the sleep state is characterized by a reduction in the power for frequencies from 30 to 45 Hz that appears about two minutes after the animal lies on one side, and disappears when the animal stands up.

Once identified and characterized awake and sleep states I mapped the brain electrical activity from restrained animals. Results suggest that slow waves are generated by the central complex of the brain. The comparison between these preparations - restrained and unrestrained (using an algorithm that combines wavelet transform and artificial neuronal networks) allowed me to verify that the central complex activity is equivalent to the slow wave activity that spreads to other areas of the crayfish brain during sleep. This could mean that brain

synchronization is a passive process due to the cease of sensorial inputs. In order to verify this possibility I blocked vision and olfaction in chronically implanted animals. Results of these experiments suggest that the central complex of the crayfish brain works like a center of relay for visual and olfactory signals, and that they are blocked, in some way, during sleep; this can be interpreted as that in crayfish sleep seems to be a passive process triggered by the blockage of sensory inputs in or near the central complex of the brain.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Estados cerebrales

El cerebro, el órgano corporal más complejo, es sin duda el que da identidad conductual y de conciencia a los animales. En los inicios de la medicina los egipcios encontraron relaciones entre el cerebro y la conducta. El papiro Edwin Smith, de contenido quirúrgico (que data de 1700 a.C. y que a su vez es una copia de un documento aún más antiguo), sugiere que comportamientos humanos anormales debidos a patologías como son las afasias, parálisis y ataques epilépticos son originados en el cerebro (Bullock, 1993). Sin embargo, es hasta mediados de la década de 1960 cuando formalmente surge la Neuroetología, cuyo objetivo consiste en encontrar la base neuronal de comportamientos específicos de cierta especie (Bullock, 1993). En ese momento surge también el concepto de estado cerebral. Este consiste en un patrón de actividad cerebral característico de una cierta condición conductual específica de la especie y está anclado a un fenómeno cuantificable y repetible: la actividad eléctrica registrada de la superficie del cerebro, es decir el electroencefalograma. Es necesario diferenciar el estado cerebral del “estado mental”, entidad psicológica en la que se plantea una “disyuntiva” mente-cerebro, que es subjetiva y no cuantificable.

El propósito de este trabajo es identificar y caracterizar los estados cerebrales asociados a las conductas del sueño y la vigilia en un invertebrado relativamente simple, el acocil. De acuerdo con la definición que enuncié en líneas previas, para que estas dos conductas sean consideradas estados cerebrales distintos deben tener patrones de actividad eléctrica cerebral también distintos. Por lo cual para cumplir con el propósito del trabajo, es necesario obtener registros de la actividad eléctrica del cerebro de acociles que manifiesten estas conductas de manera espontánea.

En los párrafos que siguen haré, primero, una revisión sucinta de la actividad eléctrica del cerebro y del ciclo sueño-vigilia en los vertebrados y en el acocil y de los principales métodos de análisis de las señales eléctricas cerebrales, y después

revisaré los principales detalles anatómicos del cerebro del acocil para poner en contexto los resultados experimentales.

3.2. Actividad eléctrica del cerebro

La actividad eléctrica cerebral se puede registrar mediante diversas técnicas: electrodos implantados a diferentes profundidades del cerebro, colocados en la superficie cortical o bien, en el cuero cabelludo. El tipo de registro dependerá del electrodo utilizado y del lugar de registro de la actividad neuronal. El análisis de estas señales también dependerá de diversos factores que trataré en párrafos posteriores.

Para estudiar los estados cerebrales en el vertebrado la técnica más empleada es la electroencefalografía. Desarrollada por Hans Berger en 1929 (Fisch, 1991), consiste en registrar la actividad eléctrica del cerebro mediante electrodos colocados en la superficie del cuero cabelludo. La señal obtenida (Figura 3.1) representa la suma espacial y temporal de diferencias de potencial debidas a corrientes sinápticas, principalmente de células piramidales, cuyas dendritas atraviesan todas las capas de la corteza y permiten el flujo de esas corrientes desde capas profundas de la corteza a capas más superficiales. Estas neuronas están orientadas en paralelo unas con otras facilitando la suma espacial. La corriente está limitada por la corteza, sin embargo una pequeña fracción penetra a través de las meninges y el cráneo, llegando al cuero cabelludo, donde debido a la propia anatomía del cráneo se registran diferentes niveles de potencial, dependiendo del área en que se coloquen los electrodos (Fisch, 1991). Estas diferencias de potencial tienen amplitudes de 10 a 100 μV , pueden ser registradas por dos electrodos en configuración diferencial y reciben el nombre de electroencefalograma (EEG).

El EEG de un humano, despierto o en descanso comúnmente está conformado por una actividad rítmica, debida a interacciones corticotalámicas.

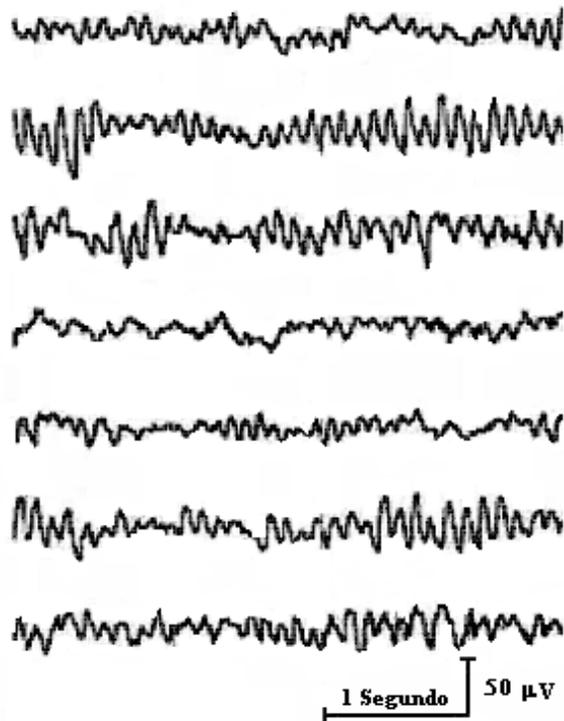


Figura 3.1. Registro típico de EEG humano (Modificada de del Águila, 1994).

Con la finalidad de caracterizar los ritmos del EEG, Dietsch (1932) introdujo el análisis de Fourier (Ec. 3.1), que establece que una señal periódica y estacionaria se puede representar con una suma de señales exponenciales de frecuencias definidas, formando un espectro de frecuencias.

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-j\omega t} dt \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde:

$f(t)$ es una función definida en tiempo

$F(\omega)$ es una función definida en frecuencia

$e^{-j\omega t} = \cos(\omega t) + j\text{sen}(\omega t)$, identidad de Euler

Para implementar en forma práctica la Transformada de Fourier mediante el uso de computadoras, a mediados de la década de los sesenta James W. Cooley y John Tukey desarrollaron un algoritmo denominado Transformada Rápida de Fourier (TRF), que simplifica el análisis de Fourier al considerar la suma de señales exponenciales finitas y eliminar información redundante (Cooley y Tukey, 1965). Posteriormente Matousek y Petersen (1973) introdujeron la TRF en el estudio del EEG y sus hallazgos confirmaron resultados previos y permitieron construir espectrogramas (Figura 3.2), de manera rápida y confiable.

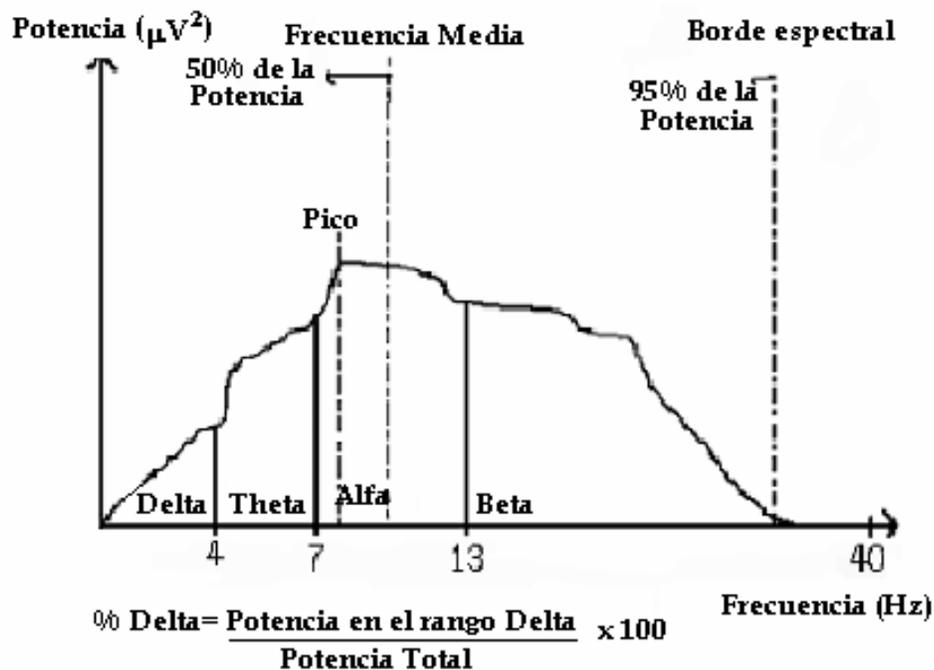


Figura 3.2. Análisis del EEG mediante TRF (Modifica de del Águila, 1994).

Estos resultados permitieron asignar valores a la clasificación cualitativa que ya existía y convertirla en una clasificación cuantitativa de las ondas del EEG (Figura 3.3). En el trazado electroencefalográfico se estudia fundamentalmente el número de ondas por segundo (frecuencia), su amplitud (diferencia de potencial en μV) y su distribución topográfica según las diferentes áreas cerebrales. A partir del análisis de las frecuencias, se distinguen cuatro ritmos fundamentales que son: el delta de frecuencia entre 1 y 4 Hz, el theta entre 4 y 8 Hz, el alfa que es la

frecuencia dominante en el adulto y va de 8 a 12 Hz, y el beta que varía entre los 12 y los 30 Hz.

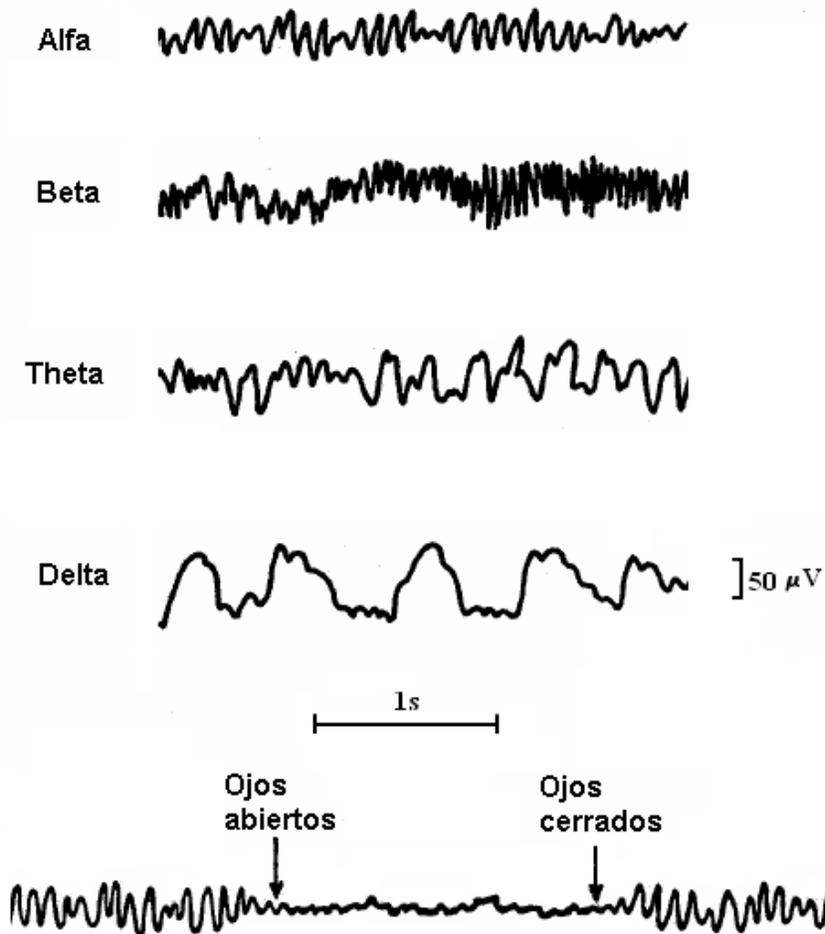


Figura 3.3. Ondas características del EEG (Modificada de del Águila, 1994).

El EEG se ha utilizado ampliamente para el estudio de los diferentes estados cerebrales.

3.3. Vigilia y sueño

La vigilia es un estado en el cual el individuo está consciente del ambiente que le rodea y tiene la capacidad de interactuar con él, respondiendo a los estímulos que recibe. Cuando la persona se encuentra despierta con los ojos abiertos, la actividad electroencefalográfica se caracteriza por ritmo beta en las regiones frontal

y temporal y ritmo alfa en la región occipital; cuando el sujeto cierra los ojos el ritmo beta de la región frontal disminuye considerablemente, mientras que el ritmo alfa se extiende hacia las regiones temporal y frontal.

En 1913 se estableció la base para definir el sueño en los mamíferos a partir de criterios conductuales (Pièron, 1913). Estos criterios consisten en: a) la adopción de una posición estereotípica de la especie; b) inmovilidad; c) una elevación en el umbral de respuesta a estímulos sensoriales (que puede reflejarse en un incremento en la intensidad o en la frecuencia del estímulo necesario para generar una respuesta, o bien en un aumento en la latencia de ésta) y; d) una rápida reversibilidad de esta conducta por medio de estimulación sensorial. Posteriormente, mediante registros de la actividad eléctrica cerebral simultáneos a observaciones conductuales, se establecieron criterios electrofisiológicos que permiten discriminar los estados de sueño de los de vigilia.

En 1953, con los trabajos de Aserinsky y Kleitman (1953), quedó bien establecida la existencia de dos tipos de sueño. El denominado sueño con movimientos oculares rápidos (MOR), también llamado sueño paradójico u onírico y el sueño no-MOR, también llamado sueño de ondas lentas, el cual se divide en cuatro etapas tomando como parámetros para cada una de ellas las características del EEG.

En la primera fase del sueño de ondas lentas, cuya duración fluctúa de 1-7 minutos, la actividad eléctrica del cerebro es escasa y el EEG está compuesto principalmente de ondas de baja frecuencia (3-7 Hz). La fase 2 se caracteriza por los denominados "complejos K" o husos del sueño (12-14 Hz), así como por la aparición de escasos movimientos oculares; su duración es de 10 a 25 minutos y ocasionalmente aparecen ondas de alto voltaje. Durante la fase 3 aparecen ondas delta con una amplitud mayor a 75 μ V, pero de frecuencia muy baja (0.5-2 Hz); esta etapa dura pocos minutos y es un estado de transición hacia la etapa 4. La fase 4 dura de 20 a 40 minutos y en ella se incrementan las ondas delta.

Aunque diversos autores difieren en la forma de organizar el sueño en el humano, debido a que existen importantes variaciones entre los individuos, se considera que el sueño está organizado en ciclos de sueño-MOR sueño-NoMOR. En general, cada ciclo dura unos 90 minutos de los cuales el sueño MOR ocupa 5-10 minutos. En una noche los ciclos se presentan de 4 a 6 veces. Cabe destacar que el sueño MOR es fundamental para lograr el efecto reparador físico asociado al dormir (Kandel, 2000).

Históricamente el sueño se consideró un estado pasivo; en 1935 Bremer postuló para la vigilia un mecanismo activo dependiente de las aferencias específicas visuales, auditivas y somáticas (Bremer, 1935). Posteriormente, Giuseppe Moruzzi y Horace W. Magoun, demostraron que la formación reticular era la responsable de la vigilia al estimular eléctricamente esta zona en un individuo dormido y registrar patrones electroencefalográficos de vigilia, demostrando que el sueño es un proceso tan activo como lo es la vigilia (Moruzzi y Magoun, 1949).

Actualmente se considera que el sueño es un proceso activo durante el cual se llevan a cabo procesos fisiológicos para el buen funcionamiento del cuerpo, como sería el caso del sistema endocrino, el cual durante el sueño secreta prolactina y hormona del crecimiento. Otras evidencias muestran que la secreción de glucosa e insulina se incrementa durante el sueño, así como los niveles de testosterona. En cuanto al sistema inmune se ha visto que los niveles de interleucina-1 se incrementan durante el sueño y llegan a un pico al inicio del sueño de ondas lentas (Graves y cols., 2001).

¿Por qué dormimos? Esta es una pregunta formulada hace mucho tiempo y que aún no tiene una respuesta satisfactoria. El sueño es un estado cerebral que tiene una expresión en la conducta del individuo y que, además, se repite con una frecuencia circadiana en la mayor parte de los vertebrados en los que se ha estudiado. Dormir es vital para los animales y su privación prolongada en animales experimentales, da como resultado la muerte (Rechtschaffen y cols.,

1989). De hecho, la importancia del sueño es subrayada por el hecho de que es una condición durante la cual el animal se encuentra indefenso.

Como ya mencioné, el sueño es esencial para el funcionamiento normal del individuo y se ha propuesto que cumple distintas funciones, entre las que están: un papel restaurador, la adaptación a las condiciones ambientales, el actuar como un reforzador del aprendizaje y para consolidar la memoria. La hipótesis que plantea el sueño como un proceso reparador sugiere que dicho estado es una forma básica de restaurar lo que el cuerpo o el cerebro han gastado durante el día, ya que existen cambios hormonales que lo sustentan (Aldrich, 1999; Muzur, 2005).

Las hipótesis que proponen funciones adaptativas plantean que el sueño permite adecuarse a los cambios en el medio ambiente y que juega un papel importante en la conservación de la energía o en la regulación térmica; uno de los datos que apoyan esta hipótesis se encuentra en la disminución de la temperatura del cuerpo de 1 a 2 °C al inicio del sueño y que es controlada por las neuronas del núcleo preóptico del hipotálamo, el cual actuaría como un termostato (Krueger y cols., 1999; Krueger y Obal, 2003). Sin embargo esta hipótesis pierde consistencia al considerar que animales ectotermos como las lagartijas y los cocodrilos también duermen (Flanigan y cols., 1971; Ayala-Guerrero y Reyna, 1987; Ayala-Guerrero y Huitrón-Reséndiz, 1991).

Otra de las funciones atribuidas al sueño, y especialmente al sueño MOR, es la maduración del cerebro en etapas tempranas de la ontogenia, en particular de animales neoténicos, en parte debido a la cantidad de horas que duermen durante el día. Los animales en el periodo prenatal o inmaduros duermen más que cuando son maduros (Roffwarg y cols., 1966), aunque esto no se aplica a todos los mamíferos, pues en cetáceos recién nacidos no se observan los largos periodos de sueño que se registran en los recién nacidos terrestres (Siegel, 2005). Por último, se ha considerado que el sueño MOR consolida el aprendizaje y la memoria de las experiencias diarias (Graves y cols., 1999). La existencia de hipótesis tan disímiles

demuestra que no existen consensos, ni una idea clara sobre cuál o cuáles son las funciones del sueño.

Las interrogantes respecto a la función del sueño se profundizan en cuanto se mira la amplia distribución del sueño en la escala filogenética. Inicialmente, el sueño se consideró exclusivo de los mamíferos, sin embargo ya en un estudio realizado por Campbell y Tobler en 1984, se describen evidencias de que conductas de tipo sueño (analizadas solamente en sus aspectos de comportamiento), se presentan en 19 especies de peces, 16 de reptiles y 9 de anfibios, así como en varios invertebrados. Los criterios de análisis fueron las posturas estereotípicas o específicas de la especie, la inmovilidad, un umbral elevado para despertar, así como la reversibilidad de este estado con la estimulación de distintas modalidades sensoriales. Este estado conductual de quietud se ha corroborado en un gran número de especies de vertebrados en los que existen pruebas electrofisiológicas de los dos tipos de sueño, MOR y de ondas lentas, aunadas a multitud de cambios en actividades dependientes del sistema nervioso autónomo, como frecuencia cardiaca, respiratoria, temperatura, y en la liberación de diversas hormonas. Además, en muchos de estos casos el sueño está íntimamente ligado con la actividad circadiana del individuo y presenta un patrón en algunas especies, aunque no es la norma.

En algunas especies de cetáceos se han demostrado patrones EEG de vigilia en la actividad cerebral en un hemisferio, aunados a patrones EEG de sueño en el otro hemisferio cerebral, sin que ello se acompañe de una conducta de inmovilidad del animal. Otro caso, igual de significativo, es el de algunas aves migratorias en las que existe sueño unihemisférico mientras vuelan. En ambos casos, el hemisferio que duerme es el que se encuentra alejado del grupo y el despierto es el que mantiene el contacto con el resto de éste. En la mayoría de las aves, los episodios de sueño son muy cortos, el sueño NO MOR suele tener una duración promedio de 150 segundos y el sueño MOR de 9 segundos y la mayoría no pierden el tono muscular durante el sueño MOR, como sucede con los mamíferos (Siegel, 2005).

Una característica común durante el sueño en los vertebrados es la aparición de ondas lentas, que indican la sincronización de grandes grupos neuronales, sin embargo, en la mayoría de los animales estudiados el sueño no es un estado cerebral uniforme y estático.

Los invertebrados representan un grupo de gran variedad de organismos, con planes corporales mucho más diversos que los de los vertebrados, pero con tamaños corporales, por lo regular, pequeños (a excepción de algunos moluscos, como el calamar y el pulpo). En este grupo se han descrito muchas conductas de reposo, que se han analizado más en la óptica de los ritmos circadianos que en la de sueño. Se han descrito estados de tipo sueño en algunos invertebrados como escorpiones (Tobler y Stalder, 1988), moscas (Hendricks y cols., 2000; Shaw y cols., 2000; Shaw y Franken, 2003; Greenspan y cols., 2001), avispas (Klein y cols., 2003) y abejas (Kaiser, 1988; Sauer y cols., 2003). Sin embargo es difícil registrar la actividad eléctrica del cerebro de invertebrados deambulantes y sólo algunas especies han sido analizadas con detalle. Por ello, los cambios conductuales no se han correlacionado con la actividad eléctrica cerebral, aunque en algunos casos se han mostrado modificaciones en la actividad cardíaca y respiratoria.

3.4. Actividad eléctrica en el cerebro del acocil

El acocil se ha usado como modelo de estudio de algunas funciones cerebrales de las llamadas 'complejas', debido a que en éste crustáceo es posible colocar electrodos extracelulares que descansan en la superficie del cerebro y mantenerlos durante periodos prolongados en el animal deambulante (Hernández y cols., 1996). De esta manera se han registrado potenciales evocados de tipo visual, respuestas a estímulos omitidos - potenciales al estímulo omitido - y señales asociadas con el procesamiento de información visual (Hernández-Falcón y cols., 1999). Es en esta preparación en la que recientemente se descubrió la presencia de sueño de ondas lentas (Ramón y cols., 2004).

La actividad eléctrica del cerebro de un acocil inmóvil muestra un patrón altamente variable de espigas de diferentes magnitudes sobre una línea base prácticamente plana o con oscilaciones esporádicas de muy bajo voltaje. Dependiendo del sitio de colocación del electrodo de registro es posible obtener potenciales evocados, por ejemplo visuales (VEPs por sus siglas en inglés), o potenciales al estímulo omitido (OSPs por sus siglas en inglés). Los VEPs son espigas ligadas estrechamente a características del estímulo, mientras los OSPs no están estrechamente ligados al estímulo sino a las condiciones del animal.

Mientras el animal deambule o interactúe con el medio, sea explorando el entorno o interactuando con otros acociles, la actividad eléctrica del cerebro presenta las mismas características. Esto no ocurre cuando el animal duerme.

3.5. Sueño en el acocil

Desde el punto de vista conductual, en el acocil se observan periodos de reposo caracterizados por inmovilidad en una posición estereotípica (de lado en la superficie del agua en condiciones de laboratorio), durante los cuales hay un incremento en el umbral a estímulos mecánicos, ausencia de las señales eléctricas que indican procesos cognitivos (potenciales al estímulo omitido) y cambios en el patrón de actividad eléctrica cerebral. Esta conducta ha sido definida como sueño, en la medida que cumple con los criterios convencionales. En condiciones de laboratorio, los acociles la adoptan con frecuencia y duración variables que no parecen depender de la hora del día (Figura 3.4; Ramón y cols., 2004).

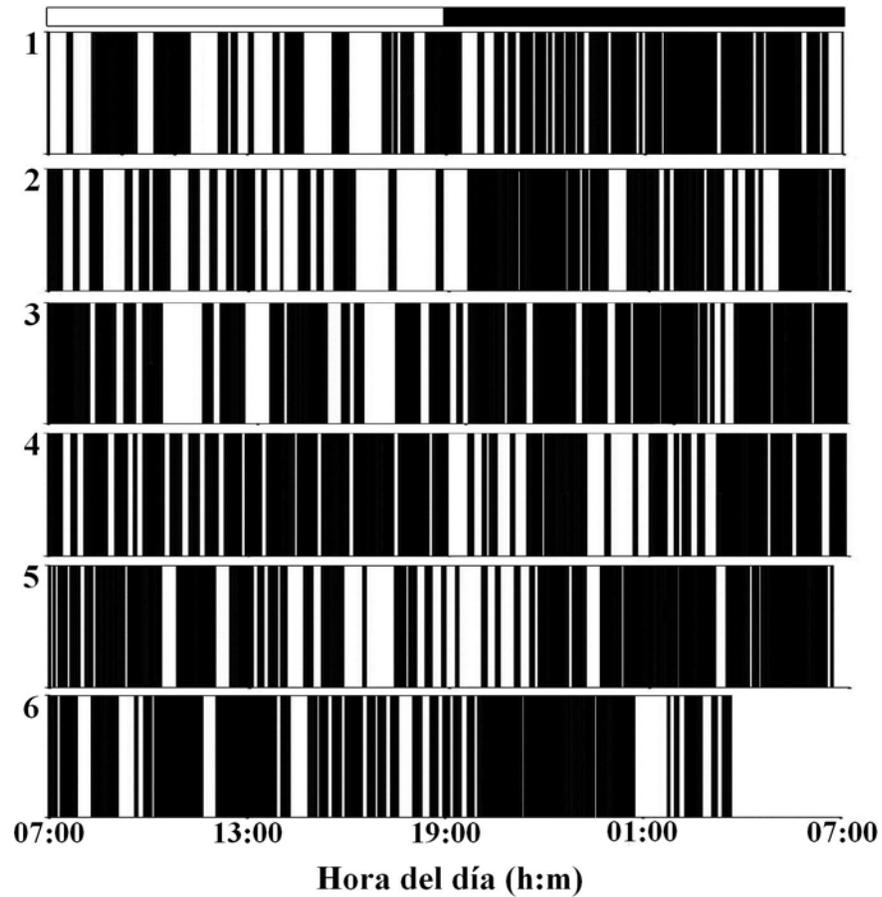
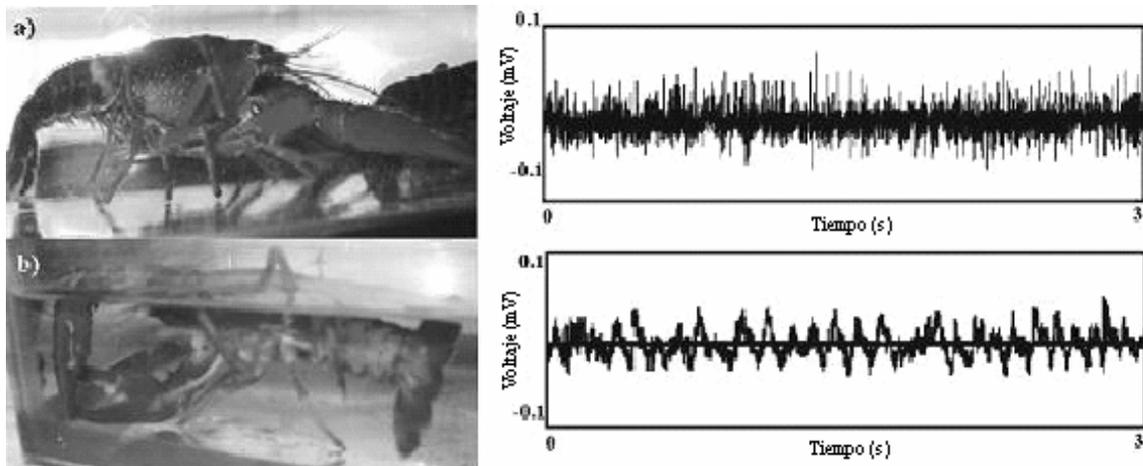


Figura 3.4. Periodos de sueño de un acicil (barras oscuras) durante un periodo de 6 días.

En el animal alerta (Figura 3.5a), el registro extracelular obtenido de la superficie del cerebro, muestra numerosas espigas de diferentes tamaños, superpuestas a una línea basal plana. En el acicil dormido, (Figura 3.5b) las espigas son sustituidas por ondas lentas con frecuencias de entre 15 y 20 Hz.



**Figura 3.5. Posiciones del acocil y su actividad cerebral correspondiente.
a) animal alerta; b) animal dormido.**

Las ondas lentas en el acocil dormido no tienen una morfología constante e incluso el sueño no parece tener las mismas características en todos los casos, ya que en algunos momentos el animal presenta movimientos rítmicos de quelas o de patas ambulatorias.

Este descubrimiento mueve las preguntas referentes al origen y función del sueño a otro nivel filogenético. El sueño en el acocil refuerza la idea de que ésta actividad desempeña una función básica para todos los animales, por lo que el uso de este animal como modelo puede proveer de algunas herramientas para entender su propósito.

Para analizar señales eléctricas cerebrales existen herramientas como la transformada de Fourier que, sin embargo, parten de supuestos matemáticos que no necesariamente se cumplen en las señales que registramos del cerebro del acocil. La transformada de Fourier permite obtener información sobre cómo está distribuida la energía de una señal a través de sus distintos componentes de frecuencia. Sin embargo, no puede ser aplicada con el objeto de obtener información precisa de señales cuyo contenido espectral varía con el tiempo, es decir, señales cuasi-estacionarias o no estacionarias.

Estados cerebrales como son las fases de sueño y el estado anestésico involucran actividad eléctrica con bruscos cambios de voltaje en cortos intervalos

de tiempo. En estas circunstancias el EEG presenta parámetros estadísticos variantes en el tiempo y la TRF no permite analizar esta dinámica.

3.6. Análisis en tiempo-frecuencia

Un proceso físico puede ser descrito en el dominio del tiempo (t) mediante valores representados por una función del tiempo $f(t)$. También es posible describir el mismo proceso en el dominio de la frecuencia (ω), mediante una serie de amplitudes representadas por $F(\omega)$. La transformada rápida de Fourier (TRF) es una herramienta con la capacidad de representar este proceso, tanto en el dominio del tiempo como en el dominio de la frecuencia. Sin embargo, debido a que está definida globalmente, sólo es válida para señales estacionarias, es decir, para aquellas cuyos parámetros estadísticos permanecen constantes a lo largo del tiempo. Para analizar señales no estacionarias, han surgido representaciones tiempo-espectrales ($t - \omega$) como la transformada de Fourier en corto tiempo (TFCT), la transformada Gabor y la transformada wavelet (TW), entre otras (Goswami y Chan, 1999).

3.6.1. Transformada de Fourier en corto tiempo

La transformada de Fourier en corto tiempo, definida por la ecuación 3.2, se basa en el hecho de que al tomar pequeños segmentos de una señal $f(t)$ es posible asumir que dicho segmento es estacionario y por lo tanto, calcular su transformada de Fourier.

$$G_{\phi} f(b, \xi) := \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{\phi_{b, \xi}(t)} dt \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde, $\phi_{b, \xi}(t) = \phi(t - b)e^{j\xi t}$ es la ventana tiempo-espectral.

En esta representación, la elección del tamaño de la ventana es crítica para la resolución. Si se desea obtener buena resolución en tiempo, es necesario elegir una ventana pequeña, mientras que para obtener buena resolución en frecuencia es necesario utilizar una ventana grande (Principio de incertidumbre de Heisenberg)¹.

3.6.2. Transformada Gabor

La transformada Gabor (Ec. 3.3) es un tipo especial de TFCT, en la que el principio de incertidumbre se lleva al mínimo al utilizar una ventana gaussiana.

$$G_{\phi} f(b, \xi) := \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{g_{\alpha}(t-b)} e^{-j\xi t} dt \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde, $g_{\alpha} = \frac{1}{2\pi\alpha} e^{-\frac{t^2}{4\alpha}}$

3.6.3. Transformada wavelet

La transformada wavelet es un método que proporciona buena resolución en tiempo y frecuencia en cualquier ubicación del plano $t-\omega$ (Mallat, 1989; Schiff y cols., 1994; Quiroga y cols., 2001; Durka y Blinowska, 2001). En otras palabras, tenemos una ventana que decrece en el tiempo mientras analizamos los componentes de alta frecuencia e incrementa en el tiempo para analizar los componentes de baja frecuencia de la señal.

La TW de una función $f(t) \in L^2$ se define como:

$$W_{\psi} f(b, a) := \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{\psi_{b,a}(t)} dt \quad \text{Ec. 3.4}$$

y donde,

¹ Ver Anexo 1

$$\psi_{b,a}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad \text{Ec. 3.5}$$

Los parámetros b y a son llamados de translación y dilatación respectivamente. El factor de normalización $a^{-1/2}$ es incluido tal que:

$$\|\psi_{b,a}\| = \|\psi\|.$$

Para que sea una función de ventana capaz de representar $f(t)$ tanto en el dominio del tiempo como de la frecuencia, $\psi(t)$ debe satisfacer la siguiente condición:

$$\hat{\psi}(0) = \int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) dt = 0 \quad \text{Ec. 3.6}$$

Para satisfacer la ecuación 3.6 es necesario que la función wavelet (ventana $t-\omega$) se construya de tal modo que posea un alto número de momentos² que converjan a 0. Se dice que una wavelet tiene un orden de momentos convergentes m si:

$$\int_{-\infty}^{\infty} t^p \psi(t) dt = 0 \quad p=0, \dots, m-1 \quad \text{Ec. 3.7}$$

En la ecuación 3.5, al reducir el parámetro a , la cobertura en tiempo de $\psi_{b,a}$ se reduce abarcando un intervalo de frecuencias más amplio, y viceversa; por lo tanto, $1/a$ es una medida de frecuencia. Por otro lado, el parámetro b indica la localización de la ventana wavelet a lo largo del eje del tiempo. Por ello, modificando (b, a) , $W_{\psi}f$ puede calcularse en todo el plano $t-\omega$ (Akay, 1995).

3.7. Anatomía del sistema nervioso del acocil

En este trabajo obtuve registros de la actividad eléctrica del cerebro del acocil mediante electrodos implantados en distintas regiones. Por ello es conveniente una

² El primer momento es la media, el segundo la desviación estándar, etc., el hecho de que los momentos de una función sean 0 implica que la función es localizable en tiempo.

revisión rápida de la anatomía del sistema nervioso de dicho invertebrado (Figura 3.6).

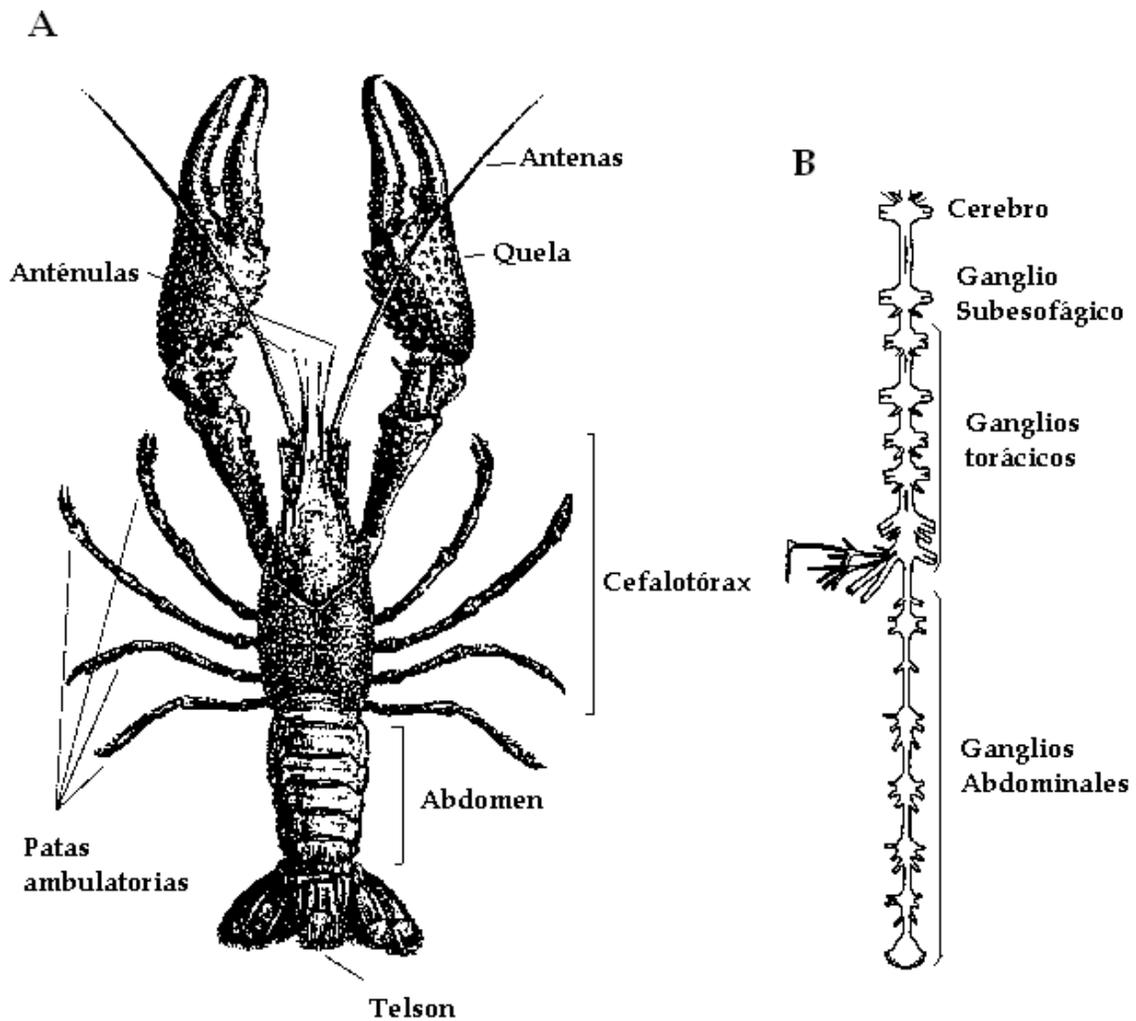


Figura 3.6. A) Vista dorsal del acocil. B) Sistema nervioso del acocil.
Modificada de Cattaert y LeRay, 2001.

El cerebro del acocil está formado por dos ganglios circunmorales, uno supraesofágico y otro subesofágico. El supraesofágico está compuesto por la unión de tres ganglios embrionarios: el más rostral es el **protocerebro**, le sigue el **deutocerebro** y el más caudal es el **tritocerebro** (Figura 3.7).

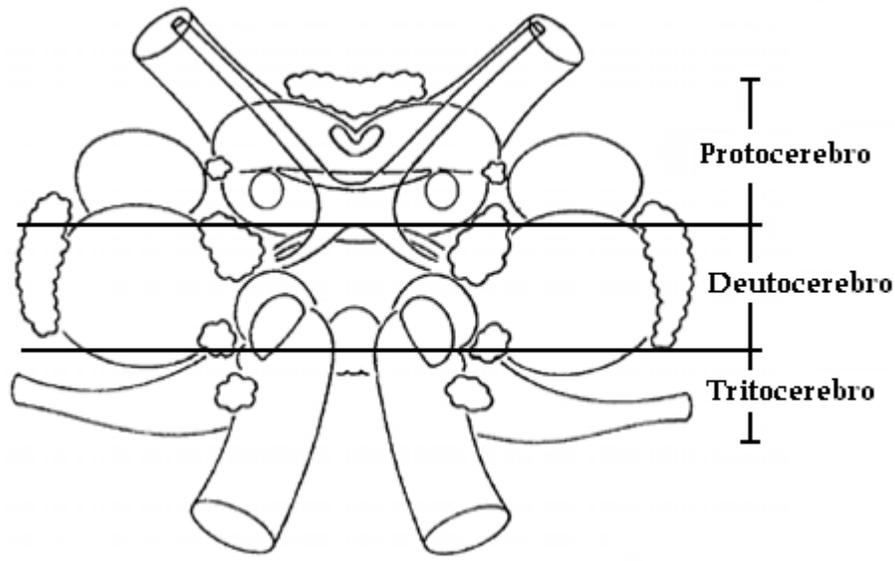


Figura 3.7. Vista dorsal del Cerebro del acicil. Modificada de Sandeman y cols., 1992.

El protocerebro contiene al ganglio óptico (lámina, y médulas interna y externa), el protocerebro lateral (médula terminal y cuerpo elipsoidal) y el protocerebro medio (puente del protocerebro y el cuerpo central).

El deutocerebro contiene los lóbulos olfatorios, los neuropilos de la antena I (mecanorreceptores y neuronas motoras) y los lóbulos accesorios.

El tritocerebro contiene el neuropilo tegumentario y los neuropilos de la antena II (mecanorreceptores, propioceptores y neuronas motoras).

El tritocerebro forma un par de conectivos que se extienden alrededor del esófago hacia el ganglio subesofágico, los cuales permiten la comunicación entre el cerebro y la cadena nerviosa tóracoabdominal. Al tritocerebro también llegan algunos nervios antenulares así como ciertos nervios sensoriales de la región anterior de la cabeza.

El ganglio subesofágico controla los movimientos de la mandíbula, la maxila y los maxilípedos. El primer ganglio torácico maneja los quelíceros y los siguientes 4 ganglios torácicos inervan los apéndices motores del cefalotórax. En los primeros cinco ganglios abdominales se encuentra el control de los apéndices asociados a

cada segmento de esta región del cuerpo y también cada uno de los músculos abdominales. El sexto ganglio se encarga de los urópodos, del telson, de la musculatura anal y de la parte posterior del tubo digestivo (Sandeman y cols., 1992; Delgado Morales, 2004).

Para realizar este trabajo implanté electrodos de diferentes características en algunas de estas regiones del cerebro, en dos tipos de preparaciones.

4. HIPÓTESIS

En condiciones de laboratorio el acocil interactúa con el medio y con sus conespecíficos a lo largo del nictámero. Para muchas de sus actividades se ha descrito un ritmo circadiano que parece ubicarlo como un animal nocturno o transicional, lo que se refleja en forma particularmente clara en el caso de su actividad locomotriz, la que presenta picos de aumento durante las transiciones entre los periodos de luz y de oscuridad. En condiciones de laboratorio, a lo largo del día es frecuente ver al animal colocado en una posición estereotípica, de lado a nivel de la superficie del agua e inmóvil, estado que se ha denominado de sueño en la medida en que cumple con los criterios conductuales y electrofisiológicos que definen dicho estado. Resultados iniciales han mostrado que durante estos momentos el umbral para los estímulos mecánicos es muy elevado y la actividad eléctrica registrada del cerebro es distinta a la obtenida del animal alerta. Desde el punto de vista neuroetológico esto plantea la necesidad de caracterizar los estados cerebrales asociados a las etapas de actividad y de sueño.

La señal eléctrica registrada del cerebro del acocil parece ser de tipo no estacionario por lo que las técnicas convencionales de análisis e identificación no son suficientes para el efecto.

Por ello es necesario identificar y caracterizar la actividad eléctrica del cerebro de acociles deambulantes mediante técnicas de análisis no convencionales como la transformada wavelet, las redes neuronales y la lógica difusa. Por lo tanto puedo formular las siguientes proposiciones e hipótesis:

- Puesto que la actividad eléctrica registrada de la superficie del cerebro del acocil es una señal no estacionaria, entonces es susceptible de ser analizada mediante técnicas no lineales como la transformada wavelet, la lógica difusa y las redes neuronales artificiales.
- Dado que las técnicas de análisis de tipo no lineal permiten la identificación y caracterización de señales no estacionarias, si existe un patrón de actividad

cerebral en el acocil, entonces podría ser identificado y caracterizado mediante técnicas no lineales.

- Puesto que las redes neuronales permiten determinar el grado de correlación entre señales de distintas fuentes, su aplicación para el estudio de registros simultáneos de diversas regiones del cerebro del acocil podría establecer si el patrón de actividad del sueño es uniforme en todo el cerebro o bien, está limitado a una estructura.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de verificar la validez de las hipótesis y proposiciones planteadas desarrollé el trabajo experimental en cuatro etapas:

- a) **Identificación de estados cerebrales.** Durante esta etapa registré de manera simultánea la posición y la actividad eléctrica cerebral de acociles deambulantes, con electrodos crónicamente implantados. Los registros tuvieron una duración de 24 horas. Para identificar los estados cerebrales utilicé criterios conductuales y electrofisiológicos. Para analizar la actividad eléctrica del cerebro usé Transformada Rápida de Fourier, Transformada Gabor y Transformada Wavelet.
- b) **Mapeo cerebral.** Una vez identificados los estados cerebrales resultó necesario determinar de dónde provienen y en qué secuencia ocurren los cambios en la actividad eléctrica cerebral, por lo que obtuve un mapa temporal de la secuencia de aparición dichos cambios en una preparación no deambulante.
- c) **Comparación entre las preparaciones.** Para verificar que en ambas preparaciones (deambulante y no deambulante) ocurren cambios similares realicé estudios comparativos entre los estados cerebrales observados en ellas. Utilicé un análisis tiempo-frecuencia con transformada wavelet y redes neuronales que determinan la correlación entre señales.
- d) **Bloqueo de las entradas sensoriales.** Determiné el papel que juegan las entradas sensoriales en la aparición de uno de los estados cerebrales (ver más adelante) mediante el bloqueo selectivo de cada una de ellas en ambos tipos de preparación. El análisis lo realicé mediante las mismas técnicas enunciadas con anterioridad.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Para este trabajo utilicé acociles machos adultos, *Procambarus clarkii* en intermuda, con los apéndices completos y una talla rostrocaudal de entre 9 y 13 cm. Los animales fueron colocados en acuarios individuales de 20x15x15 cm, bajo ciclos de luz-oscuridad 12:12 (encendido a las 07:00, apagado a las 19:00).

6.2. Identificación de estados cerebrales

6.2.1. Preparación biológica

En animales previamente anestesiados por frío (n=30), realicé una perforación en el caparazón dorsal, inmediatamente atrás del *rostrum*. Después de hacer una disección roma de los músculos de la cabeza desplacé las vísceras hacia atrás - principalmente el estómago - de manera que quedara expuesto el fondo de la cavidad cefálica y con ello también el cerebro. Retiré la hemolinfa y coloqué la preparación bajo el microscopio estereoscópico. A continuación descendí el electrodo hasta la posición seleccionada, cuidando que todo el borde de la cánula estuviera asentado sobre el cerebro para que el sello eléctrico fuera adecuado.

Para construir los electrodos usé alambres de plata o de platino-iridio (75 - 125 μm de diámetro) recubiertos de Teflón. Desde un electrodo hasta cinco eran colocados en una cánula de acero inoxidable, con la propia cánula funcionando como electrodo de referencia (Serrato y cols., 1996). Determiné la posición del electrodo en los análisis *post mortem*.

6.2.2. Registros conductuales y electrofisiológicos

Para determinar los cambios de posición de un acocil a lo largo del nictámero obtuve videos ininterrumpidos durante 24 horas, con una cámara sensible a luz infrarroja (CCD-TRV138, Sony). Los animales, previamente implantados con electrodos en la superficie cerebral, se encontraban aislados en acuarios individuales.

Esta preparación me permitió, además, obtener registros de la actividad eléctrica del cerebro. Para ello, envié la actividad eléctrica cerebral recogida por los electrodos a preamplificadores de AC (P511, Grass Instruments Co.), desde donde, una vez amplificada, la llevaba a un osciloscopio de rayos catódicos. Previamente filtraba la señal con filtros pasabanda a 3 Hz y 3 kHz. Posteriormente digitalicé la señal mediante un convertidor analógico-digital (6024E, National Instruments), usé una frecuencia de muestreo de 2 kHz, y por último almacené los datos en una computadora para realizar su análisis fuera de línea.

6.2.3. Análisis de los registros conductuales

Para analizar los registros conductuales obtuve gráficas en las que relacioné la posición de cada acocil con la hora del día. En estas gráficas consigné la posición en la que se encontraba cada acocil, la hora de inicio y de término de dicha posición y posteriormente las correlacioné con los datos electrofisiológicos.

6.2.4. Análisis de los registros de actividad eléctrica cerebral

Una parte importante de este trabajo descansa en las técnicas de análisis de la actividad eléctrica recogida del cerebro de acociles deambulantes o mantenidos en una posición fija. Debido a la complejidad de algunos de estos análisis, en las líneas que siguen solamente enumero los más importantes y su uso. He añadido una explicación más detallada y su justificación formal correspondiente en la sección de resultados y en los anexos.

Para el análisis en frecuencia de las señales cerebrales, utilicé transformada de Fourier de corto tiempo (TFCT), transformada Gabor y transformada wavelet (TW). Con las dos primeras solamente usé segmentos cortos que, de acuerdo al análisis con media y desviación estándar móviles, pueden considerarse estacionarios; con TW analicé registros en los que los segmentos se eligieron sin importar el grado de estacionariedad de la señal.

En el caso de la TFCT utilicé una ventana cuadrada de la forma:

$$f_b(t) = f(t)\phi(t-b) = f(t) \text{ si } t \in [b-\tau, b+\tau) \text{ y } 0 \text{ para cualquier otro valor}$$

con cuatro diferentes anchos $[-b, b]$: 128, 256, 512 y 1024 muestras.

Para la transformada Gabor usé los mismos anchos de ventana que para la TFCT (128, 256, 512 y 1024 muestras).

Para el análisis con representación Wavelet desarrollé un algoritmo que calcula la TW de una serie de tiempo $f(n)$ con $n=0, \dots, N$; donde N es el número de puntos en la serie de tiempo con un espaciamiento ∂t ; este algoritmo se basa en:

$$W_\psi f(b, a) := \sum_n^N f(n) \overline{\psi\left(\frac{(n-b)\partial t}{a}\right)} \quad \text{Ec. 5.1}$$

usando una ventana Morlet definida por:

$$\psi_{b,a}(t) = e^{-(t-b)^2 j / 2a} \cos\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad \text{Ec. 5.2}$$

Seleccioné la función Morlet (Figura 6.1) debido a que es no-ortogonal (lo que permite observar cambios suaves y continuos en la potencia) y compleja (mejor adaptada para capturar cambios oscilatorios), además de presentar características similares a la señal del registro extracelular del cerebro del acicil. Como el propósito de usar la TW es analizar en tiempo y frecuencia los datos obtenidos, diseñé los algoritmos que pudieran agrupar las series de tiempo de acuerdo a características comunes.

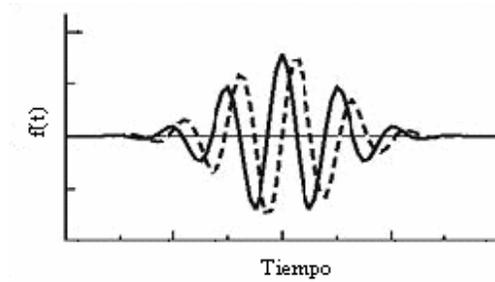


Figura 6.1. Función Morlet (Modificada de Goswami y Chan, 1999).

Analicé los valores obtenidos de la TW mediante algoritmos que determinan cuantos grupos estadísticamente diferentes existen en una serie de datos (Clustering con K-means)³.

Los algoritmos de clasificación se basan en el cálculo del centroide⁴ y las distancias entre los datos y permiten además determinar la jerarquía entre grupos (Figura 6.2).

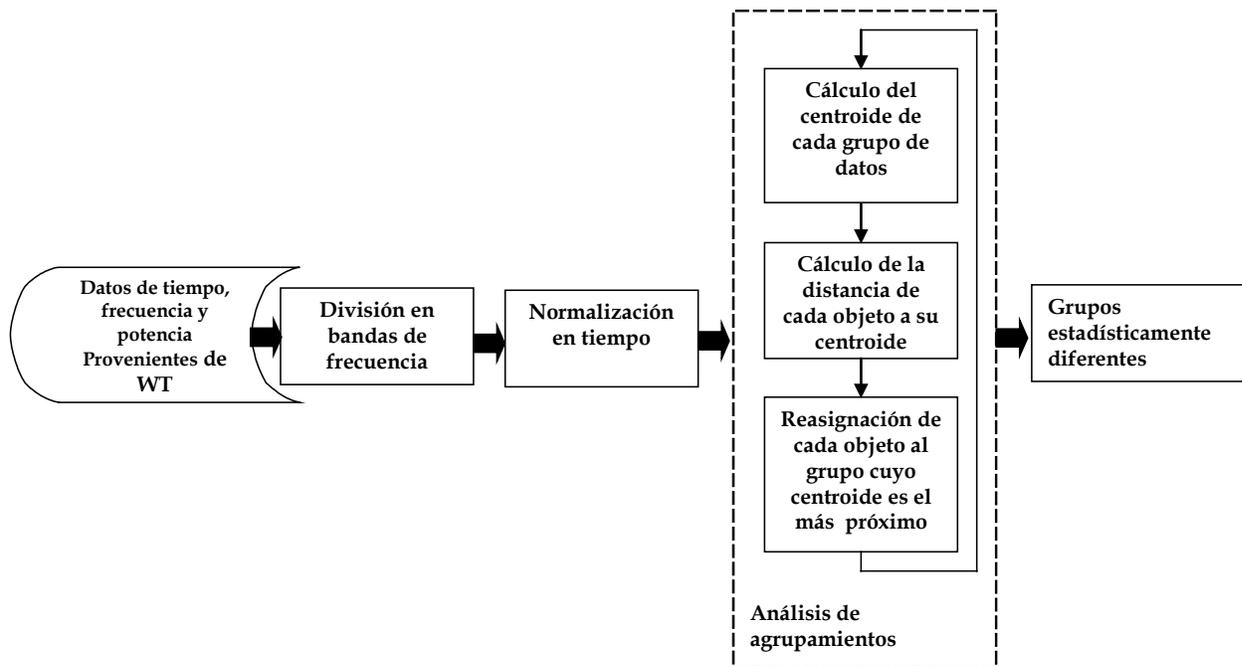


Figura 6.2. Diagrama de flujo del análisis estadístico.

³ Ver Anexo 2.

⁴ El centroide de un objeto X perteneciente a un espacio n-dimensional es la intersección de todos los hiperplanos que dividen a X en dos partes de igual cantidad de movimiento con respecto al hiperplano. Informalmente, es el promedio de todos los puntos de X.

6.3. Mapeo Cerebral

Los resultados que encontré hicieron necesario un mapeo grueso de las diferentes regiones del cerebro del acocil. Esto no es posible en el animal deambulante (porque la ventana del caparazón es relativamente pequeña y la cánula ocluye buena parte del cerebro), por lo que utilicé otra preparación para poder obtener registros de diferentes regiones en un animal inmóvil y sin anestesia por lo que además modifiqué las características del electrodo y de la preparación como detallo a continuación.

6.3.1. El electrodo

Construí electrodos dobles y triples con alambres de plata (75 μm de diámetro) cubiertos con teflón. Estos quedaron colocados dentro de una cánula que funcionaba como electrodo de referencia y de la que los alambres sobresalían por 0.5 mm.

6.3.2. Preparación biológica

Después de anestesiar los animales con frío (n=20), hice una ventana en el caparazón, luego separé y retraje los músculos con un separador de plástico, lo que me permitió tener acceso libre al cerebro.

Posteriormente fijé al acocil a un soporte metálico por medio de un corcho pegado a la cara lateral del caparazón dorsal del acocil. A continuación, bajo control microscópico, coloqué los electrodos sobre el cerebro utilizando un micromanipulador, asegurándome de que las puntas penetraran la vaina que cubre el cerebro y que la guarda formara un sello sobre la superficie del tejido, de tal manera que el registro proviniera ya no de la superficie del cerebro sino de la porción interna del mismo. Finalmente, bañé la preparación con solución salina de van Harreveld (NaCl 205mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 13.5 mM, MgCl₂ 2.6 mM, HEPES 5mM, [van Harreveld, 1936] a temperatura ambiente - aproximadamente 21 °C). Esta preparación permite obtener el registro de varias zonas del cerebro durante al

menos cuatro horas consecutivas. Al término de cada registro cerraba el orificio con Parafilm (American Can Co., Greenwich, CT) y regresaba a cada acocil a su acuario individual. Estos animales sobrevivieron un promedio de 3 días.

La posición de los electrodos en relación a las áreas cerebrales del acocil se muestra en la Figura 6.3. Los electrodos E1, E2, E3 y E4 se encontraban en el protocerebro; E1 y E3 sobre la región superior lateral (izquierda y derecha respectivamente), E2 en la región superior; que incluye el puente y el cúmulo celular 6 y, E4 en la región media del complejo central, por lo que la señal puede provenir del tracto olfatorio o del cuerpo central. Los electrodos E5 y E6 se encontraban en deutocerebro y, E7 y E8 en tritocerebro

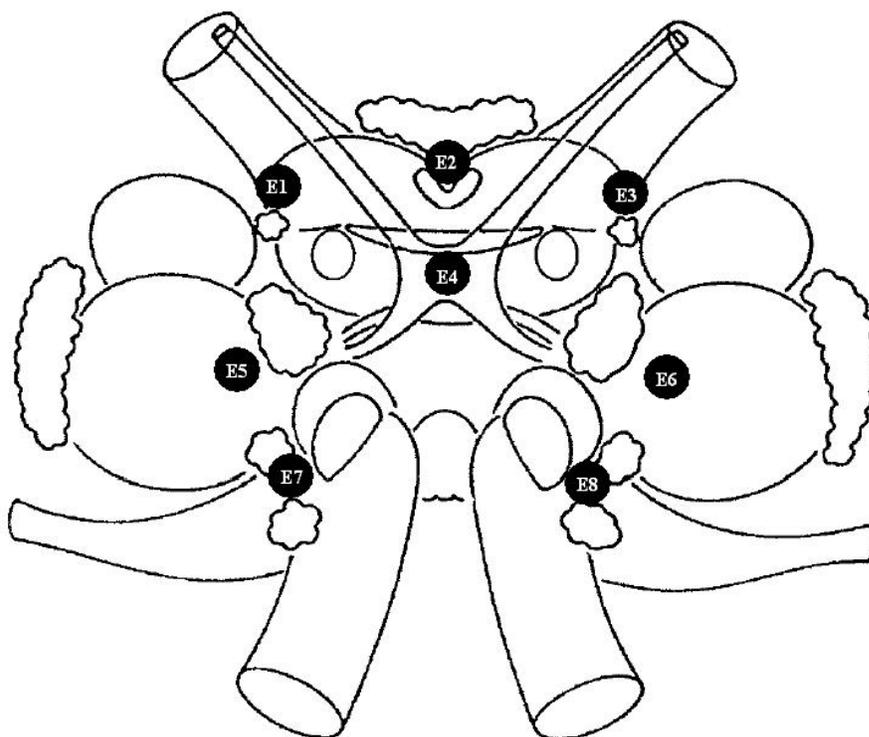


Figura 6.3. Ubicación de los electrodos de registro. Las combinaciones de electrodos de registro fueron: E1-E5, E3-E6, E2-E4, E1-E5-E7, E3-E6-E8 y E1-E4-E6

6.3.3. Registros electrofisiológicos

La señal recogida por los electrodos fue amplificada y almacenada de la manera descrita para el animal deambulante.

6.3.4. Análisis de los registros

Analicé el comportamiento en tiempo-frecuencia de los registros cerebrales utilizando la transformada wavelet que desarrollé para el análisis de los registros de animal deambulante. Hice un conteo de espigas a intervalos de dos segundos, que incluye aquellas cuya amplitud se encontraba entre $[\mu+\sigma, \mu+2\sigma]$ y $[\mu-\sigma, \mu-2\sigma]$.

6.4. Comparación entre preparaciones

Analicé el comportamiento en tiempo-frecuencia de los registros cerebrales utilizando la transformada Wavelet.

Formé series de tiempo para cada banda de frecuencia y las usé como entradas de una red neuronal del tipo competitivo⁵ que, mediante un algoritmo de aprendizaje no supervisado, realiza una extracción de características y clasifica los datos en grupos estadísticamente distintos (Figuras 6.4 y 6.5). Estos grupos se forman utilizando como parámetros de clasificación únicamente las características de la señal de entrada, es decir, de los valores de tiempo y potencia calculados con la TW.

Una vez determinados los grupos verifiqué si existe alguna relación entre ellos y la conducta del acicil.

Posteriormente, para determinar la correlación entre señales, utilicé una red del mismo tipo que determina la relación interna entre grupos estadísticamente distintos y la compara entre grupos.

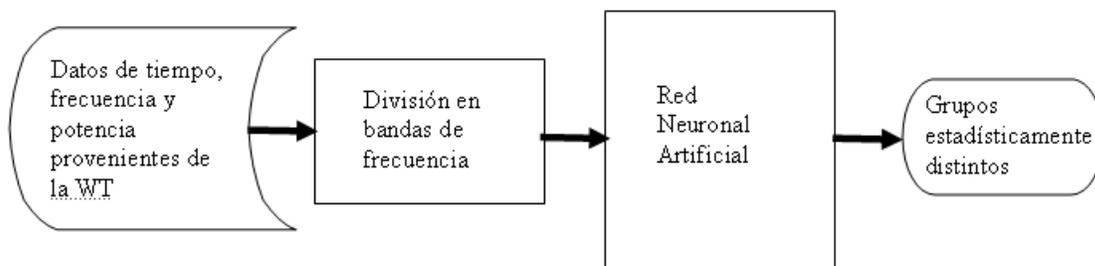


Figura 6.4. Diagrama a bloques del proceso de clasificación.

⁵ Ver Anexo 3

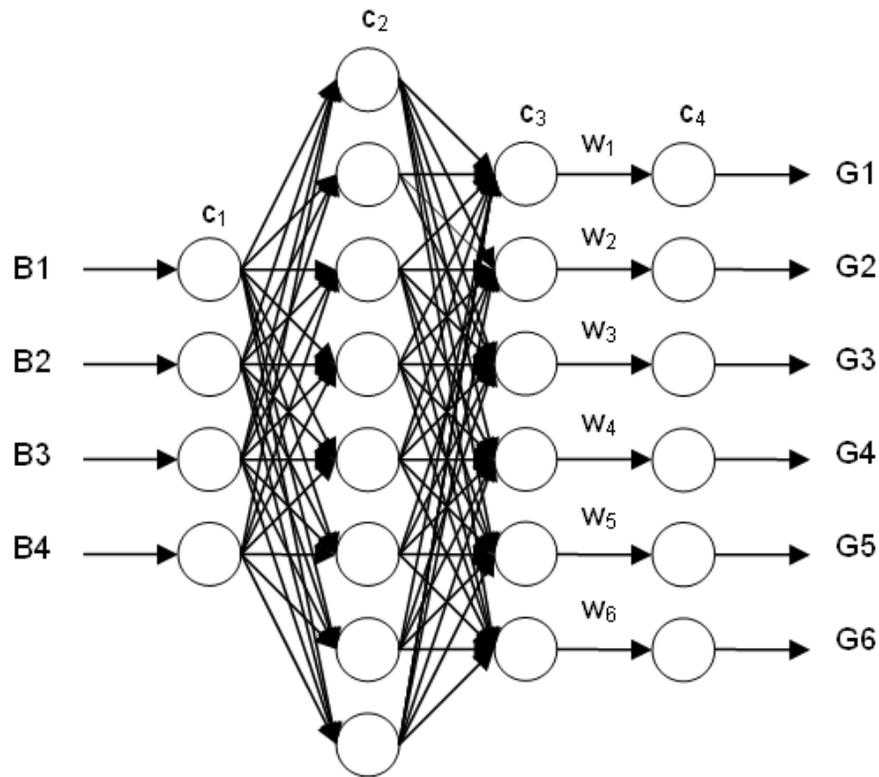


Figura 6.5. Diagrama de la red neuronal utilizada para clasificación. B1 a B4 son las bandas de frecuencia de la TW, c1 la capa de entrada, c2 y c3 capas ocultas y c4 la capa de salida. G1 a G6 son las salidas de la red y representan grupos estadísticamente distintos. Cada conexión interneuronal tiene un peso específico w .

6.5. Bloqueo de las entradas sensoriales

Los resultados del mapeo cerebral hicieron necesario explorar el papel que juegan las entradas sensoriales en la generación de las ondas lentas registradas durante el sueño del acicil. Por ello, diseñé dos experimentos en los cuales bloqueé, de manera selectiva y reversible, la visión o la olfacción.

6.5.1. Preparación biológica

En animales anestesiados por frío, implanté electrodos de platino-iridio (75 μm de diámetro), cubiertos con teflón. Bajo control microscópico coloqué el electrodo en el complejo central, asegurándome de que la punta penetrara la vaina de tejido conectivo que recubre al cerebro. Cada electrodo estaba aislado por una cánula que funcionaba como electrodo de referencia.

Antes de realizar cualquier manipulación sobre los sistemas sensoriales obtuve, de cada animal, un registro control (de 24 horas) tanto conductual como de la actividad eléctrica cerebral.

Verifiqué la localización del electrodo durante estudios post-mortem.

6.5.1.1. Bloqueo del sistema visual

Para cegar de forma reversible a los acociles coloqué capuchones negros que cubrían por completo las córneas. El procedimiento consistió en anestésiar por frío al acocil, después colocar un pequeño tubo de Parafilm alrededor del tallo ocular, al cual se ataba con hilo delgado. El otro extremo del tubo también se cerraba con hilo. Una vez colocado el capuchón, éste se pintaba de negro con varias capas de barniz. Obtuve los registros, conductual y eléctrico cinco días después de cegar a los animales, de manera que los fenómenos circadianos de tipo transitorio, asociados con mantener en oscuridad al animal hubieran transcurrido.

Verifiqué la inocuidad del procedimiento al retirar los capuchones y encontrar una pseudopupila grande y reactiva a la iluminación del ojo.

6.5.1.2. Bloqueo del sistema olfatorio

Para reducir en forma reversible la sensibilidad olfatoria, el día anterior al registro experimental realicé un lavado de las anténulas mediante la inmersión y agitación continua de éstas en agua desionizada durante 30 minutos. Este procedimiento asegura la destrucción de los estetascos que son las estructuras que contienen los receptores olfatorios. Cabe mencionar que la pérdida de los receptores olfatorios es transitoria y en poco más de 24 horas hay una recuperación significativa de los mismos (Delgado-Morales, 2004).

6.5.2. Registros conductuales y electrofisiológicos

Las técnicas utilizadas para obtener los registros son las mismas descritas en la sección 6.2.2.

6.5.3. Análisis de los registros conductuales y electrofisiológicos

Para el análisis de los registros conductuales utilicé el procedimiento descrito en la sección 6.2.3. Por otro lado, para analizar los registros de actividad eléctrica cerebral utilicé el conteo de espigas, la transformada wavelet y las redes neuronales descritas en apartados anteriores.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de estados cerebrales

7.1.1. Análisis de los registros conductuales

Cuando un acocil intacto se mantiene aislado en un acuario individual, suele deambular por periodos variables. Esta actividad locomotriz muestra una relación con los ciclos de luz y oscuridad. En animales sincronizados a ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, la actividad locomotriz incrementa significativamente en las transiciones luz-oscuridad y oscuridad-luz (Ramón y cols., 2004). Cuando el acocil no se desplaza puede mantenerse parado sobre sus patas ambulatorias o inmóvil en una de dos posturas estereotípicas: i) de lado a nivel de la superficie del agua o; ii) acurrucado.

Acocil parado. Cuando el animal se encuentra en esta posición tiene el cuerpo por arriba del fondo del acuario, es decir soportado por las patas ambulatorias que se encuentran semiflexionadas (Figura 7.1A). Las quelas suelen estar en semiflexión a nivel del *rostrum* pero también se les puede observar con máximo estiramiento en el piso del acuario; las antenas con distintos grados de flexión o con movimientos suaves, lentos y esporádicos que no afectan a toda la antena sino solamente a las porciones distales o medias y distales. Las anténulas están erectas y muestran ocasionales vibraciones de ambos flagelos. También es posible observarlo en labores de limpieza de las anténulas o de las antenas, trabajo que realiza con los palpos. En esta posición el animal puede pasar periodos de diferente duración a lo largo del día. En ocasiones es posible observar a un animal parado totalmente inmóvil durante periodos de duración variable.

Acocil de lado. Debido a que el acocil no flota, para ponerse de lado apoya todas las patas ambulatorias de un lado del cuerpo en el fondo del acuario, luego eleva las patas ambulatorias contralaterales para apoyarlas sobre la pared más cercana del acuario de tal manera que casi la mitad sagital del animal se encuentra por encima de la superficie el agua (Figura 7.1B). La cola puede estar extendida o

con una ligera flexión. La quela de la superficie suele quedar péndula y es posible observarla oscilando rítmicamente, en particular si el animal ha pasado mucho tiempo en esta posición, cuando esto ocurre puede oscilar también la pata ipsilateral del primer par de patas ambulatorias.

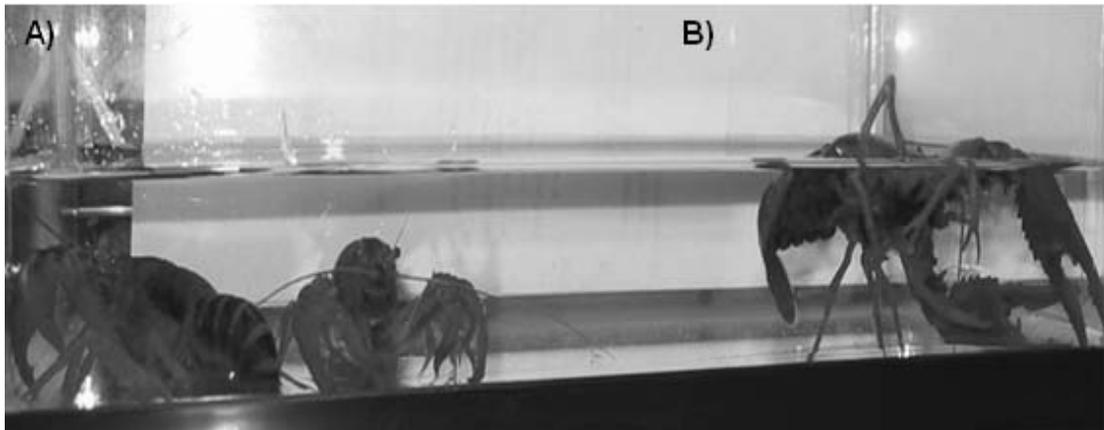


Figura 7.1. Acociles inmóviles. A) Dos animales parados y B) Un acocil de lado.

Acocil acurrucado. Cuando el acocil se acurruca (Figura 7.2), lo hace en una esquina del acuario. Para ello, aproxima todos sus apéndices al centro del cuerpo, desciende y pliega las patas ambulatorias de manera que el cuerpo queda pegado al piso, flexiona la cola por completo, luego estira las quelas y por último desciende las anténulas y las antenas, permaneciendo inmóvil por periodos de diferente duración.

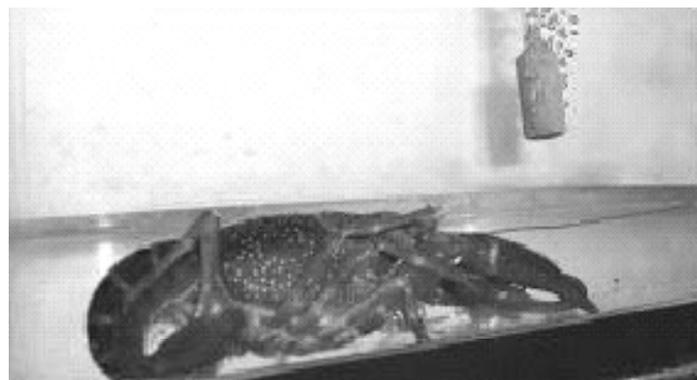
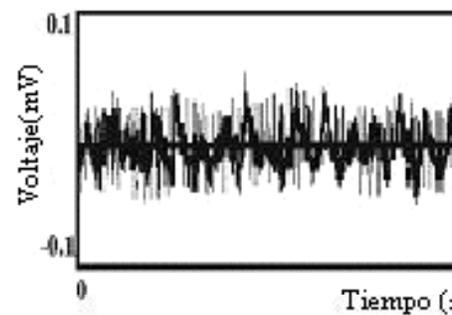


Figura 7.2. Acocil acurrucado.



Para tener una idea de la secuencia temporal de los cambios de posición a lo largo del ciclo de 24 horas, obtuve videos continuos de animales aislados y bajo

condiciones controladas de iluminación. Analicé los videos consignando la hora de inicio y de término en que ocurría una posición dada y con los datos obtenidos construí gráficas de posición (en las ordenadas) contra tiempo (en las abscisas).

En un registro típico de posición (Figura 7.3), es posible observar que durante el ciclo de 24 horas el acocil adopta cualquiera de las posiciones descritas, parado o caminando, de lado o acurrucado, y permanece en ella por periodos de duración variables que no parecen depender de la hora del día.

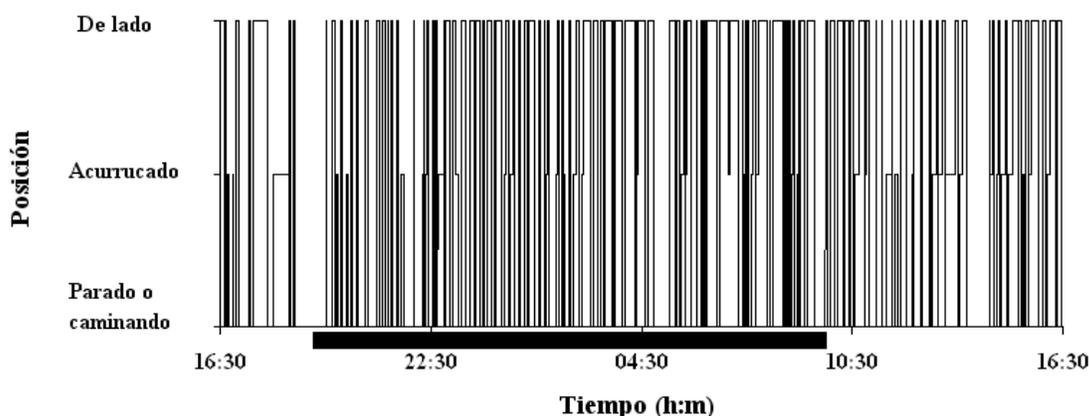


Figura 7.3. Posición de un acocil durante el ciclo de 24 horas (La barra oscura indica las horas de oscuridad).

7.1.2. Análisis de los registros eléctricos

La actividad eléctrica que registré del cerebro del acocil parado⁶ se ajusta a los datos previamente publicados (Hernández y cols., 1996). Está conformada por una gran cantidad de espigas montadas sobre una basal prácticamente plana (Figura 7.4A). En estos registros no encontré diferencias en frecuencia entre las señales de protocerebro y deutocerebro de un acocil parado. Sin embargo, la actividad recogida de tritocerebro fue claramente distinta, pues en ella hubo pocas espigas y ondas lentas de amplitud variable cuya frecuencia es la misma que la frecuencia de batido de los escafognatitos, alrededor de los 3 Hz (Shuranova y cols., 2002; Ramón y cols., 2004).

⁶ No me fue posible registrar la actividad eléctrica correspondiente a los periodos de actividad locomotriz debido a que con el movimiento de los cables la señal satura los amplificadores.

Cuando el animal se coloca de lado (Figura 7.4B), la actividad registrada en protocerebro o en deutocerebro se modifica, se reduce la cantidad de espigas y en lugar de ellas aparecen ondas lentas con frecuencias alrededor de 15 Hz.

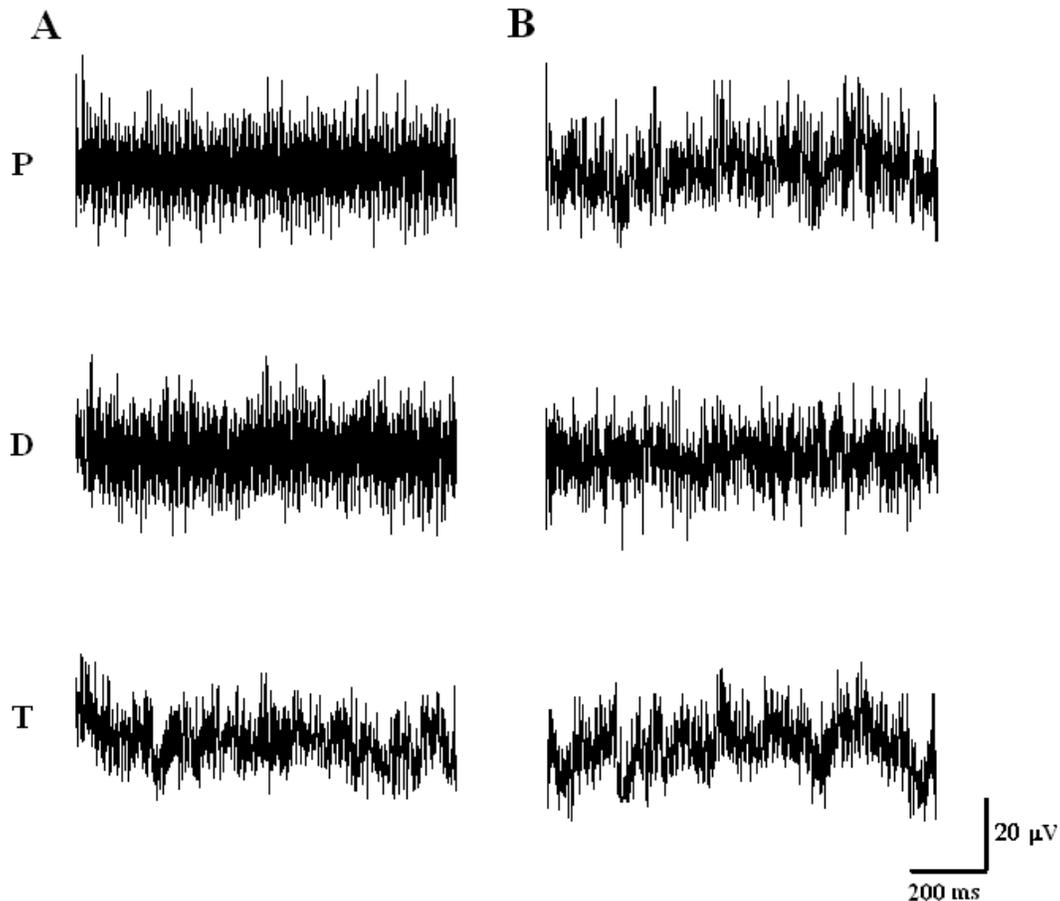


Figura 7.4. Actividad eléctrica del cerebro del acicil A) Parado y B) De lado.
P=Protocerebro, D=Deutocerebro y T=Tritocerebro.

En el animal acurrucado se pueden encontrar los dos tipos de patrones cerebrales, con espigas y una línea de base plana o bien con ondas lentas. Esto depende, en general, del estado inmediato anterior del animal, como discutiré más adelante.

Los cambios mencionados no se detectan en los trazos procedentes de tritocerebro, en ellos permanecen constantes las ondas lentas de 3 Hz, por lo cual el análisis tiempo frecuencia que a continuación describo únicamente incluye registros de protocerebro y deutocerebro.

7.1.2.1. Análisis tiempo-frecuencia

Transformada de Fourier en corto tiempo (TFCT). Para determinar si la actividad eléctrica del cerebro del acocil puede analizarse con Transformada de Fourier o bien, requiere de un análisis tiempo-frecuencia (Transformada de Fourier en corto tiempo (TFCT), Transformada Gabor o Transformada Wavelet), es necesario verificar si las señales son estacionarias. Por ello, el primer paso fue determinar los parámetros estadísticos de dichas señales procedentes tanto de animales alerta como de animales dormidos.

Las gráficas resultantes del análisis de media y desviación estándar móviles (Figura 7.5), muestran que tanto en los animales alerta como en los dormidos, ambos parámetros varían considerablemente con respecto al tiempo, salvo pequeños segmentos donde permanecen estables. Por lo tanto, puedo afirmar que la señal de la actividad eléctrica del cerebro del acocil es no-estacionaria, aunque en algunos momentos se puede considerar cuasi-estacionaria. Realicé este análisis en 12 acociles y en 10 segmentos de cada registro (cada segmento contiene 700 intervalos de 1 minuto).

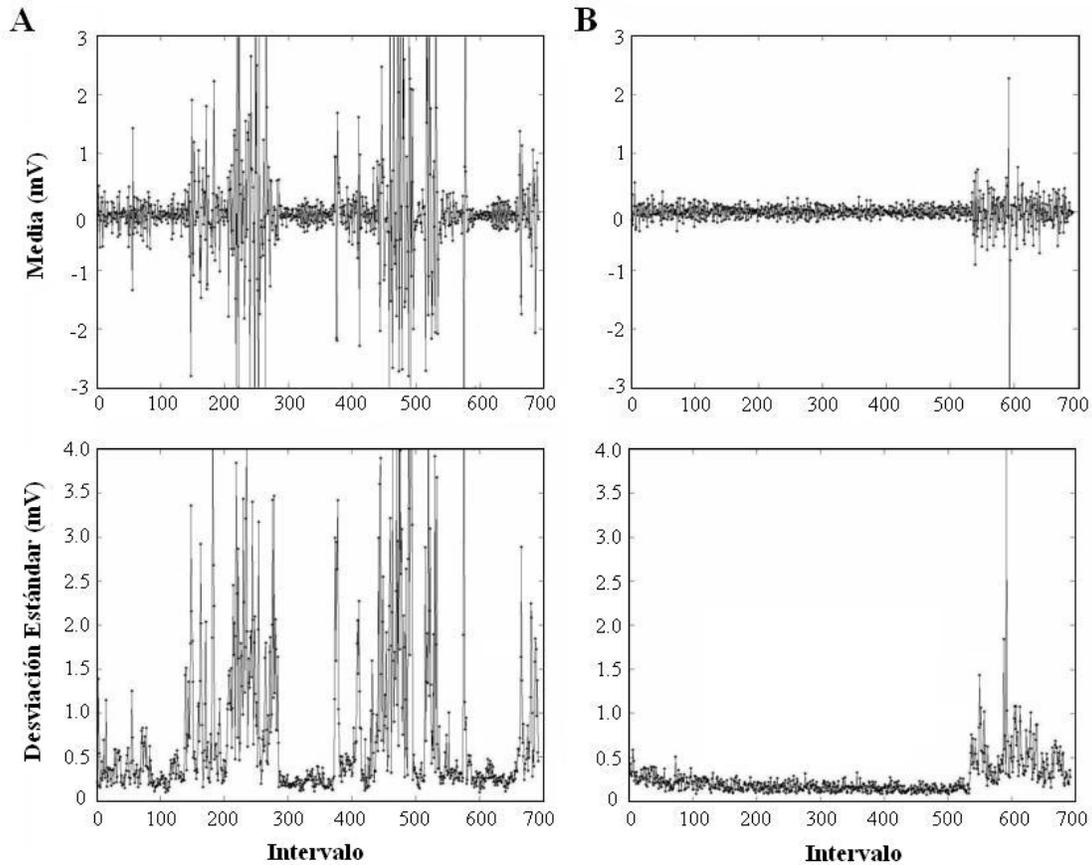


Figura 7.5. Media y desviación estándar móviles de la actividad eléctrica del acocil parado (A) y de lado (B).

También analicé los segmentos cuasi-estacionarios con TFCT y obtuve espectrogramas como los de la Figura 7.6. En esta figura se incluye frecuencia en Hertz, tiempo en segundos y potencia codificada en color de acuerdo al espectro natural de la luz visible. Cada espectrograma corresponde a una longitud de ventana (128, 256, 512 y 1024 muestras respectivamente) y por lo tanto, tiene diferente resolución. Las líneas horizontales, indican componentes de frecuencia y las líneas verticales localizan eventos transitorios en el tiempo. De acuerdo con estas gráficas, la ventana que produce mejor resolución para las frecuencias de interés (0 a 60 Hz debido a que esta banda incluye a las ondas lentas características del estado de sueño en el acocil) es de 256 muestras para el segmento correspondiente al acocil parado y de 512 muestras para el animal de lado. Al

comparar entre condiciones (acocil parado y de lado), se observa que la potencia disminuye para todas las frecuencias cuando el acocil está de lado.

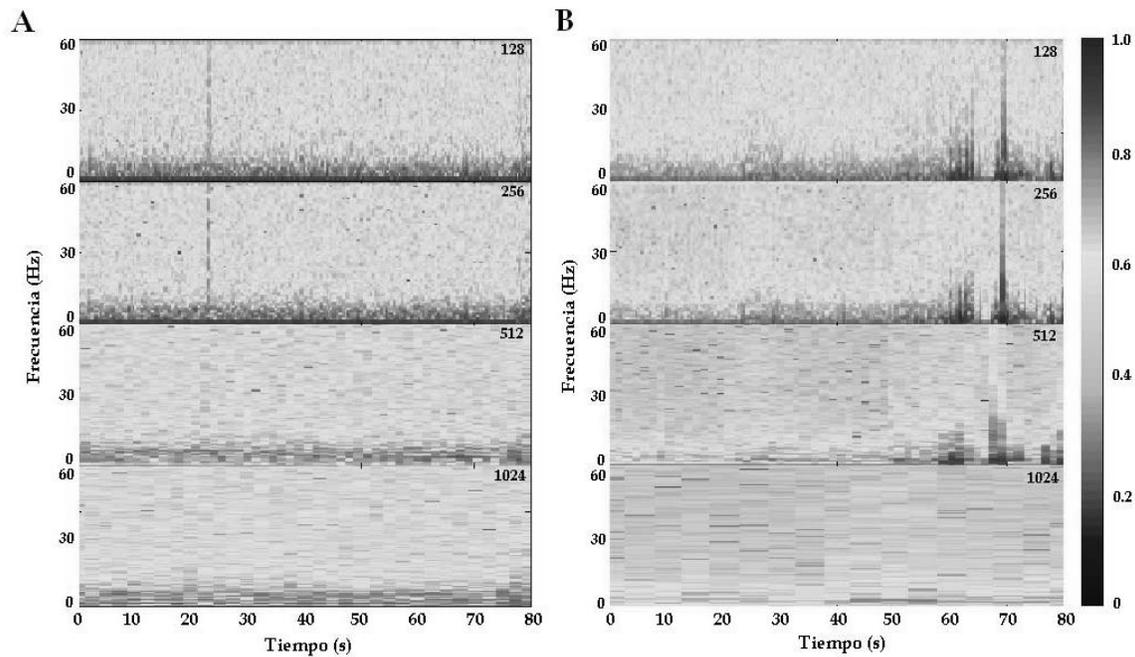


Figura 7.6. Espectrograma con TFCT de la actividad correspondiente al acocil parado (A) y de lado (B). Nótese que la potencia para todas las frecuencias disminuye cuando el acocil está de lado.

En estas gráficas no es posible localizar con precisión el momento en que se producen cambios de frecuencia; es decir, la TFCT no es suficiente para analizar los segmentos cuasi-estacionarios de la señal. Por otra parte es claro que, para obtener una mejor resolución en el análisis de cada estado cerebral, se requiere de un ancho de ventana específico y diferente, lo que imposibilita la comparación entre estados.

Transformada Gabor. Se ha planteado que un mejor análisis de señales cerebrales se obtiene al usar la transformada Gabor, pues con ella se reduce al mínimo el principio de incertidumbre (Goswami y Chan, 1999). Mediante un algoritmo de transformada Gabor obtuve espectrogramas similares a los del análisis con TFCT. En el espectrograma del acocil parado se observan potencias altas, principalmente en la banda de 0 a 10 Hz y algunos eventos transitorios representados por líneas verticales (Figura 7.7A)

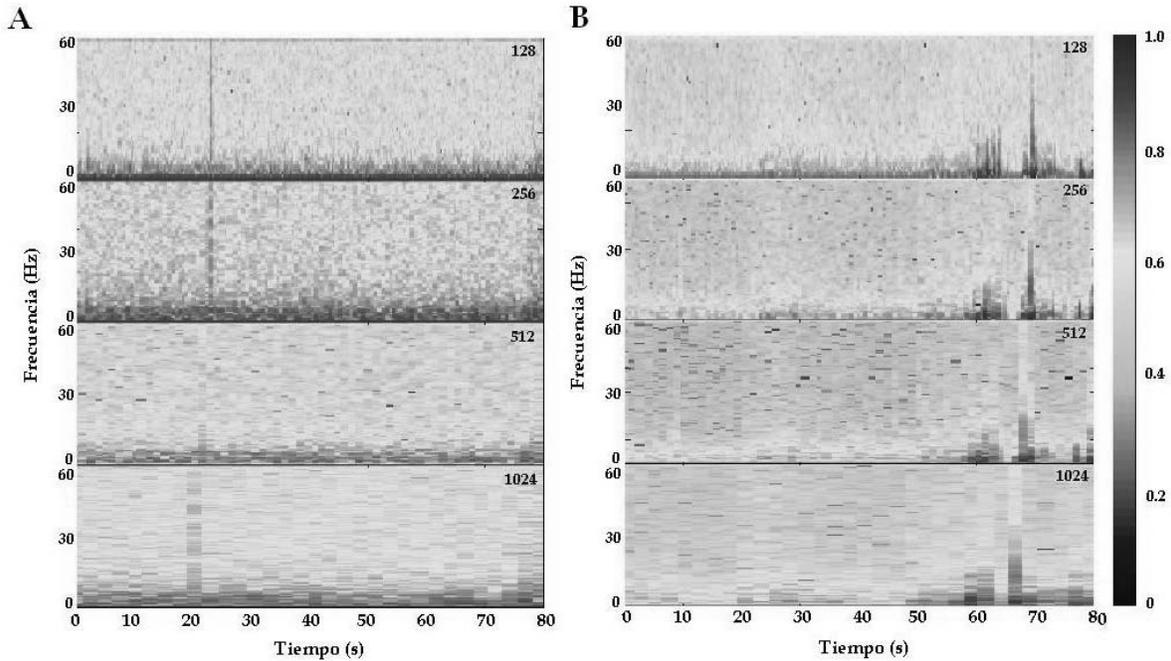


Figura 7.7. Espectrograma con transformada Gabor de la actividad correspondiente al acocil parado (A) y de lado (B). Nótese que la potencia para todas las frecuencias disminuye cuando el acocil está de lado.

En la gráfica correspondiente al acocil de lado (Figura 7.7B) se observa un importante decremento en la potencia para todas las frecuencias con respecto a la Figura 7.7A y también aparecen variaciones en la banda de 0-10 Hz, cuya potencia ya no permanece constante, por lo que los eventos transitorios se localizan con mayor precisión.

Comparada con la TFCT, la transformada Gabor proporciona una mejor resolución tanto en tiempo como en frecuencia. Sin embargo, el hecho de que la ventana mantenga las mismas dimensiones para todas las frecuencias limita la resolución del análisis de la señal.

Transformada Wavelet (TW). De los análisis anteriores resultan evidentes las limitaciones de las técnicas convencionales, desarrolladas para señales estacionarias, para el estudio y caracterización de una señal no estacionaria. Ellas son: a) es necesario fijar un ancho de ventana que no necesariamente proporcionará la mejor resolución para todo el intervalo de frecuencias que

conforma una señal y b) el análisis de la señal únicamente será confiable para segmentos cuasi-estacionarios. Por ello, el siguiente paso consistió en el desarrollo del algoritmo necesario para realizar un análisis mediante la transformada wavelet (TW). Por su naturaleza, éste método no necesita limitar el análisis a segmentos estacionarios e incluso pueden analizarse las transiciones de una posición a otra.

En la Figura 7.8 se encuentra una secuencia de posiciones extraída de la Figura 7.3. Nótese que el acocil se encuentra parado durante aproximadamente 5 minutos; luego se acurruca por un breve lapso (poco menos de un minuto); después se pone de lado durante cerca de cinco minutos, vuelve a acurrucarse por un periodo breve, y de nuevo se pone de lado durante el resto del registro. A esta secuencia corresponde el análisis con TW que sigue.

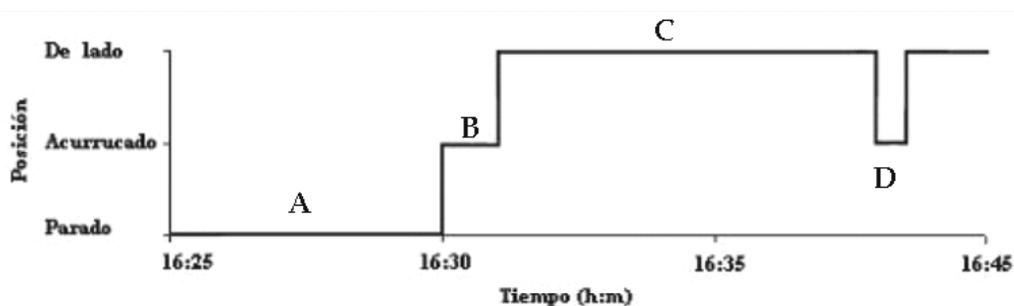


Figura 7.8. Secuencia de posiciones de un acocil deambulante mantenido en un acuario individual.

Del análisis con TW obtuve gráficas tridimensionales que incluyen tiempo, frecuencia (sólo la banda de 0-60 Hz) y potencia (codificada en color usando el espectro de la luz visible). También construí gráficas de contorno, en las que se observan tiempo y frecuencia a valores de potencia fijos.

La TW de la actividad eléctrica cerebral correspondiente al acocil parado (segmento A de la Figura 7.8), muestra la relación entre las frecuencias del registro eléctrico del cerebro (Hz), su potencia y el tiempo durante el cual se realizó el registro (Figura 7.9).

En protocerebro, se observa una actividad constante a lo largo del tiempo, las frecuencias dominantes están alrededor de los 4 y 8 Hz (ambas posiblemente

debidas a la actividad de los escafognatitos) y una más alrededor de los 25 Hz. Nótese que al inicio del segmento hay cambios transitorios bien localizados en el tiempo que afectan a todas las frecuencias.

En deutocerebro la actividad es más regular, pero la potencia alrededor de los 25 Hz es mayor que en protocerebro (esto se observa con mayor claridad al comparar las gráficas de contorno).

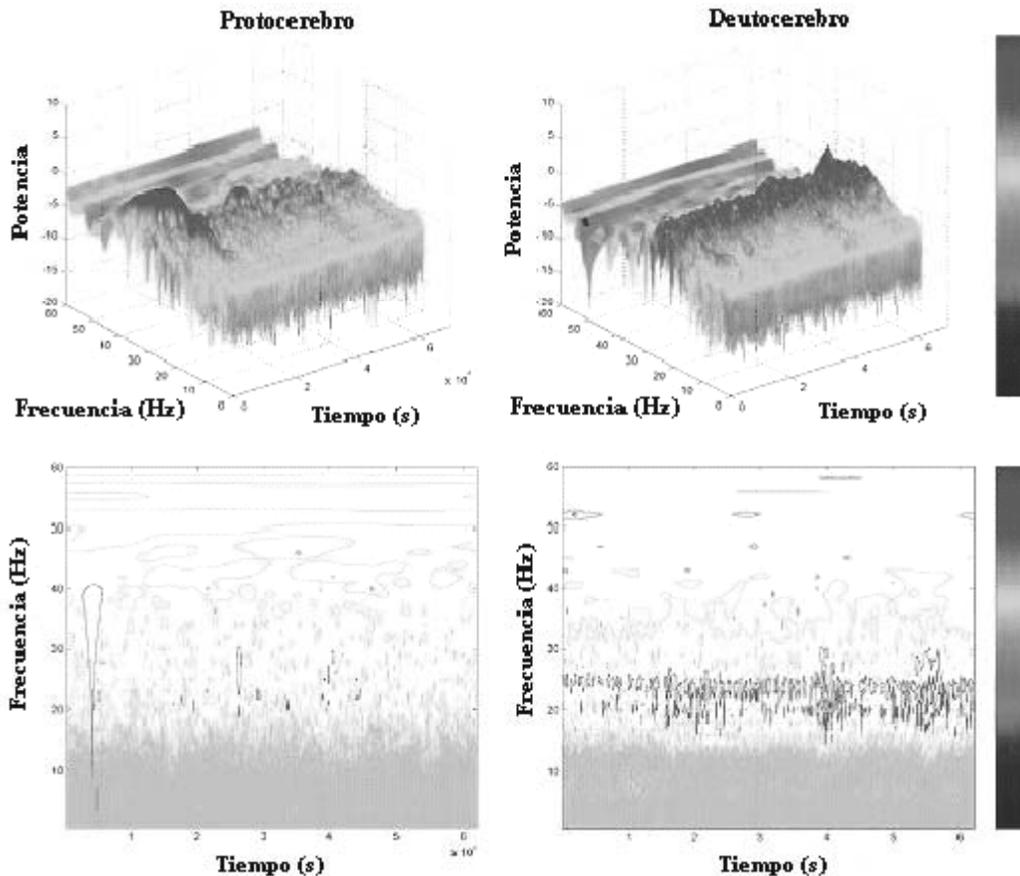


Figura 7.9. Gráficas tridimensionales y de contorno de la transformada wavelet, TW, de la actividad eléctrica de protocerebro y deutocerebro correspondientes al acocil parado.

En la Figura 7.10 se observa la TW de la actividad cerebral correspondiente al acocil acurrucado (segmento B de la Figura 7.8).

En protocerebro hay un incremento generalizado y disperso en la potencia de las frecuencias entre 5 y 45 Hz, ya no hay frecuencias dominantes en los intervalos de interés y solamente queda una alrededor de 4 Hz que corresponde a la actividad respiratoria (escafognatitos).

En deutocerebro se mantiene la frecuencia dominante alrededor de los 25 Hz, aunque comienza a disminuir su potencia y en ambas regiones cerebrales la actividad es uniforme durante todo el tiempo que el acocil estuvo acurrucado.

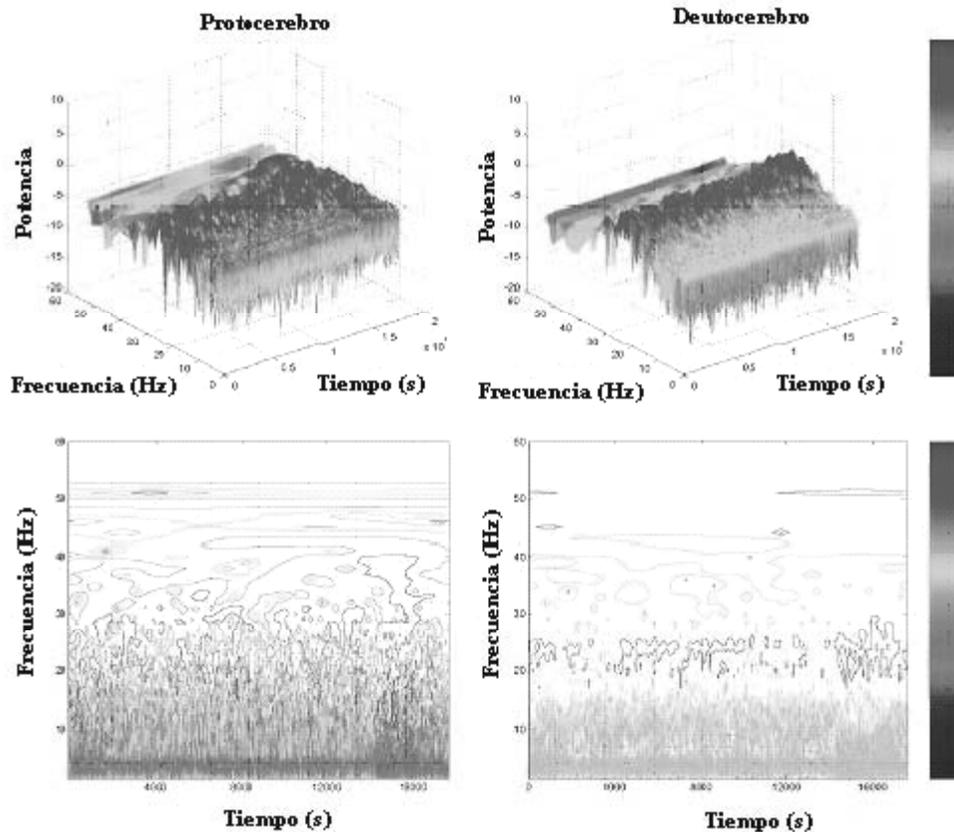


Figura 7.10. Gráficas tridimensionales y de contorno de la TW de la actividad eléctrica de protocerebro y deutocerebro correspondientes al acocil acurrucado. Nótese la elevada actividad, para las frecuencias entre 6 y 45 Hz, en protocerebro y el mantenimiento de la frecuencia dominante en deutocerebro. Compárese con la figura 7.9

Para la actividad cerebral que corresponde al acocil de lado (segmento C de la Figura 7.8), las gráficas de TW (Figura 7.11) muestran un descenso generalizado en todas las potencias.

En protocerebro se observan, además, depresiones importantes en la banda 30-45 Hz. Los mismos cambios ocurren en el deutocerebro, donde las potencias llegan a valores aún más bajos y los cambios se presentan casi desde el inicio del registro. Para ambas regiones, las depresiones se mantienen durante casi todo el

tiempo que el acocil se encuentra de lado y se presentan cada vez que el animal adopta dicha posición.

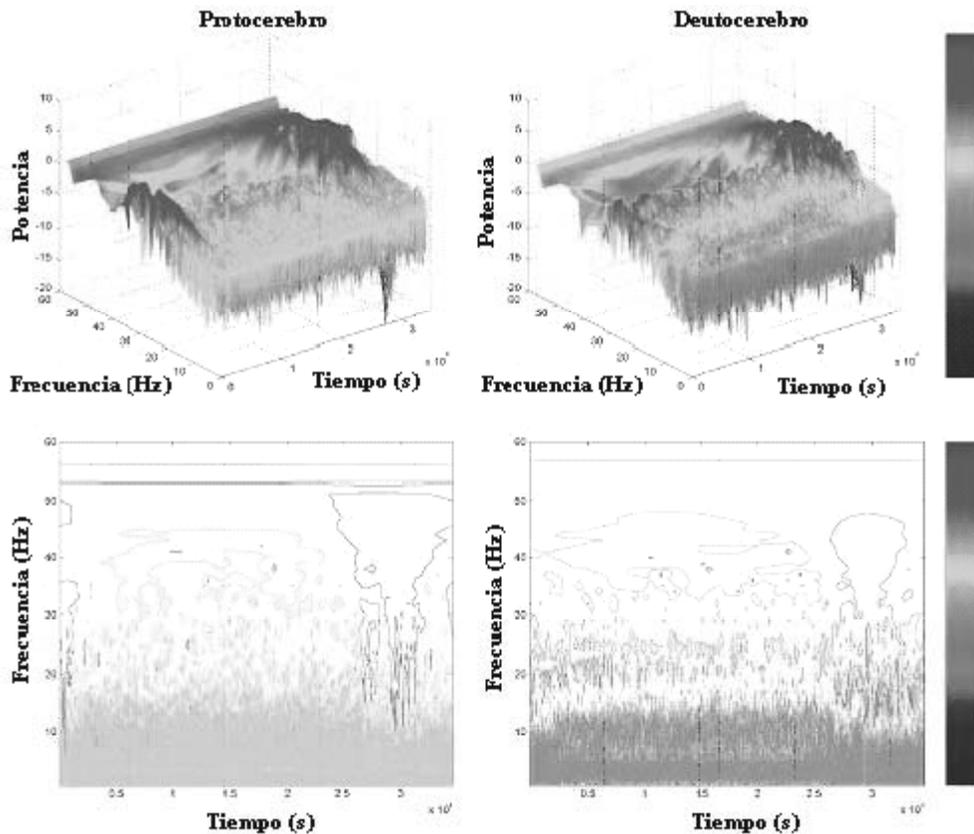


Figura 7.11. Gráficas tridimensionales y de contorno de la TW de la actividad eléctrica de protocerebro y deutocerebro, correspondientes al acocil de lado. Nótese la reducción en la potencia para todas las frecuencias en ambas regiones. Compárese con las figuras 7.9 y 7.10.

Finalmente, para la actividad correspondiente al acocil nuevamente acurrucado (segmento D de la Figura 7.8), las gráficas de TW (Figura 7.12) muestran variaciones en la actividad cerebral. En el protocerebro, la actividad en el primer tercio del registro es similar a la observada en el animal parado, cambia a características semejantes a las del acocil dormido (con reducción en la potencia de todas las frecuencias) en el segundo tercio y regresa a las del animal despierto en el último tercio del registro.

En el deutocerebro los cambios son similares pero más acentuados, la potencia desciende más que en protocerebro y, alrededor de los 30-45 Hz, se

presenta la depresión que caracteriza al animal de lado. Esto indica que la actividad eléctrica cerebral del acocil acurrucado muestra características intermedias entre los estados despierto y dormido, que parecen depender de la secuencia de cambios que le anteceden.

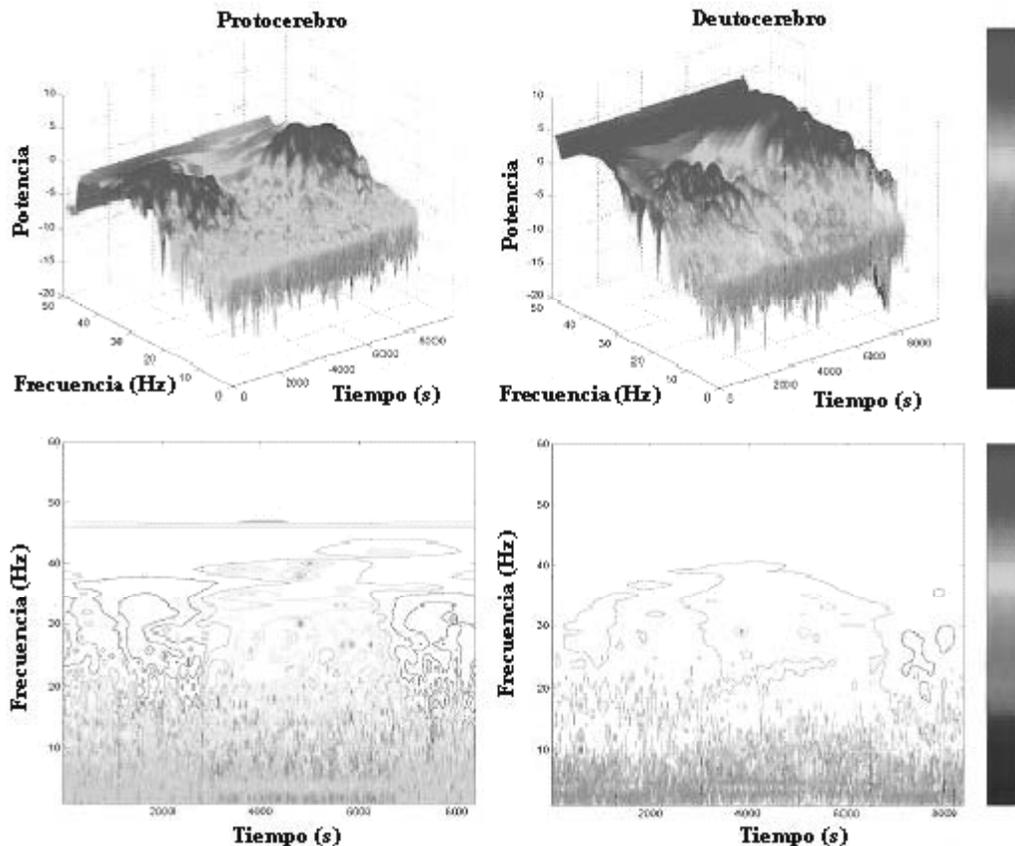


Figura 7.12. Gráficas tridimensionales y de contorno de la TW de la actividad eléctrica de protocerebro y deutocerebro correspondientes al acocil acurrucado. Nótese que la potencia no es homogénea a lo largo del tiempo en ninguna de las dos regiones. Compárese con la figura 7.9.

7.1.2.2. Análisis de las transiciones de posición

Un aspecto interesante desde el punto de vista analítico son las transiciones de posición, y por tanto de estado cerebral, porque podrían dar información sobre la dinámica de los estados cerebrales; es decir ¿los cambios de posición anteceden a los cambios en la actividad cerebral o se presentan después de un cierto tiempo? Por ello analicé las transiciones de los cambios de posición que se ilustran en la figura 7.8. La Figura 7.13 muestra las gráficas 3D de las transiciones de parado a

acurrucado (Figura 7.13A); de acurrucado a de lado (Figura 7.13B); y de lado a acurrucado (Figura 7.13C). Antes de acurrucarse (Figura 7.13A), la gráfica 3D de la TW muestra una actividad que corresponde a la de un animal alerta. Al acurrucarse (momento indicado por la flecha), se presenta una súbita reducción en la potencia para la mayoría de las frecuencias. Estos valores permanecen disminuidos durante el resto del registro, aunque son más altos que para un acocil dormido.

Con el paso del tiempo, el perfil es cada vez más parecido al del acocil de lado (final de la Figura 7.13A), de tal manera que cuando ocurre la siguiente transición, de acurrucado a de lado (flecha en la Figura 7.13B), se observa el mismo cambio en la potencia, aunque su reducción es de mayor magnitud para todas las frecuencias exploradas, en especial para el intervalo de 30 a 45 Hz.

El perfil de un animal que se acurruca después de un tiempo de estar de lado (flecha en la Figura 7.13C), muestra congruencia con los resultados anteriores. Cuando está de lado la potencia es baja para las frecuencias entre 30 y 45 Hz, durante la transición los valores de potencia aumentan y permanecen elevados por el resto del registro.

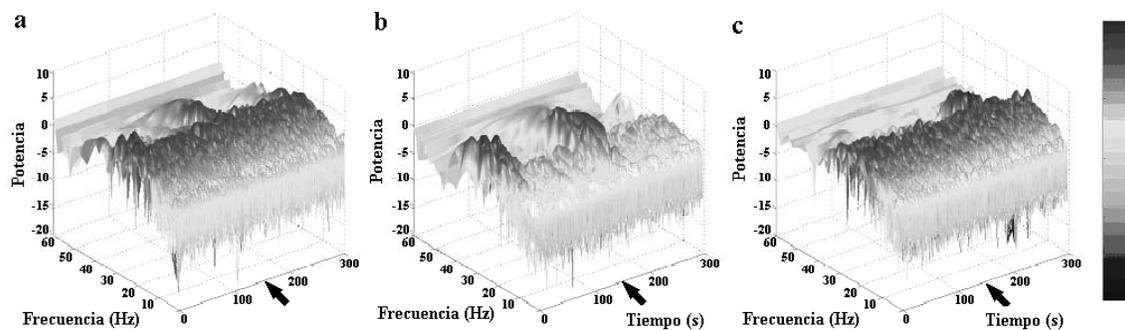


Figura 7.13. Transiciones entre posiciones. a) Parado-acurrucado, b) Acurrucado-de lado, c) De lado-acurrucado.

Los cambios en protocerebro y deutocerebro son similares, aunque los valores de potencia son menores para esta última región.

Estos resultados implican que en el acocil el sueño no es un estado uniforme y el "acurrucamiento" también podría ser un estado de sueño, dependiente de la secuencia previa de posiciones.

7.1.2.3. Análisis de agrupamientos

Los resultados anteriores muestran claras diferencias en la actividad cerebral del acocil durante las tres condiciones estudiadas. Sin embargo, es necesario demostrar estadísticamente que las diferencias son consistentes y que realmente corresponden a grupos distintos. Por ello, una vez que había obtenido la TW realicé un análisis de agrupamientos para este tipo de registros. Este tipo de análisis parte del supuesto de que en una distribución n-dimensional los datos que guardan correlación se agruparán formando acúmulos que pueden ser caracterizados mediante el cálculo de su centroide y las distancias relativas entre los datos al interior del grupo.

Para aplicar el método de agrupamientos primero generé series de tiempo con los resultados de la TW y debido a que las frecuencias de interés se encuentran en el intervalo de 1-60 Hz, dividí este intervalo en cuatro bandas: B1, con frecuencias de 1 a 5 Hz; B2, con frecuencias de 6 a 15 Hz; B3, con frecuencias de 16-30 Hz y B4, con frecuencias de 31-60 Hz. Una vez dividido el intervalo en bandas de frecuencia calculé el valor promedio de potencia para intervalos de 2 segundos. Para el análisis de agrupamientos utilicé datos provenientes de animales parados, de lado y acurrucados que fueron convertidos a series de tiempo de la manera relatada en los enunciados anteriores.

De acuerdo con este análisis, existen tres grupos de datos estadísticamente diferentes, uno claramente distinguible con un valor de silueta⁷ de aproximadamente 0.8 y otros dos con un valor de silueta de alrededor de 0.6 (Figura 7.14).

⁷ Este valor indica el grado de correlación entre los datos que conforman el grupo, su valor máximo es 1.

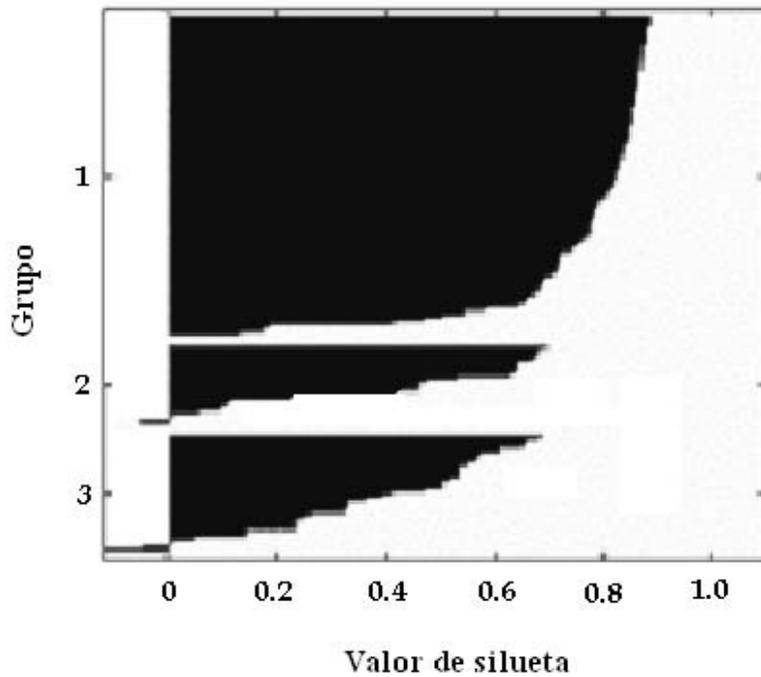


Figura 7.14. Grafica de silueta. Por definición, entre más grande es el valor de silueta mejor separados están los grupos.

En la Figura 7.15 los datos son graficados con respecto a B2, B3 y B4, y de nuevo aparecen tres grupos con el centroide de cada uno de ellos (círculo marcado con una X) separado de los demás. Nótese que los valores se encuentran bastante cercanos al centroide cuando el acocil está parado (cuadros azules) o de lado (triángulos rojos) y que, en el caso del acocil acurrucado (rombos púrpuras), los valores se encuentran relativamente dispersos. Esto confirma lo observado en las gráficas de TW, pues indica que al estar acurrucado, el acocil presenta una actividad cerebral de características intermedias entre parado y de lado.

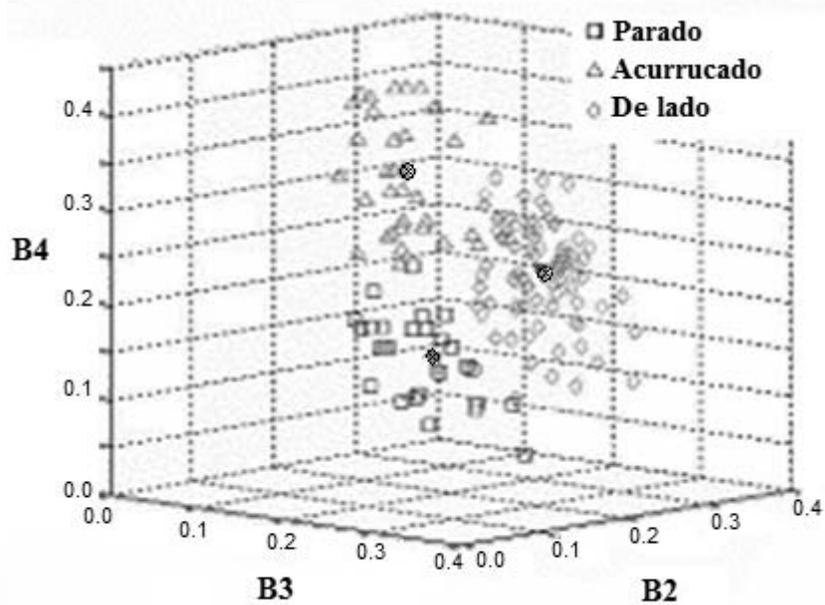


Figura 7.15. Grupos clasificados. Los círculos marcados con una x son los centroides.

Cuando se grafican las distancias relativas entre cada segmento y el centroide del grupo al que pertenece (Figura 7.16), incluyendo a la banda B4, la actividad cerebral del acocil todavía se puede clasificar en los tres estados alrededor de los centroides en las cuatro bandas de frecuencia. Nótese que la dispersión es mínima para el acocil de lado, un poco mayor en el caso del acocil parado y grande en el caso del acocil acurrucado. La dispersión podría indicar la presencia de microestados cerebrales.

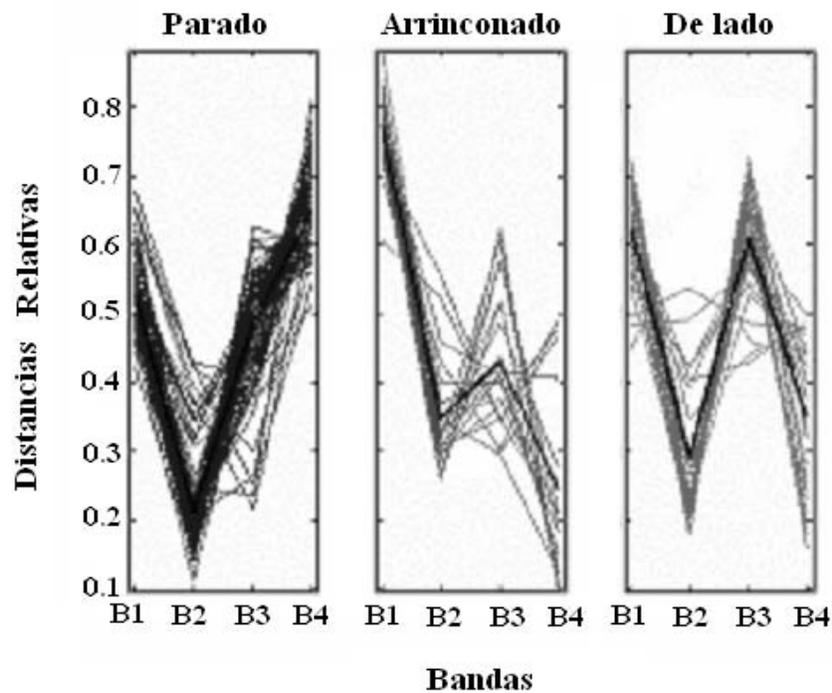


Figura 7.16. Gráfica de distancias relativas contra bandas de frecuencia. Las líneas negras representan el centroide.

7.2. Mapeo cerebral

Los resultados obtenidos hasta entonces hicieron necesario explorar si los cambios eran comunes a todo el cerebro del acocil, si existe un sitio donde inicien y, de ser cierto esto último, saber en qué secuencia ocurren y a qué velocidad suceden, de manera que se pueda tener una idea de la dinámica del sueño desde el punto de vista electrofisiológico. Por ello es menester tener un mapa de la actividad de las diferentes regiones del cerebro del acocil, durante los estados de vigilia y de sueño. En un animal deambulante esto es difícil desde el punto de vista técnico pues, idealmente, se requiere tener un gran número de electrodos sobre regiones identificadas de la superficie cerebral, o bien modificar la posición del electrodo para poder registrar las diferentes regiones cerebrales de un mismo animal, en las dos condiciones. Un mapeo de este tipo brindaría, entonces, información sobre la forma y la secuencia en que ocurren los cambios en la actividad cerebral. Es decir, respondería a preguntas relativas al origen de las

ondas lentas, la secuencia de sincronización y, finalmente, permitiría postular un origen para este tipo de cambio en la actividad eléctrica cerebral. Por ello en el laboratorio desarrollamos una preparación de acocil suspendido. En ella el animal tiene movimiento prácticamente libre pero sin poder desplazarse dentro del acuario. Además permite la visualización total del cerebro y con ello colocar electrodos más finos en las diferentes regiones cerebrales e incluso atravesar la vaina de tejido conectivo que cubre el cerebro y obtener información más puntual sobre los cambios de actividad en regiones más circunscritas.

7.2.1. Registros

Como menciono en la sección de métodos, en esta preparación el acocil se encuentra sujeto a un soporte sin limitación alguna en el movimiento de sus apéndices, pero sin apoyarse sobre la superficie del acuario. Puede flexionar o extender sus patas ambulatorias, las quelas o las cola - incluso presentar el coletazo asociado con la respuesta de escape - pero no se desplaza dentro del acuario, lo que permite realizar una apertura amplia del exoesqueleto por arriba del *rostrum* y, tras rechazar las vísceras con un separador de plástico, tener una visión completa del cerebro. De esta manera pude colocar los electrodos en regiones claramente identificadas y cambiar su posición donde fuera necesario (Figura 6.3). Sin embargo, esta misma preparación presenta un problema importante. ¿Un animal en estas condiciones puede dormir? En el acocil deambulante he podido asociar la posición de lado con la aparición de sueño de ondas lentas como lo he relatado en párrafos anteriores. Pero en un animal sujeto no puede ocurrir este cambio de posición, por lo que tuve que realizar los experimentos que relato a continuación para validar esta preparación.

Cuando un animal en estas condiciones se encuentra en el acuario inmediatamente después de realizar la cirugía que permite tener expuesto el cerebro, está activo, con movimientos espontáneos e intensos de todos sus apéndices. Tras un tiempo variable, el acocil permanece con la cola extendida,

moviendo suavemente quelas, antenas, anténulas y patas ambulatorias. Una segunda conducta se presenta después de varios minutos de mantener al acocil suspendido, en ella el animal parece perder el tono muscular y la cola cuelga semiflexionada, desciende las antenas, anténulas y quelas, y permanece inmóvil por periodos de tiempo variables. Estas dos conductas sugieren la presencia de dos estados cerebrales en esta preparación, el del animal activo (alerta) y el del animal en reposo. La pregunta obvia es si esta segunda conducta corresponde a periodos de sueño. Los registros electrofisiológicos y algunas manipulaciones experimentales me permitieron responder a ella.

En la figura 7.17 presento registros eléctricos de la actividad espontánea del cerebro de un acocil "alerta" obtenidos de diferentes regiones del cerebro. Aunque las regiones exploradas incluyen a las principales divisiones del cerebro, en la figura solamente incluyo las de un lado pues las contralaterales son iguales. Al comparar estos registros con los de acociles deambulantes, se observa un mayor número de espigas y el trazo tiene menos 'ruido eléctrico', lo que puede deberse a que el electrodo se encuentra clavado en el cerebro.

En el protocerebro superior lateral (E1 y E2), el registro se caracteriza por una basal plana, en la que se sobreponen espigas de gran amplitud que aparecen esporádicamente y que también se ven en el protocerebro superior medio, pero acompañadas por un gran número de espigas pequeñas.

Por otra parte, en el complejo central encontré una gran cantidad de espigas de distintos tamaños montadas en una onda de baja frecuencia. Esta onda aparece ocasionalmente en deutocerebro, donde las espigas son más regulares tanto en tamaño como en frecuencia de disparo.

Finalmente, en tritocerebro hubo pocas espigas montadas en una onda de baja frecuencia, alrededor de los 3 Hz.

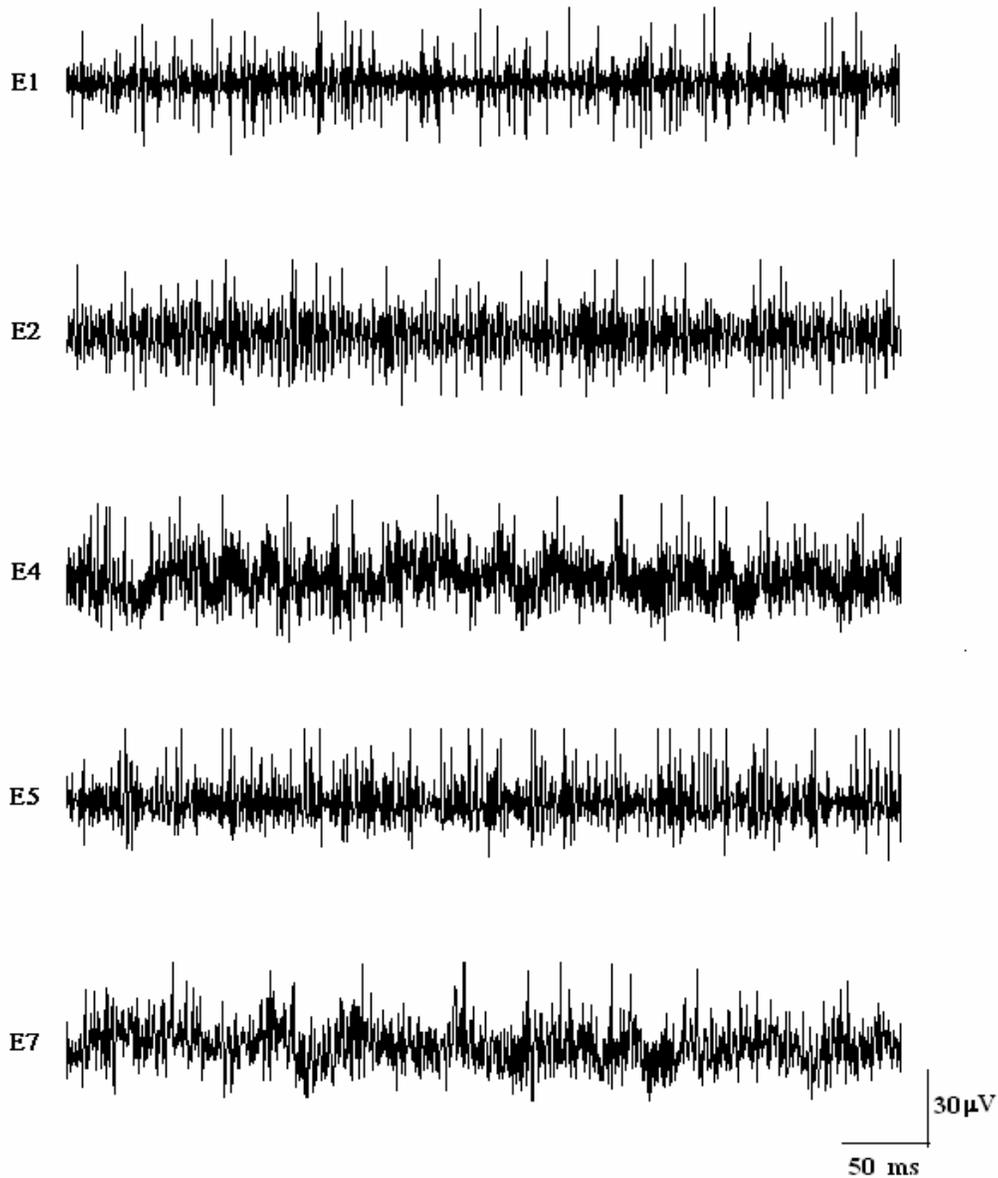


Figura 7.17. Actividad eléctrica del cerebro del acocil alerta. Las posiciones de los electrodos son las mismas de la figura 6.3.

La viabilidad de esta preparación queda de manifiesto no solamente por las características de la actividad espontánea, del todo comparable con la del animal deambulante, sino por la respuesta a manipulaciones experimentales simples. En la Figura 7.18 presento registros de la actividad eléctrica del cerebro del acocil "alerta" durante y después de la aplicación de destellos de luz. Cada destello de prueba produce una descarga de espigas de alta amplitud (potenciales en respuesta a los estímulos visuales, VEPs, por sus siglas en inglés). Los VEPs se registran en el

protocerebro superior, tanto lateral como medio, y en el complejo central. La aplicación de un tren de estímulos luminosos a frecuencia de 10 Hz induce, además de los VEPs, una descarga de espigas denominada respuesta al estímulo omitido (OSP, por sus siglas en inglés). Esta respuesta no es una posdescarga, sino que ocurre en el momento en que debiera presentarse el siguiente estímulo de haber continuado el tren y está relacionada con un proceso cognitivo básico denominado 'expectación' (Bullock, 1993). Los OSPs se registran claramente en el complejo central y con menor amplitud en el protocerebro superior medio y deutocerebro.

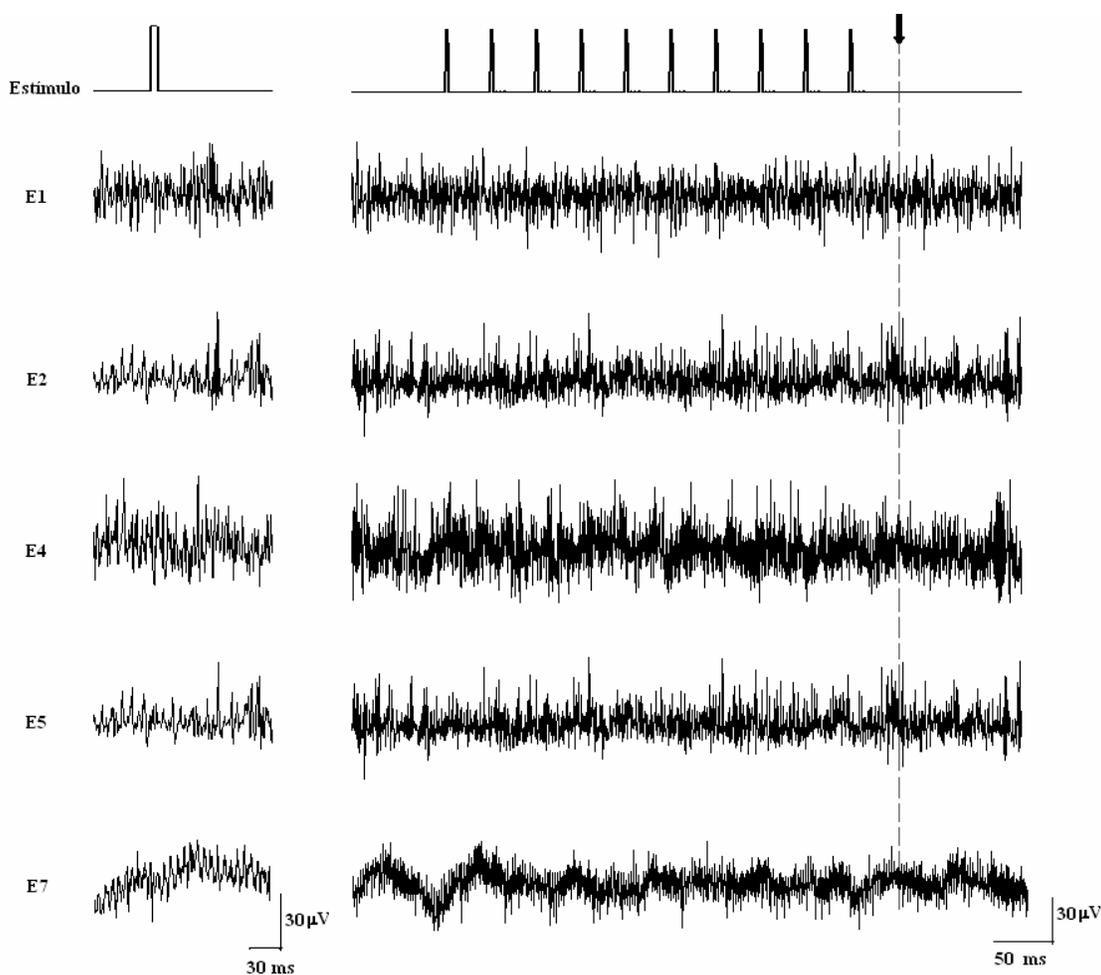


Figura 7.18. Actividad eléctrica del cerebro de un acicil suspendido alerta (obtenidas de las regiones descritas en la figura 6.3), en respuesta a estímulos luminosos (indicado como Estímulo en el trazo superior). Del lado izquierdo se muestran respuestas únicas, VEP. Del lado derecho la respuesta a un tren de estímulos a 10 Hz. La flecha indica el momento en que ocurriría el siguiente estímulo si el tren hubiera continuado, es decir señala la presencia de un OSP.

En el acocil "dormido" se modifica la actividad eléctrica de las regiones registradas, de tal manera que en el protocerebro superior, tanto lateral como medio, disminuye la amplitud de las espigas. En deutocerebro, además de una disminución similar, aparecen ondas de baja frecuencia. En el complejo central y en tritocerebro no hay cambios significativos (Figura 7.19).

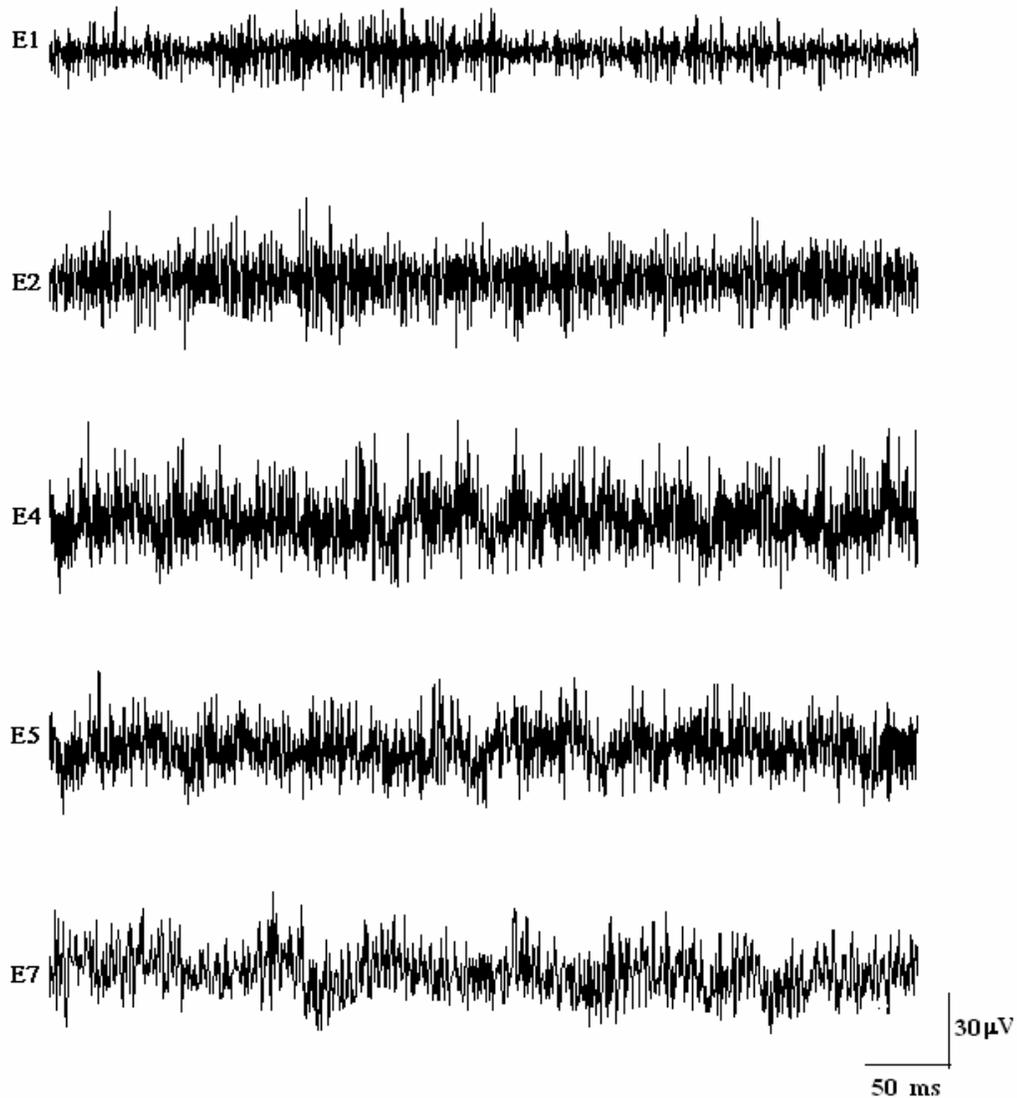


Figura 7.19. Actividad espontánea del cerebro del acocil dormido. Las posiciones de los electrodos son las indicadas en la figura 6.3.

Los estímulos luminosos aplicados al acocil "dormido" resultan en VEPs de menor amplitud, mientras que los OSPs desaparecen (Figura 7.20). Esto confirma que, debido a que se cumplen tanto con los criterios conductuales como con los electrofisiológicos que definen el estado cerebral de sueño, puedo llamar sueño al estado cerebral durante el cual se genera la actividad eléctrica que se registra en un acocil que ha perdido el tono muscular.

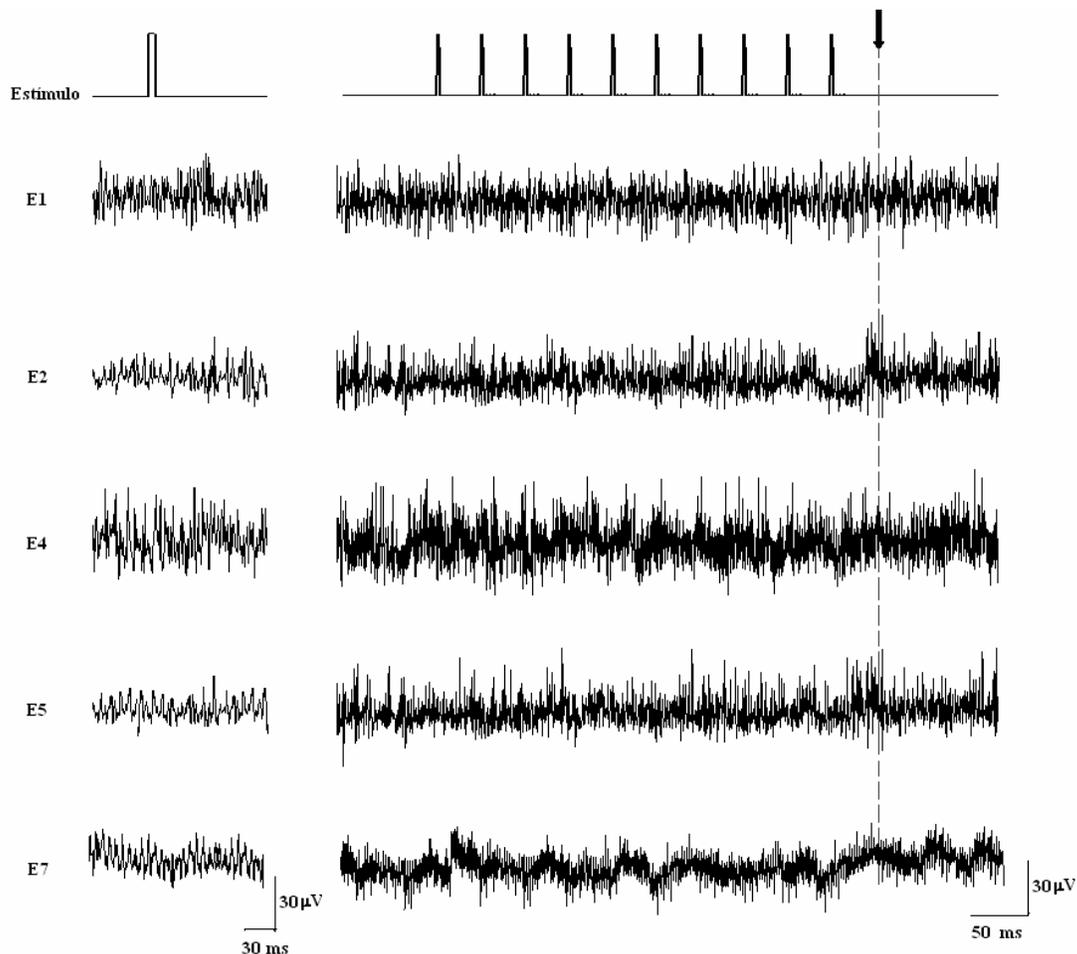


Figura 7.20. Actividad eléctrica del cerebro de un acocil dormido en respuesta a estímulos luminosos. Del lado izquierdo se encuentran las respuestas a estímulos únicos, del derecho las obtenidas por estimulación repetitiva a 10 Hz. La flecha indica el momento en que ocurriría el siguiente estímulo si el tren hubiera continuado. Nótese que ya no están presentes las descargas que corresponden a los VEPs ni a los OSPs. Las posiciones de los electrodos son las indicadas en la figura 6.3.

7.2.2. Transformada wavelet

Al analizar con la transformada wavelet los registros obtenidos de acociles suspendidos, dormidos y alerta, en varias regiones del cerebro, encuentro cambios claros en la actividad en casi todas las regiones.

En el protocerebro superior lateral del animal alerta hay una actividad muy regular, con potencias altas que disminuyen cuando el acocil está dormido. En el protocerebro superior medio, la actividad es también muy regular, con potencias altas que no cambian cuando el acocil está dormido. En el cuerpo central la actividad de muy baja frecuencia es regular y alrededor de los 30-45 Hz se presentan las caídas en potencia características del sueño, las que aparentemente están presentes en todo momento, aunque son más pronunciadas cuando el acocil está dormido. Cuando el acocil está alerta, la actividad eléctrica del deutocerebro es muy similar a la del protocerebro superior, pero cuando el acocil está dormido, aparecen depresiones alrededor de 30-45 Hz.

Por último, en tritocerebro la potencia es muy alta para las frecuencias más bajas, alrededor de los 5 Hz, y permanece elevada cuando el acocil está dormido; el cambio más significativo en esta región es un aumento en la homogeneidad de la potencia de este intervalo de frecuencias (Figura 7.21).

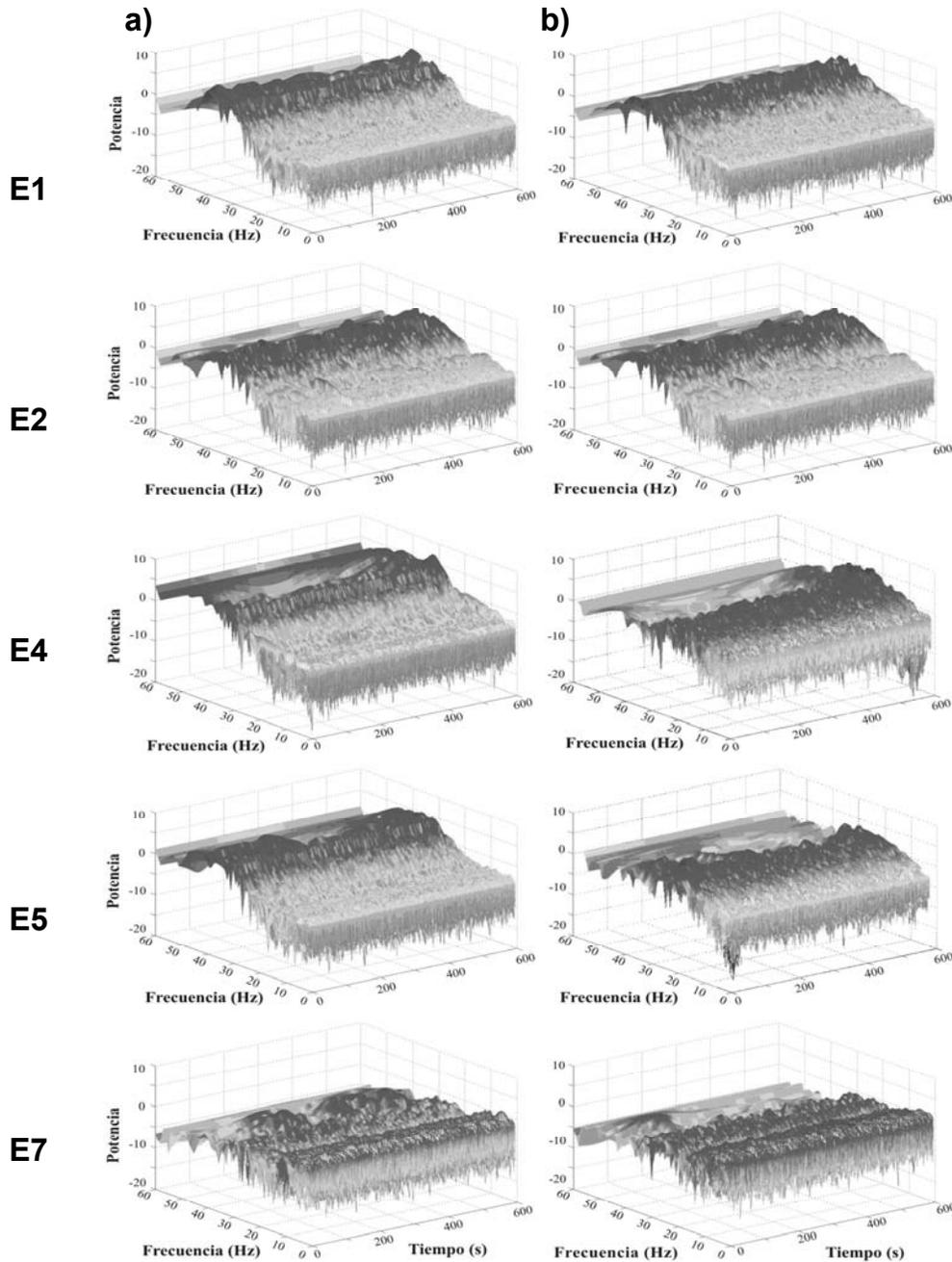


Figura 7.21. Graficas 3-D de la transformada Wavelet de la actividad eléctrica registrada en varias regiones del cerebro de acociles, a) alerta y b) dormido. Las posiciones de los electrodos son las indicadas en la figura 6.3.

7.2.3. Conteo de espigas

Los electrodos capaces de atravesar la vaina de tejido conectivo que cubre el cerebro del acocil, permiten registrar espigas provenientes de regiones muy cercanas al electrodo. Por lo tanto, puedo usar el conteo de espigas como una

herramienta para estudiar los cambios en la excitabilidad de las neuronas vecinas al electrodo, durante los estados de alerta y de sueño. Colocando estos electrodos en pares o triadas en diferentes regiones del cerebro, pude obtener registros simultáneos de esas áreas y correlacionar los tipos de actividad encontrada. El número de espigas registradas en el protocerebro superior lateral se reduce cuando el acicil duerme, mientras que en el protocerebro superior medio y en tritocerebro permanece relativamente constante, y en el complejo central presenta oscilaciones; esto último ocurre también en deutocerebro aunque con un pequeño retardo (0.75-2 s) (Figura 7.22).

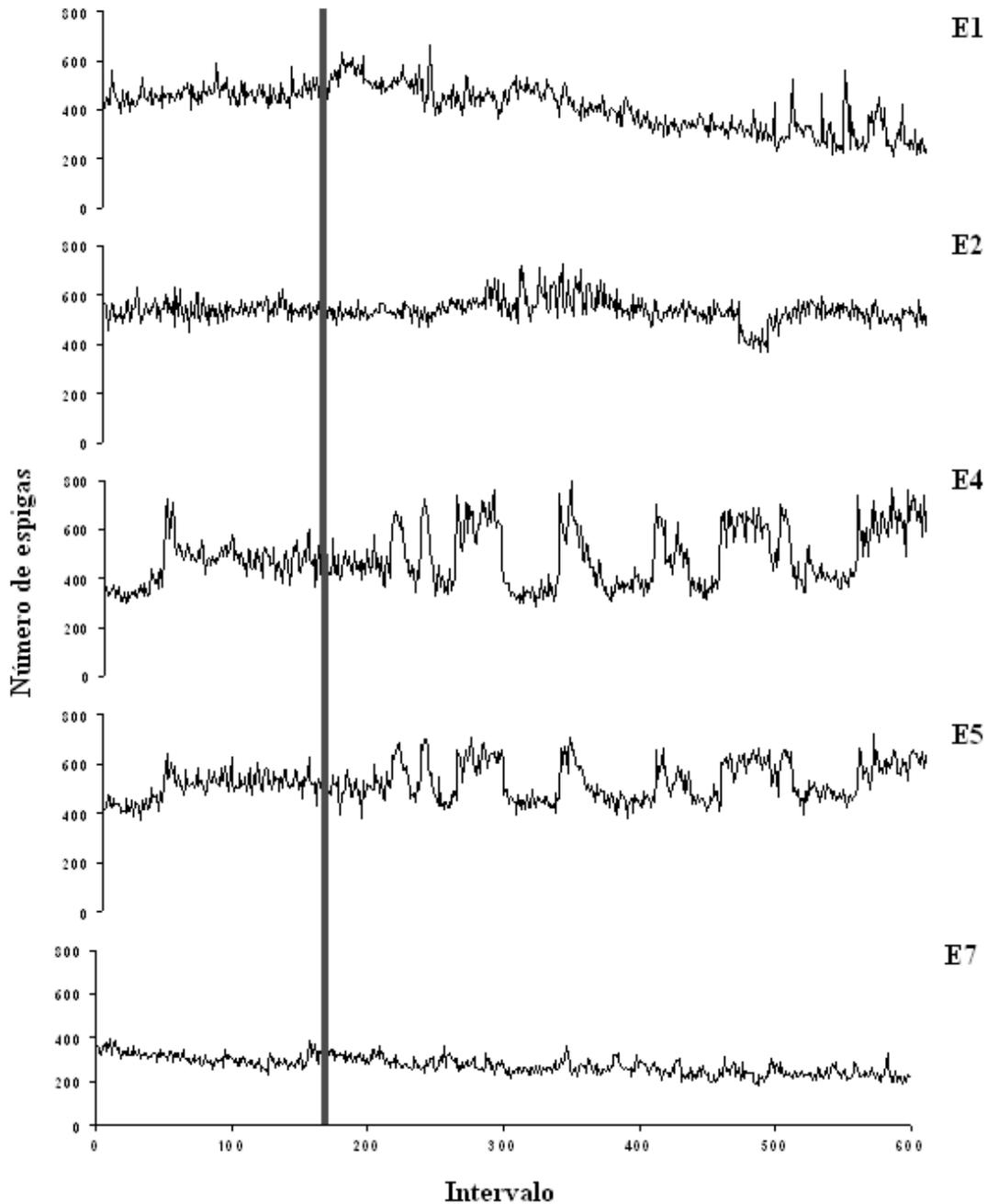


Figura 7.22. Número de espigas durante la transición (línea roja) de acocil alerta a dormido. Las regiones exploradas son las indicadas en la figura 6.3.

7.3. Comparación entre las preparaciones

El acocil suspendido muestra ondas de baja frecuencia en el complejo central (semejantes a las ondas lentas que caracterizan el sueño en el animal deambulante), constantes en amplitud y frecuencia, independientemente del estado cerebral. Esto

me llevó a analizar con más detalle los trazos de ambos tipos de preparaciones, para determinar si, en efecto, ambas señales tienen las mismas características. Para ello utilicé el análisis de agrupamientos descrito antes. Inicialmente incluí datos correspondientes a acociles con electrodos implantados en forma crónica en deuto cerebro. Como se observa en la Figura 7.23, los datos correspondientes al acocil alerta (triángulos rojos) y al acocil dormido (círculos lilas) se separan naturalmente en grupos con correlación interna elevada y se distribuyen alrededor de centroides. Al incluir los datos de la actividad registrada en el complejo central (cuadrados azules), éstos se agrupan alrededor del centroide correspondiente al acocil dormido. Esto significa que las ondas de baja frecuencia registradas en acociles dormidos y en el cuerpo central de acociles suspendidos tienen las mismas características.

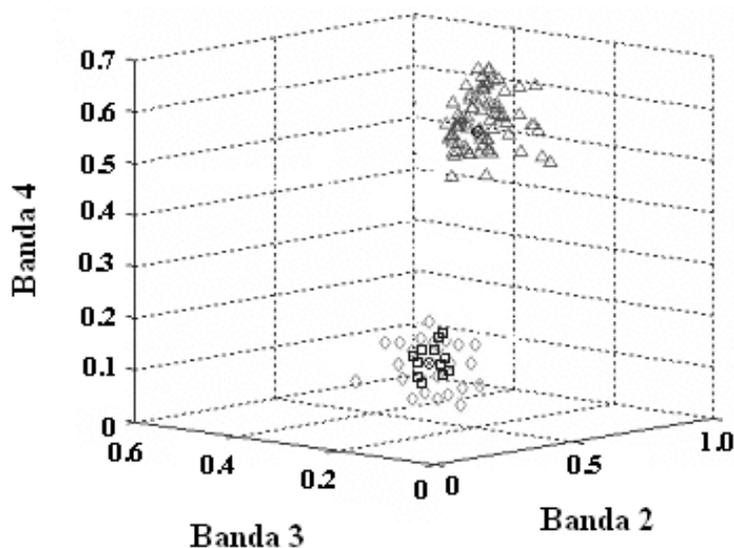


Figura 7.23. Análisis de agrupamientos de la actividad registrada en el complejo central de un animal suspendido y en deuto cerebro en un acocil deambulante. Los triángulos rojos representan datos correspondientes al acocil alerta, los círculos lilas a acociles dormidos y los cuadrados azules la actividad espontánea del complejo central de acociles alerta suspendidos.

El análisis de agrupamientos es muy útil para determinar la correlación interna entre datos, sin embargo, incluye un elemento de subjetividad, ya que para iniciar la operación del algoritmo el usuario determina el número inicial de grupos; por

este motivo, desarrollé dos redes neuronales del tipo competitivo⁸ que aprenden mediante algoritmos no supervisados. La primera red permite determinar de manera objetiva cuántos estados cerebrales puede presentar el acocil y la segunda verifica, mediante un análisis de correlación, si las ondas lentas del complejo central son las mismas ondas que aparecen en otras regiones del cerebro durante el sueño.

Al utilizar la red neuronal artificial para determinar cuántos grupos estadísticamente distintos existen a partir de los registros del animal deambulante, se observa que después de una fase de entrenamiento de 1000 iteraciones, los pesos de la red se estabilizan, y dos de las neuronas de salida c3 y c5, desaparecen porque los pesos w_3 y w_5 se anulan después de un tiempo (Figura 7.24).

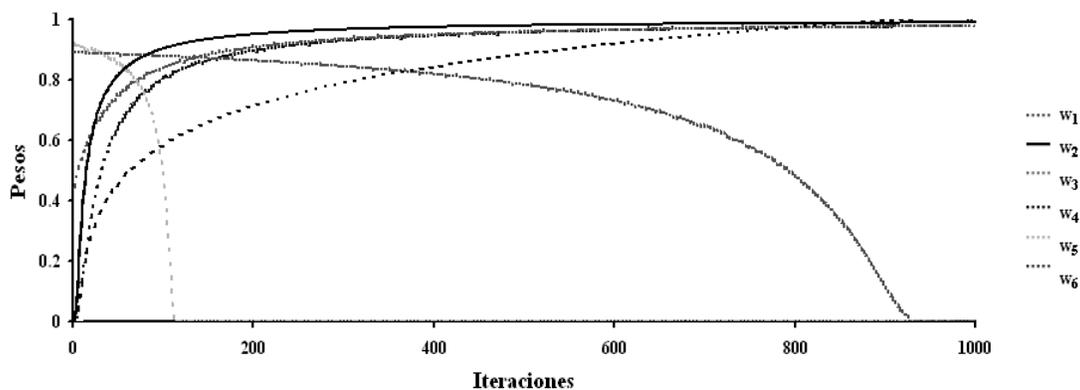


Figura 7.24. Fase de entrenamiento de la red. Los pesos w_3 y w_5 se anulan después de cierto tiempo y quedan 4 grupos de datos estadísticamente distintos.

En la figura 7.25 se observa que la red clasifica los datos en 4 grupos estadísticamente distintos.

⁸ Ver anexo 3

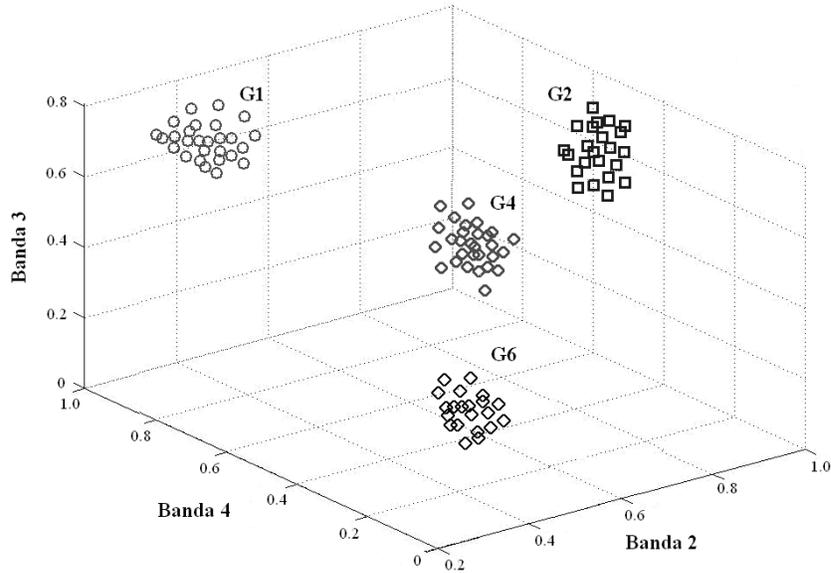


Figura 7.25. Grupos de datos estadísticamente distintos para el acocil deambulante, determinados mediante una red neuronal artificial.

Las características de los grupos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla I		
Grupo	Centroide (x,y,z) (Banda 2,Banda 4,Banda 3)	Radio
G1	0.38,0.82,0.64	0.19
G2	0.89,0.64,0.72	0.17
G4	0.59,0.47,0.61	0.20
G6	0.52,0.45,0.16	0.15

Al buscar la correlación entre los grupos y la conducta del acocil encuentro que el grupo G1 está constituido por segmentos en los que el animal estaba caminando o moviendo las quelas. El grupo G2 corresponde a los momentos en que estaba parado alerta, G6 principalmente a segmentos en los que el acocil estaba de lado y algunos en que estaba acurrucado y G4 incluye principalmente segmentos en que el acocil esta acurrucado pero también incluye segmentos en que el acocil estaba de lado o parado.

Usando como entradas para la misma red los registros de acociles suspendidos, se observa que después de la fase de entrenamiento (Figura 7.26) quedan clasificados 3 grupos distintos (Figura 7.27).

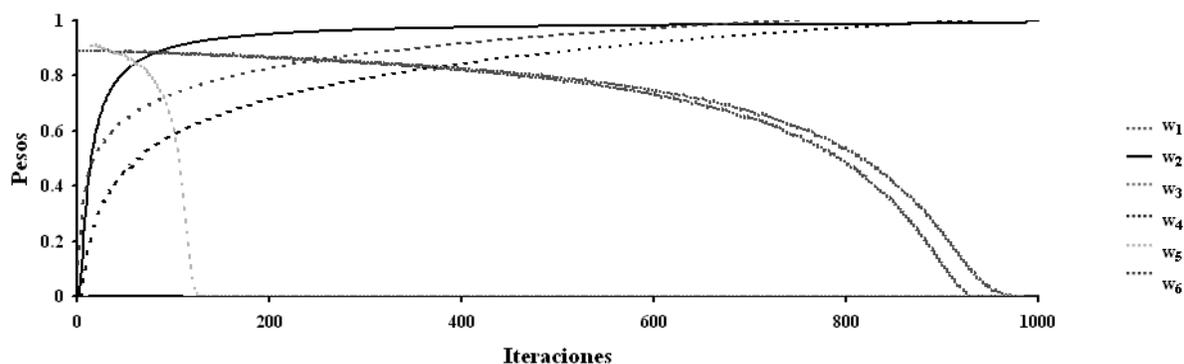


Figura 7.26. Fase de entrenamiento de la red neuronal artificial para datos provenientes de acociles suspendidos. Los pesos w_1 , w_3 y w_5 se anulan después de cierto tiempo y quedan 3 grupos de datos estadísticamente distintos.

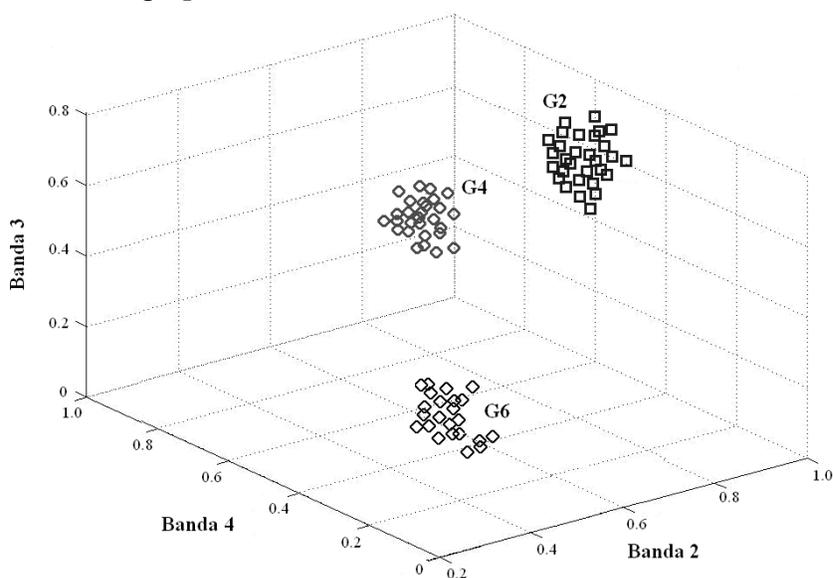


Figura 7.27. Grupos de datos estadísticamente distintos, determinados mediante la red neuronal artificial, para datos provenientes de acociles suspendidos.

Tabla II		
Grupo	Centroide (x,y,z)	Radio
G2	0.86,0.67,0.68	0.17
G4	0.61,0.50,0.63	0.18
G6	0.48,0.46,0.17	0.16

Al buscar la correlación entre los grupos clasificados y la conducta del acocil, encuentro que el grupo G2 corresponde a los momentos en que el acocil movía las antenas, anténulas, quelas y patas ambulatorias, G6 a segmentos en los que el acocil perdía el tono muscular (juzgado porque las quelas, antenas y anténulas quedan inmóviles y laxas, descendiendo), y G4 por segmentos que corresponden principalmente a esta última condición y por ocasiones en que el acocil mantenía los apéndices en movimiento.

Lo expuesto anteriormente confirma que el acocil pasa por al menos tres estados cerebrales: vigilia, sueño y un estado intermedio. Además demuestra que el sueño en el acocil suspendido tiene las mismas características que el sueño en el acocil deambulante.

Por otra parte, los resultados obtenidos parecen indicar que las ondas lentas se originan en el complejo central del cerebro y, durante el sueño, se diseminan por el resto del tejido. Para aclarar este punto, determiné la correlación entre la señal obtenida del complejo central con la de las otras áreas del cerebro del acocil durante varias conductas. En la Figura 7.28 puede observarse que antes que el acocil pierda el tono muscular (momento indicado por la flecha), la correlación es baja tanto para el protocerebro lateral como para el medio (valor de correlación promedio de 0.15 y 0.18 respectivamente), y un poco más alta para el deutocerebro (0.23 en promedio). La correlación comienza a aumentar para las tres áreas un poco antes que se presente el cambio de posición, alcanzando valores promedio de 0.74 para deutocerebro, 0.70 para protocerebro lateral y 0.68 para protocerebro medio.

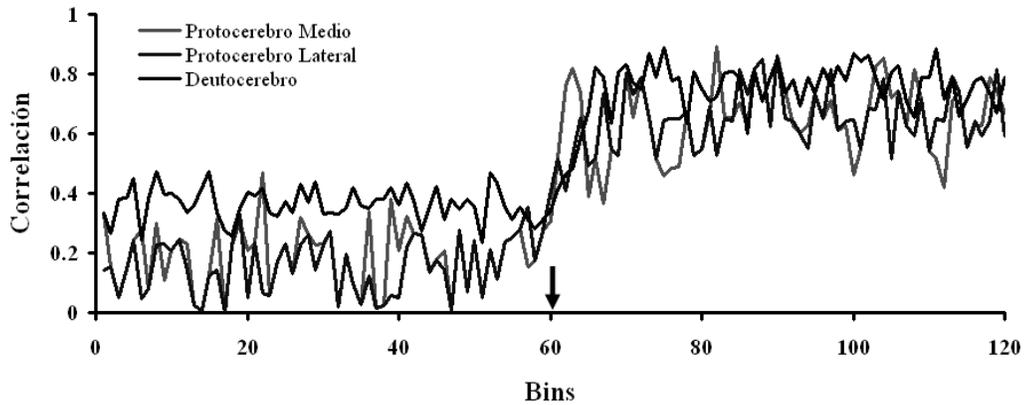


Figura 7.28. Correlación entre la actividad del complejo central y otras áreas cerebrales del acicil. La flecha indica el momento en que el acicil pierde el tono muscular.

Ahora bien, estos resultados encontrarían mayor consistencia y coherencia si se verifican en la preparación deambulante por lo que decidí modificar el electrodo penetrante para poder implantarlo en forma crónica en animales deambulantes. Obtuve registros eléctricos de la actividad del cerebro y al calcular la correlación entre la actividad del complejo central y protocerebro y deutocerebro en una preparación de este tipo (Figura 7.29), encuentro que en ambas regiones la correlación es baja cuando el acicil está parado y aumenta cuando el acicil se pone de lado. Sin embargo, al analizar segmentos largos durante los cuales el acicil permanece en esta posición, se observan momentos en que la correlación disminuye (0.25 para protocerebro y 0.38 para deutocerebro), sin llegar a los valores del estado de alerta. Estos resultados sugieren que el sueño en el acicil está fragmentado en varios microestados o etapas.

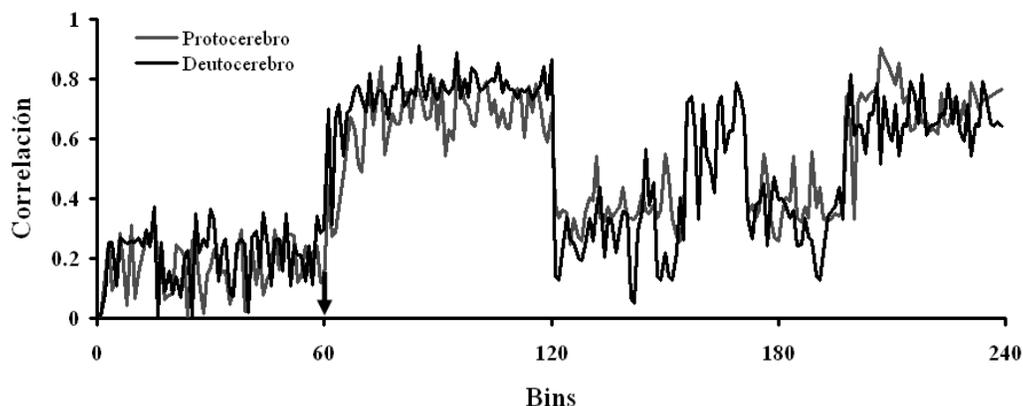


Figura 7.29. Correlación entre la actividad del complejo central y otras áreas cerebrales de un acocil deambulante con los electrodos penetrando la vaina que recubre el cerebro. La flecha indica el momento en que el acocil se pone de lado.

El análisis con transformada wavelet y con redes neuronales comprueba que la actividad generada en el complejo central es igual a la actividad de ondas lentas que aparece en otras áreas del cerebro del acocil durante el sueño. Esto puede significar que las ondas lentas características del sueño del acocil se originen en el complejo central y durante el sueño se propaguen, mediante un proceso activo, a otras regiones cerebrales. Otra posibilidad es que la sincronización de las áreas cerebrales sea un proceso pasivo que resulte del cese en el procesamiento de las entradas sensoriales. Para aportar elementos en torno a la hipótesis de sincronización pasiva por interrupción de procesamiento sensorial, registré la actividad eléctrica de un acocil deambulante antes y después de bloquear de manera reversible algunas entradas sensoriales, en particular la visión y la olfacción.

7.4. Bloqueo de entradas sensoriales

7.4.1. Bloqueo de entradas visuales

De acuerdo a los registros de posición, un acocil duerme 35.7 % más después de permanecer cegado por 5 días (Figura 7.30).

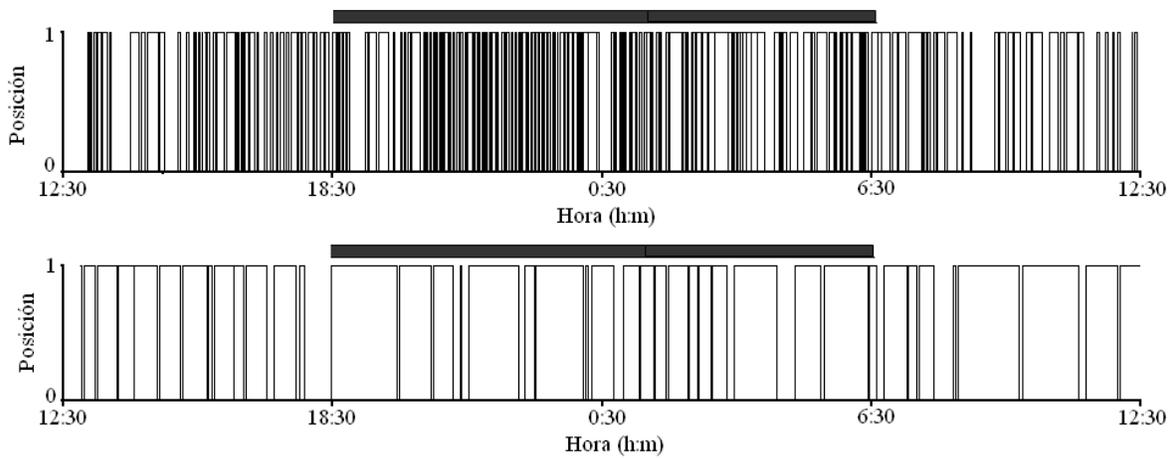


Figura 7.30. Registro de posición de un acocil antes (arriba) y 5 días después de ser cegado reversiblemente (abajo).

La tabla III resume las diferencias sobresalientes, desde el punto de vista conductual, entre las dos condiciones:

Tabla III		
Variable	Acocil Control	Acocil Cegado
Tiempo total de lado (h)	14	19
Tiempo de lado promedio por hora (min/h)	17.6	39.4
Número de transiciones	319	78
Número de transiciones promedio por hora	15.8	2.5

En cuanto a la actividad eléctrica del complejo central (Figura 7.31), el trazo proveniente del acocil cegado y alerta muestra una disminución de 47% en el número de espigas con respecto a la señal obtenida antes de bloquear las señales visuales (espigas comprendidas entre los límites $[\mu-\sigma, \mu-2\sigma]$ y $[\mu+\sigma, \mu+2\sigma]$).

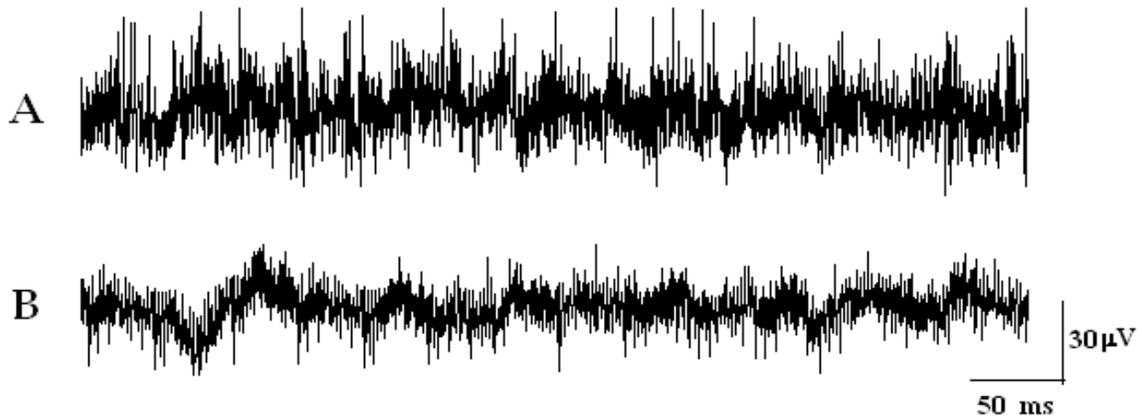


Figura 7.31. Actividad eléctrica del complejo central del cerebro de un acocil alerta A) antes y B) 5 días después de ser cegado reversiblemente.

El análisis con transformada wavelet de la actividad eléctrica del acocil cegado y dormido no muestra cambios significativos con respecto a la de la condición control. La caída en potencia alrededor de los 30-45 Hz se mantiene constante en ambas condiciones (Figura 7.32).

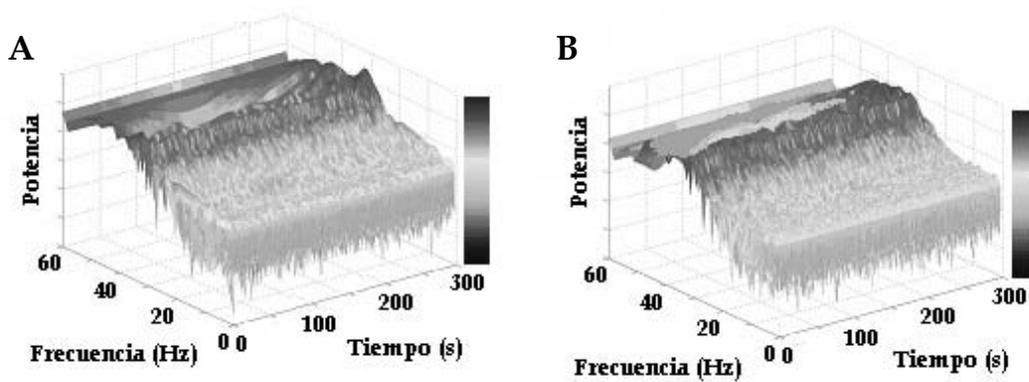


Figura 7.32. Transformada Wavelet de la actividad eléctrica del complejo central del cerebro de un acocil dormido A) antes y B) 5 días después de ser cegado reversiblemente.

Al cegar un acocil la cantidad de información que procesa el cerebro debe reducirse y, tomando en cuenta mi propuesta sobre el cuerpo central como oscilador, debería encontrarse una mayor correlación entre la actividad eléctrica del deutocerebro y la del complejo central. Para probar esto utilicé una función de correlación. Los resultados son consecuentes con las suposiciones planteadas. La

correlación deutocerebro-complejo central durante el estado de alerta es mayor en el animal cegado que en el control (promedios de 0.29 y 0.12 respectivamente) y aumenta cuando el acocil se pone de lado, alcanzando valores promedio de 0.79 y 0.62, respectivamente (Figura 7.33). Estos resultados sugieren que la propagación de las ondas lentas es un proceso pasivo.

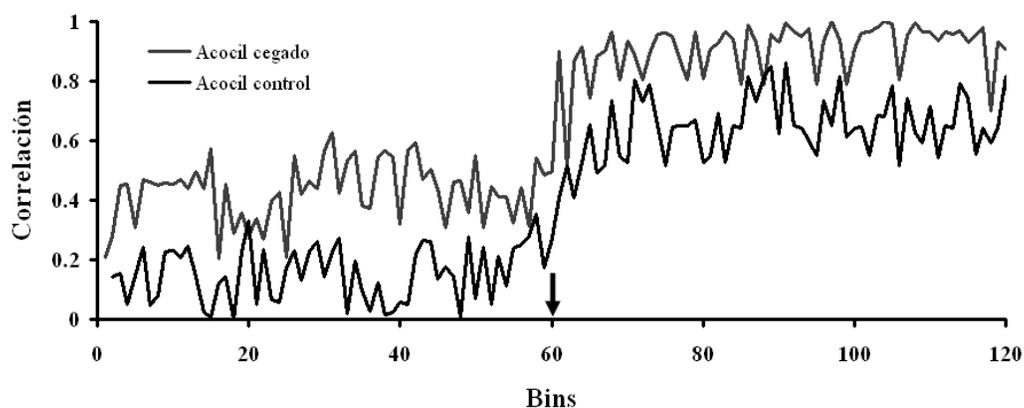


Figura 7.33. Correlación entre la actividad del complejo central y del deutocerebro de un acocil antes y después de 5 días de permanecer cegado reversiblemente. La flecha indica el momento en que el acocil se pone de lado.

7.4.2. Bloqueo de entradas olfatorias

De acuerdo a los registros de posición, el bloqueo de la entrada olfatoria en un acocil aumenta en 41.6 % el tiempo que pasa de lado durante un ciclo de 24 horas (Figura 7.34).

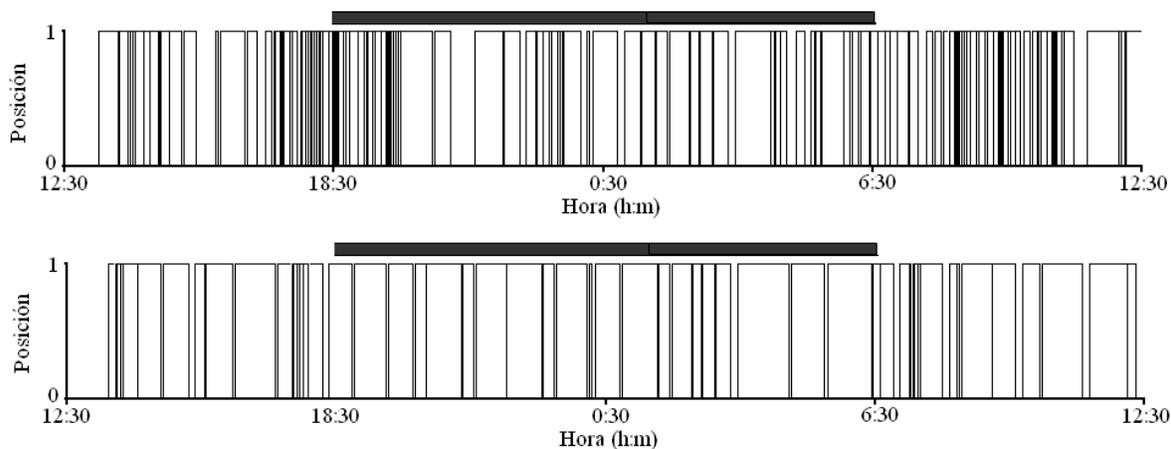


Figura 7.34. Registro de posición de un acocil antes (arriba) y 2 horas después del lavado de anténulas (abajo).

La tabla IV resume las diferencias sobresalientes, desde el punto de vista conductual, entre las dos condiciones:

Tabla IV		
Variable	Acocil Control	Acocil Anósmico
Tiempo total de lado (h)	12	17
Tiempo de lado promedio por hora (min/h)	15.1	31.2
Número de transiciones	252	69
Número de transiciones promedio por hora	11	1.2

En cuanto a la actividad eléctrica del complejo central del cerebro del acocil anósmico y alerta, no hay diferencia en el número de espigas con respecto a la señal obtenida antes de bloquear las señales olfativas (Figura 7.35).

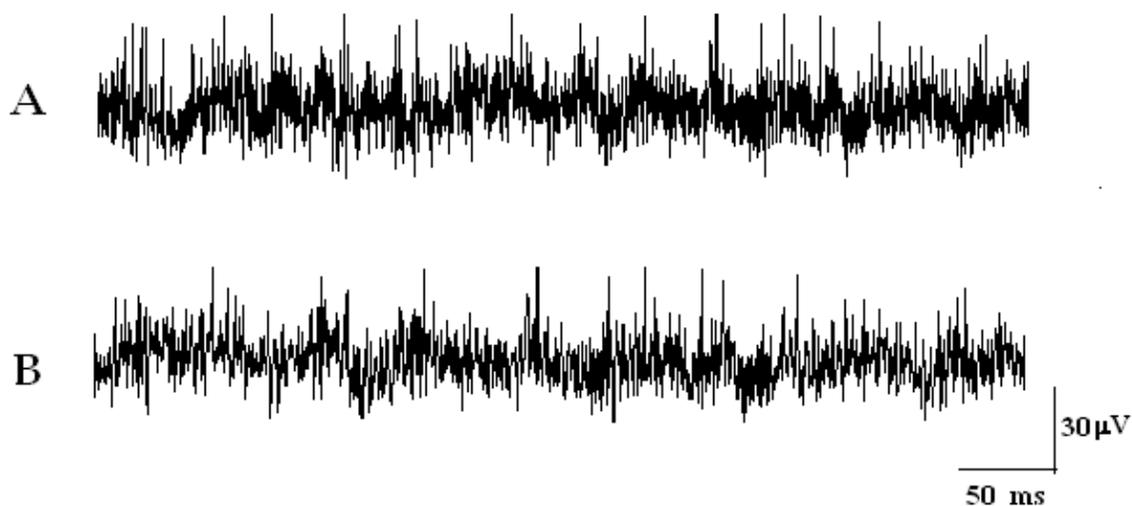


Figura 7.35. Actividad eléctrica del complejo central del cerebro de un acocil alerta A) antes y B) 2 horas después del lavado de anténulas.

El análisis con transformada Wavelet de la actividad eléctrica no muestra cambios significativos con respecto a la condición control, cuando el animal duerme la caída en potencia alrededor de los 30-45 Hz se mantiene constante en ambas condiciones (Figura 7.36).

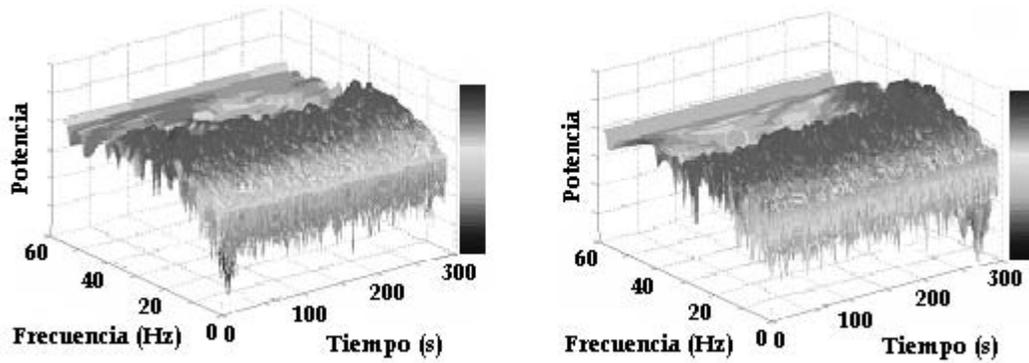


Figura 7.36. Transformada Wavelet de la actividad eléctrica del complejo central del cerebro de un acicil dormido A) antes y B) 2 horas después del lavado de anténulas.

La correlación deutocerebro-complejo central no presenta cambios al comparar entre la condición control y el acicil anósmico. En ambos casos la correlación durante el estado de alerta es baja (promedios de 0.16.6 y 0.15 respectivamente) y aumenta cuando el acicil se pone de lado, alcanzando valores promedio de 0.68 y 0.72 respectivamente (Figura 7.37).

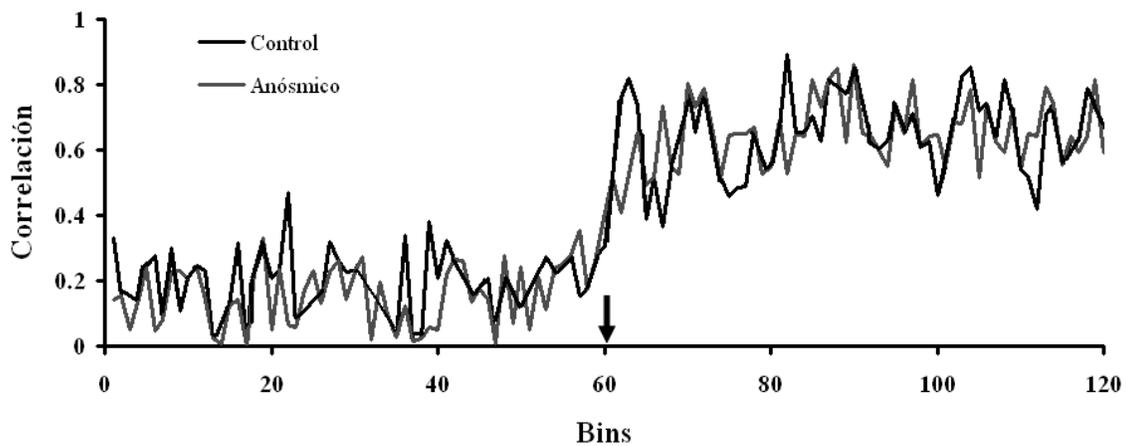


Figura 7.37. Correlación entre la actividad del complejo central y el deutocerebro de un acicil antes y después de un lavado de anténulas. La flecha indica el momento en que el acicil se pone de lado.

Finalmente, para hacer una comparación en conjunto de la actividad eléctrica cerebral de los aciciles cegado y anósmico, utilicé los datos de agrupamientos con redes neuronales que mostré en el apartado anterior (Figura 7.27). De acuerdo a dicho análisis es posible agrupar las señales en tres grupos, la clasificación la realicé con base en las características eléctricas de la señal, las bandas 1 y 2

incluyen señales de baja potencia (La banda 1 incluye de 1 a 30 Hz y la banda 2 de 30 a 60 Hz) mientras que la banda 3 incluye frecuencias altas (de 61 a 1000 Hz).

En la Figura 7.38 incluí los datos de acociles cegados y anósmicos. Los datos correspondientes al acocil cegado parado (rombos verde oscuro) muestran mayor correlación interna pero se alejan del grupo control (círculo negro) en el eje correspondiente a la banda 3, es decir, en las frecuencias altas, mientras que, cuando el acocil está de lado (rombos verde claro) se mantienen en la esfera del grupo control (círculo azul).

Por otro lado, los datos de acocil anósmico (datos en rosa oscuro) presentan mayor dispersión y se alejan del círculo control (círculo negro) principalmente en los ejes correspondientes a las bandas 1 y 2 (bajas frecuencias) pero, al igual que en el acocil cegado, cuando el animal se duerme, los datos se aglutinan al interior del grupo control (círculo azul).

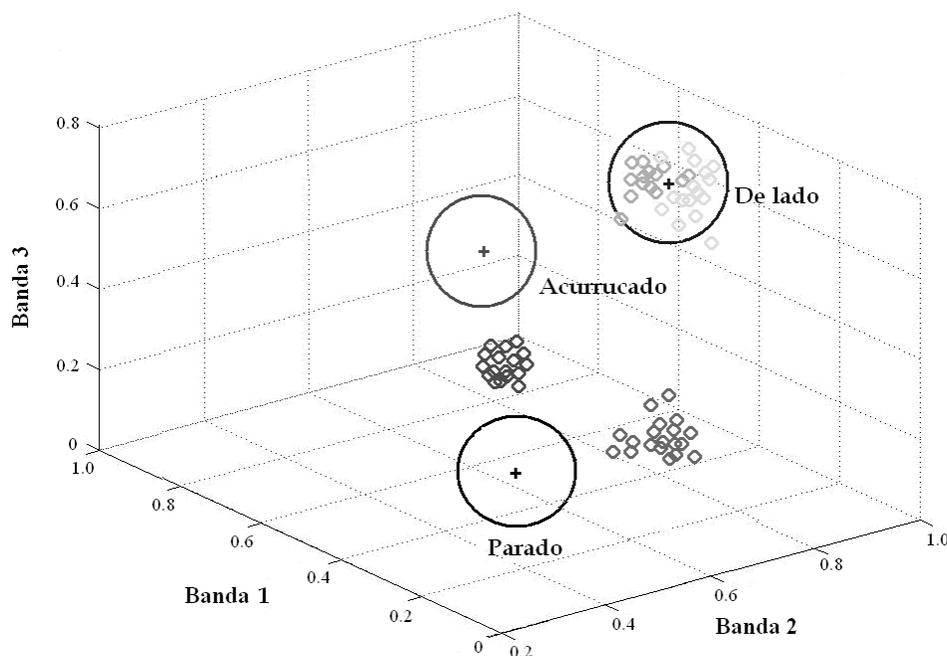


Figura 7.38. Comparación entre los grupos de datos estadísticamente distintos determinados mediante una red neuronal artificial y los datos de acociles cegados (rombos verde oscuros) y anósmicos (rombos rosa oscuro). En el caso de los datos control, solo grafiqué la esfera mínima (círculo negro) y el centroide (cruz) de cada grupo para identificar fácilmente los datos.

8. DISCUSIÓN

8.1. Identificación de estados cerebrales

Desde un punto de vista neuroetológico (Bullock, 1993), en condiciones de laboratorio, es posible distinguir en el acocil dos estados cerebrales, vigilia y sueño. En el primero, el animal deambula por el acuario o se mantiene parado con movimientos de antenas, de anténulas o realizando labores de limpieza de cualquiera de ellas. La actividad cerebral registrada durante estos momentos se caracteriza por multitud de espigas irregulares en frecuencia y amplitud, montadas sobre una línea base relativamente plana (Hernández y cols., 1996). Durante el sueño el acocil se pone de lado a nivel de la superficie del agua, como lo relaté en secciones precedentes, y la actividad cerebral se caracteriza por la reducción y casi desaparición de espigas, las que son sustituidas por ondas lentas de baja amplitud y frecuencia (Ramón y cols., 2004). En los experimentos que realicé nos interesaba obtener información sobre las características electrofisiológicas de estos dos estados, cómo y cuándo se presentan, cómo están conformadas, cuál es la asociación con la expresión conductual de los mismos, en suma, caracterizarlos desde el punto de vista neuroetológico. Por ello, partí del registro simultáneo de los cambios conductuales (mediante videos de larga duración), junto con registros de la actividad eléctrica del cerebro, mediante electrodos implantados crónicamente en animales deambulantes. Los registros “crudos” de la actividad eléctrica cerebral, muestran cambios que son difíciles de evaluar, por lo que era necesario su análisis mediante las diferentes técnicas que se aplican en series de tiempo similares.

Cabe destacar que dicho análisis, junto con el estudio conductual me permitió:

- i)* identificar los estados cerebrales correspondientes al sueño y la vigilia descritos en trabajos previos;
- ii)* demostrar que además de éstos, existe un tercer estado cerebral con características intermedias (acocil acurrucado) y;
- iii)* extraer las

características electrofisiológicas principales de cada uno de los estados cerebrales mencionados.

El estado de vigilia es particularmente inestable, en la medida en que el animal interactúa con el medio, camina aparentemente al azar o realiza exploraciones periódicas de su entorno, responde a la presencia del investigador o de conespecíficos, realiza labores de limpieza de antenas o anténulas, etcétera. Es difícil analizar estas actividades no tanto desde el punto de vista conductual – construir un etograma de las mismas es relativamente sencillo – sino desde el punto de vista de la actividad eléctrica pues cada movimiento brusco del acocil es capaz de introducir variaciones en el registro de la actividad eléctrica del cerebro, en particular por el movimiento de los cables que conectan los electrodos a las sondas de alta impedancia. Por otro lado las actividades que desarrolla un animal en estas condiciones parecen aleatorias y no hemos encontrado una manera confiable de inducir las de tal suerte que sean repetitivas y consistentes desde el punto de vista estadístico. Por ello, decidimos estudiar a profundidad el estado de sueño, que por otra parte tiene puntos de referencia muy importantes en multitud de especies, incluyendo el humano.

El estado de sueño es una conducta que, aunque se presenta a intervalos irregulares a lo largo del ciclo de 24 horas, cuando ocurre es con características que, en conjunto, son comunes a todos los acociles estudiados e incluye cambios en la actividad eléctrica del cerebro que son interesantes por sí mismos y cuyo análisis podría aportar elementos en cuanto a su origen y las funciones que cumple esta notable actividad cerebral. En consecuencia la discusión que sigue se centra en este estado cerebral.

8.1.1. Análisis con transformada wavelet

El electroencefalograma (EEG) de los vertebrados ha sido analizado mediante la transformada rápida de Fourier (Thakor y Tong, 2004). Sin embargo, el análisis de Fourier fue diseñado para señales estacionarias y periódicas. En los mamíferos, la FFT funciona debido a que en la mayoría de los casos, ya sea en un individuo despierto o dormido, las señales del EEG son estacionarias o cuasi-estacionarias.

Comparada con el EEG del vertebrado, la actividad eléctrica del cerebro del acocil es mucho menos homogénea, está compuesta tanto por componentes de baja frecuencia como por espigas. Para valorar la posibilidad de analizar la actividad eléctrica del cerebro del acocil con FFT calculé sus parámetros estadísticos (media y desviación estándar móviles) y encontré que la señal es no-estacionaria tanto en animales alerta como en animales dormidos, por lo que la transformada de Fourier no es aplicable.

Una manera de resolver el problema de análisis es la aplicación de métodos diseñados para señales cuasi-estacionarias (como la TFCT o la transformada Gabor) y restringir el estudio a segmentos de la señal que cumplan con ésta característica. Sin embargo, debido a que la resolución depende del ancho de la ventana, estos métodos requieren de usar ventanas de diferentes anchos, uno para cada grupo de frecuencias a muestrear y, considerando el rango de frecuencias que componen la actividad eléctrica del acocil (1-800 Hz), la utilización de estos métodos resulta poco práctica además de imprecisa al comparar ventanas de distintos tamaños y características. Por lo que, para determinar la dinámica de la actividad eléctrica del cerebro del acocil tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia, es necesaria la utilización de una herramienta distinta, diseñada para el análisis de señales no estacionarias, como la transformada wavelet.

La transformada wavelet es un método de análisis tiempo-frecuencia que, mediante una función madre escalable en tiempo y con propiedades de traslación, rastrea las frecuencias dominantes de una señal (ensanchándose para analizar frecuencias bajas y contrayéndose para las frecuencias altas) y las correlaciona con el tiempo en el que ocurren (Durka y Blinowska, 2001; Thakor y Tong, 2004). La transformada wavelet ha sido utilizada para identificar potenciales relacionados a eventos (ERP, por sus siglas en inglés) (Yordanova y cols., 2002; Quiroga y cols., 2001) y artefactos en el EEG del vertebrado (Kalayci, 1994; Durka y Blinowska, 1996), además de otras señales.

Elegí la función Morlet como wavelet madre debido a que es no-ortogonal (por lo que permite observar variaciones suaves y continuas de potencia), compleja (mejor adaptada para el análisis de comportamientos oscilatorios) y su forma es similar a las espigas de la actividad cerebral del acocil.

El análisis con transformada wavelet identifica simultáneamente los cambios en frecuencia y potencia y los localiza en el tiempo y muestra que cuando un acocil está alerta la actividad se compone de potencias elevadas para todas las frecuencias muestreadas y presenta múltiples picos en los gráficos de 3D. Cuando el acocil permanece de lado además de las de ondas de frecuencias entre 15 y 20 Hz previamente reportadas (Ramón y cols., 2004), la actividad eléctrica cerebral presenta una importante disminución en la potencia de la banda de frecuencias de 30 a 45 Hz (cabe destacar que estas frecuencias no están relacionadas - de ninguna manera - con las observadas en el EEG del vertebrado). Para los segmentos cuasi estacionarios de la señal la TFCT y la transformada Gabor podrían haber arrojado información al respecto, sin embargo, el análisis en frecuencia hubiera requerido de una gran cantidad de ventanas y la localización temporal de los eventos, sobre todo durante las transiciones entre estados (segmentos altamente no-estacionarios de la señal de actividad eléctrica) hubiera sido imposible debido a las limitaciones de éstos métodos.

Además, el análisis con transformada wavelet me permitió encontrar que el sueño de ondas lentas del acocil no es un estado continuo, que por el contrario está compuesto por varias fases de diferentes duraciones que no parecen seguir un patrón o ciclo.

Por otra parte el análisis de los segmentos correspondientes a las transiciones entre estados (altamente no estacionarios) muestra que el acocil no se duerme inmediatamente después de adoptar la posición de lado o después de acurrucarse, al igual que ocurre en los vertebrados, requiere de un periodo de tiempo para dormirse (en el acocil este periodo es de al menos 2 minutos; Mendoza-Ángeles y cols., 2007). Una vez dormido, conforme pasa el tiempo, se presentan descensos en potencia para todas las frecuencias muestreadas, como se muestra en la Figura 7.16.

En resumen, el análisis con transformada wavelet de la actividad eléctrica del cerebro del acocil me permitió establecer que: (1) el sueño en el acocil es un estado único y diferente del correspondiente al animal alerta; (2) el sueño en el acocil no es uniforme, aparentemente está compuesto por microestados con distintos patrones de actividad eléctrica.

8.1.2. Análisis de agrupamientos

Con la finalidad de verificar si las diferencias encontradas por la transformada wavelet son suficientes para discriminar entre estados cerebrales, utilicé un método de análisis de agrupamientos denominado k-means. Este tipo de análisis parte del supuesto de que en una distribución n-dimensional los datos que guardan correlación se agruparán formando acúmulos que pueden ser caracterizados mediante el cálculo de su centroide y las distancias relativas entre los datos al interior del grupo. Este método se ha utilizado para la clasificación de especies, en el cálculo de similitudes entre datos genéticos, en el análisis de

imágenes médicas, en la ecología de poblaciones y en la clasificación de variables económicas (Mamlouk y cols., 2005), entre otros muchos campos.

De acuerdo con el k-means los valores obtenidos del análisis de la actividad eléctrica cerebral del acocil con transformada wavelet pueden clasificarse en tres grupos de datos estadísticamente diferentes que corresponden a las tres posiciones descritas con anterioridad: parado, de lado y acurrucado. Sin embargo, la correlación no es igual para todos los grupos, la menor corresponde al acocil acurrucado. Esto confirma lo observado en las gráficas de TW, pues indica que al estar acurrucado, el acocil presenta una actividad cerebral de características intermedias entre los estados de sueño y de vigilia.

8.2. Mapeo cerebral

8.2.1. Preparación de acocil suspendido

De los resultados obtenidos del análisis con transformada wavelet surgieron interrogantes respecto al origen de las ondas lentas, si los cambios en la actividad eléctrica ocurren en todo el cerebro del acocil o existe un sitio específico donde inicien y, de ser cierto esto último, en qué secuencia ocurren los cambios y a qué velocidad suceden, de manera que pueda tener una idea de la dinámica del sueño desde el punto de vista electrofisiológico. Para responder a estas preguntas, diseñé una preparación que me permite construir un mapa de la actividad de las diferentes regiones del cerebro del acocil, durante los estados de vigilia y de sueño. En la preparación de acocil suspendido el animal tiene movimiento prácticamente libre pero sin poder desplazarse dentro del acuario. Además permite la visualización total del cerebro y con ello colocar electrodos más finos en las diferentes regiones cerebrales e incluso atravesar la vaina de tejido conectivo que cubre el cerebro y obtener información más puntual sobre los cambios de actividad en regiones circunscritas (Mendoza-Ángeles y cols., en preparación).

Los registros conductuales de la preparación de acocil suspendido muestran que, después de un tiempo sin manipularlos, los animales muestran una conducta de reposo: relajan los apéndices y cesan los movimientos de las patas ambulatorias. Este estado de reposo coincide con una reducción de los potenciales visuales evocados, la desaparición de los potenciales al estímulo omitido y una actividad eléctrica cerebral de baja frecuencia característica de los animales dormidos.

La transformada wavelet de la actividad eléctrica del cerebro de acociles suspendidos en estado de vigilia es muy similar a la obtenida de animales deambulantes alertas, la única diferencia es que las espigas son de mayor amplitud y más numerosas en la preparación de acocil suspendido, esto puede deberse a que los electrodos atraviesan la vaina de tejido conectivo. Por otro lado, las características de la actividad eléctrica cerebral de acociles de lado y de acociles colgados en reposo guardan muchas similitudes: ondas lentas, reducción de la potencia para todas las frecuencias muestreadas y en especial para la banda de frecuencias de 30 a 45 Hz. Por lo tanto, el cerebro del acocil genera patrones de sueño tanto si el animal está libre en el acuario o si está fijo, lo que indica que es capaz de presentar el estado de sueño independientemente de la posición.

La demostración de que el animal colgado genera el mismo patrón de sueño que aquel asociado con la posición de lado es importante debido a que ésta posición pudiera no presentarse en su hábitat. El acocil no es un animal gregario, pasa la mayor parte del tiempo en el interior de refugios que construye en la orilla de los ríos o lagos. Es probable que los periodos de sueño se desarrollen al interior de dichos refugios ya que únicamente los abandonan para buscar comida o pareja (Ramón y cols., 2004).

8.2.2. Secuencia de sincronización del cerebro durante el sueño

La preparación de acocil suspendido me permitió además registrar simultáneamente dos o tres áreas del cerebro y por lo tanto establecer una secuencia aproximada en que ocurren los cambios cuando el acocil duerme: Las

ondas lentas con frecuencias entre los 15 y 20 Hz y la depresión en potencia en las frecuencias de 30 a 45 Hz están presentes en el complejo central independientemente del estado cerebral del acocil, de esta área se “propagan” al deutocerebro y finalmente al protocerebro posterior medio. Esta serie experimental confirmó que no hay ondas lentas de sueño en el tritocerebro.

8.3. Origen de las ondas lentas

Las ondas lentas en el EEG de los vertebrados típicamente provienen de grandes grupos neuronales de la corteza o bien de circuitos tálamo-corticales (Crunelli y cols., 2002; Krueger y cols., 1999, Krueger y Obal, 2003; Muzur, 2005), y probablemente son originados por potenciales postsinápticos en la corteza cerebral (Crunelli y cols., 2002; Thakor y Tong, 2004). Durante el sueño, el ritmo talámico sincroniza a las células corticales y genera las ondas lentas de gran amplitud que en los mamíferos deriva en ritmos theta o delta. Sin embargo, las ondas lentas no parecen guardar relación con el tamaño del cerebro o con el ancho de la neocorteza (Lo y cols., 2004; Siegel, 2005).

Aunque hay muchos ejemplos de ondas lentas en el complejo central de invertebrados (Adrian, 1931; Jahn y Crescitelli, 1938; Bullock, 1984; Bullock y Basar, 1988; Gelperin y Tank, 1990; Ramón y cols., 2004), existen escasos estudios sobre su origen y generación. En los vertebrados se ha propuesto que la generación de ondas lentas durante el sueño es debida a cambios en la concentración intracelular de calcio en las células gliales, y que mediante uniones comunicantes entre células gliales y neuronas es posible sincronizar grandes grupos de neuronas (Crunelli y cols., 2002).

En el acocil no hay datos que indiquen el origen de las ondas lentas, pero las dendritas están en la vecindad de grandes cantidades de glía (Sandeman y cols., 1992) y podría especular que existen interacciones similares entre glía y neuronas a

través de ondas de calcio que resulten en ondas lentas en la actividad eléctrica del cerebro del acocil.

8.3.1. El complejo central como oscilador y centro de relevo

En el sistema nervioso central de los artrópodos el cuerpo de las neuronas está separado de los neuropilos, que consisten en procesos neuronales interconectados sinápticamente (Schmidt, 1997). El complejo central del cerebro es una estructura prominente en los insectos (Strauss, 2002); está localizado entre los hemisferios protocerebrales y está compuesto por cuatro neuropilos: el cuerpo en forma de abanico, el puente del protocerebro y los lóbulos laterales, todos ellos interconectados. Recibe entradas de la mayor parte de las regiones del cerebro. Está implicado en el cortejo, la comunicación, la marcha y la orientación en las moscas (Strauss, 2002; Popov y cols., 2005; Sakai y Kitamoto, 2006). Además, el complejo central se encuentra muy relacionado con los llamados cuerpos fungiformes (mushroom bodies), estructuras implicadas en aprendizaje, memoria y sueño en moscas (Heisenberg, 1998, Nitz y cols., 2002; van Swinderen y cols., 2004).

En los decápodos, el complejo central no tiene divisiones claras como en los insectos. En el acocil, comprende el puente del protocerebro, el cuerpo central y los lóbulos laterales (Utting y cols., 2000). El puente del protocerebro es un paquete de fibras gruesas, dobladas a la mitad formando una V, se encuentra detrás de los cuerpos celulares del acúmulo 6. El cuerpo central se localiza en el protocerebro medio, está doblado ventralmente en la línea media, es elipsoidal y separa los neuropilos del protocerebro anterior medio de los del protocerebro posterior medio. Los cuerpos laterales están localizados en los neuropilos del protocerebro posterior medio que, tal como ocurre en los insectos, son extensiones del cuerpo central. Las fibras del tracto olfatorio llevan salidas del los lóbulos olfatorio y accesorio a los cuerpos hemielipsoidales del tallo ocular (protocerebro lateral). Los

tractos cruzan en el centro del protocerebro medio y forman un quiasma. El cuerpo central se localiza directamente ventral al quiasma del tracto olfatorio mientras que el acúmulo 6 se encuentra inmediatamente arriba del puente del protocerebro, sus cuerpos celulares tienen proyecciones que conectan el puente del protocerebro al cuerpo central formando ocho haces que atraviesan ventral (seis haces medios) o dorsalmente (dos haces laterales) hacia el tracto olfatorio antes de entrar al cuerpo central, algunas fibras continúan hacia los lóbulos laterales ipsi o contralateralmente. Otras neuronas tienen sus somas en el acúmulo 8, pasan a través del cuerpo central y terminan en el lóbulo lateral contralateral.

La integración visual y olfatoria parece requerir de las interacciones de deutocerebro y protocerebro con las fibras y neuronas que componen el complejo central (Mellon, 2005; Wood y Glantz, 1980). En algunas de estas áreas hay oscilaciones en el rango de 0.5 Hz a 15 Hz (Mellon, 2000; Mellon y Wheeler, 1999; Sandeman y Sandeman, 1998; Mellon y cols., 1992) y hay uniones comunicantes presentes en algunos de estos agrupamientos (Mellon y cols., 1992; Schmidt y cols., 1994; Schmidt, 1997). La presencia continua de ondas lentas en el complejo central puede implicar que alrededor de esta área existen centros importantes de procesamiento de información que se interrumpen durante el sueño del acocil permitiendo que las ondas lentas propaguen a otras áreas cerebrales mediante interacciones neurona-glía (Coles and Abbott, 1996; Traub y cols., 2001) o por acoplamiento electrotónico tal como ocurre en los vertebrados (Volgushev y cols., 2006), de manera que el complejo central actúa como un centro que interrumpe la entrada de información sensorial (tal como lo hace el tálamo en los vertebrados). Se requiere de más experimentos para verificar esta hipótesis.

8.4. El sueño en el acocil como un proceso pasivo

El análisis con transformada wavelet y con redes neuronales comprueba que la actividad generada en el complejo central es igual a la actividad de ondas lentas que aparece en otras áreas del cerebro del acocil durante el sueño. Esto puede

significar que las ondas lentas características del sueño del acocil se originen en el complejo central y durante el sueño se propaguen, mediante un proceso activo, a otras regiones cerebrales. Otra posibilidad es que la sincronización de las áreas cerebrales sea un proceso pasivo que resulte del cese en el procesamiento de las entradas sensoriales (de ahí la desaparición de las espigas y de las respuestas de tipo cognitivo), con participación de la glía a través de uniones comunicantes, como ha sido propuesto para fenómenos similares en circuitos neuronales de vertebrado (Coles y Abbott, 1996; Traub y cols., 2001). En cualquiera de estos dos casos, el complejo central, y en particular el cuerpo central (Figura 8.1), podría funcionar o bien como oscilador o como el filtro de la información sensorial - equivalente al tálamo de los vertebrados, en la medida en que por esta región transita una gran cantidad de fibras sensoriales (Utting y cols., 2000).

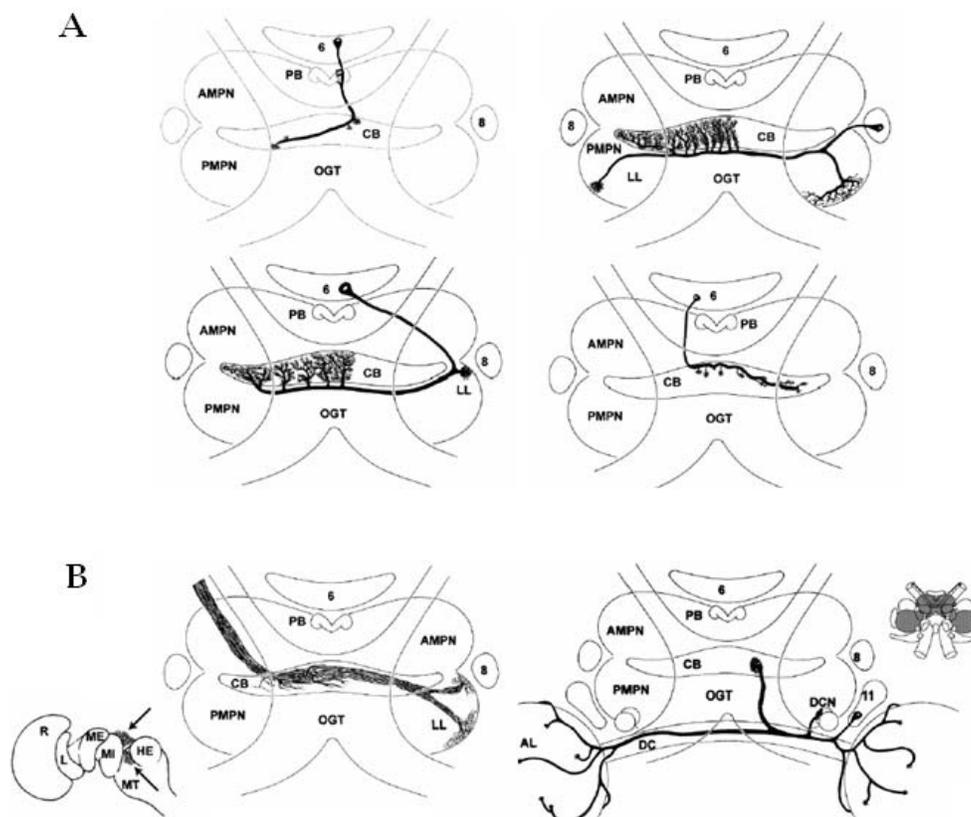


Figura 8.1. Conexiones del cuerpo central, A) Posibles vías de entrada sensorial y B) Posibles salidas.

Para verificar la validez de la hipótesis de sincronización pasiva por interrupción de procesamiento sensorial, registré la actividad eléctrica de un acocil deambulante antes y después de bloquear de manera reversible algunas entradas sensoriales, en particular la visión y la olfacción.

Los resultados de los registros obtenidos muestran que tanto el bloqueo visual como el bloqueo olfatorio aumentan el tiempo que el acocil pasa durmiendo, sin embargo, cada entrada sensorial tiene una contribución distinta en la sincronización que ocurre en el cerebro durante el sueño. El hecho de que los datos de acocil anósmico se desplacen del círculo control en las frecuencias bajas puede confirmar las proposiciones planteadas por otros autores que dicen que las señales olfatorias se procesan mediante oscilaciones de baja frecuencia, mientras que las señales visuales lo hacen mediante espigas (Bullock, 1993).

En cuanto a la hipótesis planteada del sueño como proceso pasivo, los resultados del análisis del acocil cegado y los registros de posición del acocil anósmico parecen confirmarla. Sin embargo el hecho de que no aumente la correlación de la actividad eléctrica del cerebro del acocil anósmico parece apuntar en contra. Es necesario verificar que el aumento en el tiempo que el acocil pasa de lado no sea efecto de privación de sueño debido al lavado de anténulas o del estrés producido por la manipulación experimental.

9. CONCLUSIONES

El análisis con transformada Wavelet permite observar características de la actividad eléctrica del cerebro del acocil que la simple observación del registro o el uso de otros métodos de análisis tiempo-espectral como la TFCT y la transformada Gabor no permiten discriminar.

Algoritmos de redes neuronales y lógica difusa que utilizan como entrada los resultados de la transformada wavelet pueden identificar estados cerebrales en el acocil.

El uso de esta combinación de técnicas me permitió determinar que:

- El sueño de ondas lentas en el acocil se caracteriza por una reducción en la potencia de la banda de frecuencias entre 30 y 45 Hz.
- El sueño de ondas lentas en el acocil no es uniforme.
- Entre la vigilia y el sueño existen estados intermedios que dependen de la secuencia previa de posiciones.

Por otra parte, la preparación de acocil suspendido me permitió establecer que:

- El acocil suspendido y con electrodos penetrando la vaina de tejido conectivo, duerme.
- Desde el punto de vista electrofisiológico el sueño de la preparación suspendida es igual al de la preparación deambulante. Las características del sueño de estos acociles son iguales a las de acociles implantados crónicamente.
- Las ondas lentas se originan en el complejo central y siempre están presentes en él independientemente del estado cerebral del animal. Para que el animal entre en estado de sueño estas ondas lentas se extienden primero al deutocerebro y luego al protocerebro.

- El sueño es un estado dinámico compuesto por microestados.
- El complejo central del cerebro del acocil funciona como centro de relevo de señales visuales y olfatorias las que son filtradas por esta región durante el sueño.
- El sueño en el acocil parece ser un proceso pasivo que se desencadena con el bloqueo de las entradas sensoriales en o cerca del complejo central del cerebro.

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1: Principio de incertidumbre de Heisenberg

El análisis tiempo-frecuencia de una señal $f(t)$ se obtiene calculando su espectro de frecuencia mediante una función ventana $h(t)$. Esto se hace calculando el producto interno $\langle f(t), h(t) \rangle$ y su Transformada de Fourier.

Cada punto del plano (t, ω) está representado por una región cuya dispersión depende de las características de $h(t)$.

Un procedimiento relativamente sencillo para localizar una señal simultáneamente en el tiempo y la frecuencia, consiste en calcular su centro de gravedad. Este resultado también puede obtenerse usando el valor medio y la dispersión de $|f(t)|^2, |f(\omega)|^2$.

La localización de la señal en el tiempo puede estimarse mediante la expresión:

$$t_m = \frac{1}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (t) |f(t)|^2 dt$$

y su dispersión T puede calcularse como,

$$T^2 = \frac{4\pi}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (t - t_m) |f(t)|^2 dt$$

donde E_x es la energía de la señal, que se supone finita.

$$E_x = \int_{-\infty}^{\infty} |f(t)|^2 dt < \infty$$

De forma similar, es posible establecer la localización y dispersión de la señal en frecuencia utilizando las expresiones siguientes:

$$\omega_m = \frac{1}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} \omega |f(\omega)|^2 d\omega$$

$$B^2 = \frac{4\pi}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_m) |f(\omega)|^2 d\omega$$

De esta forma, es posible localizar una señal en el plano tiempo-frecuencia utilizando el punto (t_m, ω_m) que lleva asociado como medida de dispersión el producto TB . Una propiedad interesante del producto TB reside en que presenta un límite inferior, cumpliéndose siempre que $TB \geq 1$. El mínimo se produce cuando $h(t)$ es la función de Gauss. Esta restricción se conoce con el nombre de desigualdad de Heisenberg-Gabor o principio de incertidumbre de Heisenberg, que describe la imposibilidad de localizar con una precisión indefinidamente creciente una señal en el dominio del tiempo y de la frecuencia. La condición anterior establece una limitación de extraordinaria importancia presente en cualquier representación tiempo-frecuencia de una señal.

Referencia:

Mallat S.G. 1989, A theory for multi-resolution signal decomposition: The wavelet Representation, *IEEE Trans. on Patt Anal. and Mach. Intel.*, **11**: 674-693.

11.2. Anexo 2: K-Means

K-means es una técnica de análisis de agrupamientos que establece una partición en K grupos sobre un conjunto de N objetos $\{O_1, \dots, O_n\}$ de los que disponemos de una información multivariante P -dimensional. Partiendo de la matriz de datos $X_{N \times P}$, la función que se pretende minimizar en el proceso de clasificación es la suma total de cuadrados de los errores (TESS), cuya expresión esta dada por:

$$TEES_k = \sum_{k=1}^K E_{(k)}^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k] e_{i(k)}^2$$

donde $E_{(k)}^2$ es la suma de cuadrados de los errores (ESS) para el cluster c_k , $I[O_i \in c_k]=1$ si el objeto O_i ha sido asignado a c_k , $I[O_i \in c_k]=0$ si no ha sido asignado a c_k , y $e_{i(k)}^2$ la distancia euclídea al cuadrado de cada objeto al centroide de c_k :

$$e_{i(k)}^2 = \sum_{j=1}^P (x_{ij} - x_{(k)j})^2 = (x_i - \bar{x}_{(k)})'(x_i - \bar{x}_{(k)})$$

donde,

$$x_{(k)j} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k] x_{ij}, \quad n_k = \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k]$$

En la práctica, dada una partición inicial en K clusters, la técnica se basa en el siguiente algoritmo iterativo:

1. Cálculo de las posiciones de los centroides x_k de los K clusters.
2. Para cada objeto, cálculo de su distancia a los K centroides, $e_{i(k)}^2$.
3. Reasignación de cada objeto al cluster cuyo centroide es el más próximo.

La partición final depende de la configuración inicial de los clusters elegida, siendo posible la convergencia a un mínimo local de TESS. Por ello es recomendable realizar un análisis cluster jerárquico y elegir como partición inicial la obtenida con un nivel de disimilitud que aplicado al árbol ultramétrico conduzca al número de grupos deseado.

Fuzzy K-means es una generalización en el ámbito de la lógica difusa del algoritmo K-means. La idea original de utilizar conjuntos difusos en técnicas de análisis cluster fue una propuesta de Ruspini, desarrollada posteriormente por Bezdek, Dunn, Gustafson y Kessel. Introduciendo la lógica difusa en el funcional de partición se obtiene la expresión:

$$TEES_{k,m} = \sum_{k=1}^K J_{(k),m}^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N u_{i(k)}^m e_{i(k)}^2$$

siendo $u_{i(k)}^m$ la pertenencia del elemento O_i al conjunto difuso c_k y $m \in (1, \infty)$ un exponente de fuzziness que determina la incidencia de las pertenencias difusas en la partición (cuanto más alto sea el exponente más difusa será la partición resultante). La pertenencia $u_{i(k)}$ de O_i a c_k se calcula mediante la expresión:

$$u_{i(k)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^k \left[\frac{e_{i(k)}}{e_{i(i)}} \right]^{2/(m-1)}}$$

que cumple la restricción $\sum_{i=1}^N u_{i(k)} = 1$. Para el caso límite $m=1$ con lo que se obtiene nuevamente la versión no difusa de K-means.

Referencias

Bezdek JC. 1974, Numerical taxonomy with Fuzzy sets. *J. Math. Biol.* **1** (1):57-71.

Bezdek JC. 1981, Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function. Plenum Press.

Dunn JC. 1976, Indices of partition fuzziness and the detection of clusters in large data sets, en: Gupta, M. (ed) Fuzzy automata and decision processes. Elsevier.

MacQueen J. 1967, Some methods for classification and analysis of multivariate observation. pp. 281-297 en: L.M. Le Cam & J. Neyman (eds.) Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability. Vol. 1. University of California Press, Berkeley.

Ruspini E. 1969, A New Approach to Clustering. Inf. Control **15**:22-32.

11.3. Anexo 3: Redes Competitivas

Existen dos variantes denominadas LVQ (Learning Vector Quantization) y (Self Organizing Map), ambas se basan en el principio de formación de mapas topológicos para establecer características comunes entre las series de datos de entrada a la red.

El aprendizaje en las redes competitivas requiere de una etapa de aprendizaje y otra de funcionamiento. En la etapa de aprendizaje se fijan los valores de las conexiones entre la capa de entrada y la salida. Utiliza un aprendizaje no supervisado de tipo competitivo, las neuronas de la capa de salida compiten por activarse y sólo una de ellas permanece activa ante una determinada información de entrada a la red, los pesos de las conexiones se ajustan en función de la neurona que haya resultado “vencedora”.

Durante la etapa de entrenamiento, se presenta a la red un conjunto de informaciones de entrada (vectores de entrenamiento) para que ésta establezca en función de la semejanza entre los datos las diferentes categorías (una por neurona de salida), que servirían durante la fase de funcionamiento para realizar clasificaciones de nuevos datos que se presenten a la red. Los valores finales de los pesos de las conexiones entre cada neurona de la capa de salida con las de entrada se corresponderán con los valores de los componentes del vector de aprendizaje que consigue activar la neurona correspondiente. En el caso de existir más patrones de entrenamiento que neuronas de salida, más de uno deberá asociarse con la misma neurona, es decir pertenecerán a la misma clase.

Este proceso se repetirá n veces para refinar el mapa topológico de salida, de tal forma que cuantas más veces se presenten los datos, más se reducirán las zonas de neuronas que se deben activar ante entradas parecidas, consiguiendo que la red pueda realizar una clasificación más selectiva.

El algoritmo de aprendizaje utilizado para establecer los valores de los pesos de las conexiones entre las N neuronas de entrada y las M de salida es el siguiente:

1. En primer lugar se asignan valores iniciales arbitrarios pequeños para los pesos (w_{ij}) y se fija la zona inicial de vecindad entre las neuronas de salida.
2. A continuación se presenta a la red una información de entrada en forma de vector $\mathbf{p} = (p_1, p_2, \dots, p_n)$, cuyas componentes p_i serán valores continuos.
3. Puesto que se trata de un aprendizaje competitivo, se determina la neurona vencedora de la capa de salida, esta será aquella i cuyo vector de pesos w_i (vector cuyas componentes son los valores de los pesos de las conexiones entre esa neurona y cada una de las neuronas de la capa de entrada) sea el más parecido a la información de entrada \mathbf{p} (patrón o vector de entrada). Para ello se calculan las distancias o diferencias entre ambos vectores, considerando una por una todas las neuronas de salida, suele utilizarse la distancia euclidiana :

$$d_i = \sum_{j=1}^N (p_j - w_{ij})^2 \quad 1 \leq i \leq M$$

Donde:

p_j : Componente i -ésimo del vector de entrada

w_{ij} : Peso de la conexión entre la neurona j de la capa de entrada y la neurona i de la capa de salida.

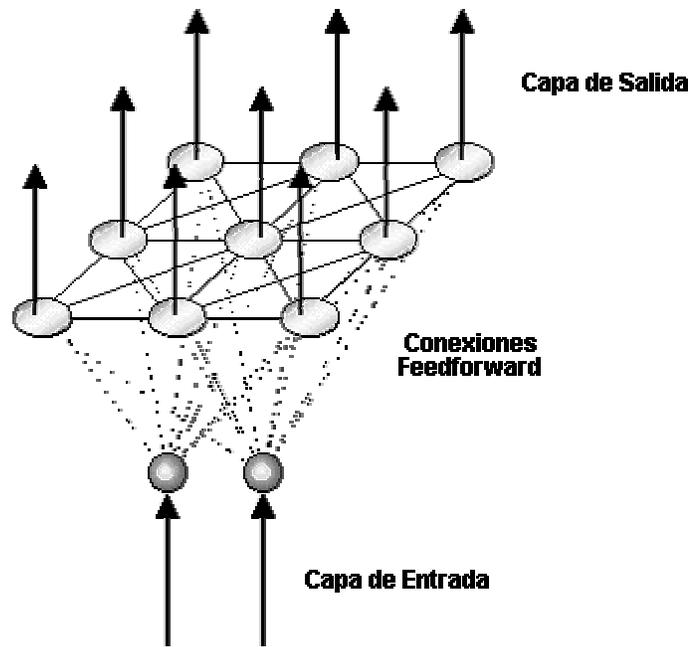


Figura 11.1. Conexiones de una red competitiva

4. Una vez localizada la neurona vencedora (i^*), se actualizan los pesos de las conexiones entre las neuronas de entrada y dicha neurona, así como los de las conexiones entre las de entrada y las neuronas vecinas de la vencedora, en realidad lo que se consigue con esto es asociar la información de entrada con una cierta zona de la capa de salida. Esto se realiza mediante la siguiente ecuación

$$w(q) = w(q-1) + a(q)(p(q) - w(q-1)) \text{ para } i \in X(q)$$

El tamaño de $X(q)$ se puede reducir en cada iteración del proceso de ajuste de los pesos, con lo que el conjunto de neuronas que pueden considerarse vecinas cada vez es menor como se observa en la Figura 11.2, sin embargo en la práctica es habitual considerar una zona fija en todo el proceso de entrenamiento de la red.

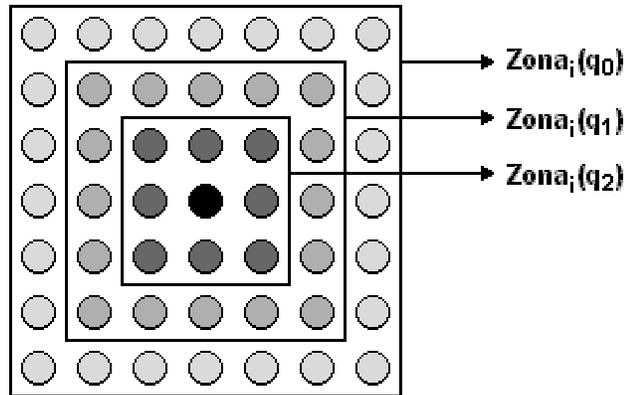


Figura 11.2 Posible evolución de la vecindad en una red competitiva

El término $\alpha(q)$ es el coeficiente de aprendizaje o parámetro de ganancia, con un valor entre 0 y 1 el cual decrece con el número de iteraciones (q) del proceso de entrenamiento, de tal forma que cuando se ha presentado un gran número de veces todo el juego de patrones de aprendizaje su valor es prácticamente nulo, con lo que la modificación de los pesos es insignificante.

Para hallar α suele utilizarse una de las siguientes expresiones:

$$\alpha(q) = \frac{1}{q} \quad \alpha(q) = \alpha_1 \left(1 - \frac{q}{\alpha_2} \right)$$

Siendo α_1 un valor de 0.1 ó 0.2 y α_2 un valor próximo al número total de iteraciones del aprendizaje, que por lo general se toma como 10000 para esta red.

5. El proceso debe repetirse, volviendo a presentar todo el juego de patrones de aprendizaje p_1, p_2, \dots, p_n hasta obtener la salida deseada.

Básicamente lo que hace una red competitiva es realizar una tarea de clasificación, garantizando que las neuronas topológicamente próximas sean

sensibles a entradas físicamente similares; por esta causa la red es especialmente útil para establecer relaciones desconocidas previamente entre conjuntos de datos.

Referencias:

Kohonen T. 1977, *Associative memory. A system theoretical approach*. Springer-Verlag.

Kohonen T. 1982, Self-organized formation of topologically correct feature maps, *Biological Cybernetics* 43, Reimpreso en el texto "Neurocomputing" de J.Anderson y E. Rosenfeld (ed.) 1988, MIT press.

Kohonen T. 1989, *Self-organization and associative memory* (3ª ed.). Springer-Verlag.

10. REFERENCIAS

Adrian ED. 1931, Potential changes in the isolated nervous system of *Dysticus marginalis*. *J. Physiol. Lond.*, **72**:132-151.

Akay M. 1995, Wavelets in Biomedical Engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, **23**: 531-542.

Aldrich M. 1999, *Sleep Medicine*. Oxford University Press.

Aserinsky E y N Kleitman. 1953, Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* **11**:273-274.

Ayala-Guerrero F y LV Reyna. 1987, Sleep and wakefulness in the lizard *Ctenosaura similis*. *Estud Med Biol Mex*, **35**:25-33.

Ayala-Guerrero F y S Huitron-Reséndiz. 1991, Sleep patterns in the lizard *Ctenosaura-pectinata*. *Physiol & Behav*, **49**(6):1305-1307.

Bremer F. 1935, Cerveau "isolé" et physiologie du sommeil. *C.R. Soc. Biol.*; **118**: 1235-124.

Bullock TH, y E Basar. 1988, Comparison of ongoing compound field potentials in the brains of invertebrates and vertebrates. *Brain Res. Rev.*, **13**: 57-75.

Bullock TH. 1984, Ongoing compound field potentials from octopus brain are labile and vertebrate-like. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **57**: 473-483.

Bullock TH. 1993, *How Do Brains Work?* Birkhäuser, Boston.

Campbell SS e I Tobler. 1984, Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **8**: 269-300.

Cattaert, D y D LeRay. 2001, Adaptive motor control in crayfish. *Progress in Neurobiology* **63**: 199-240.

Coles JA y NJ Abbott. 1996, Signalling from neurones to glial cells in invertebrates. *Trends in Neuroscience*, **19**: 358-362.

Cooley JW y J Tukey. 1965, An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series, *Math. of Comp.* **19**:297-301.

Crunelli V, KL Blethyn, DW Cope, SW Hughes, HR Parri, JP Turner, TI Tòth, SR Williams. 2002, Novel neuronal and astrocytic mechanisms in thalamocortical loop dynamics. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **357**:1675–1693.

del Águila C. 1994, Electromedicina, HASA, Madrid.

Delgado-Morales G, J Hernandez-Falcon y F Ramon. 2004, Agonistic behavior in crayfish: the importance of sensory inputs. *Crustaceana*, **77**:1-24.

Dietsch G. 1932, Fourier Analyse von Elektrenkephalogrammen des Menschen, *Pflüger's Arch Ges Physiol* **230**:106–112.

Durka PJ y KJ Blinowska. 1996, Neural Networks and wavelets analysis in EEG artifact recognition, *Third Conference on Neural Networks and their applications*, Szczyrk, 167-172.

Durka PJ y KJ Blinowska. 2001, Unified Time-Frequency Parametrization of EEG, *IEEE Eng in Med and Biol Magazine*, **20**(5):47-53.

Fisch BJ. 1991, Spehlmann's EEG Primer. Elsevier, Amsterdam.

Flanigan WF, RH Wilcox, A Rechtshaffen. 1971, The EEG and Arousal Continuum of Crocodilian, Caiman scleops. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **34**(5):521-538.

Gelperin A y DW Tank. 1990, Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *Nature*, **345**: 437-440.

Goswami JC y AK Chan. 1999, Fundamentals of wavelets: theory, algorithms, and applications, Wiley, NY.

Graves L, A Pack, T Abel. 1999, The role of sleep in hippocampus-dependent long-term memory. *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**: 87.

Graves L, A Pack, T Abel. 2001, Sleep and memory: A molecular perspective. *Trends Neurosci.* **24**: 237–243.

Greenspan RJ, G Tononi, C Cirelli, PJ Shaw. 2001, Sleep and the fruit fly. *Trends in Neuroscience*, **24**: 142-145.

Heisenberg M. 1998, What do the mushroom bodies do for the insect brain? *J. Comp. Neurol.*, **416**: 245–261.

Hendricks JC, SM Finn, KA Panckeri, J Chavkin, J Williams, A Sehgal, AI Pack. 2000, Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*. **25**: 129-138.

Hernández OH, J Serrato, F Ramón. 1996, Chronic recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: The basal, unstimulated activity. *Comp.Biochem. Physiol.*; **114A**: 219-226.

Hernández-Falcón J, J Serrato, y F Ramón. 1999, Evoked potentials elicited by natural stimuli at the brain of unanesthetized crayfish. *Physiol. Behav.*, **66**: 397-407.

Jahn TL y F Crescitelli. 1938, The electrical response of the grasshopper eye under conditions of light and dark adaptation. *J. Cell Comp. Physiol.* **12**: 39-55.

Kaiser W. 1988, Busy bees need rest, too - behavioural and electromyographical sleep signs in honeybees. *J. Comp. Physiol. A*, **163**: 565-584.

Kalayci T. 1994, Wavelet preprocessing for automated neural network detection of EEG spikes. *IEEE Eng. Med. Biol.* 761-764.

Kandel ER, JH Schwartz y TM Jessell. 2000, Principles of Neural Science, McGraw-Hill Professional Publishing, New York.

Klein BA, AG Gibbs, KMF Larsen. 2003, Signatures of sleep in the paper wasp *Polistes flavus*. *Ent. Soc. Amer.* 10464.

Krueger JM, JF Obal, J Fang. 1999, Why we sleep?: a theoretical view of sleep function. *Sleep Med Rev.*, **3**: 119-29.

Krueger JM, JF Obal. 2003, Sleep function, *Front Biosci.*, **8**: 511-519.

Lo, Ch-Ch, T Chou, T Penzel, TE Scammell, RE Strecker, HE Stanley, PCh Ivanov. 2004, Common scale-invariant patterns of sleep-wake transitions across mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **101**: 17545-17548.

Mallat SG. 1989, A theory for multi-resolution signal decomposition: The wavelet representation, *IEEE Trans. on Patt Anal. and Mach. Intel.*, **11**; 674-693.

Mamlouk A, H Sharp, K Menne, U Hoffmann, T Martinez. 2005, Unsupervised spike sorting with ICA and its evaluation using GENESIS algorithms, *Neurocomputing* **65**:275-282.

Matousek M e I Petersen. 1973, Frequency analysis of the EEG in normal children and normal adolescents. In: P. Kellaway and I. Petersen, Editors,

Automation of Clinical Electroencephalography, Raven Press, New York, pp. 75-102.

Mellon DeF y CJ Wheeler. 1999, Coherent oscillations in membrane potential synchronize impulse bursts in central olfactory neurons in the crayfish. *J. Neurophysiol.*, **81**: 1231-1241.

Mellon DeF. 2005, Integration of hydrodynamic and odorant inputs by local interneurons of the crayfish deutocerebrum. *J. Exp. Biol.*, **208**: 3711-3720.

Mellon DeF. 2000, Convergence of multimodal sensory input onto higher-level neurons of the crayfish olfactory pathway. *J. Neurophysiol.*, **84**: 3043-3055.

Mellon DeF, D Sandeman y RE Sandeman. 1992, Characterization of oscillatory olfactory interneurons in the protocerebrum of the crayfish. *J. exp. Biol.*, **167**: 15-38.

Mendoza-Ángeles K, A Cabrera, J Hernández-Falcón y F Ramón. 2007, Slow waves during sleep in crayfish: a time-frequency analysis. *J. Neurosci. Methods*, **162**:264-271.

Moruzzi G y HW Magoun. 1949, Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neuro.* **1**:455-47.

Muzur A. 2005, Toward an integrative theory of sleep and dreaming. *J. Theor. Biol.*, **233**:103-118.

Nitz DA, B van Swinderen, G Tononi y RJ Greenspan. 2002, Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **12**, 1934-1940.

Pièron H. 1913, Le Problème Physiologique du Sommeil, Masson, Paris.

Popov AV, AI Peresleni, PV Ozerskii, EE Shchekanov, EV Savvateeva-Popova. 2005, The role of flabellar and ellipsoid bodies of the central complex of the brain of *Drosophila melanogaster* in the control of courtship behavior and communicative sound production in males. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **35** (7): 741-750.

Quiroga RQ, OA Rosso, E Bassar, M Schrumann. 2001, Wavelet entropy in eventrelated potentials: a new method showing ordering of EEG oscillations. *Biol. Cybern.*, **84**: 291-299.

Ramón F, J Hernández-Falcón, B Nguyen, TH Bullock. 2004, Slow wave sleep in crayfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 11857-11861.

Rechtschaffen A, BM Bergmann, CA Everson, CA Kushida, MA Gilliland. 1989, Sleep deprivation in the rat: I. Conceptual issues. *Sleep*, **12**(1):1-4.

Roffwarg H, JN Muzio, WC Dement. 1966, Ontogenetic Development of Human Sleep-Dream Cycle, *Science*, **152**: 604-619.

Sakai T y T Kitamoto. 2006, Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship. *J. Neurobiol.*, **66** (8): 821-834.

Sandeman D, R Sandeman, C Derby, M Schmidt. 1992, Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *Biol. Bull.*, **183**: 304-326.

Sandeman, D y R Sandeman. 1998, orthodromically and antidromically evoked local field potentials in the crayfish olfactory lobe. *J. Exp. Biol.*, **201**: 1331-1344.

Sauer S, M Kinkelin, E Herrmann, W Kaiser. 2003, The dynamics of sleep-like behaviour in honey bees. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.*, **189**(8): 599-607.

Schiff SJ, A Aldroubi, M Unser, S Sato. 1994, Fast Wavelet Transformation of EEG, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **91**(6):442-455.

Schmidt M, M Wachowiak, y BW Ache. 1994, Gap junctions couple the somata of olfactory projection neurons in the spiny lobster. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **20**: 778.

Schmidt, M. 1997, Distribution of centrifugal neurons targeting the soma clusters of the olfactory midbrains among decapod crustaceans. *Brain Res.*, **752**: 15-25.

Serrato J, O Hernández, F Ramón. 1996, Integration or visual signals in the crayfish brain: Multiunit recordings in eyestalk and brain, *Comp. Biochem. Physiol.*, **114**(A): 211-217.

Shaw PJ, C Cirelli, RJ Greenspan, G Tononi. 2000, Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**:1834-1837.

Shaw PJ, P Franken. 2003, Perchance to dream: Solving the mystery of sleep through genetic analysis. *J. Neurobiol.*,; **54**: 179-202.

Shuranova ZP, YM Burmistrov. 2002, Ventilatory activity in free moving crayfish is indicative of its functional state and perception of external stimuli. En: Wiese K (ed) *The Crustacean Nervous System*, Springer, Berlin, Germany, pp, 526-535.

Siegel JM. 2005, Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*. **437**:1264-1271.

Strauss, R. 2002, The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12** (6): 633-638.

Thakor NV, S Tong. 2004, Advances in quantitative electroencephalogram analysis methods. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **6**: 453-95

Tobler I, JJ Stalder. 1988, Rest in the scorpion - a sleep-like state. *J. Comp. Physiol. A*, **163**: 227-235.

Traub RD, N Kopell, A Bibbig, EH Buhl, FEN LeBeau, MA Whittington. 2001, Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J. Neurosci.*, **21** (23): 9478-9486.

Utting M, HJ Agricola, R Sandeman, D Sandeman. 2000, Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *J. Comp. Neurol.* **416**:245-261.

van Harreveld A. 1936, A physiological solution for fresh water crustaceans, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34**:428-432.

van Swinderen B, DA Nitz, y RJ Greenspan. 2004, Uncoupling of Brain Activity from Movement Defines Arousal States in *Drosophila*. *Current Biology*, **14**: 81-87.

Volgushev M, S Chauvetts, M Mukovski, I Timofeev. 2006, Precise long-range synchronization of activity and silence in neocortical neurons during slow-wave sleep. *J. Neurosci.*, **26** (21): 5665-5672.

Wood HL y RM Glantz. 1980, Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. II. Network organization and stimulus modulation of synaptic efficacy. *J. Neurophysiol.*, **43**(3): 741-753.

Yordanova J, V Kolev, OA Rosso, M Schruyemann, OW Sakowitz, M Ozgoren, E Bassar. 2002, Wavelet entropy analysis of event-related potentials indicates modality-independent theta dominance. *J. Neurosci. Methods*, **117**: 99-109.

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1: Principio de incertidumbre de Heisenberg

El análisis tiempo-frecuencia de una señal $f(t)$ se obtiene calculando su espectro de frecuencia mediante una función ventana $h(t)$. Esto se hace calculando el producto interno $\langle f(t), h(t) \rangle$ y su Transformada de Fourier.

Cada punto del plano (t, ω) está representado por una región cuya dispersión depende de las características de $h(t)$.

Un procedimiento relativamente sencillo para localizar una señal simultáneamente en el tiempo y la frecuencia, consiste en calcular su centro de gravedad. Este resultado también puede obtenerse usando el valor medio y la dispersión de $|f(t)|^2, |f(\omega)|^2$.

La localización de la señal en el tiempo puede estimarse mediante la expresión:

$$t_m = \frac{1}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (t) |f(t)|^2 dt$$

y su dispersión T puede calcularse como,

$$T^2 = \frac{4\pi}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (t - t_m) |f(t)|^2 dt$$

donde E_x es la energía de la señal, que se supone finita.

$$E_x = \int_{-\infty}^{\infty} |f(t)|^2 dt < \infty$$

De forma similar, es posible establecer la localización y dispersión de la señal en frecuencia utilizando las expresiones siguientes:

$$\omega_m = \frac{1}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} \omega |f(\omega)|^2 d\omega$$

$$B^2 = \frac{4\pi}{E_x} \int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_m) |f(\omega)|^2 d\omega$$

De esta forma, es posible localizar una señal en el plano tiempo-frecuencia utilizando el punto (t_m, ω_m) que lleva asociado como medida de dispersión el producto TB . Una propiedad interesante del producto TB reside en que presenta un límite inferior, cumpliéndose siempre que $TB \geq 1$. El mínimo se produce cuando $h(t)$ es la función de Gauss. Esta restricción se conoce con el nombre de desigualdad de Heisenberg-Gabor o principio de incertidumbre de Heisenberg, que describe la imposibilidad de localizar con una precisión indefinidamente creciente una señal en el dominio del tiempo y de la frecuencia. La condición anterior establece una limitación de extraordinaria importancia presente en cualquier representación tiempo-frecuencia de una señal.

Referencia:

Mallat S.G. 1989, A theory for multi-resolution signal decomposition: The wavelet Representation, *IEEE Trans. on Patt Anal. and Mach. Intel.*, **11**: 674-693.

11.2 Anexo 2: K-Means

K-means es una técnica de análisis de agrupamientos que establece una partición en K grupos sobre un conjunto de N objetos $\{O_1, \dots, O_n\}$ de los que disponemos de una información multivariante P -dimensional. Partiendo de la matriz de datos $X_{N \times P}$, la función que se pretende minimizar en el proceso de clasificación es la suma total de cuadrados de los errores (TESS), cuya expresión esta dada por:

$$TEES_k = \sum_{k=1}^K E_{(k)}^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k] e_{i(k)}^2$$

donde $E_{(k)}^2$ es la suma de cuadrados de los errores (ESS) para el cluster c_k , $I[O_i \in c_k]=1$ si el objeto O_i ha sido asignado a c_k , $I[O_i \in c_k]=0$ si no ha sido asignado a c_k , y $e_{i(k)}^2$ la distancia euclídea al cuadrado de cada objeto al centroide de c_k :

$$e_{i(k)}^2 = \sum_{j=1}^P (x_{ij} - x_{(k)j})^2 = (x_i - \bar{x}_{(k)})'(x_i - \bar{x}_{(k)})$$

donde,

$$x_{(k)j} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k] x_{ij}, \quad n_k = \sum_{i=1}^N I[O_i \in c_k]$$

En la práctica, dada una partición inicial en K clusters, la técnica se basa en el siguiente algoritmo iterativo:

1. Cálculo de las posiciones de los centroides x_k de los K clusters.
2. Para cada objeto, cálculo de su distancia a los K centroides, $e_{i(k)}^2$.
3. Reasignación de cada objeto al cluster cuyo centroide es el más próximo.

La partición final depende de la configuración inicial de los clusters elegida, siendo posible la convergencia a un mínimo local de TESS. Por ello es recomendable realizar un análisis cluster jerárquico y elegir como partición inicial la obtenida con un nivel de disimilitud que aplicado al árbol ultramétrico conduzca al número de grupos deseado.

Fuzzy K-means es una generalización en el ámbito de la lógica difusa del algoritmo K-means. La idea original de utilizar conjuntos difusos en técnicas de análisis cluster fue una propuesta de Ruspini, desarrollada posteriormente por Bezdek, Dunn, Gustafson y Kessel. Introduciendo la lógica difusa en el funcional de partición se obtiene la expresión:

$$TEES_{k,m} = \sum_{k=1}^K J_{(k),m}^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N u_{i(k)}^m e_{i(k)}^2$$

siendo $u_{i(k)}$ la pertenencia del elemento O_i al conjunto difuso c_k y $m \in (1, \infty)$ un exponente de fuzziness que determina la incidencia de las pertenencias difusas en la partición (cuanto más alto sea el exponente más difusa será la partición resultante). La pertenencia $u_{i(k)}$ de O_i a c_k se calcula mediante la expresión:

$$u_{i(k)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^k \left[\frac{e_{i(k)}}{e_{i(i)}} \right]^{2/(m-1)}}$$

que cumple la restricción $\sum_{i=1}^N u_{i(k)} = 1$. Para el caso límite $m=1$ con lo que se obtiene nuevamente la versión no difusa de K-means.

Referencias

Bezdek JC. 1974, Numerical taxonomy with Fuzzy sets. *J. Math. Biol.* 1 (1):57-71.

Bezdek JC. 1981, Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function. Plenum Press.

Dunn JC. 1976, Indices of partition fuzziness and the detection of clusters in large data sets, en: Gupta, M. (ed) Fuzzy automata and decision processes. Elsevier.

MacQueen J. 1967, Some methods for classification and analysis of multivariate observation. pp. 281-297 en: L.M. Le Cam & J. Neyman (eds.) Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability. Vol. 1. University of California Press, Berkeley.

Ruspini E. 1969, A New Approach to Clustering. Inf. Control 15:22-32.

11.3. Anexo 3: Redes Competitivas

Existen dos variantes denominadas LVQ (Learning Vector Quantization) y (Self Organizing Map), ambas se basan en el principio de formación de mapas topológicos para establecer características comunes entre las series de datos de entrada a la red.

El aprendizaje en las redes competitivas requiere de una etapa de aprendizaje y otra de funcionamiento. En la etapa de aprendizaje se fijan los valores de las conexiones entre la capa de entrada y la salida. Utiliza un aprendizaje no supervisado de tipo competitivo, las neuronas de la capa de salida compiten por activarse y sólo una de ellas permanece activa ante una determinada información de entrada a la red, los pesos de las conexiones se ajustan en función de la neurona que haya resultado "vencedora".

Durante la etapa de entrenamiento, se presenta a la red un conjunto de informaciones de entrada (vectores de entrenamiento) para que ésta establezca en función de la semejanza entre los datos las diferentes categorías (una por neurona de salida), que servirían durante la fase de funcionamiento para realizar clasificaciones de nuevos datos que se presenten a la red. Los valores finales de los pesos de las conexiones entre cada neurona de la capa de salida con las de entrada se corresponderán con los valores de los componentes del vector de aprendizaje que consigue activar la neurona correspondiente. En el caso de existir más patrones de entrenamiento que neuronas de salida, más de uno deberá asociarse con la misma neurona, es decir pertenecerán a la misma clase.

Este proceso se repetirá n veces para refinar el mapa topológico de salida, de tal forma que cuantas más veces se presenten los datos, más se reducirán las zonas de neuronas que se deben activar ante entradas parecidas, consiguiendo que la red pueda realizar una clasificación más selectiva.

El algoritmo de aprendizaje utilizado para establecer los valores de los pesos de las conexiones entre las N neuronas de entrada y las M de salida es el siguiente:

1. En primer lugar se asignan valores iniciales arbitrarios pequeños para los pesos (w_{ij}) y se fija la zona inicial de vecindad entre las neuronas de salida.
2. A continuación se presenta a la red una información de entrada en forma de vector $p = (p_1, p_2, \dots, p_n)$, cuyas componentes p_i serán valores continuos.
3. Puesto que se trata de un aprendizaje competitivo, se determina la neurona vencedora de la capa de salida, esta será aquella i cuyo vector de pesos w_i (vector cuyas componentes son los valores de los pesos de las conexiones entre esa neurona y cada una de las neuronas de la capa de entrada) sea el más parecido a la información de entrada p (patrón o vector de entrada). Para ello se calculan las distancias o diferencias entre ambos vectores, considerando una por una todas las neuronas de salida, suele utilizarse la distancia euclidiana :

$$d_i = \sum_{j=1}^N (p_j - w_{ij})^2 \quad 1 \leq i \leq M$$

Donde:

p_j : Componente i -ésimo del vector de entrada

w_{ij} : Peso de la conexión entre la neurona j de la capa de entrada y la neurona i de la capa de salida.

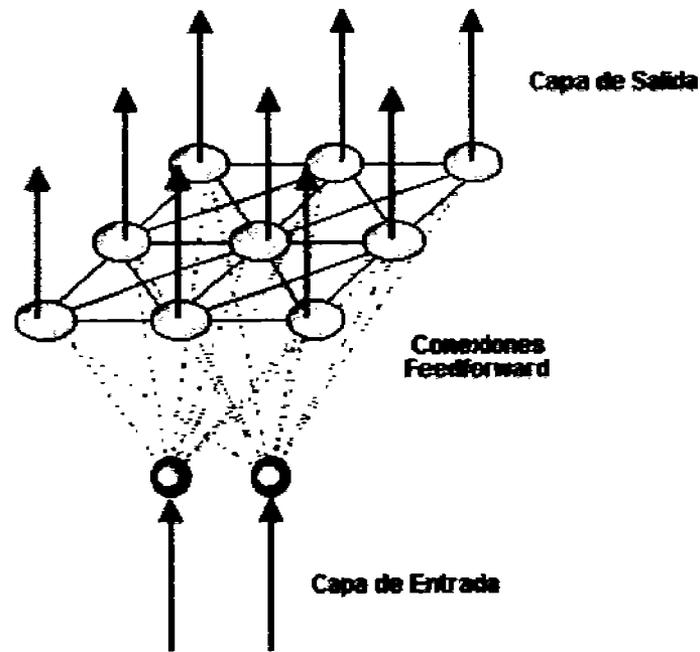


Figura 11.1. Conexiones de una red competitiva

4. Una vez localizada la neurona vencedora (i^*), se actualizan los pesos de las conexiones entre las neuronas de entrada y dicha neurona, así como los de las conexiones entre las de entrada y las neuronas vecinas de la vencedora, en realidad lo que se consigue con esto es asociar la información de entrada con una cierta zona de la capa de salida. Esto se realiza mediante la siguiente ecuación

$$w_i(q) = w_i(q-1) + a(q)(p_i(q) - w_i(q-1)) \text{ para } i \in X(q)$$

El tamaño de $X(q)$ se puede reducir en cada iteración del proceso de ajuste de los pesos, con lo que el conjunto de neuronas que pueden considerarse vecinas cada vez es menor como se observa en la Figura 11.2, sin embargo en la práctica es habitual considerar una zona fija en todo el proceso de entrenamiento de la red.

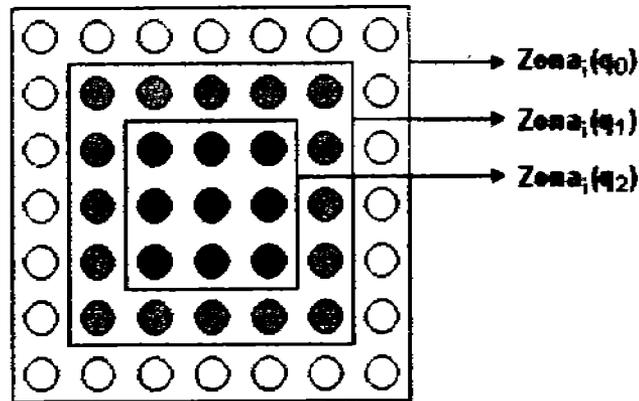


Figura 11.2 Posible evolución de la vecindad en una red competitiva

El término $\alpha(q)$ es el coeficiente de aprendizaje o parámetro de ganancia, con un valor entre 0 y 1 el cual decrece con el número de iteraciones (q) del proceso de entrenamiento, de tal forma que cuando se ha presentado un gran número de veces todo el juego de patrones de aprendizaje su valor es prácticamente nulo, con lo que la modificación de los pesos es insignificante.

Para hallar α suele utilizarse una de las siguientes expresiones:

$$\alpha(q) = \frac{1}{q} \quad \alpha(q) = \alpha_1 \left(1 - \frac{q}{\alpha_2} \right)$$

Siendo α_1 un valor de 0.1 ó 0.2 y α_2 un valor próximo al número total de iteraciones del aprendizaje, que por lo general se toma como 10000 para esta red.

5. El proceso debe repetirse, volviendo a presentar todo el juego de patrones de aprendizaje p_1, p_2, \dots, p_n hasta obtener la salida deseada.

Básicamente lo que hace una red competitiva es realizar una tarea de clasificación, garantizando que las neuronas topológicamente próximas sean

sensibles a entradas físicamente similares; por esta causa la red es especialmente útil para establecer relaciones desconocidas previamente entre conjuntos de datos.

Referencias:

Kohonen T. 1977, *Associative memory. A system theoretical approach*. Springer-Verlag.

Kohonen T. 1982, Self-organized formation of topologically correct feature maps, *Biological Cybernetics* 43, Reimpreso en el texto "Neurocomputing" de J.Anderson y E. Rosenfeld (ed.) 1988, MIT press.

Kohonen T. 1989, *Self-organization and associative memory* (3ª ed.). Springer-Verlag.

ANÁLISIS EN FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL CEREBRO DEL ACOCIL

K. Mendoza-Ángeles*, J. Hernández-Falcón*, A. Cabrera** y F. Ramón***

* Facultad de Medicina-UNAM/Depto. de Fisiología, México, D.F, México.

**UPIBI-IPN/Depto. de Bioelectrónica, México, D.F, México

*** Facultad de Medicina-UNAM/Div. de Est. de Posgrado, México, D.F, México.

e-mail: xolot@hotmail.com

Abstract – Simultaneous behavioral and electrophysiological experiments show that crayfish have periods of rest with characteristics associated with sleep in vertebrates like a stereotyped body position, high threshold to mechanical stimuli, and specific associated brain electrical signals. Behavioral studies performed videotaping crayfish in aquaria under controlled artificial light cycles for periods of 24 hours, show them having periods of motionless rest lying on one side at water surface. Electrodes implanted on the crayfish brain show numerous spikes. When crayfish is motionless lying on one side this activity changes. STFT and Gabor Transform of brain electrical signals shows this phenomenon and demonstrate that power for all the frequencies decrease.

Palabras clave: Electrophysiology, behavior, Gabor Transform, STFT, sleep.

Introducción

En los vertebrados, el sueño se ha definido con base en criterios conductuales (posición estereotípica e inmovilidad), electrofisiológicos (umbral elevado a estímulos externos, cambios en frecuencia respiratoria y cardíaca) y genéticos (encendido de genes como c-fos) [1].

En algunos invertebrados se han usado fundamentalmente los criterios conductuales y genéticos para definir periodos de reposo de tipo sueño [2].

En condiciones de laboratorio los acociles adoptan dos conductas que nos interesa destacar: i) alerta e interactuando con sus conespecíficos (Figura 1), y ii) de lado, a nivel de la superficie del agua e inmóviles (Figura 2).



Figura 1. Acocil Parado



Figura 2. Acocil de lado

Mediante técnicas desarrolladas en el laboratorio es posible registrar, en forma crónica, la actividad eléctrica del cerebro de acociles deambulantes. El registro muestra diversos patrones que dependen de las dos conductas antes mencionadas. En el animal alerta, la actividad es rápida y con numerosas espigas; cuando el acocil está de lado, las espigas son sustituidas por ondas lentas de aproximadamente 15 Hz (Figura 3).

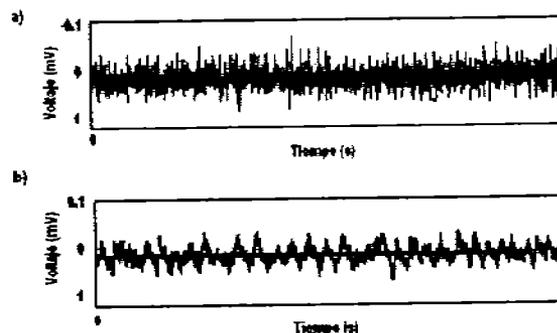


Figura 3. Actividad eléctrica del cerebro del acocil. a) Correspondiente a un acocil parado, b) Correspondiente a acocil de lado

Recientemente, se ha denominado sueño a la conducta de reposo de lado presente en el acocil debido a que cumple con los criterios conductuales (umbral elevado a estímulos mecánicos y visuales y posición estereotípica), y electrofisiológicos (actividad cerebral asociada), que definen dicha conducta [3].

Con la finalidad de caracterizar las conductas de alerta y de sueño a partir de la actividad eléctrica cerebral, se realizaron simultáneamente registros de

conducta y electrofisiológicos, estos últimos se analizaron mediante transformada rápida de Fourier en corto tiempo (STFT) y transformada Gabor.

Materiales y Métodos

Preparación biológica:

Se usaron acociles machos adultos, *Procambarus clarkii*, en intermuda; colocados en acuarios individuales bajo ciclos de luz-oscuridad 12:12.

Registros conductuales:

Los acociles fueron videograbados y se analizaron los registros consignando la posición en la que se encontraba cada acocil, así como la hora de inicio y de término de dicha posición durante el ciclo de 24 horas. Se asignó un 0 a la posición parado y 1 a la posición de lado.

Registros electrofisiológicos:

Para registrar la actividad eléctrica del cerebro del acocil se implantó un electrodo de plata en la superficie del cerebro. Esta técnica fue desarrollada hace algún tiempo en el laboratorio y, de manera resumida, consiste en abrir un orificio en el caparazón dorsal de un acocil previamente anestesiado, rechazar los órganos internos y deslizar una cánula metálica que porta en su interior un electrodo de plata recubierto de teflón. La cánula sirve como guarda de manera que las señales que se registran provienen solamente de las células que se encuentran en la vecindad del electrodo [4]. Los potenciales extracelulares se amplificaron (Grass Mod. P511) y filtraron (filtros pasabanda a 3 Hz y 3 kHz) antes de almacenarlos en una PC para su análisis fuera de línea. La captura de las señales eléctricas se realizó mediante una tarjeta A/D a una frecuencia de muestreo de 200 Hz, de manera continua por periodos de 24 horas.

Análisis de los registros:

La transformada de Fourier es una herramienta comúnmente empleada para el análisis de señales, ya que permite obtener información sobre cómo está distribuida la energía de una señal a través de sus distintas componentes de frecuencia. Sin embargo, no puede ser aplicada con el objeto de obtener información precisa de señales cuyo contenido espectral varía con el tiempo es decir señales quasi-estacionarias o no estacionarias.

Considerando que una señal no estacionaria se define como tal si sus parámetros estadísticos varían con el tiempo [5] [6], se codificó un programa para determinar la media y la desviación estándar móviles de las señales registradas. Para una señal estacionaria, estos dos parámetros deben mantenerse constantes o con variaciones mínimas.

Para el análisis en frecuencia de los registros electrofisiológicos se usaron STFT y transformada Gabor.

La STFT (1) es una representación tiempo-frecuencia ($t-\omega$) basada en el hecho de que al tomar

pequeños segmentos de una señal $f(t)$ es posible asumir que dicho fragmento es estacionario y por lo tanto, calcular su transformada de Fourier.

$$G_{\phi} f(b, \xi) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{\phi_{b, \xi}(t)} dt \dots (1)$$

donde

$$\phi_{b, \xi}(t) = \phi(t-b) e^{j\xi t}$$

es la ventana tiempo-espectral con parámetros b, ξ .

Este tipo de representación tiene como limitante el principio de incertidumbre, debido al cual, la mejor resolución en frecuencia implica la peor resolución en tiempo y viceversa.

La Transformada Gabor (2) es un tipo especial de STFT en que el principio de incertidumbre se lleva al mínimo al utilizar una ventana gaussiana.

$$G_{g_{\alpha}} f(b, \xi) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-\frac{(t-b)^2}{4\alpha}} e^{-j\xi t} dt \dots (2)$$

donde

$$g_{\alpha}(t) = \frac{1}{2\pi\alpha} e^{-t^2/4\alpha}$$

Ambas representaciones fueron codificadas en PC. En el caso de la STFT se utilizó una ventana cuadrada con cuatro diferentes anchos: 128, 256, 512 y 1024 muestras. Para la transformada Gabor (ventana gaussiana) se empleó una ventana de 1024 muestras.

Resultados

Registros conductuales

De los registros de video se obtuvieron gráficas de posición contra tiempo (Figura 4), que permiten identificar en el registro electrofisiológico el momento en que el acocil adoptó alguna de las posiciones descritas y el tiempo que permaneció en ella.

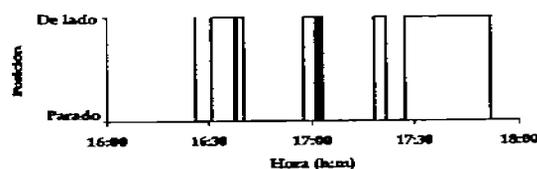


Figura 4. Posición de un acocil durante 2 horas.

Registros electrofisiológicos

Las gráficas resultantes del análisis de media y desviación estándar móviles (Figuras 5-8) muestran que ambos parámetros varían considerablemente con respecto al tiempo, tanto para la señal correspondiente al acocil parado como para aquella propia del acocil en posición de lado. Sin embargo, en algunos segmentos, ambos parámetros presentan variaciones mínimas. Por lo tanto, es posible afirmar que la señal de la actividad eléctrica del cerebro del acocil es no estacionaria, aunque en pequeños fragmentos puede considerarse estacionaria.

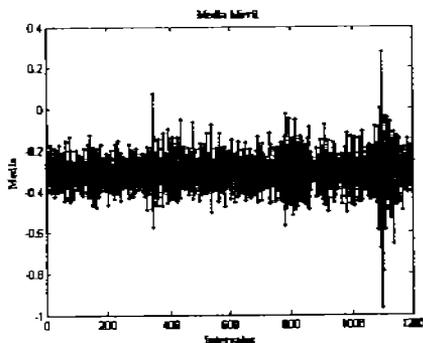


Figura 5. Media móvil de la actividad eléctrica del acocil mostrada en la figura 1 (acocil parado).

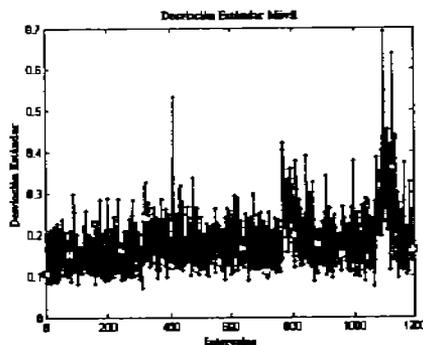


Figura 6. Desviación estándar móvil de la actividad eléctrica del acocil mostrada en la figura 1 (acocil parado).

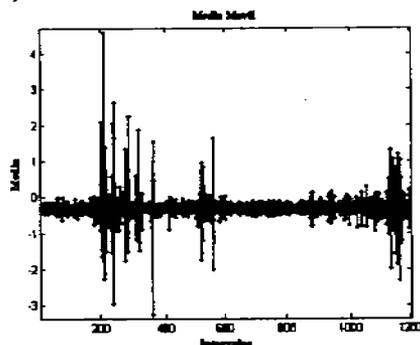


Figura 7. Media móvil de la actividad eléctrica del acocil mostrada en la figura 2 (acocil de lado).

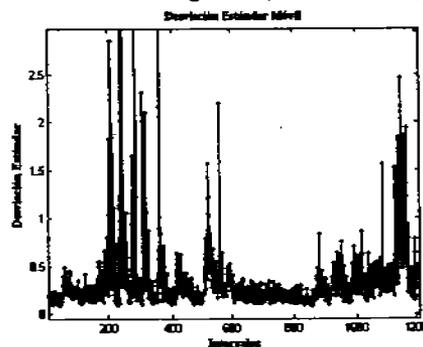


Figura 8. Desviación Estándar móvil de la actividad eléctrica del acocil mostrada en la figura 2 (acocil de lado).

Como era de esperar, con la STFT, para cada una de las ventanas empleadas obtenemos diferentes resoluciones tanto en tiempo como en frecuencia (Figuras 9-10). De acuerdo con las gráficas mostradas, la ventana que produce mejor resolución para las frecuencias que nos interesan (0-50 Hz) es la de 256 muestras para el segmento correspondiente al acocil parado y de 512 muestras para el animal de lado. Estas ventanas se consideran óptimas debido a que las gráficas resultantes muestran líneas finas, que localizan en forma puntual tanto las frecuencias dominantes como el tiempo en que ocurren cambios frecuenciales.

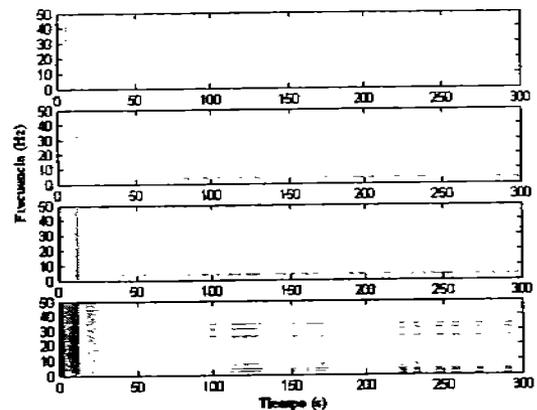


Figura 9. STFT de la actividad mostrada en la figura 1 (animal parado). En orden descendente: 128 muestras, 256 muestras, 512 muestras, 1024 muestras.

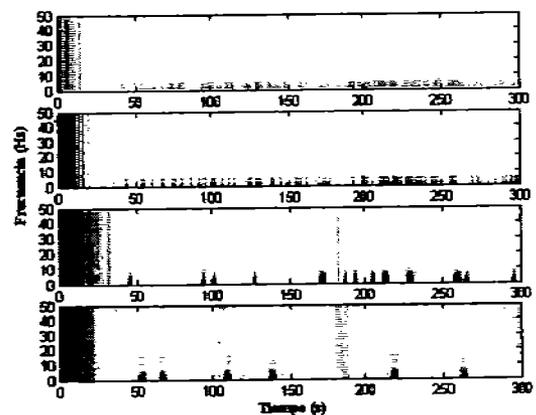


Figura 10. STFT de la actividad mostrada en la figura 2 (animal de lado). En orden descendente: 128 muestras, 256 muestras, 512 muestras, 1024 muestras.

Con la transformada Gabor, al reducir al mínimo el principio de incertidumbre se consigue una mejor resolución tanto en tiempo como en frecuencia. En la gráfica de la transformada de la actividad correspondiente al acocil parado (Figura 11), se observan frecuencias dominantes entre 0-10 Hz, así

como la localización del tiempo en que ocurren cambios bruscos en la señal.

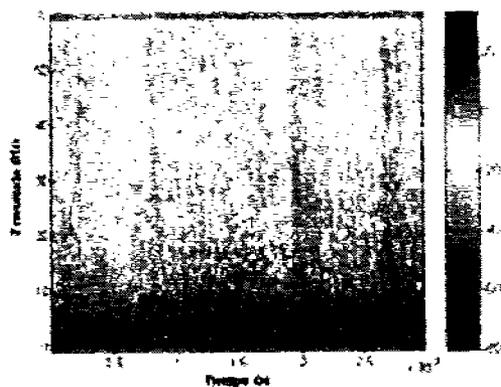


Figura 11. Espectrograma con transformada Gabor del segmento mostrado en la figura 1 (acocil parado).

En la representación $t-\omega$ de la actividad eléctrica correspondiente al acocil en posición de lado no se observa una frecuencia dominante, aunque si se observan cambios con respecto al tiempo.

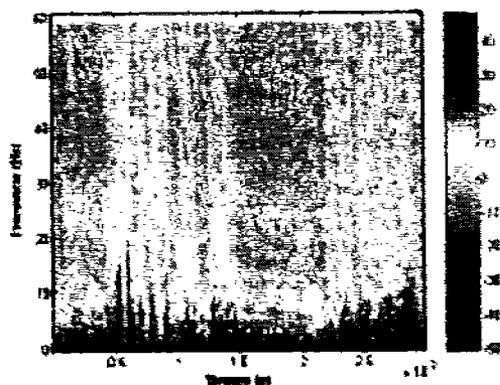


Figura 12. Espectrograma con transformada Gabor del segmento mostrado en la figura 2 (acocil de lado).

Comparando ambas representaciones (Figuras 11- 12) se observa que hay un importante decremento en la potencia de todas las frecuencias expresadas cuando el acocil cambia de parado a de lado.

Discusión

Tanto con STFT como con la transformada Gabor se observan diferencias entre la actividad cerebral correspondiente al acocil parado y la correspondiente al acocil de lado, sobre todo aumentos en la actividad de baja frecuencia para esta última condición, sin embargo, con la transformada Gabor es más clara la localización temporal de los eventos.

Por otra parte, la transformada Gabor nos permite observar una importante caída en potencia para todas las frecuencias presentes en la señal cuando el acocil cambia de la posición 0 a la posición 1.

Por el momento sólo se analizaron segmentos pequeños de la señal en los cuales se considera estacionaria, esto debido a las limitaciones propias de los métodos utilizados, como es el hecho de que la ventana tiempo-frecuencia mantenga las mismas dimensiones para el análisis de todas las frecuencias.

Conclusiones

Por lo expuesto en párrafos anteriores, podemos concluir que el cerebro del acocil es capaz de presentar al menos dos estados cerebrales asociados a posiciones específicas, una de ellas denominada sueño.

Sin embargo, para una caracterización completa de dichos estados cerebrales, es necesario usar un método diseñado para señales no estacionarias que involucre escalamiento y desplazamiento de las ventanas de acuerdo a las frecuencias a analizar; así como, un análisis estadístico que permita determinar el nivel de significancia de los cambios de la señal propia del acocil de lado con respecto a la señal correspondiente al acocil parado.

Referencias

- [1] HENDRICKS J.C. et al. "Rest in *Drosophila* is a sleep-like state". *Neuron*, 5:129-138, 2000.
- [2] SHAW J. P., CIRELLI C, GRENNSPAN R. J., TONONI G. "Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*". *Science* 287:1834-1837, 2000.
- [3] HERNÁNDEZ-FALCÓN J., MENDOZA-ÁNGELES K., RAMÓN F., BULLOCK T. H., "Sleep in crayfish", *Soc. Neurosci. Abs.* 2003
- [4] HERNÁNDEZ O., SERRATO J., RAMÓN F., "Chronic Recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: The basal unstimulated activity". *Comp. Biochem. Physiol.*, 114(A) 219-226, 1996.
- [5] MALLAT S.G. "A theory for multi-resolution signal decomposition": The wavelet Representation, *IEEE Trans. on Patt. Anal. and Mach. Intel.*, 11; 674-693, 1989.
- [6] DURKA P. J. Y BLINOWSKA K. J., Unified "Time-Frequency Parametrization of EEG", *IEEE Eng in Med and Biol Magazine*, 20(5):47-53, 2001.

Crayfish Brain States Characterization with Wavelet Transform

K. Mendoza-Ángeles¹, J. Hernández-Falcón¹, A. Cabrera², F. Ramón³

¹Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México D. F. México.

²Depto. de Bioelectrónica, UPIBI-IPN, México D. F. México.

³División de Posgrado e Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, México D. F. México.

E-mail: xolot@prodigy.net.mx

Abstract – Behavioral and electrophysiological experiments show that crayfish have periods of rest with characteristics similar to sleep in vertebrates, a stereotyped body position, high threshold to mechanical stimuli, and specific brain electrical signals. The aim of this work is to characterize the brain electrical signals associated with sleep in crayfish. Electrical and behavioral recordings from individual crayfish were performed continuously during 24 hours. Videotapes from crayfish in aquaria under control conditions show three different behaviors: i) standing up, ii) lying on one side against the surface of the water, and iii) crouched and motionless. Brain electrical activity was different for each one of these positions. Wavelet analysis of brain electrical records show high power at all frequencies in the standing up crayfish, a decrease in the power of all frequencies, mainly for 30 to 45 Hz band, in the animal lying on one side (sleeping) and intermediate values for the crouched crayfish, the characteristics of this latter activity depended on the previous positions sequence.

Keywords — Signal Processing, Time-Frequency Analysis, Sleep.

I. INTRODUCTION

Sleep occurs in a wide variety of animals. Clearly distinguished in most mammals it is present also in other vertebrates and in some invertebrates [1][2][3][4] as crayfish.

Sleep in crayfish is characterized by a stereotypical position (lying on one side against the surface of the water), increase in threshold for mechanical stimuli, absence of electrical signs of cognitive processes, and a unique brain electrical activity. In the alert animal (Fig. 1a) records from the brain surface show numerous spikes of various sizes superimposed on an almost flat baseline. In the sleeping animal (Fig. 1b) the spikes are substituted by slow waves with frequencies ranging from 10 to 20 Hz [5].

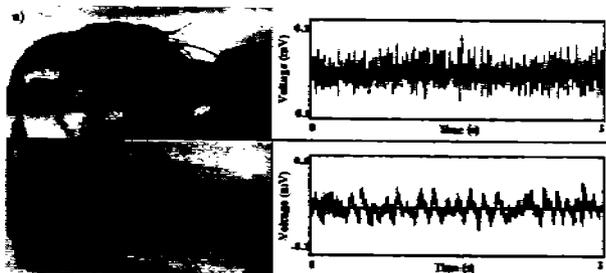


Fig 1. Crayfish positions and its corresponding brain electrical activity. a) Alert crayfish, b) Crayfish lying on one side.

Analysis of the brain electrical activity of sleeping or alert crayfish with traditional methods, such as the Fast Fourier Transform, show only gross differences in the frequency domain between these two states. Because the recorded wave is non-stationary, other methods are necessary for a more accurate description of alert and sleeping states in crayfish. In this work the Wavelet Transform (WT) was used to analyze records from crayfish.

II. METHODOLOGY

A. Biological Preparation

Experiments were performed on young adult, male crayfish, *Procambarus clarkii*. After animals arrived to the laboratory they were kept in aquaria with well aerated old tap water under controlled light (cycles of 12:12 light-dark).

Crayfish were implanted with two Teflon coated silver electrodes (15-25 μm diameter) on the brain surface. Electrodes were visually placed, one on protocerebrum and the other on deutocerebrum. Each electrode was isolated by a cannula used as reference [9].

Electrode localization was verified during post-mortem studies.

B. Signal Acquisition

Isolated crayfish were videotaped continuously throughout 24 hours with an infrared video camera (CCD-TR416, Sony), and its brain electrical activity was simultaneously recorded.

Electrical signals were preamplified with AC amplifiers (P511, Grass Instruments Co.) and filtered from 3Hz to 3 kHz. Because our interest was only on slow events, records were sampled at 200-400 Hz and stored in a computer for off-line analysis.

C. Analysis of Records

To analyze crayfish behaviour video cartridges were replayed on a TV monitor. Three crayfish positions were noted: standing-up, lying on one side and crouching. In this latter position crayfish moves to a corner of the aquarium,

lowers chelae, antennulae and antennae, curls the tail and remains motionless for periods of different length (Fig 2).

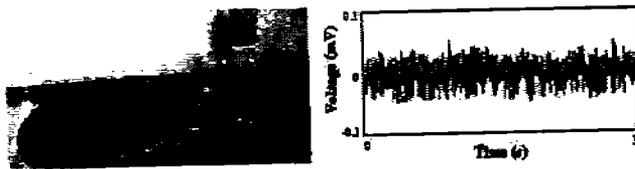


Fig 2. Cornered crayfish and its brain electrical activity.

Transitions between any two positions were also identified the time spent each one measured.

Brain electrical recordings show non stationary and high non linear behavior, and classical signal processing methods could not be applied [7] [8]. WT is a method that can give good time-frequency resolution at an arbitrary location in the t - ω plane. That is, its a window function whose radius increases in time to the low-frequency contents and decreases in time as resolves the high frequency contents of the signal [9].

The WT of a function $f(t) \in L^2$ with respect to some analyzing wavelet ψ is defined as

$$W_{\psi} f(b, a) := \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \overline{\psi_{b,a}(t)} dt \quad (1)$$

where

$$\psi_{b,a}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (2)$$

The parameters b and a are called translation and dilation parameters, respectively. The normalization factor $a^{-1/2}$ is included so that $\|\psi_{b,a}\| = \|\psi\|$

For ψ to be a window function and recover $f(t)$ from its inverse wavelet transform, $\psi(t)$ must satisfy the following condition:

$$\hat{\psi}(0) = \int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) dt = 0 \quad (3)$$

In addition to satisfying (3) a wavelet is constructed so that it has a higher order of vanishing moments. A wavelet is said to have vanishing moments of order m if

$$\int_{-\infty}^{\infty} t^p \psi(t) dt = 0 \quad p=0, \dots, m-1 \quad (4)$$

Observe that in (2), by reducing a , the support of $\psi_{b,a}$ is reduced in time and hence covers a larger frequency range, and vice versa. Therefore, $1/a$ is a measure of frequency. The parameter b , on the other hand, indicates the location of the wavelet window along the time axis. Thus, by changing (b, a) $W_{\psi} f$ can be computed on the entire time frequency plane.

To analyze the brain electrical recordings an algorithm was developed in a personal computer (PC). The algorithm calculates WT of a discrete time series $f(n)$ with $n=0, \dots, N$, where N is the number of points in the time series with equal time spacing δt ; the algorithm is based in:

$$W_{\psi} f(b, a) := \sum_n f(n) \overline{\psi\left(\frac{(n-b)\delta t}{a}\right)} \quad (5)$$

using the Morlet Wavelet (Fig.3) defined by:

$$\psi_{b,a}(t) = e^{-j(t-b)^2/2a} \cos\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (6)$$

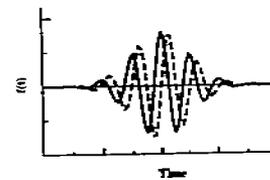


Fig. 3. Morlet Wavelet

This wavelet function was selected because is non-orthogonal (allowing to observe smooth and continuous variations in power), complex (better adapted for capturing oscillatory behavior) and its shape is similar to crayfish extracellular brain spikes [10].

Position versus time (day-hour) graphs allow to locate specific segments of the brain electrical records corresponding to each one of the three positions described and to use WT to obtain 3D-graphs, that include samples, frequency and power (only the band of interest 0-60 Hz was represented; power is codified in color using light spectrum). For each one of the 3D-graph, the contour graph is shown in a fixed power value.

III. RESULTS

Position versus time graphs (Fig. 4) show the distribution of intervals of standing up, crouching and lying on one side positions during the 24-hours cycle in a random, non-periodical way.

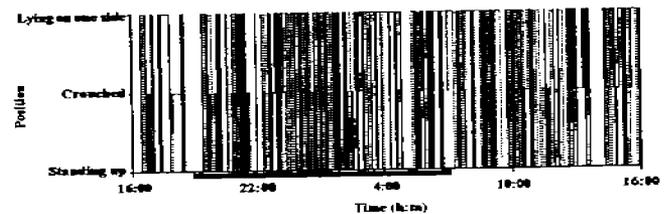


Fig. 4. Graph of crayfish position during a 24 hours cycle. Dark line indicates darkness hours.

In Fig. 5 are the positions sequence that analyzed below.

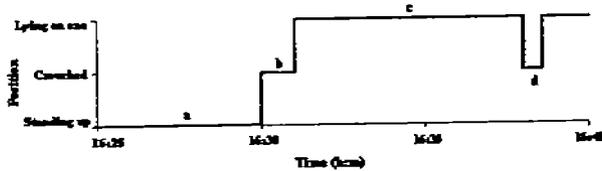


Fig. 5. Positions sequence.

Fig. 6 shows WT graphs from a segment corresponding to a standing up crayfish (segment a in the Fig. 5). Protocerebrum has a quasi regular activity with dominant frequencies around 4, 8, and 25 Hz (lower frequencies are probably due to respiratory activity). Initially, there are transient changes at 200 s. Deutocerebrum has a more regular activity, a higher power at the 25 Hz frequency band as compared with protocerebrum, and less evident transients at the beginning of the record. These data are clearly distinguished in the contour graphs of both brain areas.

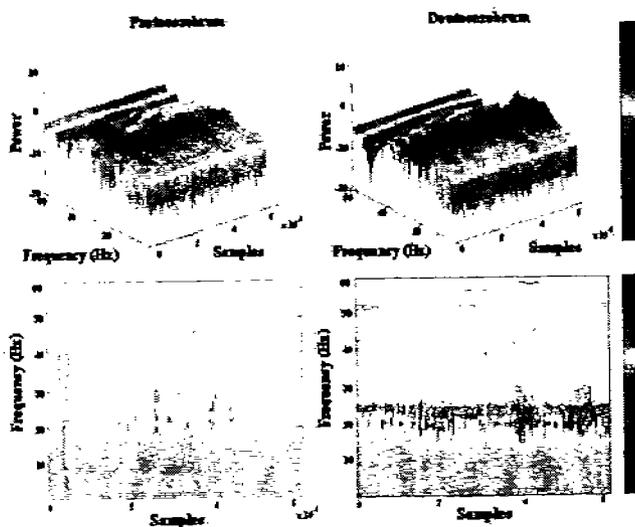


Figure 6. Alert crayfish. 3D and contour WT graphics of electrical activity from protocerebrum and deutocerebrum.

Fig 7 shows WT of brain electrical activity for a crouched crayfish (segment b in Figure 5). In protocerebrum there is a generalized increase in power for frequencies between 5-45 Hz and no dominant frequencies except at 4 Hz (see contour graph). Deutocerebrum graph is rather similar to that from alert animal, although a slight power decrease can be observed at all frequencies (compare contour graphs with those from Fig. 6).

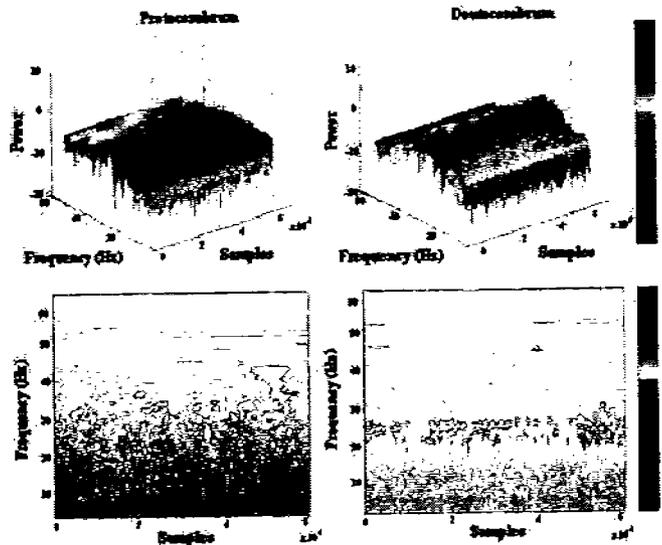


Fig 7. Crouched crayfish. 3D and contour WT graphics of electrical activity from protocerebrum and deutocerebrum.

A lying on one side animal (Segment C in Fig. 5), shows (Fig. 8) clear changes in almost all frequencies. The main change is a decrease in power at all frequencies with important decreases at frequencies of 30-45 Hz. Changes occur in both protocerebrum and deutocerebrum, but they are clearer in the last one, lasting for almost the whole analyzed segment. The strong reduction in power is clearly shown in contour graphs.

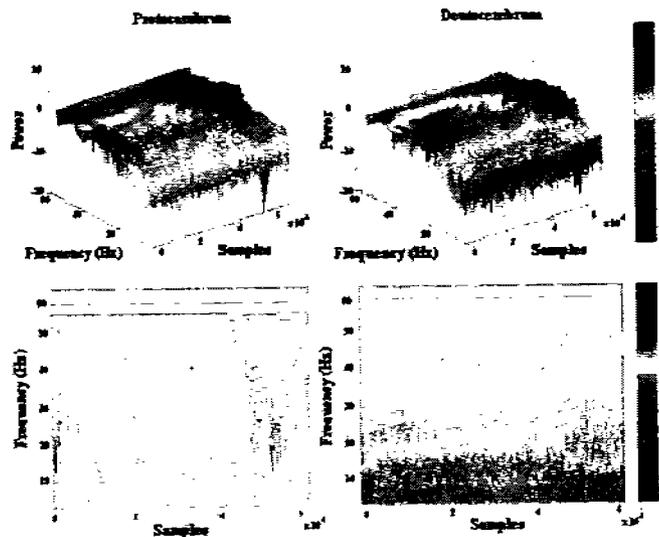


Figure 8. Crayfish lying on one side. 3D and contour WT graphics of electrical activity from protocerebrum and deutocerebrum.

WT from segment D in Fig. 5 (crouched crayfish) is shown in Fig 9. The recorded brain electrical activity is similar to that from a crayfish lying on one side (note the power reduction for most frequencies in both protocerebrum and deutocerebrum, and the presence of depressions around 30-45 Hz for deutocerebrum). From the comparison between

Fig 7 and 9, it seems that brain electrical activity from crouched crayfish shows characteristics between the standing up and lying on one side animal, and that its profile depends on the sequence of positions.

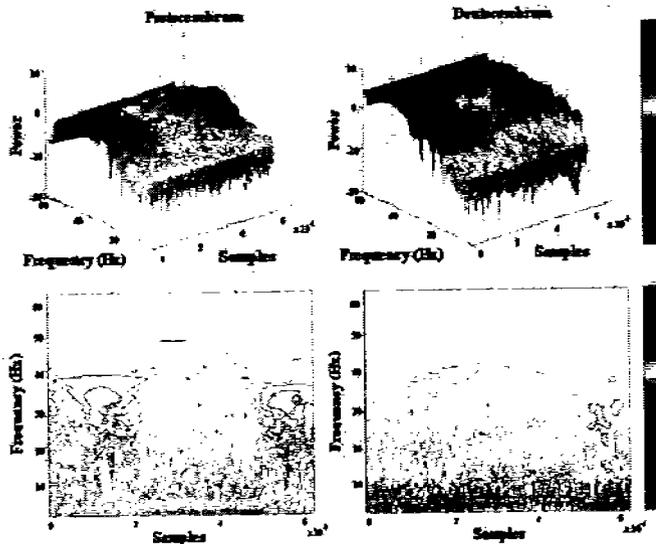


Figure 9. Cornered crayfish. 3D and contour WT graphics of electrical activity from protocerebrum and deutocerebrum.

IV. CONCLUSION

Brain electrical activity while crayfish stands-up or lies on one side are similar in the frequency space but the power values for the sleeping animal decrease considerably as compared with the awake crayfish.

Sleep starts with a sudden reduction of power for 30-45 Hz.

The slow wave frequency is variable during sleep periods.

Slow wave sleep seems to originate in deutocerebrum.

Crouched position indicates a transitional brain state between those of standing-up and lying on one side positions.

Brain electrical activity during transitional states depends on the previous positions sequence.

REFERENCES

- [1] J.C. Hendricks, et al. 2000. "Rest in *Drosophila* is a sleep-like state". *Neuron*, 25, , pp 129-138.
- [2] I. Tobler and J. J. Stadler, J. J. 1988. "Rest in the scorpion - a sleep-like state?" *Comp. Physiol.* 163, pp 227-235.
- [3] P. J. Shaw, C Cirelli, R. J. Greenspan, and G. Tononi, 2000. "Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*". *Science*. 287, pp 1834-1837.
- [4] R. J. Greenspan, G. Tononi, C. Cirelli, P. J. Shaw. 2001. "Sleep and the fruit fly". *Trends Neurosci.* 24, pp 142-145.
- [5] F. Ramón, J. Hernández-Falcón, B. Nguyen, T. H. Bullock. Slow Wave Sleep in Crayfish. *PNAS*, 101(32):11857-11861.
- [6] O. Hernández, J. Serrato, F. Ramón. 1996, Chronic Recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: The basal unstimulated activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114(A) 219-226.
- [7] P. J. Durka y K. J. Błimowska. 2001, Unified Time-Frequency Parametrization of EEG, *IEEE Eng in Med and Biol Magazine*, 20(5):47-53.
- [8] M Akay. 1995, Wavelets in Biomedical Engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, 23: 531-542.
- [9] J. C. Goswami, Andrew K. Chan, Fundamentals of wavelets: theory, algorithms, and applications, Wiley, NY, 1999.
- [10] C. Torrence, G. P. Compo, "A Practical Guide to Wavelet Analysis", *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 79; 61-78.

Slow waves during sleep in crayfish: A time–frequency analysis[☆]

Karina Mendoza-Angeles^a, Agustín Cabrera^b, Jesús Hernández-Falcón^a, Fidel Ramón^{c,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México, Mexico

^b Departamento de Bioelectrónica, UPIBI, IPN, México, Mexico

^c División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina, UNAM, Av. Universidad No. 3000, México 04510, D.F., Mexico

Received 24 August 2006; received in revised form 24 January 2007; accepted 29 January 2007

Abstract

NREM phases of sleep in vertebrates are characterized by slow waves. Crayfish also sleeps while lying on one side on the surface of the water. At this time the numerous spikes on an almost flat base line generated by the brain when alert are replaced by slow waves of 15–20 Hz. In this work, we conducted experiments to determine the temporal relationship between the lying on one side position and the brain slow waves. We videotaped chronically implanted animals to detect their body position and simultaneously recorded their brain electrical activity. To analyze brain electrical activity, we developed a wavelet based method and correlated the results with body position. Among results are: (a) during sleep signals in the frequency range 30–45 Hz show a large decrease in power; (b) sleep slow waves are generated 1–2 min after the animal lies on one side and are maintained throughout the whole period in such position. We conclude that the strong correlation between brain slow waves and lying on one side position further indicates periods of true sleep in these animals.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Crayfish; Invertebrate; Wavelet analysis; Sleep; Slow waves; Brain; Electrophysiology

1. Introduction

Sleep is a physiological behavior found in all vertebrates, where it has been thoroughly characterized by signals generated at the brain. Two states have been identified, the paradoxical or REM sleep and the Non-REM sleep with its four stages, during which the pattern of electrical activity changes to reflect the level of blockage of sensory signals (Krueger et al., 1999; Krueger and Obal, 2003).

Sleep-like states have also been described in several invertebrates, such as scorpions (Tobler and Stalder, 1988), fruit flies (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000; Shaw and Franken, 2003), bees (Sauer et al., 2003), and wasps (Klein et al., 2003). For technical reasons in these animals the brain electrical activity has not been recorded during such state. However, in crayfish the electrical brain activity has been recorded in unrestrained animals not only during the awake state (Hernández et al., 1996), but also when they lie on one side against the surface of the

water, which we tentatively took as a behavioral sign of sleep (Ramón et al., 2004). While in this recumbent position the brain generates a continuous stream of slow waves, an activity different from that recorded in an alert animal and clearly indicating a different brain state. As both parameters, a recumbent position and slow waves seem to be signs of sleep, we conducted experiments to determine their temporal relationship. For this, we used crayfish chronically implanted with electrodes on the brain and behaving freely in an aquarium.

Brain electrical signals from behaving or sleeping crayfish are non-stationary and their Fourier spectral analysis (Fast Fourier Transform, FFT) lacks information about the time of events. Thus, for this work we used a wavelet transform (WT), which is more appropriate for the analysis of such signals (Thakor and Tong, 2004). This wavelet analysis shows that the slow waves are generated 1–2 min after crayfish lies on one side, confirming that such position is a behavioral sign of sleep in these invertebrates.

2. Methods

2.1. Biological preparation

Experiments were performed on adult male crayfish *Procambarus clarkii* (7–10 cm rostrum to tail) with complete

[☆] This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of KMA, DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

* Corresponding autor. Tel.: +52 55 5622 0823; fax: +52 55 5550 8859.

E-mail address: fidelr@servidor.unam.mx (F. Ramón).

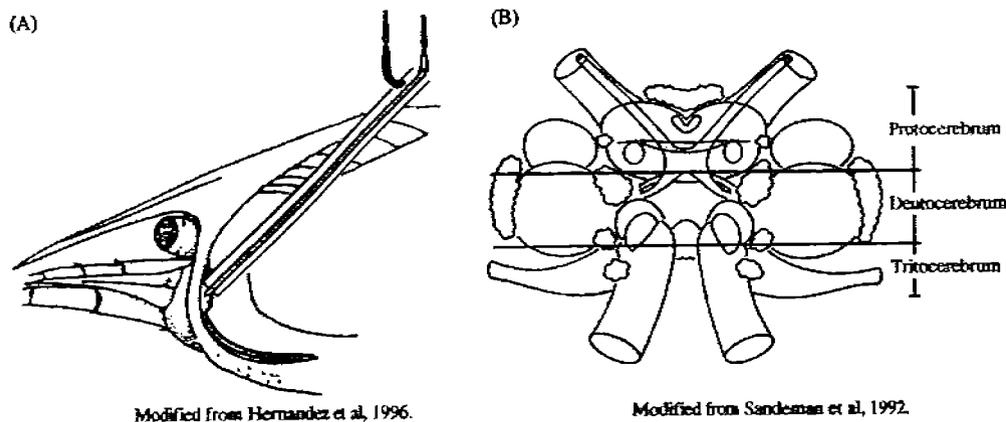


Fig. 1. Biological preparation. (A) Diagram of the crayfish head showing the form and position of the cannula and electrodes on the brain surface. (B) Diagram of a dorsal view of the crayfish brain showing its three main areas as described by Sandeman et al. (1992).

appendages. Since their arrival to the laboratory animals were maintained in communal aquaria with well-aerated tap water, with 12-h light:12-h dark cycles and fed twice a week with cat chow.

To determine crayfish positions, we videotaped them continuously during periods of 24 h. Tapes were played on a TV monitor and we measured the starting and ending times in each position. A standing up animal was identified with a value of 0, and with a 1 when in a recumbent position. An additional position in which the crayfish moves to a corner of the aquarium, lower their chelae, antennae and antennulae, flex the tail and stay motionless was called “crouch” and assigned it a value of 0.5. Position versus time (day-hour) graphs were constructed for entire 24-h periods and segments of the brain electrical signals corresponding to each one of those positions identified.

2.2. Brain recordings

To record the brain electrical activity we followed the procedure described elsewhere (Ramón et al., 2004). Briefly, a hole was made in the dorsal carapace of cold-anesthetized crayfish to introduce a stainless steel cannula carrying two platinum–iridium Teflon coated wires (25 μm diameter). Under microscope guidance the electrodes were placed on identified regions of the brain surface (protocerebrum, deutocerebrum, tricocerebrum) and the cannula, used as reference electrode, was glued to the exoskeleton with dental cement (Fig. 1). After surgery animals were returned to their aquaria and left undisturbed for at least 24 h.

The electrical activity from the brain was band-pass filtered between 3 Hz and 3 kHz; a 60 Hz notch filter was sometimes used. Records were amplified with AC preamplifiers (P511, Grass Instruments, Quincy, MA), displayed on an oscilloscope (DSO 1604, Gould Electronics, Essex, England) and in parallel sampled at 2 kHz by an A/D converter (NI-DAQ, PCI-6024E, NI Corp. Austin, TX). Data were acquired using a Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA) based software developed in our laboratory and stored on a personal computer for off-line analysis.

2.3. Data analysis with classical methods

To ascertain that crayfish brain electrical signals were non-stationary we calculated statistical parameters (i.e., the mobile mean and its standard deviation) defining this property. For both, mobile mean and standard deviation, we used 2000 samples bins, that is, 1 s for each bin.

Fig. 2 shows that the statistical parameters of the brain electrical activity, mobile mean (A) and standard deviation (B), vary along the time (in bins), indicating that crayfish brain electrical activity is non-stationary. However, in some short segments in which variations are minimal, such as those belonging to a lying on one side position, the signal might be considered quasi-stationary and we analyzed it with the Short Time Fourier Transform and the Gabor transform. Although both methods give information about the time resolution of the spectrum they have poor resolution and require limiting the analysis to short quasi-stationary segments of the records, preventing us from obtaining precise information about time and frequency locations (see supplementary material).

Therefore, as the analysis of crayfish brain electrical activity with traditional processing methods showed the signals to be non-stationary and highly non-linear (Akay, 1995; Durka and Blinowska, 2001), it did not produce satisfactory results and another method of analysis was necessary (see supplementary material).

2.4. Data analysis with a wavelet transform

In contrast to other time–frequency analysis methods of analysis, a Wavelet Transform (WT) is a window function whose radius increases in time (decreases in frequency) while resolving the low-frequency content of the signal, and decreases in time (increases in frequency) while resolving its high frequency; thus, notwithstanding the non-linearities in the records, it provides a good time–frequency resolution at an arbitrary location (Goswami and Chan, 1999). Therefore, we analyzed the signal in all segments with a Wavelet Transform (WT).

To analyze the crayfish brain electrical records we developed an algorithm for use in a personal computer. It calculates WT

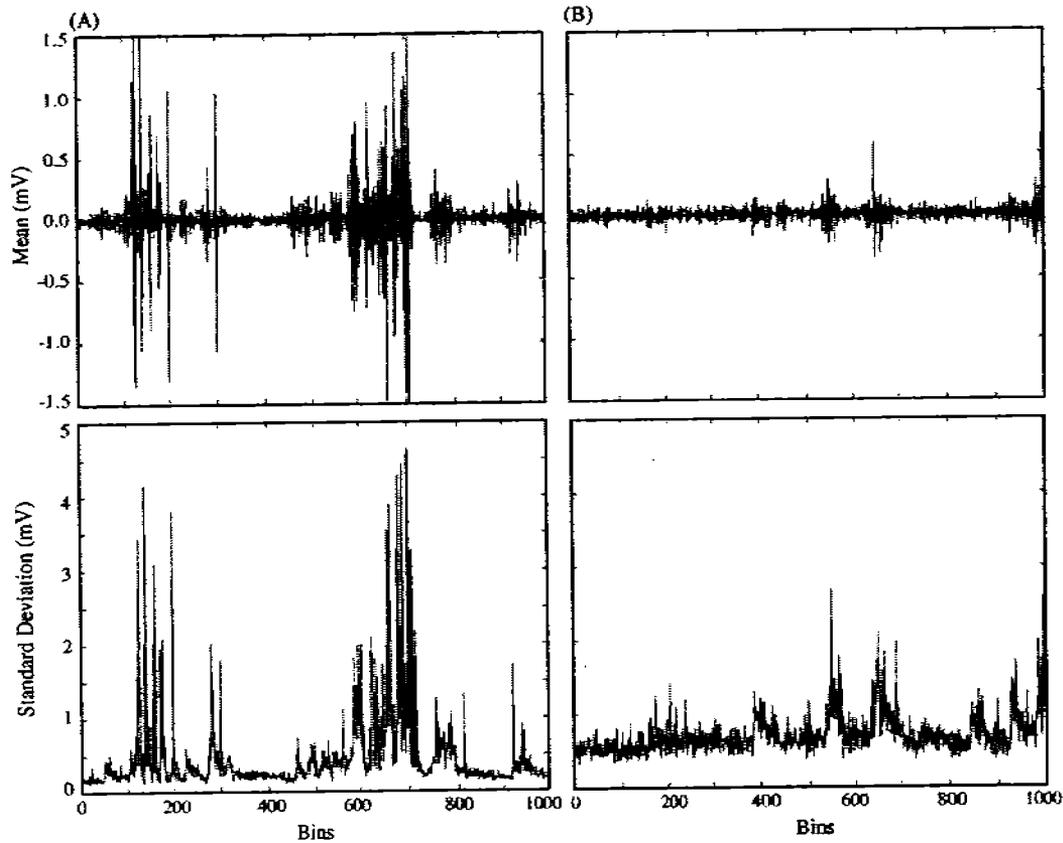


Fig. 2. Mobile mean and standard deviation from the brain electrical activity of crayfish: (A) standing up and (B) lying on one side.

of a discrete time series $f(n)$ with $n=0, \dots, N$, where N is the number of points in the time series with equal time spacing δt . The algorithm is based on:

$$W_{\psi} f(b, a) := \sum_n f(n) \overline{\psi\left(\frac{(n-b)\delta t}{a}\right)} \quad (1)$$

where overbar indicates the conjugated complex and uses the Morlet Wavelet defined by:

$$\psi_{b,a}(t) = e^{-(t-b)^2/2a} \cos\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (2)$$

The WT was used to obtain contour and 3D-graphs that include time (to facilitate comparisons among graphs in this work we use time instead of samples, and frequency instead of scale), frequency and power (only the 0–60 Hz band of interest was represented and power is normalized and codified in color using

the visible light spectrum. Frequencies higher than 60 Hz are beyond the scope of this paper). We also show contour graphs that include time and frequency for fixed values of power (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1).

3. Results

As previously described (Ramón et al., 2004), crayfish behaving freely in an aquarium can be seen in several positions and Fig. 3 shows a graph of the three more common ones, alert, crouch and recumbent, which were identified with a number 0, 0.5 and 1, respectively. Data shown were obtained during a complete 24-h cycle for a single animal, and are characteristic of more than 20 similar recordings. Although in the figure it seems that at some hours there are more transitions among the three positions, large differences in the data from animals does not allow us to identify a clear diurnal rhythm.

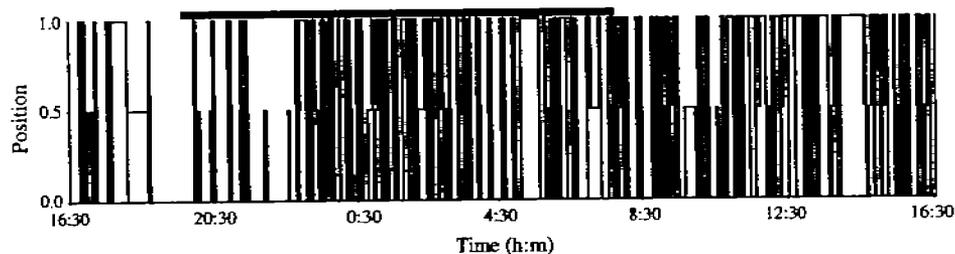


Fig. 3. Crayfish positions during a 24-h cycle. 0 indicates crayfish standing up, 0.5 crouching and 1 lying on one side.

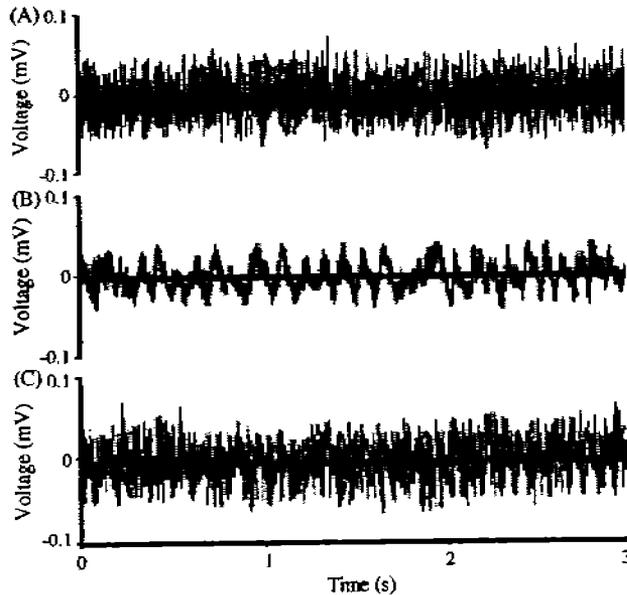


Fig. 4. Brain electrical activity from crayfish: (A) alert; (B) lying on one side; (C) crouching.

We recorded the brain electrical activity of behaving animals and correlate it with the corresponding body position. The brain electrical activity from alert animals (Fig. 4A) is comprised by numerous spikes on an almost flat baseline, while when they lie motionless on the surface of the water the spikes are replaced by slow waves (Fig. 4B). The brain activity from a crouching animal shares characteristics seen while in the other two positions (Fig. 4C).

Records obtained from the brain were analyzed with the wavelet transform and results are shown as 3D graphs. In a standing up animal, the WT analysis of records from deutocerebrum shows high power at frequencies between 20 and 35 Hz (Fig. 5A; we present 3D graphs and contour with fixed power value graphs only in this figure, and in the following ones we show only 3D graphs. Other 3D and contour graphs can be found in supplementary material) and relatively low power values at frequencies over 60 Hz. Contour graphs (Fig. 5B) confirm these findings for the analyzed segments of 300 s and WT analysis of

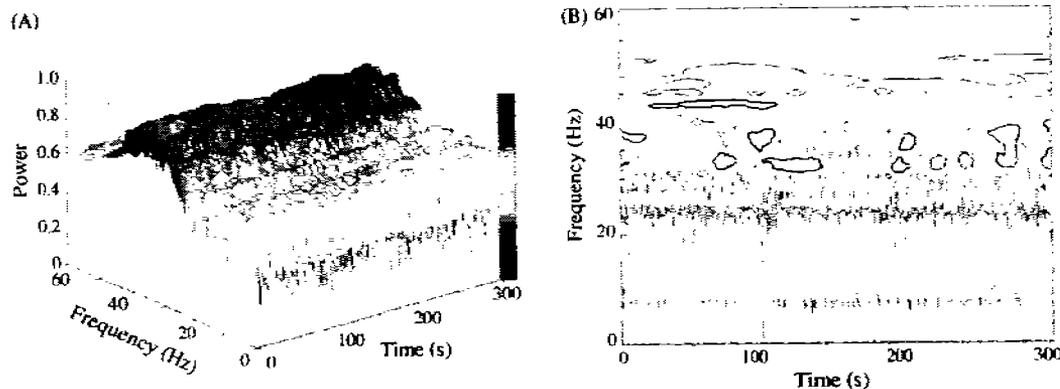


Fig. 5. Wavelet Transform of deutocerebral brain electrical activity from a standing up crayfish during 300 s. (A) 3D representation, (B) contour representation, that is a time–frequency representation with fixed values of power.

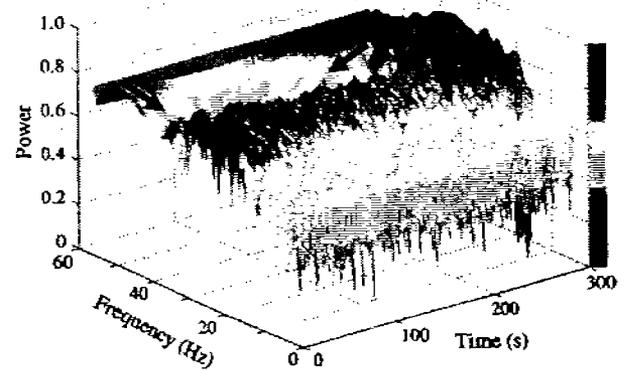


Fig. 6. 3D representation of the wavelet transform of deutocerebral brain electrical activity from a lying on one side crayfish. Note the change in dominant frequencies to 15–20 Hz, and the reduction in power for the 30–45 Hz range (arrows).

records obtained from protocerebrum present similar features (data not shown).

WT analysis of records from a lying on one side crayfish unravels a shift of the dominant frequencies from 20–35 to 15–20 Hz, as well as a strong decrease in power at frequencies of 30–45 Hz (Fig. 6; for a contour graph, see Fig. 2 in supplementary material). These changes are seen in records obtained from most brain regions, particularly in those from deutocerebrum.

A common finding in WT graphs from lying on one side animals is the presence of large decreases in power at frequencies in the range 30–45 Hz. These decreases disappear before the animals stand up, and are not observed in awake crayfish.

Comparison of graphs in Figs. 5 and 6 clearly indicates that it is possible to record at least two types of electrical signals in the crayfish brain, reflecting two clearly different brain states, awake and sleeping. Furthermore, since during the day an animal lies on one side for periods ranging from few seconds to more than 40 min, we considered of interest to search for a pattern during the nictameres. Table 1 shows that an animal recorded continuously during 24 h spends many periods lasting less than 2 min in a recumbent position. As it is shown in Fig. 3, there

Table 1
Length of periods spent by a crayfish lying on one side or crouching in the corner of the aquarium during a 24-h cycle

Interval (min)	Crouching		Lying on one side	
	Total duration (h:m:s)	Number of events	Total duration (h:m:s)	Number of events
<2	00:16:22	13	00:53:10	56
2–5	01:20:24	24	03:28:51	71
5–10	01:12:12	11	02:24:04	3
10–15	00:38:04	3	02:13:21	11
15–20	00:16:43	1	01:39:15	6
>20	00:00:00	0	01:30:09	3

is not a detectable rhythm in as many as 20 different recorded animals.

Fig. 7 shows a fragment of a 2-h position record obtained from a continuous one lasting 24-h. In the sample, the animal stands up, then moves to the recumbent position for a few minutes and stands up again, remaining some minutes in this position, after which once again lays on the surface of the water. In total there are 12 transitions in the first 30 min, 14 in the second 30 min period, 12 in the third, and 13 in the fourth. Similar patterns were recorded from 20 animals, and in all cases there were many transitions between recumbent positions lasting from 10 s to around 40 min. This variability of periods in such position raises the question about whether animals sleep during all of them. In particular, does the animal go to sleep as soon as it lies on one side?

To answer the question above, we resorted to a WT analysis of records from 10 animals lying on one side for lengths of time ranging between 10 s and 42 min. We analyzed 100 different segments of records from animals lying on one side less than 2 min.

The analysis of different segments of brain electrical activity shows that during the shortest lying on one side period there is not a decrease in power at any frequency, nor a shift of the dominant frequencies from 20–35 to 15–20 Hz. In fact, both, the decrease in power and the shift of dominant frequencies, are not seen when lying on one side periods are shorter than 2 min (Fig. 8; for a contour graph see Fig. 3 in supplementary material). Therefore, it seems that the brain activity is synchronized to a slow wave pattern only when animals lie on one side for longer periods of time. Moreover, the decrease in power seems to wax and wane.

3D wavelet transform graphs for segments corresponding to crouching crayfish show intermediate power values at all frequencies, usually lower than those of a standing up animal but higher than for a crayfish lying on one side (data not shown). However, results from crouching animals were less homoge-

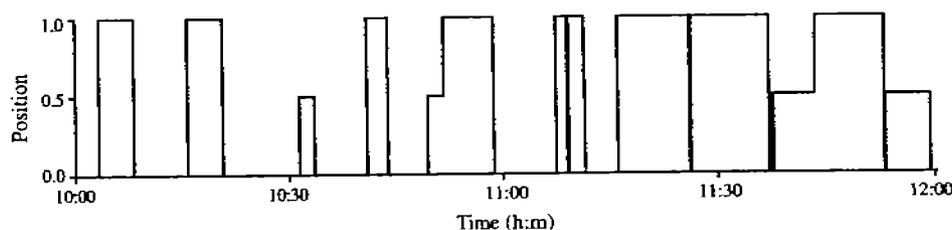


Fig. 7. Crayfish positions during 2 h. 0 indicates crayfish standing up, 1 lying on one side and 0.5 crouching. Compare this record with that of Fig. 3.

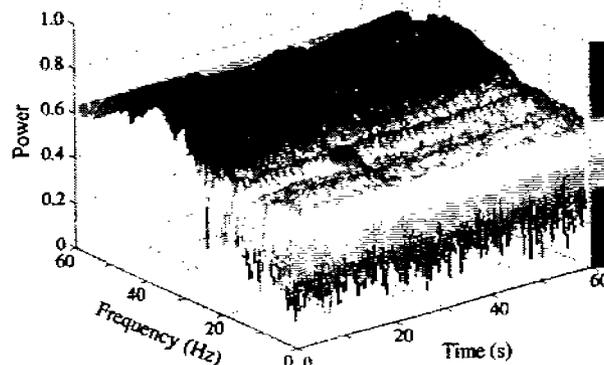


Fig. 8. 3D representation of the wavelet transform of deutoerebral brain electrical activity for a crayfish lying on one side for 60 s. Note the similarities with Fig. 5 (standing up crayfish).

nous than those from animals in other positions, and although in many cases we found the same decrease in power at frequencies 30–40 Hz, in others values were closer to those from awake animals. To throw light on this point we analyzed the transitions between two positions, searching for a correlation between crayfish position and brain electrical activity.

Fig. 9A shows the 3D WT transform of data from a crayfish moving from a standing up to a crouching position. When the animal crouches (arrow) there is a sudden increase in power for most frequencies and then a decrease that remains low the rest of the record, but with values higher than those of a sleeping animal. Fig. 9B shows results during the transition from crouching to lying on one side position at the arrow. Before the arrow the power for frequencies between 30 and 45 Hz is low, during transition it increases, and then decreases when the animal lies on one side. There is also a continuous decrease in power for frequencies in the range 20–30 Hz, which returns to normal values only during the position transitions.

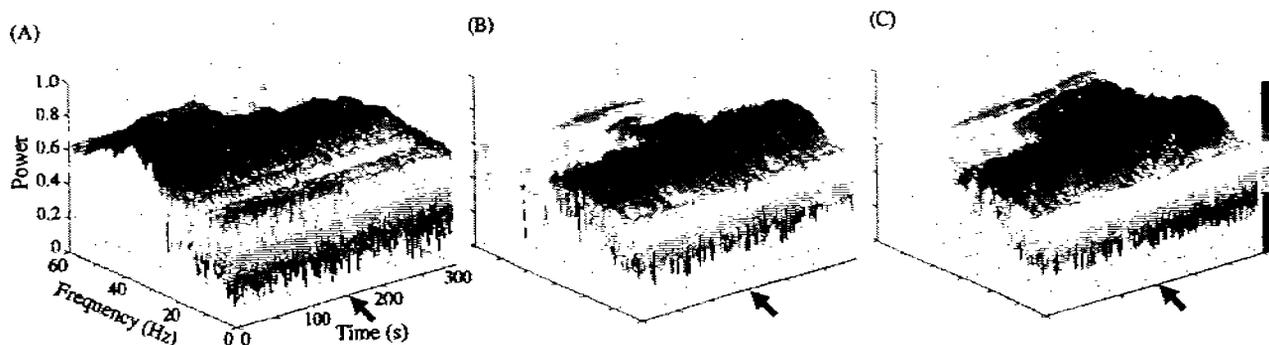


Fig. 9. Wavelet Transform of deutocerebral brain electrical activity during position transitions. (A) Transition from standing up to crouching (arrow). (B) Transition from crouching to lying on one side (arrow). (C) Transition from lying on one side to crouching (arrow). Scale is the same for all graphs.

The 3D wavelet transform graph of the brain electrical activity for an animal crouching after lying on one side shows another feature. During the transition there is a slow increase in power values for most frequencies, that reaches its maximum around 200 ms and remains high, resembling that of an alert crayfish for the rest of the recorded time (Fig. 9C). Data for protocerebrum and deutocerebrum are similar, although power values are lower for this latter region.

We analyzed 20 transitions from and to crouching trying to find some pattern. We found that when transition is from standing up to crouching the WT shows an alert pattern (60% of the cases), while when the transition is from recumbent to crouching the WT is similar to that of a sleeping animal (75% of the cases).

4. Discussion

Results presented in this study support our previous conclusion, throughout day or night crayfish has many periods during which they sleep, as defined by behavioral and electrical criteria. As a whole, the crayfish sleeping state is characterized by slow waves generated at the brain, but the WT analysis also disclosed other components of the brain electrical activity. In particular, crouching is also a sleeping state, but it depends on the previous position of the animal.

In previous work, we have shown that crayfish behaving in an aquarium have periods of rest during which they lie on one side against the surface of the water. At those times they also show characteristics compatible with sleep as determined in mammals, such as a high threshold to mechanical stimuli, lack of processing of visual signals compatible with a mild cognitive function, rebound after a period of sleep deprivation, and a pattern of brain electrical behavior characterized by slow waves (Ramón et al., 2004).

An initial point of concern was that the slow waves recorded from the brain could be originated from regions outside the head, such as, for example, the respiratory muscles that move the scaphognathites. To rule out this possibility we recorded the electrical activity generated by the movement of those structures and found frequencies in the range between 1 and 8 Hz, different from those of the brain slow waves (Ramón et al., 2004). Similarly, since our cannula electrodes do not record the activity from head muscles, as it was discussed previously (Hernández

et al., 1996), we conclude that the slow waves are originated by the brain itself.

The spontaneous brain electrical activity of awake crayfish is comprised by numerous spikes on an almost flat baseline (Hernández et al., 1996). During sleep, spikes are substituted by slow waves and its spectral analysis with an FFT shows their power peaking at 10–15 Hz. Slow waves are seen when an animal is lying on one side against the surface of the water, and continuous monitoring of crayfish position and brain electrical activity during 24 h cycles confirmed these findings.

We took the lying on one side position as a behavioral indication of sleep and the slow waves as the sign characteristic of such brain state. Thus, in the present work we intended to study the relationships between these two parameters by simultaneously recording them and analyzing the electrical activity with a powerful and mathematically coherent method, the wavelet transform.

4.1. Rationale for a new analytic approach

Characteristics of the vertebrate electroencephalogram (EEG) in the frequency domain have been obtained assuming that the signal is quasi-stationary and analyzing it with the Fourier transform (Thakor and Tong, 2004). However, it must be recalled that Fourier analysis is designed to analyze stationary and periodical signals, otherwise results are only approximate. In mammals FFT works because in most cases, awake or during the different sleep stages, EEG signals are quasi-stationary.

Crayfish brain electrical activity is extremely complex and reveals both rhythmical and transient features. To study the possibility of using a Fourier transform to analyze crayfish brain electrical activity, we first tested its statistical properties and found that it is non-stationary in awake and sleeping animals, making the analysis unreliable. A way to bypass such a problem during short periods of time is to consider the records as quasi-stationary and use the STFT or Gabor transform. However, because resolution depends on the size of the window, those methods require using several windows of different size, one for each group of frequencies to resolve, and although the frequency resolution of our data improved the method as a whole was impractical. Therefore, to determine dynamics and sequences of the crayfish brain electrical activity in the frequency and time domains we needed a different tool.

Wavelet based analysis of a non-stationary time series is an adaptive time–frequency method. By using a scalable function instead of the fixed-scale window function, wavelets identify the frequencies and time at which a given event occurs (Durka and Blinowska, 2001; Thakor and Tong, 2004). Wavelets have been used to identify and characterize event related potentials (Yordanova et al., 2002; Quiroga et al., 2001) and EEG artifacts (Kalayci, 1994; Durka et al., 1996), among other signals.

4.2. Wavelet analysis

We chose to analyze our data with a Morlet function wave as the mother wavelet because it is non-orthogonal (allowing to observe smooth and continuous variations in power), complex (better adapted for capturing oscillatory behavior), and its shape resembles crayfish neuronal spikes. Wavelet analysis identifies simultaneously time and frequency changes, and show that when crayfish are lying on one side the electrical activity of the brain is comprised by 16–30 Hz waves with no spikes and a reduction in power at most frequencies, mainly in the 30–45 Hz range. Although we could, in principle, get some of that information with STFT or Gabor transform, it would have required many windows and localization of phenomena, on the time domain would have been quite difficult; for example, during transitions between states.

Wavelet analysis allowed us to find out that slow wave sleep in crayfish is not a continuous state, but it is comprised by phases of various durations that do not seem to have a pattern or cycle. Furthermore, the correlation between wavelet results and position shows that a crayfish does not fall asleep immediately after lying on one side or crouching; instead and similarly to vertebrates, it ‘requires’ some time to fall asleep. Once slept, as time increases there are persistent decreases in power at frequencies not previously detected, a sign that we tentatively interpret as sleep deepening.

Slow waves in the electroencephalogram are typical of large brains with neocortex and thalamocortical circuits (Crunelli, 2002; Krueger and Obal, 1999, 2003; Muzur, 2005), and probably originate from postsynaptic potentials in the brain cortex (Crunelli et al., 2002; Thakor and Tong, 2004). During sleep the rhythmic thalamic output synchronizes the cortical cells and generates the large slow waves that in mammals results in delta and theta rhythms. However, slow waves do not seem to have any relation with brain size or neocortex width (Lo et al., 2004; Siegel, 2005).

In contrast, although there are many examples of slow waves in the central nervous system of invertebrates (Adrian, 1931; Jahn and Crescitelli, 1938; Bullock, 1984; Bullock and Basar, 1988; Gelperin and Tank, 1990; Ramón et al., 2004), explanations about their origin are scarce. In vertebrates it has been proposed that during sleep, changes in the intracellular calcium concentration of glial cells synchronize large groups of neurons via glia-neuron gap junctions and play an important role in the genesis of slow waves (Crunelli et al., 2002). In crayfish there are no data indicating the bases of slow waves, but the highly branched neuronal dendritic trees have large amounts of glia (Sandeman et al., 1992) and we speculate that similar interac-

tions between glia and neurons by means of calcium waves might result in slow waves in the crayfish brain electrical activity.

In summary, WT analysis of crayfish brain electrical activity during sleep allows us to state that: (1) sleep in crayfish is a state unique and different from that of an alert animal; (2) sleep in crayfish is not uniform, but comprised by ‘micro-states’ with different electrical activity patterns; (3) animals do not sleep immediately after a recumbent position and ‘require’ a few minutes before their brain electrical activity indicates sleep, and; (4) lying on one side at the surface of the water is a behavioral sign of sleep in crayfish. All these conclusions support the view that, similar to the equivalent state of vertebrates, sleep in invertebrates is complex and probably due to the activity of several neuronal circuits.

Acknowledgments

The authors would like to dedicate this paper to the memory of Prof. Theodore H. Bullock, whose profound biological knowledge and good nature enlightened our discussions during this project.

This work was supported by Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, and a Fellowship from CONACyT to KMA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.025.

References

- Adrian ED. Potential changes in the isolated nervous system of *Dysticus marginalis*. *J Physiol Lond* 1931;72:132–51.
- Akay M. Wavelets in biomedical engineering. *Ann Biomed Eng* 1995;23(5):531–42.
- Bullock TH. Ongoing compound field potentials from octopus brain are labile and vertebrate-like. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984;57:473–83.
- Bullock TH, Basar E. Comparison of ongoing compound field potentials in the brains of invertebrates and vertebrates. *Brain Res Rev* 1988;13:57–75.
- Crunelli V, Blethyn KL, Cope DW, Hughes SW, Parri HR, Turner JP, Tóth TL, Williams SR. Novel neuronal and astrocytic mechanisms in thalamocortical loop dynamics. *Phil Trans R Soc Lond B* 2002;357:1675–93.
- Durka PJ, Blinowska KJ. Unified time–frequency parametrization of EEG. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2001;20:47–53.
- Durka P, Koziezyk R, Blinowska K. Neural networks and wavelets analysis in EEG artifact recognition. In: *Proceedings of the Second Conference on Neural Networks and their Applications*; 1996. p. 167.
- Gelperin A, Tank DW. Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *Nature* 1990;345:437–40.
- Goswami JC, Chan AK. *Fundamentals of wavelets: theory, algorithms and applications*. NY: Wiley; 1999. p. 324.
- Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams J, Sehgal A. Pack AJ Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 2000;25:129–38.
- Hernández OH, Serrato J, Ramón F. Chronic recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: the basal, unstimulated activity. *Comp Biochem Physiol* 1996;114A:219–26.
- Jahn TL, Crescitelli F. The electrical response of the grasshopper eye under conditions of light and dark adaptation. *J Cell Comp Physiol* 1938;12:39–55.
- Kalayci T. Wavelet preprocessing for automated neural network detection of EEG spikes. *IEEE Eng Med Biol* 1994;761–4.

- Klein BA, Gibbs AG, Larsen KMF. Signatures of sleep in the paper wasp *Polybia flavus*. *Ent Soc Am* 2003 [Paper 10464].
- Krueger JM, Obal Jr F, Fang J. Why we sleep? A theoretical view of sleep function. *Sleep Med Rev* 1999;3:119–29.
- Krueger JM, Obal Jr F. Sleep function. *Front Biosci* 2003;8:511–9.
- Lo Ch-Ch, Chou T, Penzel T, Scammell TE, Strecker RE, Stanley HE, Ivanov PCh. Common scale-invariant patterns of sleep–wake transitions across mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17545–8.
- Muzur A. Toward an integrative theory of sleep and dreaming. *J Theor Biol* 2005;233:103–18.
- Quiroga RQ, Rosso OA, Bassar E, Schruemann M. Wavelet entropy in event-related potentials: a new method showing ordering of EEG oscillations. *Biol Cybern* 2001;84:291–9.
- Ramón F, Hernández-Falcón J, Nguyen B, Bullock TH. Slow wave sleep in crayfish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11857–61.
- Sandeman D, Sandeman R, Derby C, Schmidt M. Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 1992;183:304–26.
- Sauer S, Kinkelin M, Herrmann E, Kaiser W. The dynamics of sleep-like behaviour in honey bees. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2003;189(8):599–607.
- Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000;287:1834–7.
- Shaw PJ, Franken P. Perchance to dream: solving the mystery of sleep through genetic analysis. *J Neurobiol* 2003;54:179–202.
- Siegel JM. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 2005;437:1264–71.
- Tobler I, Stalder JJ. Rest in the scorpion—a sleep-like state. *J Comp Physiol A* 1988;163:227–35.
- Thakor NV, Tong S. Advances in quantitative electroencephalogram analysis methods. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:453–95.
- Yordanova J, Kolev V, Rosso OA, Schruemann M, Sakowitz OW, Ozgoren M, Bassar E. Wavelet entropy analysis of event-related potentials indicates modality-independent theta dominance. *J Neurosci Methods* 2002;117:99–109.