

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

Facultad de Ciencias

ESTUDIO ELECTROFISIOLOGICO DE LOS POTENCIALES DE RAIZ QUE
RESULTAN DEL ACOPLA SINAPTICO ELECTRICO ENTRE AXONES AFERENTES
Y MOTONEURONAS EN LA MEDULA ESPINAL DE RANA.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

H U M B E R T O C R U Z B L A N C A H E R N A N D E Z

1985



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 está 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.

INDICE.

1.- OBJETIVOS GENERALES. _____	1
2.- INTRODUCCION. _____	2
2.1 Aspectos funcionales de la transmisión sináptica. _____	4
2.1.1 Desarrollo histórico del concepto de transmisión sináptica _____	4
2.1.2 Transmisión sináptica química _____	6
2.1.3 Transmisión sináptica eléctrica _____	7
2.1.4 Transmisión sináptica mixta _____	8
2.1.5 Diferencias entre los mecanismos de transmisión sináptica química y eléctrica _____	8
2.2 Características de los potenciales de raíz generados en la médula espinal de los anfibios anuros _____	10
2.2.1 El potencial de raíz ventral (DR-VRP) _____	11
2.2.2 El potencial de raíz dorsal (VR-DRP) _____	12
3.- ANTECEDENTES. _____	14
4.- METODOS. _____	19
4.1 Preparación biológica _____	19
4.2 Técnica de disección de la médula espinal de rana _____	19
4.2.1 Extracción y disección de la médula espinal del canal vertebral _____	19
4.2.2 Hemisección sagital _____	20
4.3 Técnicas de registro _____	21
4.3.1 Registro extracelular de fenómenos bioeléctricos _____	21

4.3.1.1	Potenciales de raíz _____	21
4.3.1.2	Potencial de campo antidrómico _____	22
4.4	Soluciones fisiológicas _____	23
4.4.1	Solución Ringer normal _____	23
4.4.2	Modificaciones en la composición del - Ringer normal _____	23
4.5	Modificación en la temperatura del baño de - perfusión _____	24
5.-	RESULTADOS. _____	25
5.1	Potenciales de raíz cuando la médula espinal es perfundida con solución Ringer normal _____	25
5.1.1	Potencial de raíz ventral producido -- por la estimulación eléctrica de la ra íz dorsal ipsilateral homosegmentaria (DR-VRP) _____	25
5.1.2	Potencial de raíz dorsal producido por la estimulación eléctrica de la raíz - ventral ipsilateral homosegmentaria -- (VR-DRP) _____	26
5.2	Disociación entre los componentes de los po- tenciales de raíz mediados por transmisión - sináptica química y eléctrica respectivamente -	27
5.3	Efecto de la temperatura sobre los potencia- les de raíz resistentes a la ausencia de -- Ca ⁺⁺ y a la presencia de Co ⁺⁺ ó Mn ⁺⁺ en la - solución de perfusión _____	28
5.3.1	Efecto de la temperatura sobre el -- DR-VRP eléctrico _____	29
5.3.2	Efecto de la temperatura sobre el -- VR-DRP I y el VR-DRP II _____	30
5.4	Otras propiedades del VR-DRP I y del VR-DRP II. Facilitación del VR-DRP II _____	32

5.5 Efecto del tetraetilamonio (TEA) sobre los - potenciales de raíz dorsal resistentes a la ausencia de Ca^{++} y presencia de Co^{++} o Mn^{++}	32
6.- DISCUSION.	34
6.1 Identificación de los componentes del DR-VRP y del VR-DRP mediados por interacciones eléc- tricas: efecto de la substitución de Ca^{++} -- por Co^{++} ó Mn^{++}	34
6.2 Interpretación de los efectos de la tempera- tura sobre los potenciales de raíz debidos a interacciones eléctricas	35
6.3 Interpretación del fenómeno de facilitación del VR-DRP II, así como la ausencia de faci- litación en el VR-DRP I	39
6.4 Mecanismos a través de los cuales se origina el VR-DRP I y el VR-DRP II	40
6.5 Significado biológico de la comunicación in- tercelular de naturaleza eléctrica en la mé- dula espinal de los anfibios	43
7.- CONCLUSIONES.	47
8.- BIBLIOGRAFIA.	49
9.- FIGURAS.	57

1.- OBJETIVOS GENERALES.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- Corroborar por medio de técnicas electrofisiológicas si las fibras aferentes primarias y las motoneuronas están acopladas eléctricamente en la médula espinal de rana.
- 2.- Dilucidar si el acople eléctrico ocurre en dirección antidrómica, es decir, de las motoneuronas hacia las fibras aferentes de la raíz dorsal ipsilateral y homosegmentaria.
- 3.- Identificar la naturaleza y el mecanismo de generación de los componentes de corta latencia del potencial de raíz dorsal, producidos por la estimulación eléctrica de la raíz ventral ipsilateral y homosegmentaria (VR-DRP).
- 4.- Caracterizar algunas propiedades de los componentes de corta latencia del VR-DRP. Estudiar sistemáticamente los cambios que ocurren en dichos componentes cuando se modifica la temperatura de la médula espinal.
- 5.- Discutir el posible significado de la transmisión sináptica eléctrica en el reflejo monosináptico de los anuros.

2.- INTRODUCCION.

Una de las funciones del Sistema Nervioso de los vertebrados es mantener y regular la postura estática y dinámica del cuerpo, función que ha alcanzado un alto grado de complejidad en los vertebrados terrestres. En los vertebrados existen varias regiones del Sistema Nervioso Central que regulan y efectúan la función anterior, por ejemplo: la corteza cerebral, el cerebelo y la médula espinal. La información motora que sale de estos centros nerviosos converge en las motoneuronas espinales, a las que Sherrington denominó "la vía final común", y de las cuales se generan impulsos que son transmitidos por sus axones hacia los músculos efectores correspondientes.

Las motoneuronas forman parte de un circuito anatómico-funcional que juega un papel fundamental en la generación del tono muscular y consecuentemente en el control de la postura estática y dinámica. Los elementos que forman este circuito se esquematizan en la figura 1. En ella, observese que el circuito se inicia en las llamadas terminales anuloespirales que forman parte del huso muscular. Dichas terminales son en realidad, la ramificación final de fibras nerviosas sensoriales denominadas fibras aferentes primarias o fibras Ia. Cada fibra Ia sale del músculo correspondiente y entra a la médula espinal a través de las raíces dorsales. En su recorrido intramedular las fibras Ia hacen contactos monosinápticos excitatorios con las motoneuronas-alfa. Estos contactos se conocen con el nombre de sinapsis Ia. El circuito se continúa con los axones de las motoneuronas, los cuales emergen de la médula espinal por las raíces ventrales dirigiéndose a sus músculos respectivos. En los músculos, las terminales presinápticas de los axones motores hacen sinapsis excitatorias con las fibras musculares extrafusales.

Desde el punto de vista fisiológico el circuito descrito opera en principio, de la siguiente manera: un estiramiento

to del músculo produce un aumento en la longitud del huso muscular y como consecuencia de esta deformación se generan potenciales de acción en las terminales anuloespirales, los cuales viajan hacia la médula espinal. Intramedularmente, a través de las sinapsis Ia se excitan a las motoneuronas, produciéndose en estas células potenciales de acción. Los impulsos nerviosos son conducidos por los axones motores hacia las uniones neuromusculares para iniciar en las fibras musculares el proceso de acople excitación-contracción. La consecuencia de todos estos eventos es el acortamiento del músculo que se acompaña a su vez de un cese en el disparo de potenciales de acción en las terminales anuloespirales.

La acción refleja (el arco reflejo de estiramiento) del circuito en cuestión contribuye junto con otros circuitos neuronales (por ejemplo, el sistema gamma) a la generación del tono muscular y de ahí su importancia, pues interviene de manera decisiva en el control de la postura. De éste circuito estamos interesados en conocer el mecanismo de transmisión sináptica entre los axones Ia y las motoneuronas. Varias preguntas surgen de inmediato cuando dirigimos la atención sobre el mecanismo de operación de estas sinapsis. Algunas de ellas son: ¿cual es el mecanismo de transmisión sináptica?, en otras palabras, ¿la sinapsis es química, eléctrica, o mixta?, ¿el mecanismo de transmisión es el mismo en todos los vertebrados terrestres?. En relación a la primera pregunta podemos afirmar que el mecanismo de transmisión en la sinapsis Ia, así como sus propiedades funcionales comienza a comprenderse, a pesar de que el problema se empezó a abordar desde 1955 en la médula espinal de gato (Coombs y col., 1955c). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en los anfibios anuros la transmisión es mixta, es decir, química y eléctrica (Alvarez-Leefmans y col., 1979; Shapovalov y col., 1978). No sabemos en el momento presente si dicho mecanismo de transmisión mixta es exclusivo de los anfibios o es una característica común del phylum vertebrata.

En lo que sigue de esta introducción consideramos necesario revisar brevemente dos tópicos importantes para la presente tesis pues sirvieron como marco teórico a partir del cual se diseñaron los experimentos y se interpretaron los resultados. Los antecedentes inmediatos al problema que se aborda en esta tesis son presentados en la sección correspondiente.

El primer tópico que se aborda es el de transmisión sináptica y tiene el fin de hacer un análisis comparativo de los dos modelos de transmisión: el químico y el eléctrico. Finalmente se resume el conocimiento que se tiene sobre el modo de generación de los potenciales de raíz que se originan ya sea por activación de las fibras aferentes de raíz dorsal o bien de los axones motores, ambos conjuntos nerviosos pertenecientes a la médula espinal.

2.1 Aspectos funcionales de la transmisión sináptica.

En los primeros párrafos de esta sección se intenta hacer un enfoque histórico de como fueron evolucionando las ideas acerca del mecanismo de transmisión sináptica. Esto es con el objeto de que antes de abordar los tópicos mencionados con anterioridad, el lector tenga una perspectiva histórica de las controversias inherentes a la comprensión del modo de transmisión sináptica en el Sistema Nervioso Central.

2.1.1 Desarrollo histórico del concepto de transmisión sináptica.

A fines del siglo pasado e inicio del presente, dos teorías intentaban explicar la estructura del Sistema Nervioso. Por un lado, la teoría neuronal sostenía que el Sistema Nervioso estaba constituido por unidades discretas o neuronas. Dicha teoría fue tenazmente defendida por el ilustre histólogo Español, Santiago Ramón y Cajal. Sin embargo, la teoría

reticular concebía al Sistema Nervioso como un sincio anatómico-funcional. No fue hasta el advenimiento del microscopio electrónico cuando dicha controversia se resolvió a favor de la teoría neuronal.

Estrechamente vinculado al anterior debate se encontraba el problema del mecanismo mediante el cual se transmitía el impulso nervioso de una neurona a otra. En este sentido, los primeros intentos por resolver el problema anterior se remontan a la misma época.

En 1877 Du Bois Reymond planteó dos alternativas de transmisión sináptica. Él sugirió que la transmisión podía ser de naturaleza química ó eléctrica. Elliott, en 1905, basándose en la similitud de acción entre la estimulación de nervios simpáticos y la adrenalina, sobre los órganos inervados por estos nervios, aportó la primera evidencia sugerente de la existencia de un mediador químico específico (Kuffler y Nicholls, 1976). Posteriormente Dale, en 1910, extendió el estudio de Elliot discrepando en sus conclusiones sólo en la naturaleza exacta del mediador químico (el neurotransmisor). No fue hasta 1921 cuando Otto Loewi obtuvo la primera evidencia que apoyaba fuertemente la hipótesis de la transmisión química.

Resumiendo su clásico y trascendental experimento, Loewi encontró que el líquido de perfusión de un corazón "frenado", previa estimulación del nervio vago, provocaba en otro corazón una disminución en la frecuencia cardíaca. Loewi interpretó este resultado sugiriendo que las eferentes vagales secretaban una sustancia química que producía en ambos corazones disminución en la frecuencia cardíaca. A partir de esta evidencia la teoría química ganó aceptación general entre los fisiólogos de la época.

Sin embargo, en 1959, Furshpan y Potter describieron la primera sinapsis cuyo mecanismo de transmisión es eléctrico. A partir de este descubrimiento se han reportado un gran número de sinapsis eléctricas en el Sistema Nervioso, tanto de

invertebrados como de vertebrados (Sotelo y Korn, 1978).

2.1.2 Transmisión sináptica química.

Paradójicamente el conocimiento que se tiene acerca del mecanismo de transmisión sináptica química, proviene en su mayoría de dos sinapsis no centrales. Una de ellas es la -- unión neuromuscular y la otra es la sinapsis gigante de calamar. Sin embargo hay abundantes razones experimentales que nos permiten hacer una generalización que incluyan sinapsis del Sistema Nervioso Central.

Los eventos más importantes de la transmisión química se resume en los siguientes puntos:

- 1) Despolarización de la terminal presináptica por el potencial de acción (Katz y Miledi, 1965a, 1967; Briggant y Mallart, 1982).
- 2) Activación de una conductancia al Ca^{++} , dependiente del voltaje transmembrana, en la terminal presináptica (Katz y Miledi, 1967d; Llinás y col., 1976).
- 3) Incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} , debido al influjo del mismo, en la terminal presináptica (Llinás, 1975).
- 4) El incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular ocasiona, por algún mecanismo desconocido, la fusión de las vesículas sinápticas en la cara interna de la membrana presináptica, produciéndose la liberación "cuántica" del neurotransmisor al espacio sináptico (Del Castillo y Katz, 1954; Ceccarelli y Hurlbut, 1980; Katz y Miledi, 1972).
- 5) Difusión del neurotransmisor a través del espacio sináptico (Katz y Miledi, 1965b).
- 6) Unión del neurotransmisor con un receptor específico ubicado en la membrana postsináptica (para una revisión de este tópico ver: Takeuchi, 1977).
- 7) En el caso de una sinapsis excitatoria, el complejo

neurotransmisor-receptor produce un incremento instantáneo en la permeabilidad al Na^+ y al K^+ y en menor grado al Ca^{++} (Takeuchi, 1977). La permeabilidad del iónoforo activado por dicho complejo es lineal dentro de ciertos valores de voltaje transmembranal (+50 a -175 mV) (Magleby y Stevens, 1972a).

8) El resultado final es una entrada neta de cargas positivas que despolarizan transitoriamente a la membrana postsináptica. A esta despolarización se le conoce como "potencial postsináptico excitatorio químico" (PPE químico). Los mismos eventos ocurren en una sinapsis inhibitoria difiriendo solo en el punto 7, ya que en la inhibición sináptica ocurre un aumento en la permeabilidad al Cl^- ó K^+ y Cl^- .

2.1.3 Transmisión sináptica eléctrica.

El acople eléctrico no es exclusivo del tejido nervioso pues dicho fenómeno ocurre en otras estirpes celulares, como por ejemplo, entre hepatocitos o entre algunas células epiteliales. El acople eléctrico entre neuronas da lugar a lo que denominamos transmisión sináptica eléctrica.

En una sinapsis eléctrica lo que sucede es que la corriente axial asociada al potencial de acción fluye directamente del elemento presináptico al postsináptico. Esto produce una corriente saliente en la neurona postsináptica con la consecuente despolarización transitoria de su membrana (figura 2). A esta despolarización electrotónica se le llama potencial postsináptico excitatorio eléctrico (PPE eléctrico). La corriente axial intracelular fluye a través de puentes de baja resistencia ubicados en una zona restringida de la membrana de ambas neuronas (Bennett, 1977; Loewenstein, 1981). La base estructural de estos puentes de comunicación intracelular son las uniones comunicantes originalmente descritas por Revel y Karnovsky en 1967.

2.1.4 Transmisión sináptica mixta.

Cuando en la misma sinapsis coexisten funcional y morfológicamente los dos tipos básicos de transmisión sináptica, se dice que dicha sinapsis es mixta. La primera descripción fisiológica de una sinapsis mixta se debe a Martín y Pilar quienes publicaron su hallazgo en 1963. Posteriormente se han descrito otras sinapsis mixtas en el Sistema Nervioso Central de vertebrados (Shapovalov, 1980; Sotelo y Korn, 1978; Sotelo y Grofova, 1976). Sin embargo poco se conoce sobre la manera en que interactúan los procesos involucrados en la transmisión química y en la eléctrica, en la sinapsis mixta. Hasta el momento, la respuesta a este problema es abordada solo en el plano especulativo (Shapovalov, 1980; Bennett, 1977).

2.1.5 Diferencias entre los mecanismos de transmisión sináptica química y eléctrica.

Basados en las descripciones referidas en párrafos anteriores, se infiere que la transmisión química difiere de la eléctrica en varios aspectos funcionales. Estas diferencias pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1) La transmisión química depende de la concentración de calcio libre extracelular ($[Ca^{++}]_e$) (Katz y Miledi, 1965 c; 1967d; Miledi, 1973) mientras que la transmisión eléctrica no. Sin embargo esta afirmación comúnmente aceptada debe tomarse con cautela pues en la glándula salival de la mosca de agua Chironomus, Loewenstein y colaboradores (1967) han encontrado que cuando la $[Ca^{++}]_e$ es de 5 micromolas, se produce desacoplamiento eléctrico entre las células de este epitelio. Ahora bien, este efecto, solo se induce cuando la preparación se mantiene en una solución que contiene EGTA ó EDTA como amortiguadores de la $[Ca^{++}]_e$. En soluciones sin quelantes y diferentes concentraciones de Ca^{++} (partiendo de ce

ro nominal) las células permanecen acopladas eléctricamente (Loewenstein, 1967). Resultados similares han sido observados en la médula espinal de los anfibios (Alvarez-Leefmans y cols., 1979). No se sabe si el efecto se debe a la disminución o a la ausencia en el Ca^{++} extracelular o bien a la presencia de agentes quelantes.

2) En la transmisión química hay un retardo sináptico debido en su mayor parte al tiempo que tarda en activarse el mecanismo de liberación del neurotransmisor. En la unión neuromuscular el retardo sináptico medido como el lapso de tiempo entre el pico negativo del campo producido por el potencial de acción presináptico y el inicio del potencial de placa, fluctúa entre 0.5 y 5 mseg. a 20°C (Katz y Miledi, 1965 b). Por otro lado, en las sinapsis eléctricas dicho retardo es de alrededor de los 50 microsegundos (Bennett, 1977).

3) Como el PPE químico se genera por un flujo entrante de Na^{+} y uno saliente de K^{+} , siguiendo ambos iones sus respectivos gradientes electroquímicos, es posible invertir el sentido de estos flujos de corriente modificando el potencial eléctrico de la membrana postsináptica. En otras palabras, el modelo químico predice un valor de potencial de membrana en el cual la corriente sináptica es cero [el potencial de inversión o punto nulo del PEE (Fatt y Katz, 1951)]. Por ejemplo, supongamos que el potencial de equilibrio del Na^{+} ($E_{\text{Na}^{+}}$) es de +55 mV y el potencial de equilibrio del K^{+} ($E_{\text{K}^{+}}$) es de -70 mV. Si el ionóforo por donde fluyen ambos iones es igualmente permeable a los dos, entonces el potencial de membrana tenderá a ser llevado a un valor entre $E_{\text{Na}^{+}}$ y $E_{\text{K}^{+}}$ o sea a -15 mV. Esto implica que si modificamos el potencial de membrana con corrientes polarizantes a un valor de -15 mV, entonces la corriente sináptica neta será igual a cero y estaremos en el punto nulo del PPE químico. En la mayoría de las sinapsis químicas excitatorias hasta ahora estudiadas, el potencial de inversión se encuentra entre 0 y -20 mV (Takeuchi, 1977). En las sinapsis eléctricas no se ha ob-

servado un potencial de inversión a pesar de que el PPE eléctrico tiene un comportamiento similar bajo el efecto de corrientes polarizantes (Bennett, 1977; Nicholls y Purves, 1970; Shapovalov y col., 1978).

4) El efecto de la temperatura sobre la amplitud del PPE y sobre el retardo sináptico es diferente en una sinapsis química y en una eléctrica. Cuando la temperatura se disminuye lentamente se produce un incremento gradual en la latencia y una disminución en la amplitud del PPE químico, mientras que en los mismos parámetros el PPE eléctrico no presenta variaciones (Nicholls y Purves, 1972). La disminución en la amplitud del PPE químico probablemente se explica por un decremento en la cantidad de neurotransmisor liberado de las terminales presinápticas (Takeuchi y Takeuchi, 1958; Kostial y Vouk, 1956).

5) Las sinapsis eléctricas se desacoplan cuando aumenta la concentración de Ca^{++} intracelular (Loewenstein, 1981), contrario a lo que ocurre en una sinapsis química pues en esta última es necesario un incremento en el Ca^{++} intracelular para disparar el proceso de liberación del neurotransmisor.

2.2 Características de los potenciales de raíz generados en la médula espinal de los anfibios anuros.

El potencial de raíz se genera por cambios en el potencial de membrana de los segmentos intramedulares de los axones que constituyen a la raíz espinal en cuestión. Dicho potencial se produce después de estimular vías específicas de la médula espinal como por ejemplo la columna lateral o las propias raíces espinales.

El potencial de raíz puede registrarse con un electrodo extracelular. Los potenciales de raíz resultan por tanto de la activación de una población neuronal en regiones restringidas de la sustancia blanca o gris de la médula y generalmente reflejan la actividad sináptica que ocurre den--

tro de la misma. La interpretación de los potenciales de raíz, junto con la información anatómica disponible, han permitido elaborar un esquema conceptual de los circuitos neuronales que los generan.

Son dos los potenciales de raíz que más nos interesan para el presente estudio, pues en su generación participan las fibras aferentes de raíz dorsal y las motoneuronas. Siguiendo la nomenclatura empleada por otros autores (Barrón y Mathews, 1938a; Eccles y Malcom, 1946; Grinnell, 1966), estos son: 1) el potencial de raíz ventral, que se produce cuando se estimula la raíz dorsal ipsilateral y homosegmentaria (DR-VRP); y 2) el potencial de raíz dorsal que se produce cuando se estimula la raíz ventral ipsilateral y homosegmentaria (VR-DRP). En adelante nos referiremos a ellos como los potenciales de raíz ventral y dorsal respectivamente, o bien por su nomenclatura abreviada.

2.2.1 El potencial de raíz ventral (DR-VRP).

El potencial de raíz ventral tiene dos componentes. Uno en forma de espiga que dura aproximadamente 5 mseg., superpuesto a un potencial lento cuya duración total es de aproximadamente 1 seg. (figura 3). La espiga corresponde a la descarga sincrona de potenciales de acción de las motoneuronas activadas a través de la vía monosináptica responsable del arco reflejo de estiramiento (Brookhart y Fadiga, 1960; Fadiga y Brookhart, 1960; 1962; Holemans y col., 1966; Katz y Miledi, 1963). Estos potenciales se generan de PPEs químicos y mixtos que despolarizan a la membrana de las motoneuronas hasta alcanzar el valor umbral (Alvarez-Leefmans y col., 1979; Shapovalov y col., 1978). El potencial lento se ha interpretado como resultado de la actividad polisináptica que reciben las motoneuronas (Araki y col., 1953). En algunas ocasiones los potenciales polisinápticos también despolarizan a la motoneurona hasta su umbral de disparo (figura 3).

2.2.2 El potencial de raíz dorsal (VR-DRP).

En este potencial concentramos todo nuestro interés -- pues es el fenómeno bioeléctrico cuya interpretación motiva el presente trabajo. En su generación están involucrados por lo menos dos de los elementos neuronales que producen el potencial de raíz ventral, es decir, las fibras aferentes de raíz dorsal y las motoneuronas.

El potencial de raíz dorsal tiene varios componentes. -- El más ostensible es de curso temporal lento, y que fue el primero en ser descrito (Barron y Mathews; 1938a). Este componente consiste de una despolarización cuya latencia es de 20 mseg. a 15°C; el tiempo al pico se encuentra entre los 50 y 60 mseg y su duración es alrededor de 350 mseg. (figura 4a). La amplitud al pico del potencial lento decrece cuando la temperatura disminuye (Grinnell, 1966), y el potencial desaparece cuando se aplican bloqueadores de la transmisión colinérgica nicotínica como el curare y la beta-eritroidina (Mitchell y Phillips, 1962) o por la acción de la alfa-cobrotoxina (Alvarez-Leefmans y Miledi, 1983), por lo que se ha postulado que en su generación interviene por lo menos una sinapsis colinérgica.

El origen del componente lento del VR-DRP en los anuros se empezó a elucidar cuando se encontró que la inhibición de la espiga monosináptica del DR-VRP, producida por estimulación previa de la raíz ventral, tenía un curso temporal similar al componente lento del VR-DRP (Czéh, 1977; Grinnell, 1966; Meij y Holemans, 1969). Grinnell (1966) sugirió que la inhibición recurrente de la espiga ocurría a nivel presináptico. Actualmente se acepta que este tipo de inhibición ocurre a consecuencia de la despolarización de ciertas fibras de raíz dorsal a través de una vía recurrente en donde la colateral del axón de la motoneurona forma la primera sinapsis

con una o más interneuronas (figura 4b). Se desconoce el número exacto de interneuronas que componen dicha vía recurrente. La despolarización de las fibras aferentes de raíz dorsal se propaga electrotonicamente hacia dicha raíz produciendo el componente lento del VR-DRP. En el presente trabajo nos referiremos a este potencial lento como el componente "tardío" del VR-DRP.

Otro componente del VR-DRP es un potencial despolarizante que aparece inmediatamente después del artefacto del estímulo. En el presente trabajo nos referiremos a este potencial como el VR-DRP I. Grinnell (1970) ha postulado que el VR-DRP I no es más que el registro, en la raíz dorsal, del potencial de campo antidrómico que invade a la población de motoneuronas. Además de este componente de corta latencia, Grinnell (1970) ha encontrado que cuando baña a la médula espinal de rana con un Ringer que contiene galamina o tetraetilamonio (TEA), se genera otro componente del VR-DRP, también de corta latencia e inmediato al VR-DRP I. A este nuevo componente le llamó el "early" VR-DRP. Resultados similares han encontrado Galindo y Rudomin (1978) bajo las mismas condiciones experimentales. En la sección de antecedentes discutiremos en detalle el mecanismo de origen del "early" VR-DRP.

3. ANTECEDENTES.

En la introducción mencionamos muy superficialmente los problemas inherentes a la identificación del modo de transmisión sináptica en los contactos entre fibras aferentes de raíz dorsal y las motoneuronas. En los siguientes párrafos reabordaremos con más detalle el problema anterior, pues es precisamente la sinapsis Ia, el sistema analizado en el presente trabajo. Es conveniente definir nuevamente lo que entendemos como sinapsis Ia. Las sinapsis Ia son aquellas formadas entre fibras aferentes primarias de raíz dorsal y la membrana de la motoneurona. Cada fibra Ia se origina en un huso muscular y el cuerpo celular de la misma se encuentra localizado en el ganglio de raíz dorsal o raquídeo, del segmento que le corresponde. Las sinapsis Ia son excitatorias y consecuentemente su acción sobre la membrana de la motoneurona es la generación de el potencial monosináptico excitatorio (PPE monosináptico).

En la médula espinal del gato, Coombs y colaboradores (1955c) estudiaron el efecto de corrientes polarizantes sobre la amplitud del PPE monosináptico (Ia PPE producido por la activación de una población de fibras Ia). Estos investigadores encontraron que dicho potencial se comportaba como lo predecía el modelo químico de transmisión sináptica (Fatt y Katz, 1951) cuando se aplican corrientes polarizantes de distinta magnitud y sentido, con la ayuda de un microelectrodo. Este comportamiento puede resumirse de la siguiente manera: cuando se pasan corrientes hiperpolarizantes, la amplitud del PPE monosináptico se incrementa y cuando se pasan corrientes despolarizantes la amplitud de dicho potencial sináptico disminuye hasta llegar a un punto (punto nulo) en el que el potencial se abate. Coombs y colaboradores (1955c) encontraron que el potencial de inversión o punto nulo del PPE monosináptico se alcanza a los 0 mV de potencial de membrana. Sin em-

bargo, frecuentemente encontraron (en otras motoneuronas) que el PPE monosináptico era insensible a las corrientes hiperpolarizantes, es decir, su amplitud no se modifica además de no observar una inversión sistemática del mismo. A pesar de ello concluyeron que el tipo de transmisión en la sinapsis Ia era química.

Nelson y Frank en 1967 dieron una posible explicación a la frecuente insensibilidad del PPE monosináptico cuando la motoneurona se hiperpolariza. Ellos mostraron que en el rango de corrientes hiperpolarizantes usadas por Coombs y colaboradores, se producía una disminución en la resistencia de la membrana (rectificación anómala) que explicaba la ausencia de un incremento en la amplitud del PPE monosináptico.

Al mismo tiempo, Rall y colaboradores (1967) después de analizar algunos parámetros del PPE monosináptico (la fase de ascenso y la amplitud al pico) como indicadores de la localización espacial de las sinapsis Ia concluyeron que la mayor parte de dichas sinapsis se encontraban localizadas en las dendritas distales, con este resultado sugirieron que la frecuente falla en la producción de la inversión del signo de el PPE monosináptico podía explicarse como consecuencia de un incompleto control del potencial de membrana dendrítico debido a la distancia electrotónica que hay entre las dendritas y el sitio de la inyección de la corriente polarizante (el soma de la motoneurona). La conclusión de estos autores, después de analizar las evidencias existentes hasta ese momento en pro y contra del modo de transmisión sináptica -- fue que no era posible distinguir entre transmisión química y eléctrica. La incertidumbre aumentó cuando Edwards y colaboradores (1976) tampoco pudieron observar la inversión de los PPE monosinápticos producidos en el soma de la motoneurona por la activación de una sola fibra Ia (para una revisión más extensa ver: Alvarez-Leefmans, 1982). Más recientemente, Finkel y Redman (1983) utilizando la técnica de fijación de

voltaje, han podido invertir la corriente sináptica asociada al PPE monosináptico unitario de origen somático.

En la médula espinal de gato el mecanismo de transmisión en la sinapsis Ia parece estar esclarecido, a pesar de las irregularidades en el comportamiento del PPE monosináptico. Por otro lado, en los vertebrados inferiores, particularmente en los anfibios anuros, la situación es más constante. En los anuros se ha demostrado la persistencia de un componente del PPE monosináptico cuando la transmisión química en la médula espinal se bloquea con Co^{++} ó Mn^{++} (Alvarez-Leefmans, et. al., 1978, 1979; Shapovalov, et. al., 1978, 1980). Alvarez-Leefmans y colaboradores y el grupo de Shapovalov concluyen que el PPE resistente a la substitución del Ca^{++} extracelular por Co^{++} (o Mn^{++}) es debido al acople eléctrico entre las fibras Ia y las motoneuronas. Otras evidencias en favor de la transmisión eléctrica en la sinapsis Ia son: 1) el PPE eléctrico es insensible a cambios en la temperatura (Shapovalov, et. al., 1978); y 2) el PPE eléctrico tiene una latencia mínima de 0.3 ms (Alvarez-Leefmans, et. al., 1979). En resumen, la evidencia acumulada en los últimos años nos permite concluir que en los anfibios anuros el tipo de transmisión sináptica en la sinapsis Ia es no solo química sino también eléctrica. Conocemos muy poco del mecanismo de transmisión, en la sinapsis Ia de los reptiles y las aves.

Se ha postulado que las sinapsis mixtas axodendríticas de la substancia intermedia de la médula espinal de los anuros (Sotelo y Grofova, 1976) son la base estructural del componente químico y eléctrico del PPE monosináptico. No obstante la indudable existencia de acople eléctrico entre las fibras Ia y las motoneuronas, poco se conocen, en este sistema, sobre las propiedades electrofisiológicas y fisiopatológicas de las uniones comunicantes a través de las cuales se genera el componente eléctrico del PPE monosináptico.

Existen evidencias que sugieren que las uniones comunicantes presentan bidireccionalidad al flujo de corriente, es decir, que el acople eléctrico ocurre tanto en dirección ortodrómica como antidrómica. Grinnell (1970) encontró (posteriormente confirmado por Galindo y Rudomín, 1978) que cuando la médula espinal se perfunde con Ringer que contiene Galamina ó TEA, sustancias que por su acción sobre el canal de potasio dependiente del voltaje, aumentan la invasión antidrómica de las motoneuronas, aparece en las raices dorsales, un componente de latencia relativamente corta (5 a 8 ms) del VR-DRP. Grinnell dió a este componente el nombre de "early" VR-DRP o "VR-DRP temprano" para distinguirlo del componente tardío al cual ya se hizo referencia en páginas anteriores. La amplitud del VR-DRP temprano se incrementa cuando la temperatura se disminuye de 17 a 10°C. A temperaturas más bajas su amplitud decae junto con la de los otros potenciales de raíz. Por otra parte, cuando la concentración de calcio extracelular se incrementa de 5 a 10 mM, el VR-DRP temprano se deprime rápidamente. En su trabajo, Grinnell concluye que el VR-DRP temprano resulta del acople eléctrico entre las motoneuronas y las fibras aferentes.

Un análisis más crítico de los resultados de Grinnell, arroja varias dudas. Desde un punto de vista farmacológico, es muy aventurado afirmar que el VR-DRP temprano se deba a transmisión sináptica eléctrica cuando no se ha bloqueado la transmisión química en la médula espinal. Por otra parte, la presencia del VR-DRP temprano solo pudo demostrarse sistemáticamente cuando la médula era perfundida con fármacos de acción múltiple. Se sabe, por ejemplo, que la Galamina además de bloquear la conductancia al potasio voltaje dependiente, también bloquea los receptores nicotínicos y los receptores al glutamato (Cull-Candy y Miledi, 1983). Así, un incremento en la excitabilidad de las fibras aferentes, por la Galamina o por el TEA, puede producir disparo de las mis

más por un efecto de campo eléctrico más que por un mecanismo de transmisión sináptica eléctrica.

Con respecto a la depresión del VR-DRP temprano, cuando se aumenta la $[Ca^{++}]$ extracelular, también es un resultado de difícil interpretación. Grinnell lo atribuye a un efecto directo del Ca^{++} sobre la transmisión eléctrica. Si bien es cierto que un aumento en la $[Ca^{++}]$ intracelular puede producir desacoplamiento electrónico (Loewenstein, 1981) también sabemos que la membrana de las neuronas es altamente impermeable al calcio y este catión se mantiene a niveles constantes incluso cuando se aumenta el gradiente electroquímico (Alvarez-Leefmans, et. al., 1981). Por otro lado sabemos que un incremento en la $[Ca^{++}]$ extracelular produce una disminución en la probabilidad de invasión antidrómica de la membrana somatodendrítica por el potencial de acción (Dambach y Erulkar, 1973). Este efecto puede explicar más congruentemente la depresión del VR-DRP temprano. En base a las críticas anteriores consideramos que los resultados de Grinnell no son suficientes para afirmar que la transmisión eléctrica ocurre también en dirección antidrómica, entre fibras aferentes y motoneuronas.

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores consideramos que es necesario hacer un estudio más crítico del modo de generación de los componentes de corta latencia del VR-DRP (y del DR-VRP) para determinar si las uniones comunicantes responsables del componente eléctrico del PPE monosináptico presentan la postulada bidireccionalidad al flujo de corriente eléctrica y si este acoplamiento es de suficiente intensidad como para producir disparo de potenciales de acción en las fibras aferentes por estimulación de sus elementos postsinápticos, es decir, las motoneuronas.

4.- METODOS.

4.1 Preparación biológica.

Se utilizó la médula espinal aislada y sagitalmente hemiseccionada de Rana moctezumae y R. pipiens.

El empleo in vitro de la médula espinal de los anfibios anuros ofrece ciertas ventajas técnicas sobre la de otros vertebrados. Las ventajas se resumen en los siguientes puntos: 1) la relativa facilidad con que la médula puede extraerse del cuerpo del animal; 2) bajo condiciones apropiadas de oxigenación y de suministro de nutrientes, la funcionalidad de la médula se prolonga por periodos de tiempo de más de 8 horas; 3) es posible controlar de manera precisa variables como el pH, la temperatura, así como la composición de los líquidos de perfusión; 4) la hemisección sagital disminuye las barreras difusionales que significan las meninges, de tal manera que se facilitan los experimentos de tipo farmacológico; 5) la hemisección sagital permite hacer registros intracelulares en diferentes zonas de las substancias gris y blanca sin producir lesiones severas en el tejido nervioso durante el recorrido del microelectrodo; 6) la hemisección a pesar de producir una lesión en la médula, ésta generalmente se recupera y mantiene una condición fisiológica estable y similar a la que presenta cuando es mantenida in situ ó cuando se aísla sin ser hemiseccionada.

4.2 Técnica de disección de la médula espinal de rana.

4.2.1 Extracción y disección de la médula espinal del canal vertebral.

El procedimiento de disección y montaje de la médula espinal se resume en los siguientes pasos:

1) La rana se descerebra cortando el craneo a la altura del

hueso occipital. El animal se sumerge en decúbito ventral, - en una cámara de disección conteniendo Ringer oxigenado a una temperatura entre 10 y 15°C, y se fijan sus extremidades con ganchos facultados para este propósito (figura 5a).

2) Se hace una incisión sagital en la piel y se disecciona la musculatura dorsal hasta hacer visible la columna vertebral y el hueso isquion.

3) Se hace una laminectomía dorsal en dirección rostrocaudal cuidando de no lesionar a la médula durante este procedimiento quirúrgico. Una buena laminectomía garantiza la funcionalidad de la preparación, por lo que esta etapa es crítica (figura 5b).

4) Se hace una incisión longitudinal de la duramadre y se remueve cuidadosamente.

5) Después se seccionan las raíces dorsales y ventrales, así como el filum terminale.

6) Una vez aislada, la médula espinal se fija con la cara -- ventral hacia arriba, en una caja de Petri cuyo piso contiene un polímero plástico (sylgard) (figura 6a). La fijación se hace con alfileres entomológicos. Estos se colocan en los extremos de la médula aislada, la cual se estira ligeramente para que no se mueva durante la hemisección.

4.2.2 Hemisección sagital.

1) La hemisección se hace con una navaja de afeitar y constituye la etapa crucial. La navaja debe colocarse en un plano perpendicular a la superficie ventral de la médula. El corte se hace sagitalmente a lo largo del surco ventral para que -- así se obtengan dos mitades simétricas (figura 6b).

2) Finalmente, se fija una de las mitades en otra caja de Petri (volumen: 5ml), la cual sirve como cámara de perfusión y registro durante los experimentos (figura 6c). La médula debe fijarse al piso de la cámara firmemente para que no se -- mueva por perturbaciones del flujo de Ringer que pasa por la

cámara y así poder tener registros de potenciales de campo estables.

4.3 Técnica de registro.

4.3.1 Registro extracelular de fenómenos bioeléctricos.

4.3.1.1 Potenciales de raíz.

Después de fijar una mitad de la médula espinal en la cámara de registro, las raíces dorsal y ventral, ipsilaterales y del mismo segmento, se montan en electrodos de succión cuyo interior fue previamente llenado con el mismo Ringer -- que perfunde al resto de la preparación. De esta manera los potenciales de raíz se registran como los cambios en el potencial de lesión que existe en la zona seccionada de la raíz y un electrodo indiferente que se encuentra en la cámara de perfusión. El circuito equivalente de esta técnica de registro se muestra en la figura 7. Este arreglo experimental equivale a hacer "un registro intracelular simultaneo de todas las fibras" que forman la raíz espinal (dorsal o ventral), ya que eléctricamente dichas fibras se encuentran dispuestas en paralelo. Bajo estas condiciones de registro, un potencial despolarizante se manifiesta como una positividad en el interior de las fibras con respecto al electrodo indiferente y por tanto se registra como una deflexión hacia arriba en el osciloscopio. Por otra parte, la amplitud de los potenciales de raíz es función de la resistencia de corto -- circuito (Rcc) por lo que es importante que el sello entre el electrodo de succión y la raíz sea lo mejor posible.

La figura 8 muestra un diagrama del circuito de registro empleado en los experimentos. Los potenciales de raíz se registraron con un amplificador diferencial cuya entrada no inversora recogía la señal del electrodo de succión, mientras que la entrada inversora estaba conectada al electrodo de referencia. El Ringer que baña a la médula se conectó --

eléctricamente a la "tierra principal", a través de un tercer electrodo. Todos los electrodos utilizados fueron de plata clorurada (Ag/AgCl_2).

Todos los registros se hicieron en DC (acolamiento directo) y las señales se pasaron a través de un filtro de 10 KHZ con el objeto de eliminar ruido de alta frecuencia.

Experimentalmente el DR-VRP se genera de la siguiente manera: el electrodo que succiona a la raíz dorsal se conecta a un estimulador a través de un interruptor de dos pasos, como se esquematiza en la figura 8. El mismo interruptor conecta simultaneamente al electrodo de la raíz ventral al amplificador diferencial del osciloscopio. El pulso de voltaje del estimulador se dispara con la ayuda de un generador de pulsos que sincroniza la salida del pulso estimulador con el barrido del osciloscopio. El VR-DRP se genera experimentalmente con el solo hecho de mover el interruptor a su otra posición, de esta manera la raíz ventral se conecta al estimulador y la raíz dorsal al amplificador.

4.3.1.2 Potencial de campo antidrómico.

Cuando se estimula la raíz ventral con un choque eléctrico se produce en cada axón de las motoneuronas un potencial de acción que se propaga hacia el soma de las células. Esta invasión antidrómica de las motoneuronas genera un potencial de campo compuesto. Así, en los experimentos se registró el potencial de campo antidrómico (AS) colocando la punta de un microelectrodo sobre el núcleo motor. La resistencia DC de estos microelectrodos fue del orden de 2 a 5 megohms. Una característica importante de éstos, fue que se llenaron con solución Ringer de la misma composición con la que se perfunde a la médula.

El potencial de campo antidrómico se registró con respecto a un electrodo de referencia que conectó a tierra el líquido de perfusión. Ambos electrodos se conectaron a un

amplificador de alta impedancia de entrada (WPI, KS700).

Como se sabe, la morfología del campo antidrómico registrado en el núcleo motor consiste de una onda trifásica (positivo-negativo-positivo), si la punta del microelectrodo se encuentra en los somas neuronales (Fatt, 1957; Araki y Terzuolo, 1962) ó bifásica (negativo-positivo) si el campo se registra sobre las dendritas (Araki y Terzuolo, 1962).

4.4 Soluciones fisiológicas.

Los reactivos usados para preparar las soluciones fueron analíticos y de la mayor pureza que se encuentra en el mercado. Por otra parte, todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

4.4.1 Solución Ringer normal.

La composición del Ringer normal fue la siguiente (mM): NaCl, 114; KCl, 2; CaCl₂, 2; Hepes-Na (amortiguador), 10; glucosa 5.5. El Ringer se preparó a partir de soluciones madre (1 M) de cada componente. La concentración final se obtuvo adicionando el volumen adecuado de cada solución madre. Posteriormente el Ringer se oxigenó durante 15 minutos con una mezcla de oxígeno (95%) y CO₂ (5%), para ajustar su pH a un valor final de 7.2.

4.4.2 Modificaciones en la composición del Ringer normal.

Las modificaciones en la composición del Ringer normal consistieron en substituir al Ca⁺⁺ por una concentración equimolar de Co⁺⁺ (Ringer cobalto) ó de Mn⁺⁺ (Ringer manganeso). La adición de Co⁺⁺ (ó Mn⁺⁺) al Ringer se hizo después de haber ajustado el pH final. Los demás componentes del Ringer permanecieron constantes.

4.5 Modificación en la temperatura del baño de perfusión.

Los experimentos en donde se estudió el efecto de la temperatura sobre los potenciales de raíz se hicieron con la ayuda de cuatro elementos Peltier conectados en serie. La superficie fría de dichos elementos se adhirió al piso de un recipiente en donde se encontraba parcialmente inmersa la cámara de perfusión. De esta manera era posible cambiar y fijar la temperatura de la cámara de perfusión. La rapidez del sistema de enfriamiento era tal que una disminución en la temperatura de 16 a 3°C ocurría en un tiempo de 30 minutos. La temperatura de dicha cámara se registró continuamente con un termistor digital ($\pm .1^{\circ}\text{C}$).

5. RESULTADOS.

5.1. Potenciales de raíz cuando la médula espinal es perfundida con solución Ringer normal.

5.1.1 Potencial de raíz ventral producido por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal ipsilateral homosegmentaria (DR-VRP).

Quando se aplica un estímulo de intensidad supramáxima a una raíz dorsal y se registra la actividad eléctrica resultante en la raíz ventral ipsilateral homosegmentaria, se obtienen una serie de cambios de potencial que en su conjunto se denominan como el potencial de raíz ventral. Como ya dejamos apuntado en párrafos anteriores, el DR-VRP se distingue por tener dos componentes fácilmente identificables. El primero de ellos es una espiga superpuesta al otro componente el cual tiene un curso temporal más lento (figura 9a).

En nuestros experimentos, la espiga monosináptica medida de la línea isoeléctrica al pico, tuvo una amplitud de hasta 10 mV. Recordemos que la amplitud de los potenciales es función de la Ree (figura 7) y del número de elementos neuronales activados. Por otra parte, la duración de la espiga fué de 5 mseg. a 16°C, contrastando con la duración del componente lento cuya duración es del orden de segundos (1 a 5 seg). En este último componente puede apreciarse la presencia de fluctuaciones algunas de las cuales ostentan un carácter "todo o nada" y que corresponden en su mayoría al disparo asíncrono de potenciales de acción en las motoneuronas.

Quando se aumenta la velocidad de barrido del osciloscopio se observa en detalle los componentes de corta latencia del DR-VRP (figura 9b). Inmediatamente después del artefacto del estímulo se registra un potencial trifásico (positivo-negativo-positivo) y en ocasiones bifásico (positivo-negativo)

que se ha interpretado como el registro, en la raíz ventral, del potencial de campo generado por los potenciales de acción que se conducen a lo largo de los segmentos intramedulares y las ramas terminales de las fibras aferentes. Después de este evento se observa un potencial despolarizante, que llamaremos "prepotencial" pues es previo a la rama ascendente de la espiga monosináptica. El prepotencial corresponde a la suma de los potenciales postsinápticos excitatorios que se generan en las dendritas y el soma de las motoneuronas, una fracción de los cuales corresponden a potenciales monosinápticos.

5.1.2 Potencial de raíz dorsal producido por la estimulación eléctrica de la raíz ventral ipsilateral homosegmentaria (VR-DRP).

Si se aplica un estímulo a la raíz ventral y se registra el cambio de potencial en la raíz dorsal ipsilateral homosegmentaria se obtiene el potencial de raíz dorsal. Como ya dejamos apuntado en la introducción, el VR-DRP presenta dos componentes cuando la médula es perfundida en Ringer normal a 16°C: un potencial despolarizante que surge inmediatamente después del artefacto del estímulo (figura 10b) y al cual designaremos con el nombre de VR-DRP I; y, un segundo componente que llamamos como potencial "tardío" del VR-DRP (figura 10a).

En nuestros experimentos, el componente "tardío", medido de la línea isoelectrica al pico tiene una amplitud de -- hasta 0.5 mV y su duración es del orden de unos 300 msec. a 16°C. La latencia del componente "tardío", medida como el -- lapso de tiempo entre el inicio del artefacto del estímulo y el inicio del potencial, es del orden de 20 msec. a 16°C.

Al aumentar la velocidad de barrido del osciloscopio -- puede distinguirse con mayor detalle el VR-DRP I (figura 10

b). El VR-DRP I tiene una latencia de 0.3 msec (16°C). Grinnell (1970) sugiere que este potencial corresponde al campo antidrómico generado por la invasión antidrómica de las motoneuronas.

En Ringer normal y a las temperaturas que utilizó Grinnell (1970) nunca fue posible observar un potencial de las características del llamado "early" VR-DRP.

5.2 Disociación entre los componentes de los potenciales de raíz mediados por transmisión sináptica química y eléctrica, respectivamente.

Actualmente está bien establecido el hecho de que los iones Co^{++} y Mn^{++} son dos potentes inhibidores de la transmisión sináptica química (Katz y Miledi, 1969b; Meiri y Rahamimoff, 1972; Weakly, 1973). El efecto de estos cationes se ejercen a nivel presináptico. Su acción consiste en bloquear la conductancia al Ca^{++} que se activa en las terminales durante el potencial de acción.

En la figura 11 se muestran los resultados de un experimento en el que se estudió el efecto de la substitución equimolar de los iones Ca^{++} por Co^{++} ó Mn^{++} , sobre los potenciales de raíz. Después de tomar los registros control del DR-VRP (figura 11a y 11b) y del VR-DRP (figura 11a₁ y 11b₁), la médula se perfundió con Ringer cobalto. En la médula hemiseccionada, los efectos de modificaciones en la composición del Ringer sobre los potenciales de raíz, se manifiestan después de los 5 minutos de iniciada la maniobra y se alcanza el efecto máximo a los 15 minutos.

Después de haberse iniciado la perfusión con Ringer cobalto se observa una reducción gradual de la espiga monosináptica y del componente lento del DR-VRP, hasta el bloqueo de ambos potenciales (figura 11c). Nótese sin embargo, que una fracción del "prepotencial del DR-VRP" persiste después

de la sustitución equimolar del Ca^{++} por el Co^{++} (figura -- 11c). A este potencial despolarizante resistente a la ausencia de Ca^{++} y a la presencia de Co^{++} ó Mn^{++} (figura 11e) se le denomina en el presente estudio como el DR-VRP eléctrico. Una característica de este potencial es que su curso temporal es similar al del componente eléctrico del PPE monosináptico (figura 19). Por otra parte, notese que la amplitud del potencial de campo bifásico no se modifica substancialmente cuando se substituye al Ca^{++} (figuras 11b y 11c). Este último hecho descarta la posibilidad de que la gradual reducción y posterior bloqueo de la espiga monosináptica y del componente lento del DR-VRP, se deban a que el Co^{++} altera el número de axones aferentes capaces de generar o propagar potenciales de acción.

Los efectos de la sustitución de Ca^{++} por Co^{++} sobre el VR-DRP, se reflejan en una gradual disminución y posterior bloqueo del potencial "tardío" del VR-DRP (figura 11c₁) ya que por otro lado, el VR-DRP I es resistente al Co^{++} (figura 11c₁) y al Mn^{++} (figura 11e₁).

Los efectos del Co^{++} son reversibles tanto para el DR-VRP (figura 11d) como para el VR-DRP (figura 11d₁). Similarmente, el Mn^{++} tiene los mismos efectos sobre los potenciales de raíz (figuras 11e, 11f, 11e₁ y 11f₁) y es tan potente como el Co^{++} para bloquear la transmisión sináptica química en la médula espinal aislada.

Los resultados anteriores sugieren que el DR-VRP eléctrico y el VR-DRP I no se originan por transmisión sináptica química entre algunas aferentes de raíz dorsal y motoneuronas. Es probable que ambos potenciales resulten de interacciones eléctricas.

5.3 Efecto de la temperatura sobre los potenciales de raíz resistentes a la ausencia de Ca^{++} y a la presencia de Co^{++} ó Mn^{++} en la solución de perfusión.

Actualmente está bien establecido el hecho de que la transmisión sináptica química es termosensible (Takeuchi, 1958). Por otro lado, experimentos realizados en diferentes especies animales han mostrado que los PPEs eléctricos son prácticamente insensibles a modificaciones en la temperatura (Nicholls y Purves, 1972; Shapovalov y col., 1978). Sin embargo, existen en la literatura resultados contradictorios en relación al efecto de la temperatura sobre la resistencia de acople de uniones comunicantes (Payton y col., 1969; Ramón y Zampighi, 1980). Con el objeto de probar el efecto de la temperatura sobre la transmisión sináptica eléctrica en una sinapsis central de vertebrado, se estudió el efecto de un descenso gradual de la temperatura sobre los potenciales de raíz resistentes al Co^{++} ó al Mn^{++} .

5.3.1 Efecto de la temperatura sobre el DR-VRP eléctrico.

En la figura 12 se muestran los resultados de un experimento en el que se estudió el efecto de la temperatura sobre el DR-VRP eléctrico. En la parte superior de la figura (fig. 12a) se muestran 3 registros obtenidos a diferentes temperaturas; en la parte inferior (fig. 12b) se muestra la gráfica de la amplitud (normalizada) de los DR-VRPs eléctricos, medida de la línea isoeléctrica al pico, en función de la temperatura. Las flechas sobre la gráfica indican el curso del experimento.

Partiendo de 5°C , un incremento en la temperatura hasta 17°C produce en el DR-VRP eléctrico, una disminución en su amplitud al pico (círculos). Un descenso subsecuente de la temperatura, de nuevo hasta 5°C , tiene el efecto de incrementar la amplitud de dicho potencial hasta un 100% con respecto a su amplitud a 17°C . A pesar de que hay histeresis duran

te el experimento, el efecto de la temperatura es reversible. Por otra parte, una disminución en la temperatura se refleja en el potencial de campo registrado en la raíz, como una disminución en su amplitud del 18% pero a su vez hay un incremento en su duración del 40%, ambos parámetros con respecto a los encontrados a 17°C.

5.3.2 Efecto de la temperatura sobre el VR-DRP I y el VR-DRP II

El efecto de la temperatura sobre los componentes del VR-DRP presenta rasgos más notables. Esto se ilustra en la figura 13. Cuando la temperatura se disminuye gradualmente de 13°C (control; figura 13a) a temperaturas menores de 10°C se observa la aparición de un potencial despolarizante, de relativamente corta latencia (5 mseg.), inmediatamente después del VR-DRP I (figura 13b). A este nuevo componente del VR-DRP que aparece cuando se disminuye la temperatura le designamos el "VR-DRP II". Dicho potencial aparece en Ringer normal (fig. 13b), es altamente termosensible y persiste cuando la transmisión química ha sido bloqueada (fig. 13d). Además de estas características, el VR-DRP II presenta de un estímulo a otro de la misma intensidad, fluctuaciones aleatorias en su amplitud. Este último comportamiento contrasta con el VR-DRP I, cuya amplitud no fluctúa de estímulo a estímulo. Por otra parte, en el contorno del VR-DRP II es posible detectar potenciales de carácter unitario (todo o nada) (flechas en la figura 13d). Finalmente observese que el VR-DRP "tardío" disminuye en su amplitud e incrementa su latencia cuando se disminuye la temperatura.

Con estos antecedentes se estudió sistemáticamente el efecto que tienen los cambios en la temperatura sobre los potenciales de campo antidrómico, el VR-DRP I y el VR-DRP II, todos registrados simultáneamente. Los resultados se --

ilustran en la figura 14a. Obsérvese que la amplitud al pico del potencial de campo antidrómico, registrado en el núcleo motor, coincide temporalmente con el pico del VR-DRP I pero nunca se observó un segundo potencial de campo asociado al VR-DRP II. En este experimento se observa que de 16 a 6°C hay un incremento gradual en la amplitud y en la duración del potencial de campo antidrómico. A los 9°C se insinúa el VR-DRP II el cual aparece claramente como un cúmulo de eventos unitarios a los 8 y 7°C. Conforme se continúa disminuyendo la temperatura, la amplitud del potencial de campo junto con la del VR-DRP II continúan incrementándose. En este rango de temperaturas (menores de 10°C) no hay cambios aparentes en la amplitud del VR-DRP I, pero sí en su duración la cual se incrementa al disminuir la temperatura.

Los resultados anteriores son reproducibles y se muestran en forma gráfica, de otro experimento, en la figura 14b, en la cual las amplitudes al pico normalizadas de los tres potenciales se grafican en contra de la temperatura. Nótese que en el rango de 15 a 3°C hay un incremento gradual en la amplitud del potencial de campo antidrómico (cuadros, fig. 14b). Este resultado es opuesto al de Grinnell (1966) - pues este autor encuentra que la invasión antidrómica decae a temperaturas menores de 10°C. En el intervalo de 9 a 11°C se produce la activación del VR-DRP II (círculos llenos, figura 14b), alcanzando su máxima amplitud a los 3°C. Si la médula se mantiene a esta temperatura durante un lapso de tiempo relativamente largo, los tres potenciales aquí estudiados decaen hasta bloquearse y el efecto es irreversible. Por otra parte, nótese que hay una aparente saturación en la amplitud del VR-DRP I (triángulos, fig. 14b) a temperaturas menores de 10°C, contrastando con el comportamiento del VR-DRP II.

El efecto de la temperatura sobre el VR-DRP II es reversible en el rango de temperaturas explorado. El comportamiento

to del VR-DRP II es similar ya sea en Ringer normal que en Ringer cobalto ó Ringer manganeso (figura 15).

5.4 Otras propiedades del VR-DRP I y del VR-DRP II. Facilitación del VR-DRP II.

Cuando en la raíz ventral se dan dos estímulos de intensidad supramáxima a diferentes intervalos de tiempo, se encuentra que el VR-DRP II, a diferencia del VR-DRP I, se facilita. Esta propiedad se ilustra, a tres escalas de tiempo, en la figura 16 (el VR-DRP II está señalado por los círculos vacíos). El curso temporal de la facilitación del VR-DRP II se muestra en la gráfica de la figura 17. En ella se grafican las amplitudes al pico normalizadas del VR-DRP I, del VR-DRP II y del potencial de campo antidrómico, correspondientes a los registros de la figura 16, contra el intervalo de tiempo entre el estímulo condicionante y el de prueba. Nótese que a intervalos menores de 20 mseg. hay oclusión de los tres potenciales. En el caso del VR-DRP II, la oclusión desaparece a los 30 mseg. y es seguida, a intervalos mayores, por facilitación la cual alcanza su máximo entre los 50 y 60 mseg.. Esta facilitación dura hasta 200 mseg.. En contraste, ni el VR-DRP I, ni el potencial de campo antidrómico, se facilitan en los mismos intervalos de tiempo. Esto sugiere que la facilitación del VR-DRP II no se debe a facilitación de la invasión antidrómica de las motoneuronas.

5.5 Efecto del tetractilamonio (TEA) sobre los potenciales de raíz dorsal resistentes a la ausencia de Ca^{++} y presencia de Co^{++} ó Mn^{++} .

En ninguno de los experimentos que se hicieron en el presente trabajo se observó la aparición del VR-DRP II a --

temperaturas mayores de 10°C. La aparición del VR-DRP II al aumentar la temperatura disminuye al disminuir la temperatura así como su sensibilidad a cambios de temperatura. En la misma puede deberse a efectos sobre la amplitud y la duración del potencial de acción antidrómico. Tales efectos consistirían en incrementar los anteriores parámetros del potencial de acción. De acuerdo a lo anterior, entonces la activación del VR-DRP II depende probablemente del grado de invasión antidrómica del árbol dendrítico de las motoneuronas. Si esto es cierto, se esperaría que cualquier agente farmacológico que incremente la amplitud y la duración del potencial de acción, tenga un efecto que mimetice la acción de la disminución en la temperatura por abajo de los 10°C.

Para probar la idea anterior, se hizo un experimento en el cual la médula se perfundió en Ringer cobalto a 16°C, conteniendo 5 mM de bromuro de TEA. Sabemos que el TEA produce un incremento en la amplitud y en la duración del potencial de acción como consecuencia del bloqueo de la conductancia transmembranal tardía de K^+ (Armstrong, 1969).

La figura 18 resume los resultados obtenidos en este experimento. El trazo superior de cada par de registros corresponde al potencial de campo antidrómico, mientras que el inferior, corresponde al registro del potencial de raíz dorsal en presencia de Co^{++} . La figura 18a muestra los registros control a 4°C. En ellos se observa claramente la presencia del VR-DRP II. Cuando se incrementa la temperatura hasta 16°C ocurre una disminución en la amplitud y duración del campo y del VR-DRP I así como la desaparición del VR-DRP II (fig. 18b). La adición de TEA a esta temperatura produce un incremento en la amplitud y la duración del campo antidrómico, tanto en el pico negativo como en la positividad que sigue a dicho pico. Este fenómeno se acompaña de la aparición de un potencial despolarizante que se asemeja al VR-DRP II (fig. 18c). Estos resultados sugieren que la despolarización antidrómica dendrítica de las motoneuronas es indispensable para generar dicho potencial.

6. DISCUSION.

Cabé preguntarse de antemano si la médula espinal aislada y hemiseccionada refleja fielmente su fisiología como si se encontrase in situ. Aunque no hay una respuesta absoluta a esta pregunta podemos ofrecer una observación importante que responde a esta interrogante. Dicha observación consistió en que los potenciales de raíz que se registraron en Ringer normal (el DR-VRP y el VR-DRP tardío) son idénticos a los reportados por otros autores utilizando la médula espinal aislada (Czéh, 1972; Eccles y Malcom, 1946; Grimnell, 1966) ó in situ (Barron y Mathews, 1938a; Lloyd, 1943). Lo anterior sugiere que la preparación aquí utilizada es un modelo experimental confiable para el estudio de algunos aspectos de la fisiología espinal. Partiendo de esta premisa, podemos ahora discutir el resto de nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren la existencia de acople eléctrico antidrómico entre algunas fibras aferentes de raíz dorsal y motoneuronas. Cuando nos referimos al acople eléctrico implícitamente se acepta que éste resulta del flujo de corriente eléctrica via uniones comunicantes. Es muy probable que las uniones comunicantes que permiten el acople eléctrico antidrómico son las mismas que permiten el acople ortodrómico entre fibras aferentes Ia y motoneuronas (Alvarez-Leeffmans y col., 1979; Shapovalov y col., 1978).

6.1 Identificación de los componentes del DR-VRP y del VR-DRP mediados por interacciones eléctricas: efecto de la substitución de Ca^{++} por Co^{++} ó Mn^{++} .

Quando se perfundió a la médula espinal con Ringer cobalto ó Ringer manganeso, se encontró que tanto la espiga -

monosináptica como el componente lento del DR-VRP, se abolieron. Este resultado se explica porque, bajo estas condiciones, el cobalto y el manganeso inhiben la liberación del neuro---transmisor en las terminales sinápticas. Estos resultados a confirman la hipótesis de que ambos componentes del DR-VRP - se originan por transmisión sináptica química.

Por otra parte, la existencia de un componente del po---tencial de raíz dorsal resistente a la ausencia de Ca^{++} y a la presencia de Co^{++} ó Mn^{++} en el Ringer, va de acuerdo con la interpretación de que dicho componente refleja el acople eléctrico ortodrómico entre fibras Ia y motoneuronas. Una oboservación que apoya esta hipótesis es la semejanza en latenocia y curso temporal entre el DR-VRP eléctrico y el PPE elécotrico registrado intracelularmente en una motoneurona (figuora 19). En este sentido, los datos sugieren que el DR-VRP --o eléctrico constituye la suma de los PPE eléctricos que se geoneran en las dendritas de las motoneuronas y que se propagan decrementalmente hacia la raíz ventral.

En lo que toca al VR-DRP, los resultados obtenidos muesotran que el componente tardío de este potencial se abolió --o cuando la médula espinal fue perfundida con Ringer Co^{++} ó Mn^{++} . Este hallazgo apoya la hipótesis de que el VR-DRP tarodío se genera a consecuencia de la activación de una cadena de sinapsis químicas.

En contraste con el VR-DRP tardío, el VR-DRP I y el VR-DRP II fueron resistentes al Co^{++} y al Mn^{++} . Este resultado descarta la posibilidad de que ambos potenciales se originen por transmisión sináptica química. Sin embargo, con solo este dato, no podemos afirmar si dichos potenciales se origi---nan por algún tipo de interacción eléctrica.

6.2 Interpretación de los efectos de la temperatura sobre - los potenciales de raíz debidos a interacciones eléctricas.

Los experimentos en donde se estudió el efecto de la temperatura sobre la amplitud del DR-VRP eléctrico mostraron un continuo aumento en la amplitud de este potencial, conforme se disminuía la temperatura. Este resultado también descarta la posibilidad de que el DR-VRP eléctrico se deba a transmisión química.

El aumento en la amplitud del DR-VRP eléctrico cuando se disminuye la temperatura puede interpretarse si suponemos que este efecto es el resultado final de una serie de eventos potenciados por el descenso de la temperatura. El primero de ellos sería el aumento en la duración del potencial de acción presináptico. Aunque los experimentos no constituyen una evidencia directa de que ocurra lo anterior el incremento en la amplitud y en la duración del potencial de campo ortodrómico sugiere que este es el caso. El aumento en la duración del potencial de acción produciría un incremento en la duración de la corriente despolarizante que acompaña a la onda de excitación. Esto a su vez favorecería la propagación del impulso nervioso en los puntos de bifurcación de las fibras Ia, pues se sabe que dichos segmentos del axón son regiones de bajo factor de seguridad (Hatt y Smith, 1976; Westerfield y col., 1978). Como consecuencia de lo anterior, es muy probable que al bajar la temperatura se produzca un incremento en el número de terminales sinápticas invadidas por el impulso presináptico provocando así un incremento en la amplitud del DR-VRP eléctrico.

Con respecto a los experimentos en donde se estudió el efecto de la temperatura sobre el VR-DRP, estos revelaron la aparición de un tercer componente del VR-DRP (el VR-DRP II). El comportamiento de este componente resistente al Cobalto o al manganeso, con los cambios en la temperatura su-

gieren que no se debe a transmisión química.

El efecto de la temperatura sobre el VR-DRP II puede explicarse si suponemos que dicho potencial se genera por un acople eléctrico entre las dendritas distales de las motoneuronas y algunas fibras aferentes (figura 20) y que un incremento gradual (dependiente de la temperatura) en la despolarización antidrómica de la membrana somatodendrítica de las motoneuronas explica la sensibilidad a la temperatura del VR-DRP II.

Antes de explicar en detalle el efecto de la temperatura sobre el VR-DRP II es necesario recordar algunos de los efectos de la temperatura que tiene sobre las propiedades activas y pasivas de las membranas excitables. Por un lado, Hodgkin y Katz (1949), trabajando en el axón gigante de calamar, encontraron un incremento en la amplitud y en la duración del potencial de acción cuando se disminuyó la temperatura hasta los 5°C. Un efecto similar ha sido descrito en las motoneuronas de gato (Klee y col., 1979) y probablemente lo mismo sucede en las motoneurona de rana a juzgar por el incremento gradual en la amplitud y en la duración del potencial de campo antidrómico cuando se modifica la temperatura del líquido de perfusión de 15 a 3°C (figura 14). En relación al efecto de la temperatura sobre las propiedades pasivas de la membrana, podemos citar experimentos hechos en la motoneurona de gato y en la fibra muscular de anfibio. En ambas preparaciones el efecto de disminuir la temperatura se manifiesta como un incremento en la resistencia de entrada de la célula (Klee y col., 1979; Del Castillo y Machne, 1953). Tal incremento en la resistencia de entrada muy probablemente es consecuencia de un incremento en la resistencia específica de la membrana (R_m) (Del Castillo y Machne, 1953). Ahora bien, dado que la constante de espacio se define como: $\lambda = (R_m/R_T)^{1/2}$, donde R_m ya fue definida y R_T es la resistencia específica del citoplasma, si se

incrementa R_m también lo hará la constante de espacio por lo que cualquier potencial, sea electrotonico ó activo, se propagará a mayores distancias de su sitio de origen.

Con estos datos podemos ahora explicar la sensibilidad del VR-DRP II a la temperatura. A temperaturas mayores de 11°C , digamos a 16°C , solo el soma de las motoneuronas y las dendritas proximales son invadidas (figura 20a), y por tanto despolarizados por el potencial de acción antidrómico; conforme se disminuye la temperatura, por ejemplo a 11°C , se produce una mayor invasión y despolarización dendrítica la que provoca una mayor invasión y despolarización dendrítica la que a su vez produce un mayor flujo de corriente axial a través de algunas sinapsis eléctricas (figura 20b). Conforme se baja más la temperatura ahora la despolarización alcanza un mayor número de dendritas distales (fig. 20c) haciendo cada vez más evidente el acople eléctrico axodendrítico que normalmente existe entre fibras Ia y motoneuronas. Aunque nuestros resultados no dan evidencia directa de un incremento en la despolarización dendrítica distal de las motoneuronas, el incremento en la amplitud y duración de la positividad que sigue al pico negativo del potencial de campo antidrómico, cuando se baja la temperatura a menos de 11°C (fig. 14a, 6°C) ó bien a temperaturas mayores de 11°C pero en presencia de TEA (fig. 18c) sugiere que este es el caso. Recordemos que esta onda positiva refleja la densidad de corriente saliente despolarizante de las dendritas (Araki y Terzuolo, 1962; Lloyd, 1959).

Con respecto al VR-DRP I se encontró que su amplitud también se incrementa al bajar la temperatura hasta los 11°C , aproximadamente. Sin embargo, a menores temperaturas el VR-DRP I muestra una aparente saturación en su amplitud (figura 14b).

Como ya hemos mencionado, Grinnell (1970) ha postulado que el VR-DRP I es el registro en la raíz dorsal del poten--

cial de campo antidrómico generado en el núcleo motor. Sin embargo, esta hipótesis que parece explicar la resistencia del VR-DRP I al Co^{++} ó al Mn^{++} , no es consistente con el fenómeno de saturación encontrado en el presente trabajo, pues en el rango de temperaturas aquí utilizadas (17 a 3°C) el potencial de campo antidrómico siempre incrementó su amplitud y su duración. En este sentido, una interpretación alternativa acerca del origen del VR-DRP I es que este componente refleja el acople eléctrico entre un número pequeño de terminales Ia que hacen sinapsis con las dendritas primarias y el soma de las motoneuronas (fig. 20). Hay evidencias anatómicas que apoyan la ubicación espacial de este tipo de contactos sinápticos (Motorina y col., 1982; Székely, 1976) en la médula espinal de los anuros. Esta última hipótesis explicaría el fenómeno de saturación así como otras propiedades del VR-DRP I a las cuales nos referiremos más adelante.

6.3 Interpretación del fenómeno de facilitación del VR-DRP II, así como la ausencia de facilitación en el VR-DRP I.

La amplitud tanto del VR-DRP I como del VR-DRP II, es función de la intensidad del estímulo aplicado a la raíz ventral, hasta que ambos componentes del VR-DRP alcanzan su amplitud máxima, siendo el VR-DRP I el que se satura primero. Por otra parte, cuando se aplican dos estímulos de intensidad supramáxima a ciertos intervalos de tiempo, se encuentra que el VR-DRP II se facilita. Uno podría pensar que dicha facilitación se deba al reclutamiento, por el segundo estímulo, de más elementos neuronales (motoneuronas y/o fibras aferentes), sin embargo, esto no es posible ya que la intensidad de los estímulos fue supramáxima y por otro lado el potencial de campo antidrómico tampoco presentó facilita

ción. Creemos que este fenómeno esta de alguna manera reflejando las propiedades eléctricas de la membrana de la motoneurona. En este sentido, la facilitación del VR-DRP II probablemente es consecuencia de la despolarización residual de la membrana dendrítica que provoca el primer estímulo de tal manera que el segundo produce una despolarización más intensa y de mayor amplitud espacial. La despolarización residual se debe a que la membrana disipa la carga que inyecta el potencial de acción antidrómico con cierta constante de tiempo. En este sentido, no es casual que los intervalos de tiempo en los cuales se inicia y se alcanza la máxima facilitación (30 a 50 mseg., respectivamente) coincidan con el valor promedio de la constante de tiempo de la membrana de la motoneurona (Magherini y col., 1976a).

Por otra parte, la ausencia de facilitación del VR-DRP I parece ser compatible con la hipótesis de que este potencial se origina en un número pequeño de sinapsis eléctricas ubicadas en el soma y dendritas proximales de las motoneuronas. Tal ubicación de estas sinapsis permitiría que todas siempre fuesen activadas por el potencial de acción antidrómico.

6.4 Mecanismos a través de los cuales se origina el VR-DRP I y el VR-DRP II.

Hasta ahora hemos afirmado que el VR-DRP II se origina por transmisión sináptica eléctrica. Sin embargo, la resistencia del VR-DRP II a la substitución de Ca^{++} por Co^{++} ó Mn^{++} , no descarta la posibilidad de que este potencial, al igual que el VR-DRP I, se origine por transmisión efáptica.

El termino transmisión efáptica se refiere a la situación en la cual se altera la excitabilidad de una neurona por las corrientes extracelulares producidas por la generación de potenciales de acción en la ó las neuronas adyacen

tes. Este mecanismo no involucra, a diferencia de la transmisión sináptica eléctrica, alguna especialización en la estructura y composición de las membranas de las neuronas que establecen la interacción efáptica.

Así, uno puede sugerir que el VR-DRP II se origina por transmisión efáptica entre fibras aferentes primarias y dendritas de motoneuronas. Aunque nuestros resultados no excluyen esta posibilidad, se sabe que este tipo de interacción eléctrica no ocurre en las sinapsis Ia de gato (Redman, 1979), y no es aventurado suponer que la misma situación también ocurra en las sinapsis Ia de rana. Particularmente, Redman (1979) ha calculado que en las sinapsis Ia de gato, el potencial de acción presináptico inyecta al espacio extracelular una corriente de 90×10^{-9} A., la cual es mucho menor que la corriente sináptica que genera el Ia-PPE. Si trasladamos esta situación a la sinapsis Ia de rana y nos referimos, ahora por analogía, al flujo de corriente desde la motoneurona a la fibra Ia, podemos cualitativamente concluir que es muy poco probable que se establezca una interacción efáptica pues para ello se requiere un cambio de potencial de 100 mV en la membrana de las dendritas, lo cual, es casi imposible si reconocemos que el potencial de acción antidrómico de las motoneuronas no invade activamente toda la membrana dendrítica. Mas aún, si así ocurriese, la inyección de corriente en la terminal Ia sería tan pequeña como para llevar al potencial de membrana a su valor umbral y provocar potenciales de acción como parece ocurrir.

Por todo lo anterior, nosotros reafirmamos que el VR-DRP II se origina por transmisión sináptica eléctrica entre algunas fibras aferentes de raíz dorsal y dendritas distales de motoneuronas. La presencia en la substancia intermedia (lugar en donde termina la mayoría de las terminales Ia y las dendritas distales del plexo dorsal) de uniones comunicantes en sinapsis axodendríticas (Sotelo y Grofova, 19--

76) y el hecho de que exista acople eléctrico ortodrómico (Alvarez-Leefmans y col., 1979; Shapovalov y col., 1978) -- son evidencias que apoyan fuertemente la hipótesis anterior.

Por otra parte, la ubicación espacial de los contactos sinápticos donde probablemente se genera el VR-DRP II permite explicar varias de sus propiedades, como: su amplitud fluctuante cuando se estimula sucesivamente la raíz ventral a frecuencias relativamente pequeñas; su sensibilidad a la temperatura; y, la facilitación que presenta cuando se dan pares de estímulos a la misma raíz ventral. Finalmente, retomando el hecho de que como parte integrante del VR-DRP II se encuentran los eventos unitarios todo o nada, sugerimos que dicho potencial representa la suma en la raíz dorsal de potenciales de acción generados en aquellas fibras aferentes que han sido activadas desde las motoneuronas a través del acople eléctrico antidrómico.

Con respecto al origen del VR-DRP I nosotros sugerimos que este potencial se origina por transmisión sináptica eléctrica entre un número pequeño de aferentes que hacen sinapsis con las dendritas primarias y el soma de las motoneuronas. Además de la evidencia anatómica que tiende a apoyar la ubicación de estas sinapsis (Motorina y col., 1982; Székely, 1976) (aunque a este nivel de la sustancia gris, no se han reportado uniones comunicantes), su localización permitiría explicar algunas propiedades del VR-DRP I, como: 1) la presencia de este potencial a cualquier temperatura; 2) la ausencia de fluctuaciones en su amplitud; 3) la saturación tanto con la temperatura como con aquellas intensidades de estimulación a las cuales el VR-DRP II aún no alcanza su máxima amplitud; 4) la ausencia de facilitación. Las anteriores propiedades serían consecuencia de que las sinapsis que generan dicho potencial son siempre invadidas por el potencial de acción antidrómico. Sin embargo, la coinci-

dencia temporal del potencial de campo antidrómico con el VR-DRP I y el hecho de que ambos potenciales no se faciliten parecen ser inconsistentes con nuestra hipótesis. En este sentido consideramos que es necesario estudiar con mayor detalle las propiedades del VR-DRP I y su relación con el potencial de campo antidrómico para poder ofrecer una hipótesis más plausible acerca de su mecanismo de generación.

6.5 Significado biológico de la comunicación intercelular de naturaleza eléctrica en la médula espinal de los anfibios.

El papel que juegan las uniones comunicantes en la fisiología de las células que establecen este tipo de contactos, ha sido amplia y detalladamente discutido en varias revisiones (Alvarez-Leefmans, 1982; Bennett, 1972; 1977; Cox, 1974; Loewenstein, 1981; Pitts, 1969; Sotelo y Korn, 1978), por lo que no es objetivo de esta sección de la discusión recopilar todas las posibles funciones en que están involucradas las uniones comunicantes. Por el contrario, discutiremos brevemente el posible significado del acople eléctrico en la sinapsis Ia y consecuentemente su papel en la fisiología de la médula espinal.

En relación al efecto de la temperatura sobre la transmisión sináptica eléctrica, en la presente tesis hemos encontrado que todos los potenciales de raíz de origen sináptico eléctrico se potencian cuando se produce un descenso en esta variable. El fenómeno de potenciación probablemente no resulta de un efecto directo de la temperatura sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes sino más bien de un efecto sobre las propiedades eléctricas pasivas y activas de las membranas adyacentes a dichas uniones. En otras palabras, un descenso gradual de la temperatura probablemente no modifica la permeabilidad de las uniones comunicantes

pero si favorecen indirectamente la transmisión sináptica eléctrica. Este hecho puede ser relevante para la fisiología de la médula espinal pues le confiere al organismo mecanismos adaptativos importantes. Por ejemplo, se ha observado que los anfibios mantienen a 0°C un tono muscular similar al que presentan a temperaturas mayores de 10°C (Mellanby, 1940). De hecho es una observación muy familiar la rápida recuperación de la actividad motora cuando una rana se extrae del refrigerador después de estar en él varios días. Las anteriores condiciones experimentales no están lejos de ser las ecológicas pues como sabemos, los anfibios son fundamentalmente de hábitos nocturnos y además la temperatura ambiente nocturna, en un clima templado, llega a ser hasta de 5°C. En este sentido, para un animal ectotermo, resulta importante mantener una postura estática y dinámica que le permita realizar todas sus actividades incluyendo conductas de escape.

Otro aspecto importante de la transmisión eléctrica en la sinapsis Ia de anfibios es el relacionado con el posible significado funcional del acople eléctrico antidrómico. En este sentido, se podría argumentar que el VR-DRP II es resultado de una maniobra experimental, sin embargo, nosotros consideramos que es muy probable que el acople eléctrico antidrómico puede jugar un papel en la modulación del flujo de la información desde las fibras Ia hacia las motoneuronas. Supongamos que las motoneuronas se activan por cualquier vía neuronal que convergen en ellas, incluyendo las fibras Ia. A pesar de que los potenciales de acción se generan en el segmento inicial y que se propagan activamente a lo largo del axón motor, es muy probable que estos mismos potenciales de acción se propagan decrementalmente hacia las dendritas distales. Esta despolarización electrotonica de las dendritas pasaría vía uniones comunicantes a las fibras Ia. Resultado final de estos eventos es que probable--

mente el acople eléctrico antidrómico module la liberación de neurotransmisor en las terminales sinápticas Ia dependiendo del grado de despolarización antidrómica.

Quizá un papel más plausible de las uniones comunicantes es su participación en el fenómeno de cooperación metabólica. Esto es que, las uniones comunicantes permiten el paso de iones, nucleótidos, aminoácidos, monosacáridos y otras moléculas con peso molecular no mayor de los 2500 daltones (Loewenstein, 1981). La cooperación metabólica se descubrió primero en cultivo de fibroblastos en los cuales se produjo una mutación de tal manera que estos no podían incorporar hipoxantina- H^3 exógena en sus ácidos nucleicos. Cuando los mutantes se pusieron en contacto con fibroblastos normales, se produjo incorporación de este metabolito en ambos tipos celulares. Estos resultados se han interpretado en el sentido de que los fibroblastos normales "donan" el metabolito vía uniones comunicantes a los fibroblastos mutantes (Subak-Sharpe y col., 1969; Cox, 1974). Por otro lado Sotelo (1976) ha encontrado que después de hacer axotomía del nervio vestibular de rana, es posible encontrar después de 7 días, algunas terminales vestibulares intactas haciendo sinapsis con sus células blanco. El hecho sobresaliente es que todas estas sinapsis "sobrevivientes", presentan uniones comunicantes. La interpretación de estos resultados es que en estas terminales el proceso degenerativo provocado por la axotomía se ha retardado probablemente debido al acople metabólico entre las terminales vestibulares y neuronas vestibulares centrales (Sotelo, 1976).

Una interacción de tipo cooperación metabólica entre fibras Ia y motoneuronas puede ser de importancia para mantener la integridad del circuito que media el reflejo monosináptico, ante situaciones donde ocurran procesos degenerativos. Experimentos recientes en donde se hace axotomía de la raíz dorsal (Blazquez, 1983) han mostrado que bajo estas

condiciones persisten durante más tiempo los componentes eléctricos del DR-VRP y del VR-DRP, con respecto a los componentes químicos de estos mismos potenciales de raíz, sugiriendo la existencia de cooperación metabólica entre estos elementos neuronales.

Finalmente, recordemos que hay evidencias tanto anatómicas como electrofisiológicas que apoyan la hipótesis de que en la médula espinal de los anfibios, la sinapsis Ia es mixta (química y eléctrica), sin embargo, desconocemos cual es la forma en que interactúan ambos mecanismos de transmisión. Shapovalov (1980) ha discutido algunas implicaciones funcionales acerca de la coexistencia de los dos tipos de transmisión pero aún queda mucho por estudiar.

En relación a la filogenia del mecanismo de transmisión sináptica en la sinapsis Ia, es probable que en los reptiles la transmisión también es mixta (Waxman, 1979). Desconocemos totalmente qué es lo que sucede en las aves. Por otra parte, recientemente se ha demostrado, y parece estar resuelta la controversia, de que en la médula espinal de gato, el mecanismo de transmisión sináptica en la sinapsis Ia es solamente químico (Finkel y Redman, 1983). Lo anterior sugiere que, evolutivamente, en la sinapsis Ia de los ectotermos ha persistido un mecanismo de transmisión sináptica químico y eléctrico.

7.- CONCLUSIONES.

1.- Los resultados del presente trabajo confirman que la transmisión sináptica entre fibras aferentes primarias y motoneuronas presenta un componente eléctrico cuyo substrato morfológico está constituido probablemente por las uniones comunicantes que se encuentran en la sustancia gris intermedia de la médula espinal. Asimismo, nuestros hallazgos sugieren que dichas uniones conducen la corriente de manera bidireccional aunque por razones técnicas no es posible conocer el grado de linealidad de dicha bidireccionalidad.

2.- El DR-VRP eléctrico representa la suma de varios PPE eléctricos generados en motoneuronas individuales a través del acople eléctrico ortodrómico con las fibras Ia.

3.- El efecto de la temperatura sobre la aparición y subsecuente incremento en la amplitud del VR-DRP II se debe probablemente a un aumento en la integral de la corriente saliente despolarizante dendrítica.

4.- Los resultados obtenidos con el VR-DRP I no son concluyentes para afirmar que este potencial se origina por un mecanismo de acople eléctrico ó solamente es la propagación hacia la raíz dorsal del potencial de campo antidrómico que invade a las motoneuronas.

5.- El efecto de la temperatura sobre la transmisión eléctrica entre fibras aferentes y motoneuronas se debe a cambios en las propiedades eléctricas pasivas y activas de las membranas adyacentes a las uniones comunicantes más que a cambios en la conductancia de éstas. Sin embargo, el efecto directo de la temperatura sobre las uniones comunicantes no debe descartarse.

6.- Se discute el probable significado del acople eléctrico entre fibras aferentes y motoneuronas en la médula espinal de los anfibios y otros vertebrados. En este sentido, la cooperación metabólica entre estas células puede

ser la función más importante de las uniones comunicantes. Sin embargo, no se puede descartar un posible papel en el -- control de la información aferente que converge en las motoneuronas.

8.- BIBLIOGRAFIA.

Alvarez-Leefmans, F. J., De Santis, A. and Miledi, R. (1978). Possible electrotonic coupling between dorsal root afferents and frog spinal motoneurons. *J. Physiol.* 285, 63 P.

Alvarez-Leefmans, F. J., De Santis, A. and Miledi, R. (1979). Effects of some divalent cations on synaptic transmission in the frog spinal neurones. *J. Physiol.* 294, 387-406.

Alvarez-Leefmans, F. J., Rink, T. J. and Tsien, R. Y. (1981). Free calcium ions in neurones of Helix aspersa measured with ion-selective-microelectrodes. *J. Physiol.* 315, 531-548.

Alvarez-Leefmans, F. J. Algunos problemas involucrados en la determinación del mecanismo de transmisión sináptica entre fibras aferentes primarias y motoneuronas en los vertebrados. En: Libro homenaje por los XXV años de labor académica y formativa del maestro Dr. Hector Brust Carmona. UNAM. Fac. de Medicina. pp. 107-182. México, 1982.

Araki, T., Otani, T. and Furukawa, T. (1953). The electrical activities of single motoneurons in toad's spinal cord, recorded with intracellular electrode. *Jap. J. Physiol.* 3, 254-267.

Araki, T. and Terzuolo, C. A. (1962). Membrane currents in spinal motoneurons associated with action potential and synaptic activity. *J. Neurophysiol.* 25, 772-789.

Armstrong, C. M. (1969). Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J. Gen. Physiol.* 54, 553-575.

Barron, D. H. and Mathews, B. H. C. (1938a). The interpretation of potential changes in the spinal cord. *J. Physiol.* 92, 276-321.

- Bennett, M. V. L. A comparison of electrically and chemically mediated transmission. In: Structure and Function of Synapses. (ed: Pappas, G. D. & Purpura, D. P.). 221-256. (1972).
- Bennett, M. V. L. Electrical transmission: a functional analysis and comparison to chemical-transmission. In: Cellular Biology of Neurons. (Handbook of Physiology. The Nervous System) (ed.: Kandel, E. R.), p. 357-416, vol. 1. (1977).
- Blasquez, N. (1984). Efecto de la sección del nervio ciático de la raíz dorsal 9, sobre los potenciales radiculares generados a través de sinapsis químicas y eléctricas en la médula espinal de la rana. Tesis de Maestría. Depto. de Fisiología y Biofísica. CINVESTAV del IPN. México.
- Brigant, J. L. and Mallart, A. (1982). Presynaptic currents in mouse motor endings. J. Physiol. 333, 619-636.
- Brookhart, J. L. and Fadiga, E. (1960). Potential fields initiated during monosynaptic activation of frog motoneurons. J. Physiol. 150, 633-655.
- Ceccarelli, B. and Hurlbut, W. P. (1980). Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. Physiol. Rev. 60, 396-441.
- Coombs, J. S., Eccles, J. C. and Fatt, P. (1955c). Excitatory synaptic action in motoneurons. J. Physiol. 130, 374-395.
- Cox, R. F., Krauss, M. R., Balis, M. E. and Dancis, J. (1974). Metabolic cooperation in cell culture: Studies of the mechanisms of cell interaction. J. Cell. Physiol. 84, 237.
- Cull-Candy, S. G. and Miledi, R. (1983). Block of glutamate activated synaptic channels by curare and gallamine. Proc. R. Soc. Lond. 218, 111-118.
- Czéh, G. (1977). Ventral root elicited depression of the dorsal root evoked response in frog motoneurons. Expl. Brain Res. 27, 441-449.
- Dambach, C. E. and Erulkar, S. D. (1973). The action of calcium at spinal neurones of the frog. J. Physiol. 228, 799-817.

- Del Castillo, J. and Machne, X. (1953). Effect of temperature on the passive electrical properties of the muscle fibre membrane. *J. Physiol.* 120, 431-434.
- Eccles, J. C. and Malcom, J. L. (1946). Dorsal root potentials of the spinal cord. *J. Neurophysiol.* 9, 139-160.
- Edwards, F. R., Redman, S. J. and Walmsley, B. (1976). The effect of polarizing currents on unitary Ia excitatory postsynaptic potential evoked in spinal motoneurons. *J. Physiol.* 259, 705-723.
- Fadiga, E. and Brookhart, J. M. (1960). Monosynaptic activation of different portions of the motor neuron membrane. *Am. J. Physiol.* 198, 693-703.
- Fatt, P. (1957). Electric potential occurring around a neurone during its antidromic activation. *J. Neurophysiol.* 20, 27-60.
- Fatt, P. and Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* 115, 320-370.
- Finkel, A. S. and Redman, S. J. (1983). The synaptic current evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group Ia axons. *J. Physiol.* 342, 615-632.
- Galindo, J. and Rudomín, P. (1978). The effects of gallamine on field and dorsal root potentials produced by antidromic stimulation of motor fibres in the frog spinal cord. *Expl. Brain Res.* 32, 135-150.
- Grinnell, A. D. (1966). A study of the interaction between motoneurons in the frog spinal cord. *J. Physiol.* 182, 612-648.
- Grinnell, A. D. (1970). Electrical interaction between antidromically stimulated frog motoneurons and dorsal root afferents: enhancement by gallamine. *J. Physiol.* 210, 17-43.
- Hatt, H. and Smith, D. O. (1976). Synaptic depression related to presynaptic axon conduction block. *J. Physiol.* 259, 367-393.

- Hodgkin, A. L. and Katz, B. (1949). The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 109, 240-249.
- Holeman, K. C., Meij, H. S. and Meyer, B. J. (1966). The existence of a monosynaptic reflex arc in the spinal cord of the frog. *Expl. Neurol.* 14, 175-186.
- Katz, B. and Miledi, R. (1963). A study of spontaneous miniature potentials in spinal motoneurons. *J. Physiol.* 168, 389-422.
- Katz, B. and Miledi, R. (1965a). Propagation of electric activity in motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond.* 161, 453-482.
- Katz, B. and Miledi, R. (1965b). The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc. R. Soc. Lond.* 161, 483-495.
- Katz, B. and Miledi, R. (1965c). The effect of calcium on the acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond.* 161, 496-503.
- Katz, B. and Miledi, R. (1967d). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol.*, 189, 535-544.
- Katz, B. and Miledi, R. (1969b). The effect of divalent cations on transmission in the squid giant synapse. *Pubb. Staz. Zool. Napol.* 37, 665-699.
- Katz, B. and Miledi, R. (1972). The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J. Physiol.* 224, 665-699.
- Klee, M. R., Pierau, F. K. and Faber, D. S. (1974). Temperature effects on resting potential and spike parameters of cat motoneurons. *Expl. Brain Res.* 19, 478-492.
- Kostial, K. and Vouk, B. (1956). The influence of temperature on the acetylcholine from a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* 132, 239-341.
- Kuffler, S. W. and Nicholls, J. G. *From Neuron to Brain*. Sinauer Ass. Mass, USA. Chapter 8. 1976.

- Loewenstein, W. R., Nakas, M. and Socolar, S. J. (1967). Junctional membrane uncoupling: Permeability transformations at a cell-membrane junction. *J. Gen. Physiol.* 50, 1865-1894.
- Loewenstein, W. R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell to cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61, 829-913.
- Llinás, R. and Nicholson, C. (1975). Calcium in depolarization secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72, 187-190.
- Llinás, R., Steinberg, I. Z. and Walton, K. (1976). Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: Voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for the calcium gate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 2918-2922.
- Lloyd, D.P. C. (1943). Reflex action in relation to pattern and peripheral source of afferent stimulation. *J. Neurophysiol.* 6, 111-119.
- Lloyd, D. P. C. (1959). Temperature and dendritic response of spinal motoneurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 45, 589-592.
- Magherini, D. C., Precht, W. and Schwindt, P. C. (1976a). Electrical properties of frog motoneurons in the in situ spinal cord. *J. Neurophysiol.* 39, 459-473.
- Magleby, K. L. and Stevens, C. R. (1972a). The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol.* 223, 151-171.
- Martin, A. R. and Pilar, G. (1963). Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol.* 168, 443-463.
- Meij, H. S. and Holemans, K. C. (1969). Inhibitory interaction between motoneurons of adjacent segments in the frog spinal cord. *Expl. Neurol.* 23, 174-186.
- Meiri, U. and Rahamimoff, R. (1972). Neuromuscular transmission: inhibition by manganese ions. *Science.* 176, 302-309.

- Mellanby, K. (1940). Temperature acclimatization in amphibia. *J. Physiol.* 98, 27-28P.
- Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond.* -- 183, 421-425.
- Mitchell, J. F. and Phillis, J. W. (1962). Cholinergic transmission in the frog spinal cord. *Br. J. Pharmac.* 19, 534-543.
- Motorina, M. V., Tamarova, Z. A., Shapovalov, A. Y. and Shiriyaev, B. I. (1982). Investigation of synaptic connections between primary afferents and motoneurons in the frog spinal cord by intracellular injection of horseradish peroxidase. - *Neurofisiologia.* 14, 60-68.
- Nelson, P. G. and Frank, K. (1967). Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential. *J. Neurophysiol.* 30, - 1097-1113.
- Nicholls, J. G. and Purves, D. (1970). Monosynaptic chemical and electrical connexions between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech. *J. Physiol.* 209, -- 647-667.
- Nicholls, J. G. and Purves, D. (1972). A comparison of chemical and electrical synaptic transmission between single sensory cells and motoneurone in the central nervous system of the leech. *J. Physiol.* 225, 637-656.
- Payton, B. W., Bennett, M. V. L. and Pappas, G. D. (1969). - Temperature-dependence of resistance at an electrotonic synapse. *Science.* 165, 594-597.
- Pitts, J. D. Direct communication between animal cells. *International Cell Biol.* (eds.: Brinkley, B. R. & Porter, K. R.). p. 43.
- Rall, W., Burke, R. E., Smith, T. G., Nelson, P. G. and Frank, K. (1967). Dendritic location of synapses and possible mechanisms for the monosynaptic EPSP in motoneurons. *J. Neurophysiol.* 30, 1167-1193.

- Ramón, F. and Zampighi, G. (1980). On the electrotonic coupling mechanisms of crayfish segmented axons: temperature dependence of junctional conductance. *J. Membrane Biol.* 54, -- 165-171.
- Redman, S. J. (1979). Junctional mechanisms at group Ia synapses. *Progress in Neurobiol.* 12, 33-83.
- Revel, J. P. and Karnovsky, M. J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7-C12.
- Shapovalov, A. I., Shiriaev, B. I. and Velumian, A. A. (1978). Mechanisms of post-synaptic excitation in amphibian motoneurons. *J. Physiol.* 279, 437-455.
- Shapovalov, A. I. (1980). Interneuronal synapses with electrical dual and chemical of transmission in vertebrates. -- *Neuroscience.* 5, 1113-1124.
- Sotelo, C. and Grofova, I. (1976). Ultrastructural features of the spinal cord. In: *Frog Neurobiology* (eds.: Llinás, R. & Precht, W.). 707-727.
- Sotelo, C. (1976). Morphological basis for electrical communication between neurons in the central nervous system of vertebrates. *Neuron Concept. Today Symp.* Tibany, 17-26.
- Sotelo, C. and Korn, H. (1978). Morphological correlates of electrical and other interactions through low-resistance pathways between neurons of the vertebrate central nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 55, 67-106.
- Subak-Sharpe, J. H., Bürk, R. R. and Pitts, J. D. (1969). -- Metabolic cooperation between biochemically marked cells in tissue culture. *J. Cell Sci.* 4, 353-367.
- Székely, G. (1976). The morphology of motoneurons and dorsal root fibers in the frog spinal cord. *Brain Res.* 103, -- 275-290.
- Takeuchi, N. (1958). The effect of temperature on the neuromuscular junction of the frog. *Jap. J. Physiol.* 8, 391-404.

Takeuchi, A. Junctional transmission. Postsynaptic mechanisms. In: Cellular Biology of Neurons. (Handbook of Physiology. The Nervous System). (ed.: Kandel, E. R.), vol. 1. pp. 295-327. 1977.

Waxman, S. G. (1979). Electron microscopy in reptile spinal cord. Neurosci. Lett. 13, 237-242.

Weakly, J. N. (1973). The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. J. Physiol. 234, 597-612.

Westerfield, M., Joyner, R. W. and Moore, J. W. (1978). Temperature-sensitive conduction failure at axons branch points. J. Neurophysiol. 41, 1-8.

9.- FIGURAS.

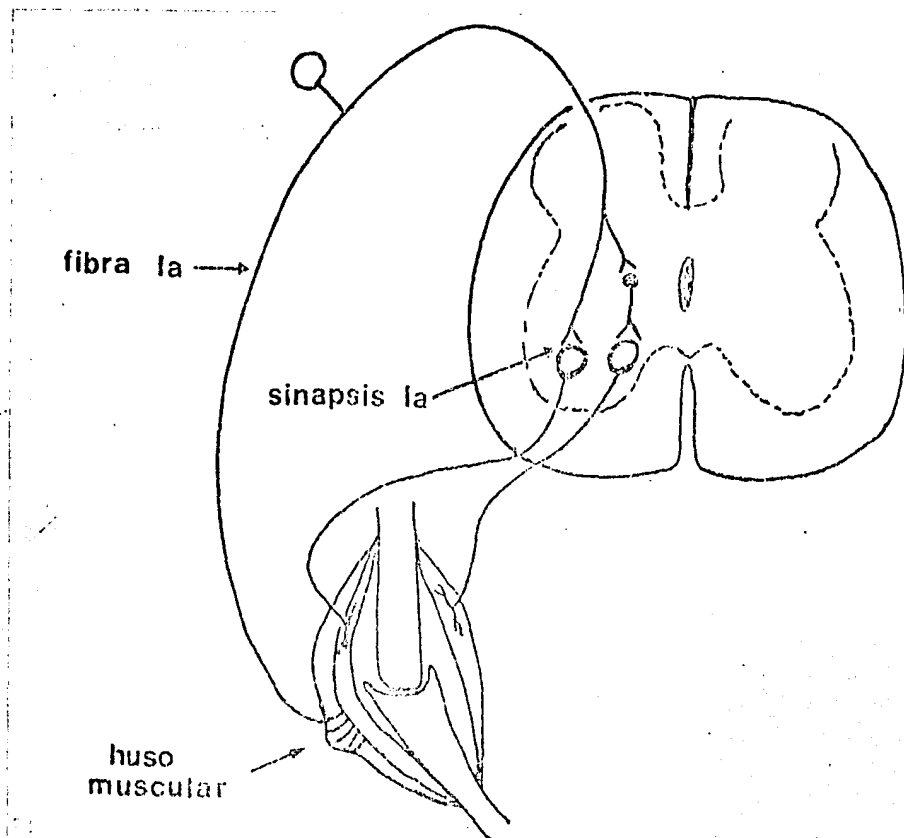
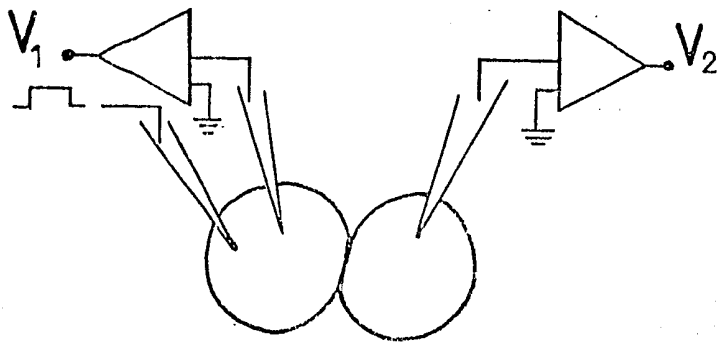
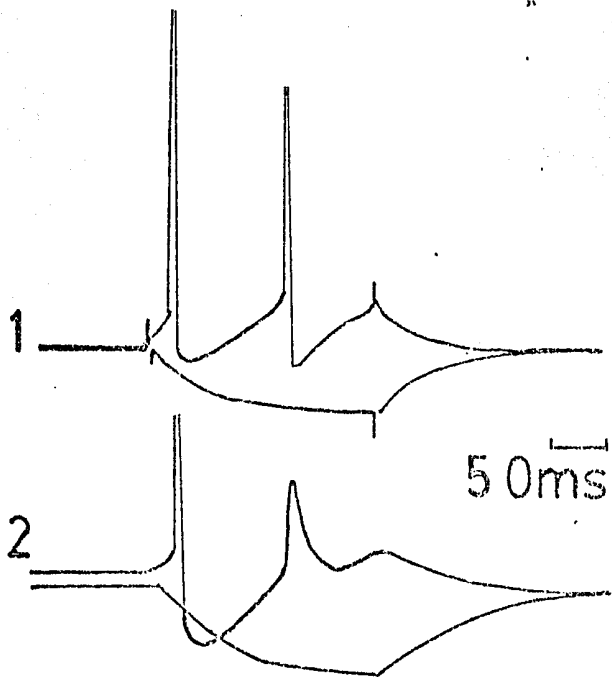


Figura 1.

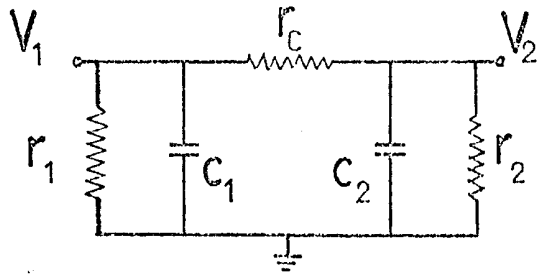
Esquema que muestra los elementos del circuito monosináptico responsable del arco reflejo de estiramiento. Dicho circuito se inicia en las terminales anuloespirales del huso muscular, de donde emergen las fibras Ia y que entran a la médula espinal por la raíz dorsal. En su recorrido por la sustancia gris las fibras Ia hacen contactos monosinápticos con las motoneuronas-alfa. El axón de las motoneuronas sale de la médula por la raíz ventral para inervar las fibras extrafusales del músculo correspondiente. Por otra parte, observe, que las fibras Ia hacen sinapsis con interneuronas que a su vez contactan con las motoneuronas que inervan el músculo antagonista, estableciendo así una vía disináptica.



A₁



A₂



B

FIGURA 2.

Figura 2.

Transmisión sináptica eléctrica entre dos neuronas Retzius del ganglio de sanguijuela (Hirudo medicinalis). Experimento realizado por el autor de la presente tesis. En A_1 se muestra un esquema del arreglo experimental que convencionalmente se utiliza para demostrar el acople eléctrico entre -- dos células. El experimento consistió en penetrar una de las células con dos microelectrodos. Con uno de ellos se registró el potencial de membrana (V_1) mientras que con el otro -- se inyectaban pulsos cuadrados de corriente. La otra célula de Retzius se penetró con un microelectrodo para registrar -- los posibles cambios en el potencial de membrana (V_2).

En A_2 se muestra la reproducción de unos registros obtenidos en dos células Retzius después de hacer el experimento anterior. La célula 1 fue la que penetró con dos microelectrodos. Observe que la inyección de un pulso hiperpolarizante provocó en la misma célula un cambio transitorio de voltaje cuyo curso temporal se debe a las propiedades RC de la -- membrana. Dicho estímulo provoca en la célula 2 un cambio de voltaje similar pero de menor amplitud. Por otro lado, cuando el pulso es despolarizante, éste es suficiente para llevar al umbral de disparo a la célula 1. En B se muestra el -- circuito equivalente que forman las dos células (Bennett, -- 1966). r_1 y r_2 son las resistencias de membrana de las células 1 y 2 respectivamente. De igual manera c_1 y c_2 son sus -- capacitancias. Finalmente, r_c es la resistencia de acople -- que comunica eléctricamente a las dos neuronas.

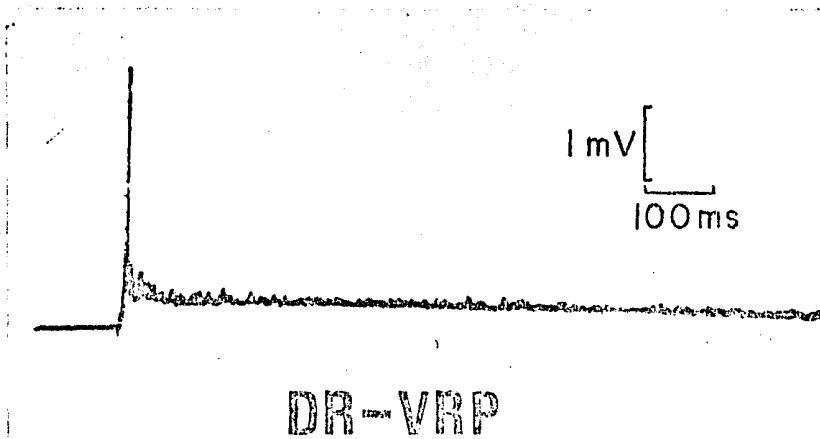


Figura 3.

Registro del potencial de raíz ventral producido por estimulación eléctrica de la raíz dorsal ipsilateral y homosegmentaria (DR-VRP). Observese los dos componentes que caracterizan al DR-VRP. El primero de ellos es una espiga mientras que el otro, de curso temporal más lento, ostenta duraciones hasta de 1 segundo. Montados en este último componente se observan pequeñas espigas que reflejan el disparo asíncrono de las motoneuronas. Para mayor detalle ver el texto.

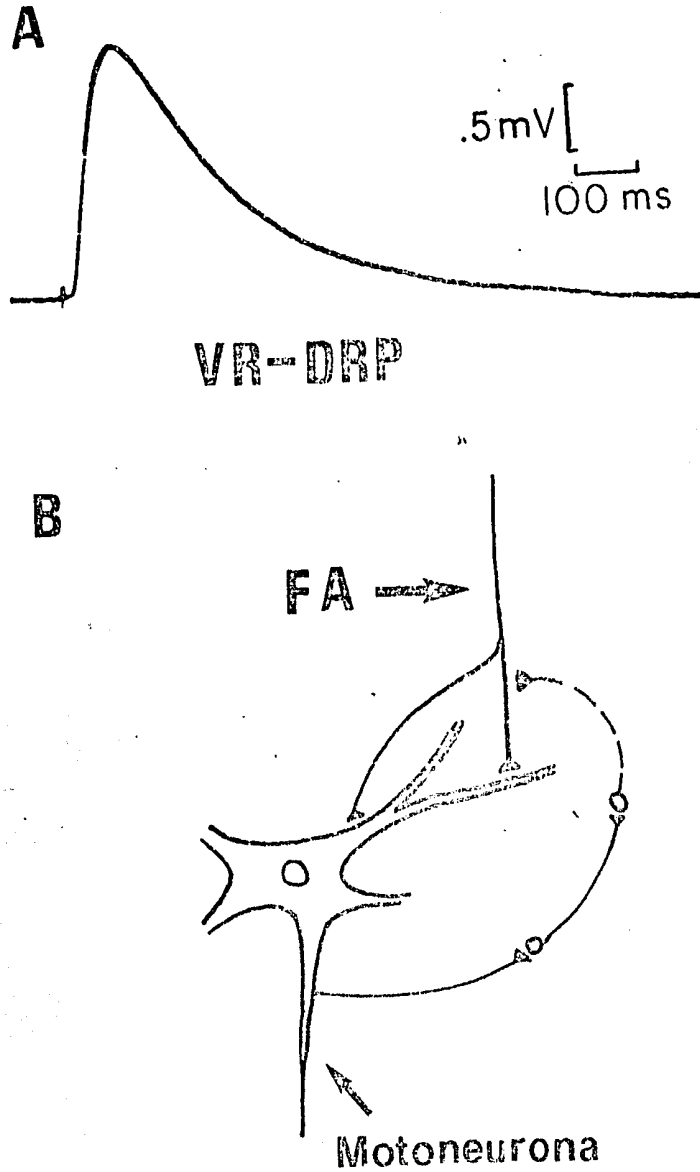
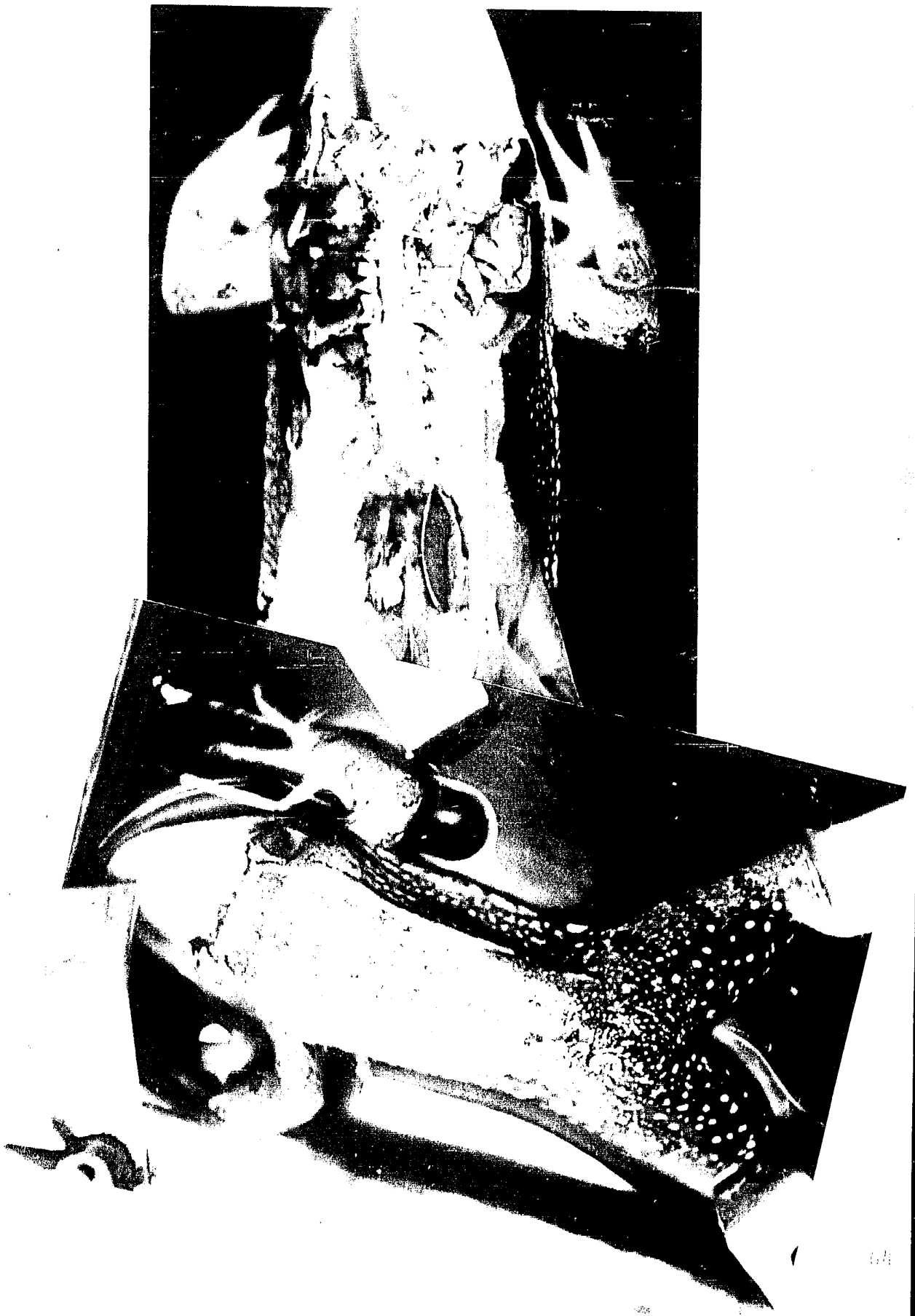


figura 4.

Registro del potencial de raíz dorsal producido por estimulación eléctrica de la raíz ventral ipsilateral y homosegmentaria (VR-DRP). A esta escala de tiempo se observa el componente "tardío" del VR-DRP. Se ha postulado que dicho componente corresponde a la despolarización de cierto grupo de fibras aferentes (FA) a través de una vía recurrente que se inicia con la colateral del axón de la motoneurona (B).

Figura 5a.

Procedimiento de inmovilización de la rana a la cámara de disección. La rana descerebrada se coloca en decúbito ventral. Con un gancho se sujeta la mandíbula inferior del animal. De igual manera, las extremidades posteriores se sujetan con la ayuda de otros dos ganchos.



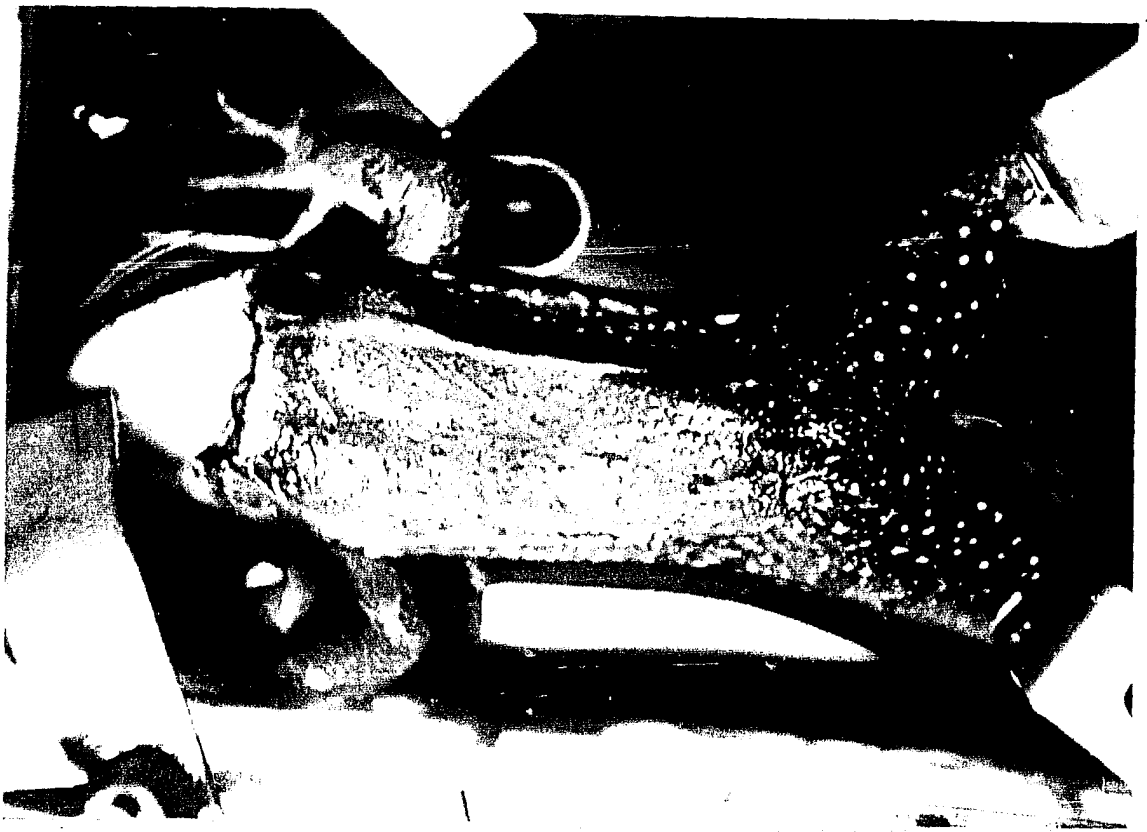


Figura 5a.

Procedimiento de inmovilización de la rana a la cámara de disección. La rana descerebrada se coloca en decúbito ventral. Con un gancho se sujeta la mandíbula inferior del animal. De igual manera, las extremidades posteriores se sujetan con la ayuda de otros dos ganchos.



Figura 5b.

Vista dorsal de la médula espinal "in situ" después de terminar la laminectomía. En este caso ya se ha cortado la duramadre y la médula está lista para ser removida del canal vertebral. Para tal fin se amarra el extremo rostral, después, se levanta dicho extremo y se van cortando una a una las raíces espinales.

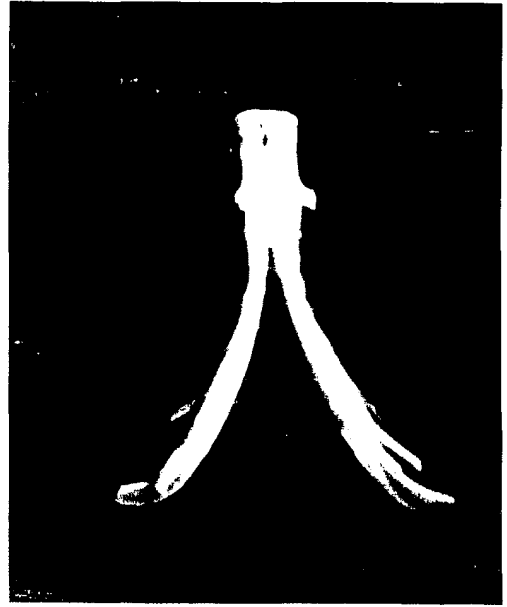
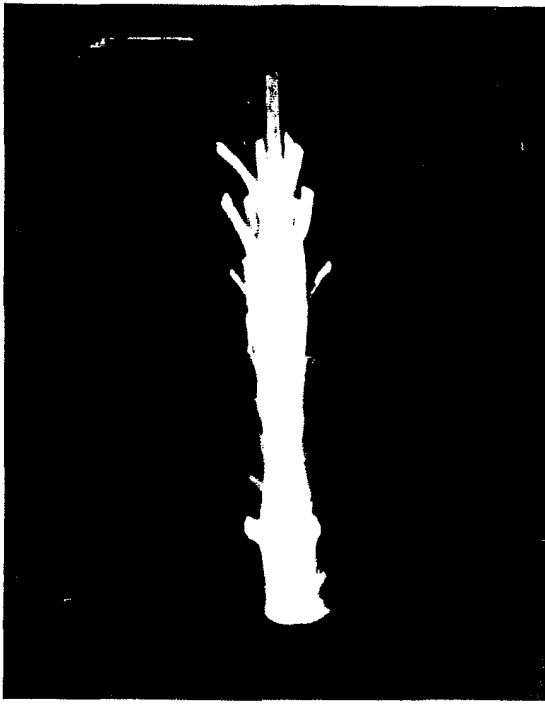


Figure 6

Figura 5.

Procedimiento de hemisección de la médula espinal.

En A se muestra la posición en que debe quedar la médula antes de hacer el corte sagital. La cara ventral de la médula debe estar hacia arriba para que el surco ventral -- sirva de guía al recorrido de la navaja.

En B se muestra la médula después de haber hecho la -- hemisección. Este procedimiento da lugar a dos mitades simétricas.

En C se muestra una de las mitades de la médula dentro de la cámara de perfusión y registro. La hemimédula se fija con el neuropilo hacia arriba. De esta manera la hemisección reduce las barreras difusionales y además se tiene acceso -- directo al núcleo motor para el registro intracelular de motoneuronas.

Para mayores detalles ver el texto.

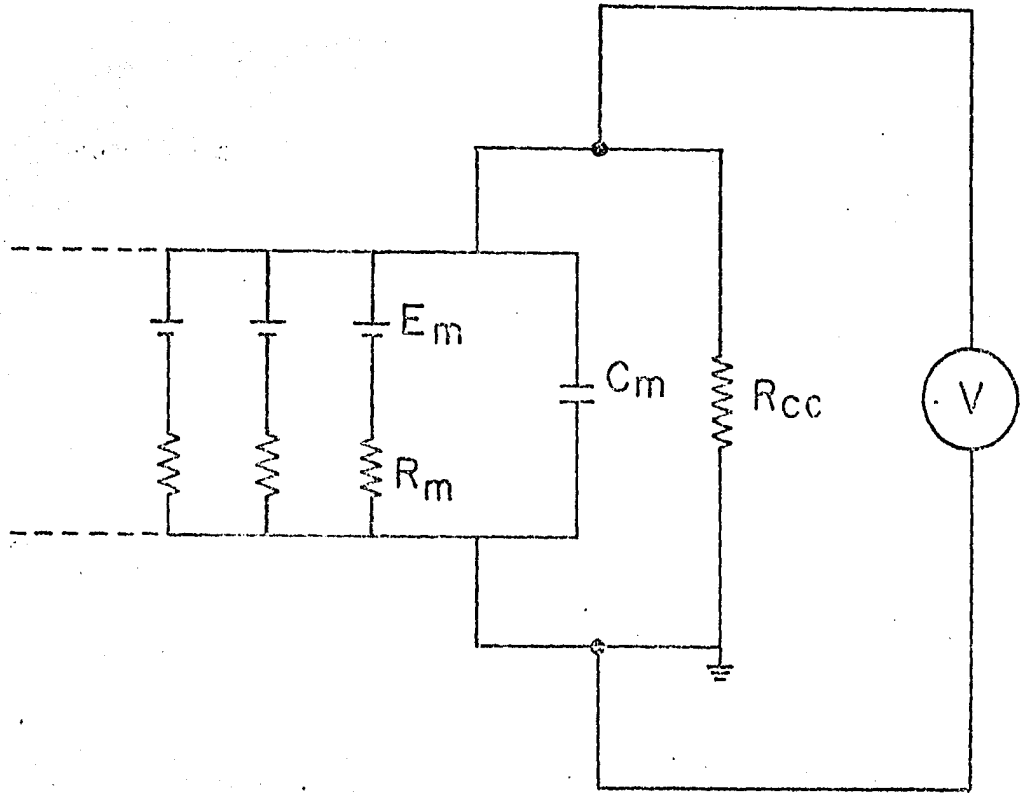


Figura 7.

Circuito equivalente del sistema utilizado para registrar los potenciales de raíz. En el modelo, cada fibra nerviosa está representada por el circuito $R_m C_m$ en paralelo. Por otra parte, cada axón (aquí solo se representan 3 de los que en su totalidad conforman la raíz) se encuentra en paralelo con su vecino. El potencial de raíz se registra como la caída de voltaje a través de la resistencia de cortocircuito (R_{cc}). La magnitud de este potencial (V) depende de la ecuación: $V = [R_{cc} / (R_{cc} + R_m)] \times E_m$, que corresponde a la solución de V para un divisor de voltaje.

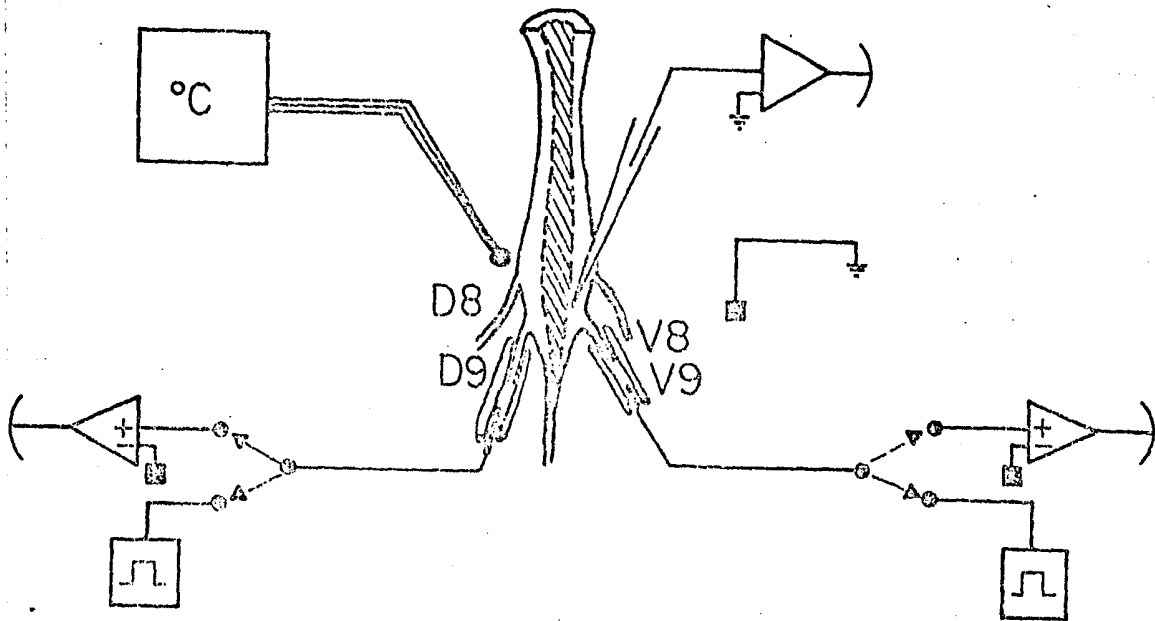


Figura 8.

Esquema del arreglo experimental utilizado en los experimentos. Cada electrodo de succión está conectado a un interruptor que permite usar al primero como electrodo de estimulación ó de registro. En esta última modalidad los potenciales de raíz se registraron con la ayuda de un amplificador diferencial. Por otra parte, se utilizaron microelectrodos para el registro de potenciales de campo. Este último registro se hizo con un amplificador de alta impedancia de entrada. La temperatura del medio de perfusión fue censada constantemente con un termistor de despliegue digital. Para mayores detalles ver el texto.

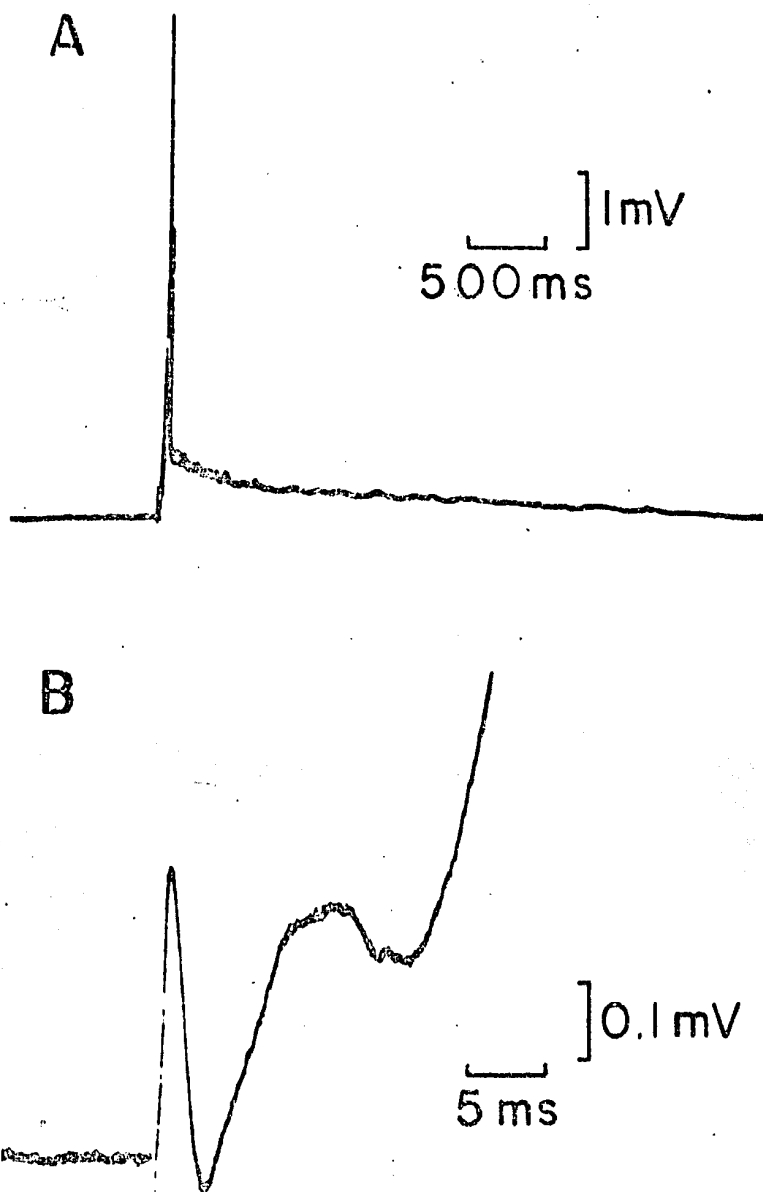


Figura 9.

Potencial de raíz ventral producido por estimulación de la raíz dorsal ipsilateral y homosegmentaria. El DR-VRP fue registrado a dos diferentes velocidades de barrido con el objeto de mostrar todos sus componentes. En A se muestra un típico registro del DR-VRP a barrido lento. En B se muestra el mismo potencial a barrido rápido. En este último registro se pueden distinguir los componentes tempranos del mismo. La primera onda es de origen presináptico. Después de esta onda hay un "prepotencial" de donde parece originarse la espiga monosináptica. Los registros se obtuvieron en Ringer normal y a temperatura de 16°C. Para mayor detalle ver el texto.

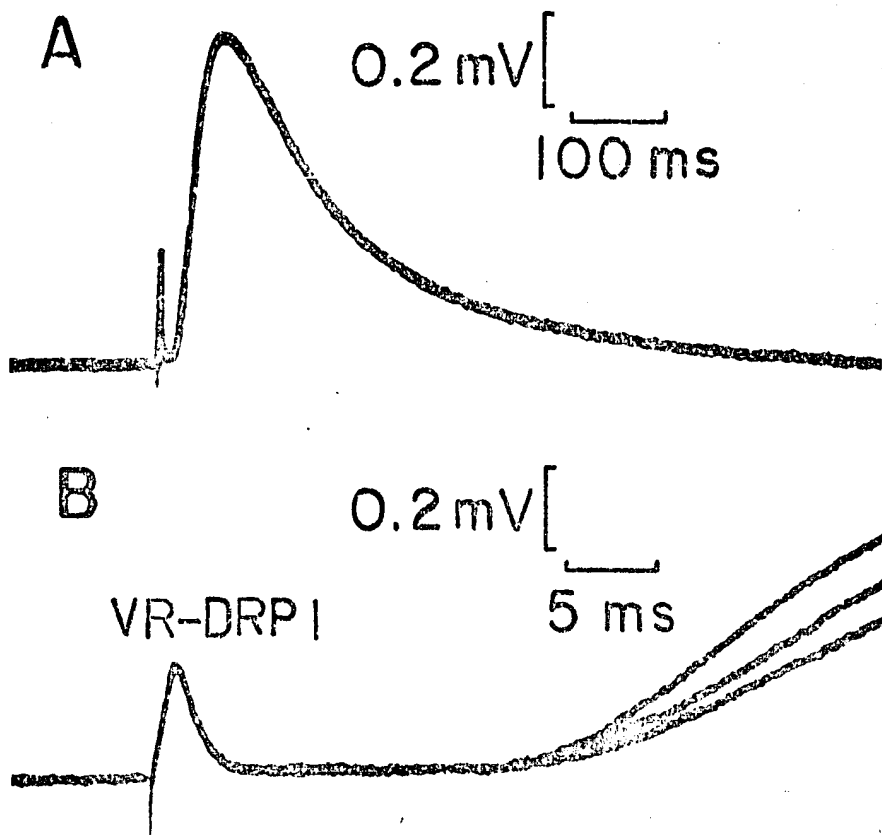


Figura 10.

Potencial de raíz dorsal producido por la estimulación de la raíz ventral ipsilateral y homosegmentaria. En A y en B se muestran los registros del VR-DRP a barrido lento y rápido respectivamente. Ambos registros se obtuvieron en Ringer normal a 16°C . A esta temperatura el VR-DRP presenta 2 componentes: el VR-DRP I y el componente "tardío". Es notoria la diferencia en latencias que tienen estos componentes ya que el VR-DRP I surge inmediatamente después del artefacto del estímulo mientras que el potencial "tardío" tiene -- una latencia de 20 mseg.

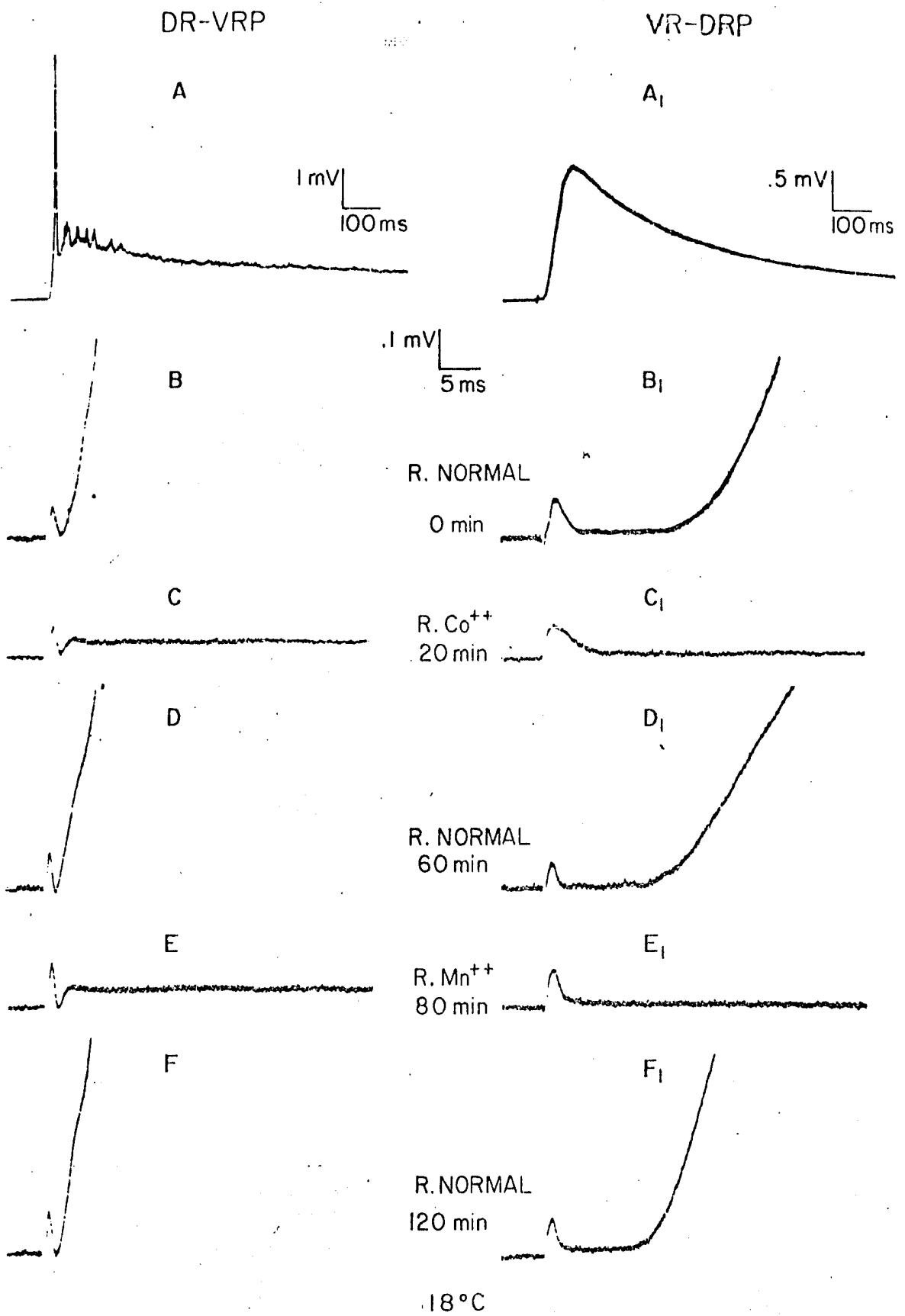


Figura 11.

Figura 11.

Efecto sobre los componentes del DR-VRP y del VR-DRP, - de substituir equimolarmente al Ca^{++} por Co^{++} ó Mn^{++} , en el Ringer de perfusión.

En A y en B se muestran los registros control del DR-VRP, obtenidos con un barrido lento y rápido, respectivamente. De igual manera, en A_1 y B_1 se muestran los registros control del VR-DRP. En ambos potenciales de raíz se advierten sus respectivos componentes ya citados en la figuras 9 y 10. En C y C_1 , se muestran los registros obtenidos después de 20 minutos de perfusión de la médula espinal en Ringer Co^{++} . Nótese que en el DR-VRP (C) se abolió la espiga monosináptica y el componente lento, mientras que en el VR-DRP (C_1) se abolió el componente "tardío". Los efectos de la substitución del Ca^{++} por Co^{++} son reversibles como se puede observar en la D para DR-VRP y en D_1 para el VR-DRP. Estos últimos registros se obtuvieron después de perfundir a la médula durante 40 minutos - en Ringer normal. El efecto de substituir al Ca^{++} por Mn^{++} - sobre los potenciales de raíz (E y E_1) es idéntico al obtenido con la substitución por Co^{++} y de igual manera también es irreversible (F y F_1).

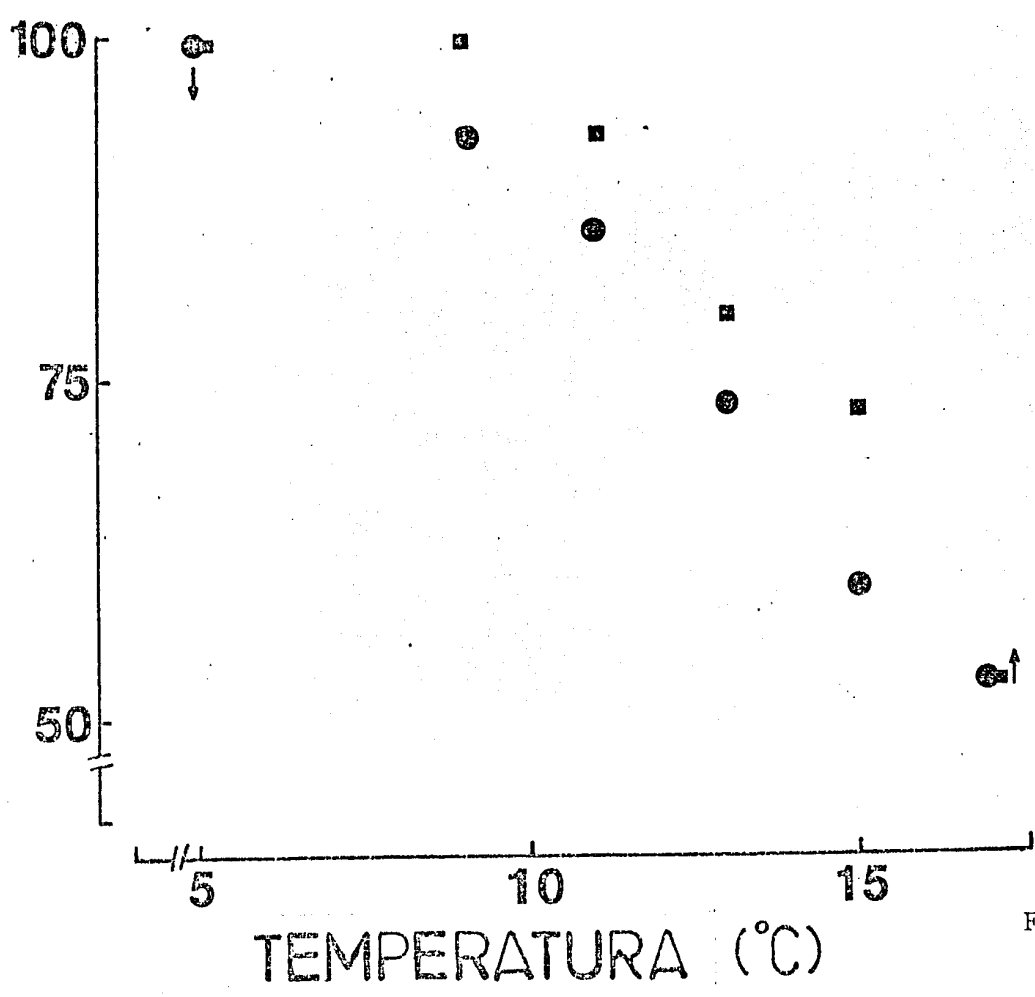
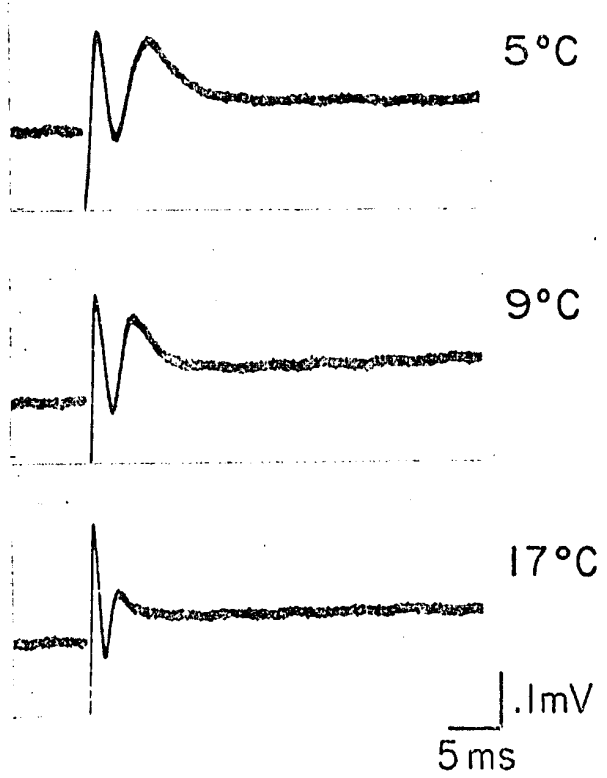


Figura 12. 73

Figura 12.

Efecto de la temperatura sobre el componente eléctrico del DR-VRP. En la parte superior de la figura se muestran 3 registros del DR-VRP eléctrico obtenidos a las temperaturas indicadas a la derecha de los mismos. Nótese que un incremento en la temperatura produce una disminución en la amplitud al pico de dicho potencial. El efecto anterior se ilustra en forma gráfica en la parte inferior de la figura. En ella se graficó la amplitud normalizada del DR-VRP eléctrico en función de la temperatura. Los círculos llenos representan un ascenso en la temperatura y los cuadros llenos representan una subsecuente disminución en la misma variable. Nótese que a pesar de la histeresis, siempre la relación entre ambas variables es inversamente proporcional, en el rango de temperaturas exploradas. Este experimento se hizo perfundiendo a la médula espinal en Ringer Co^{++} .

Para mayor detalle ver el texto.

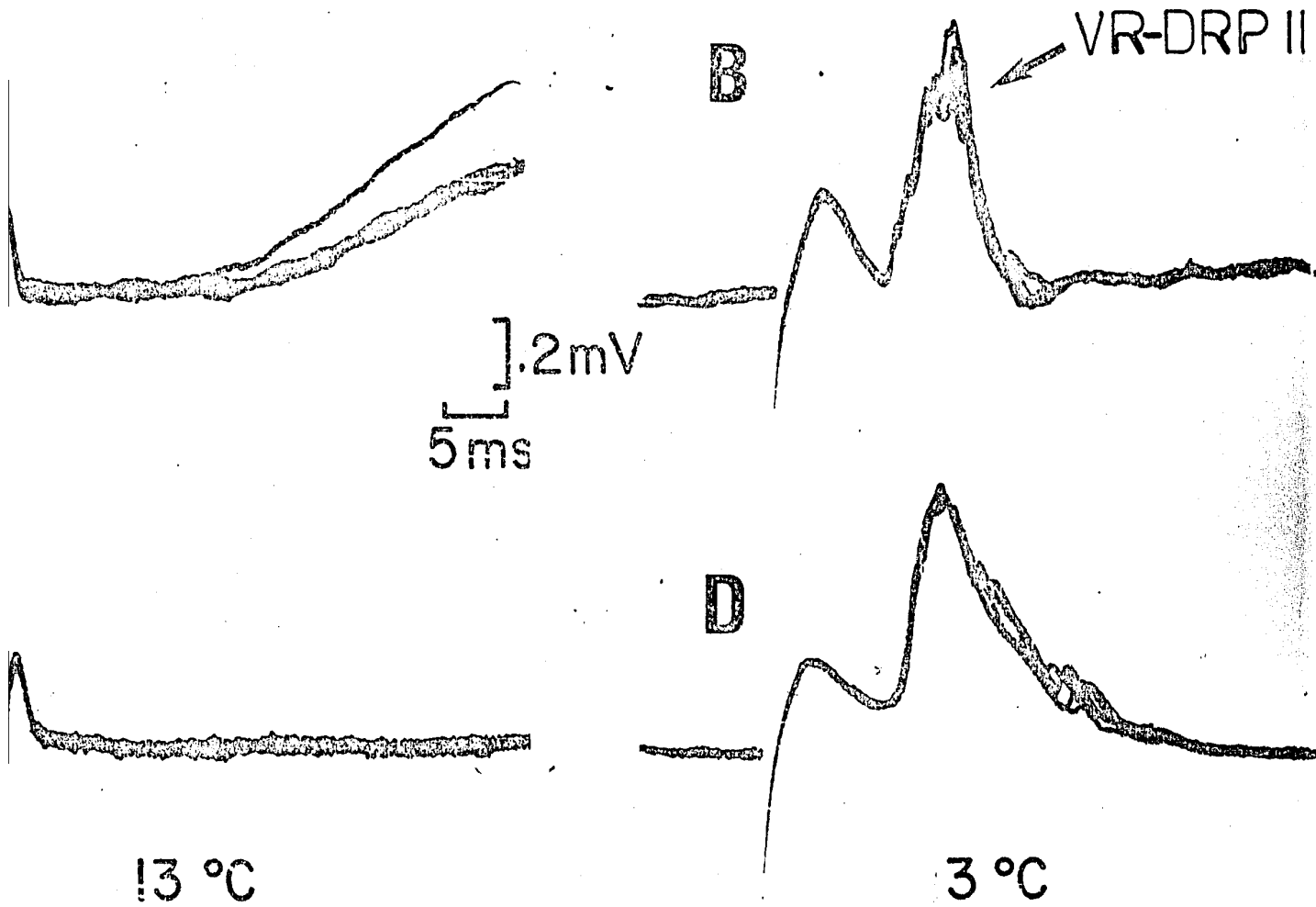


Figura 13.

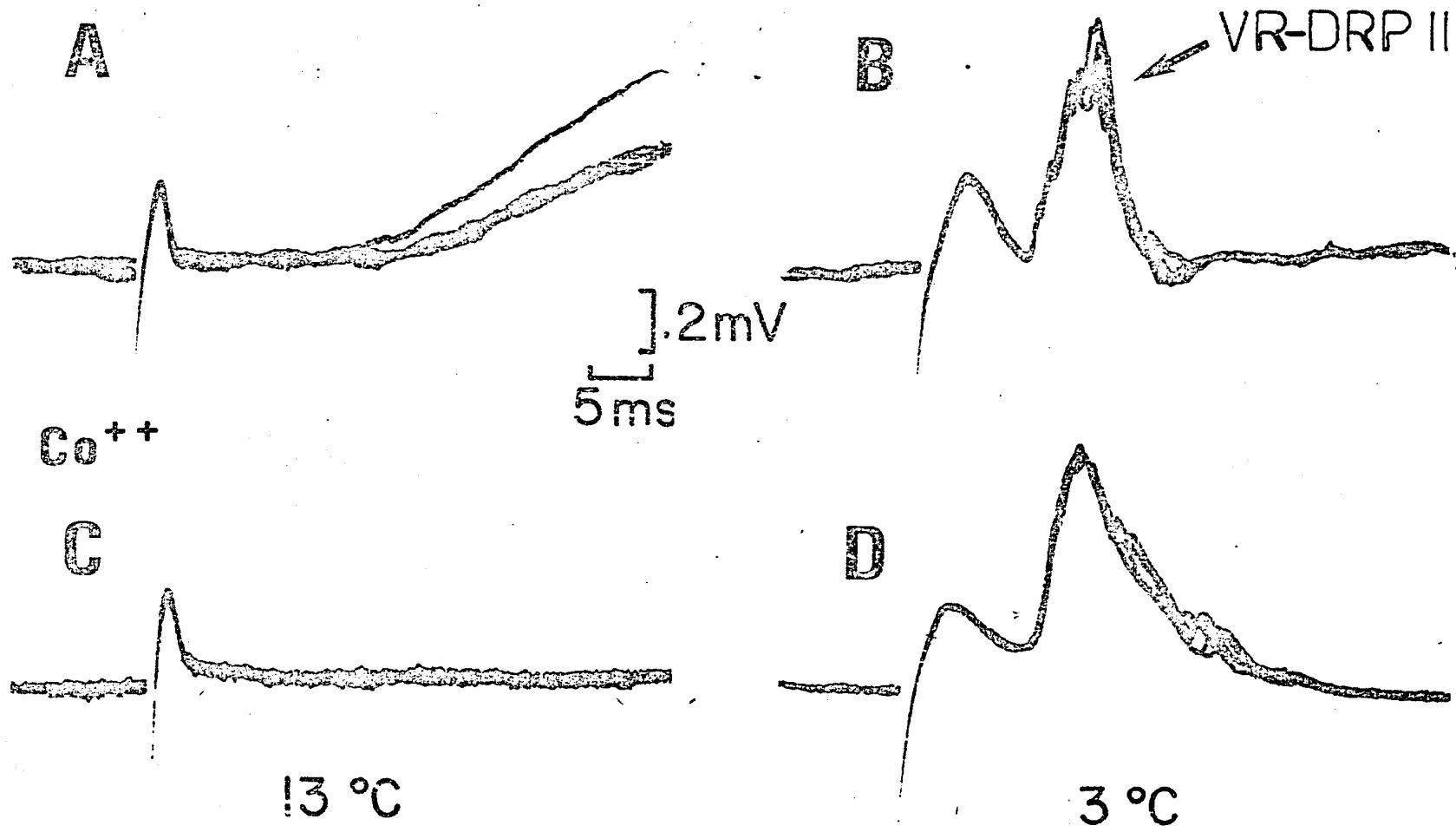


Figura 13.

Figura 13.

Efectos sobre el VR-DRP de disminuir la temperatura del Ringer que baña a la médula. En A se muestra el registro control a 13°C del VR-DRP, a barrido rápido, en donde se distinguen los dos componentes clásicos de dicho potencial de raíz. En B se muestra el resultado de disminuir la temperatura hasta 3°C. Obsérvese que ahora se registra un segundo componente de corta latencia (el VR-DRP II) además de que se incrementa la latencia del componente "tardío". El VR-DRP II es resistente a la ausencia de Ca^{++} y presencia de Co^{++} (D), pero es muy sensible a cambios en la temperatura (A y C).

Mn⁺⁺ RINGER

A

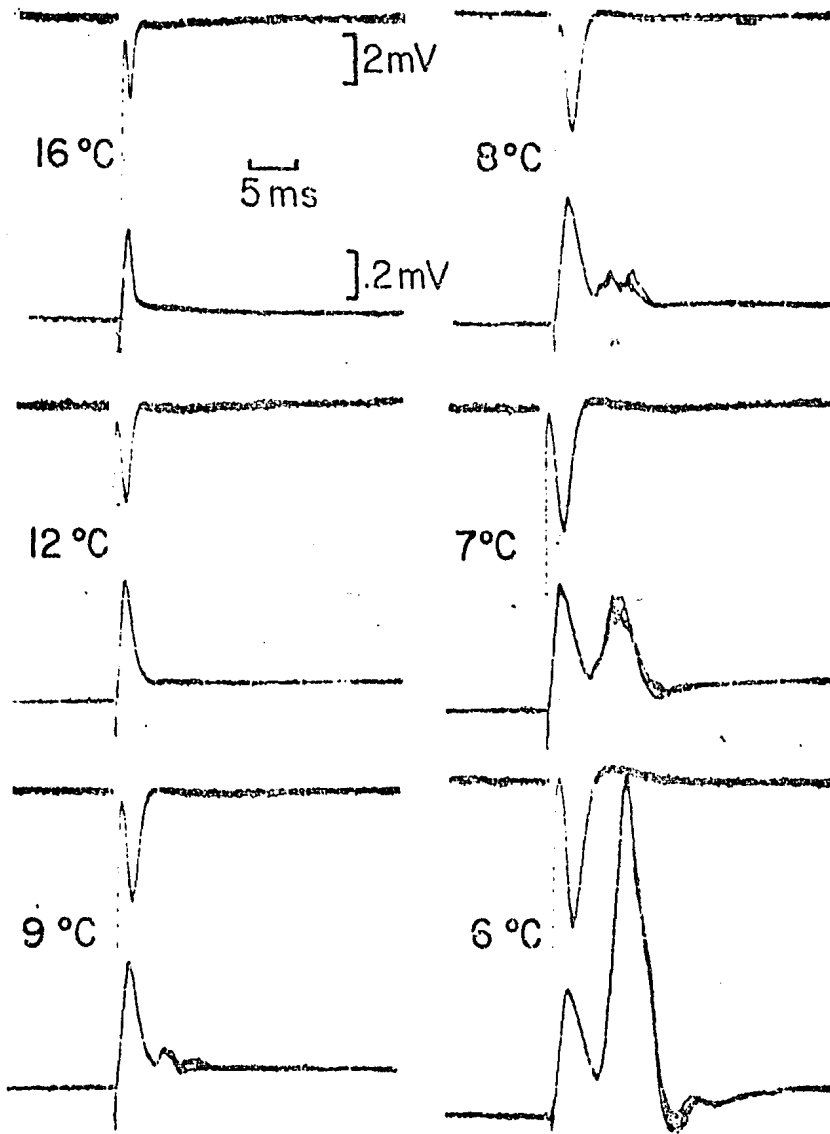


Figura 14 A.

B

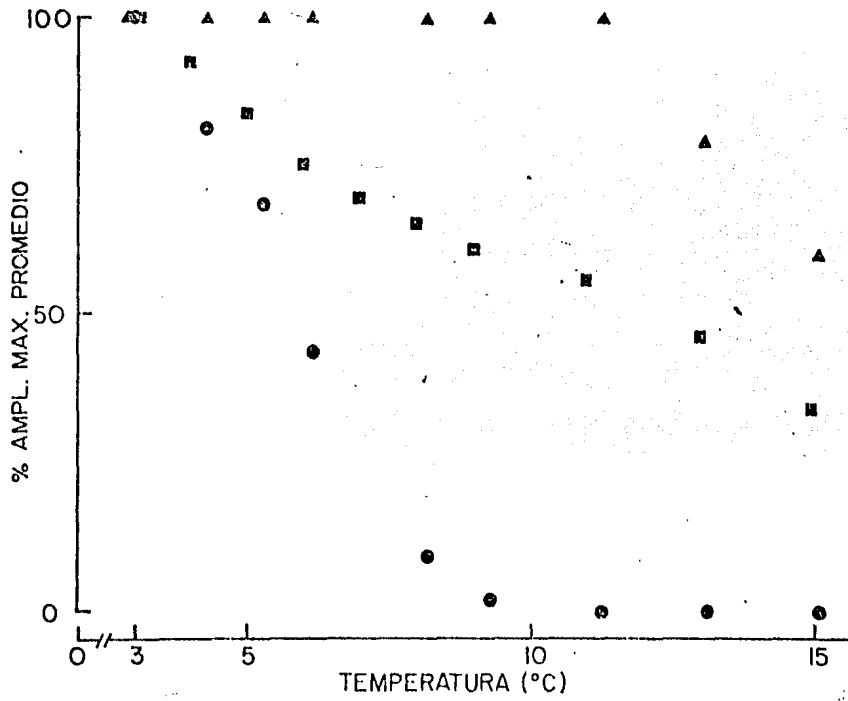
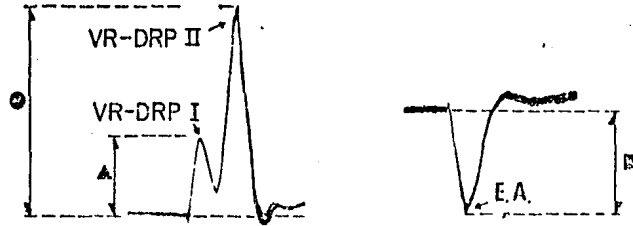


Figura 14 B.

Figura 14.-

En A se muestran los efectos sobre los potenciales de campo, el VR-DRPI y el VR-DRPII, de disminuir la temperatura de la solución de perfusión. En cada juego de registros, el trazo superior corresponde al potencial de campo registrado en el núcleo motor. Este potencial resulta de la invasión antidrómica de las motoneuronas. El trazo inferior corresponde al registro de los componentes resistentes a la ausencia de Ca^{++} y su substitución por Mn^{++} . Observese que el VR-DRPII no se registra a temperaturas mayores de $10^{\circ}C$. Sin embargo, una vez alcanzada la temperatura de activación, la amplitud del VR-DRPII se incrementa conforme baja la temperatura. Por otro lado, la amplitud del potencial de campo muestra una dependencia a la temperatura. Ver el texto. En B se muestra la gráfica en donde se ilustra la dependencia que tienen los 3 potenciales de la temperatura. Los registros muestran las amplitudes que se midieron. Los círculos corresponden al VR-DRPII; los cuadrados, al potencial de campo. Y los triángulos, al VR-DRPI. En la gráfica se observa con mayor claridad la dependencia que tiene el VR-DRPII de la temperatura. Nótese que una vez activado el VR-DRPII, muestra un rápido incremento en su amplitud en función de la disminución de la temperatura. Por otro lado, observese que en contraste, la amplitud del potencial de campo se incrementa linealmente conforme se disminuye la temperatura. Finalmente observese que en este experimento el VR-DRPI muestra una clara saturación a temperaturas menores de $10^{\circ}C$.

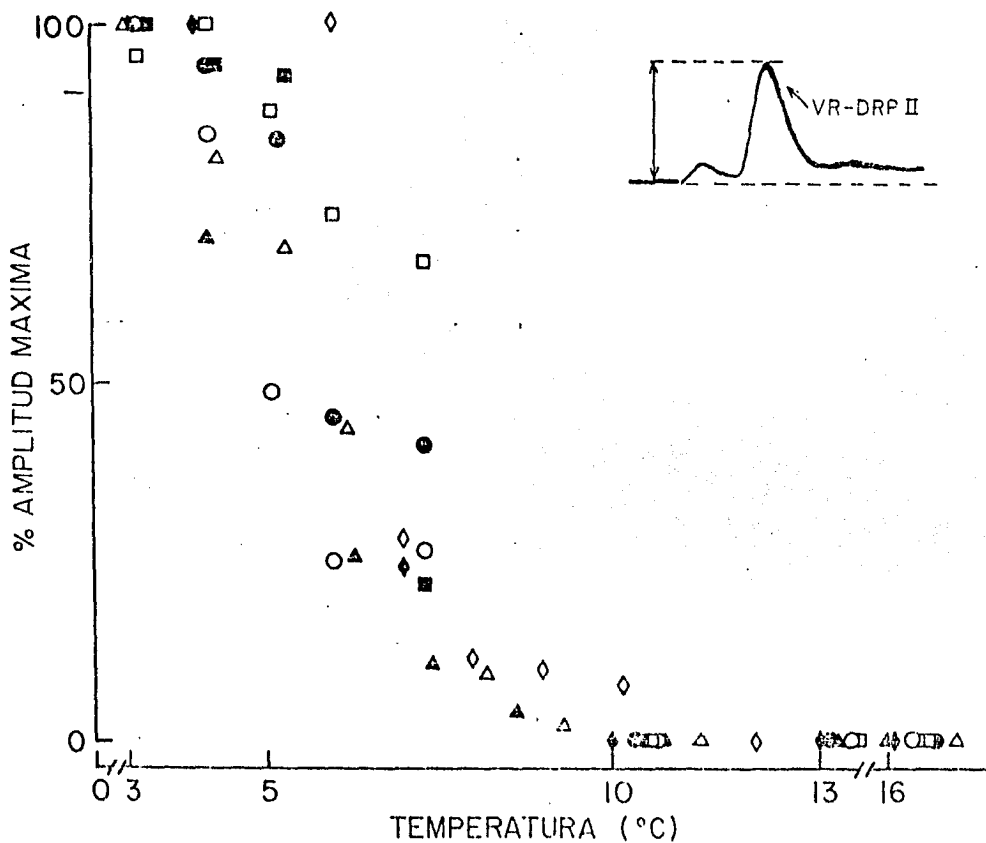


Figura 15.

Efecto de la temperatura sobre el VR-DRP II registrado en diferentes soluciones de perfusión. La grafica resume los resultados obtenidos cuando el protocolo de modificar la temperatura se hizo con soluciones Ringer de distinta composición. Como se puede observar, el VR-DRP II presenta cualitativamente el mismo comportamiento anteriormente descrito. La simbología es la siguiente: círculos y triángulos vacíos, R. normal, aumentando la temperatura; cuadrados y rombos vacíos, R. normal, disminuyendo la temperatura; círculos y triángulos llenos, R. cobalto, disminuyendo la temperatura; cuadros llenos, R. cobalto, aumentando la temperatura; rombos llenos, R. manganeso, disminuyendo la temperatura.

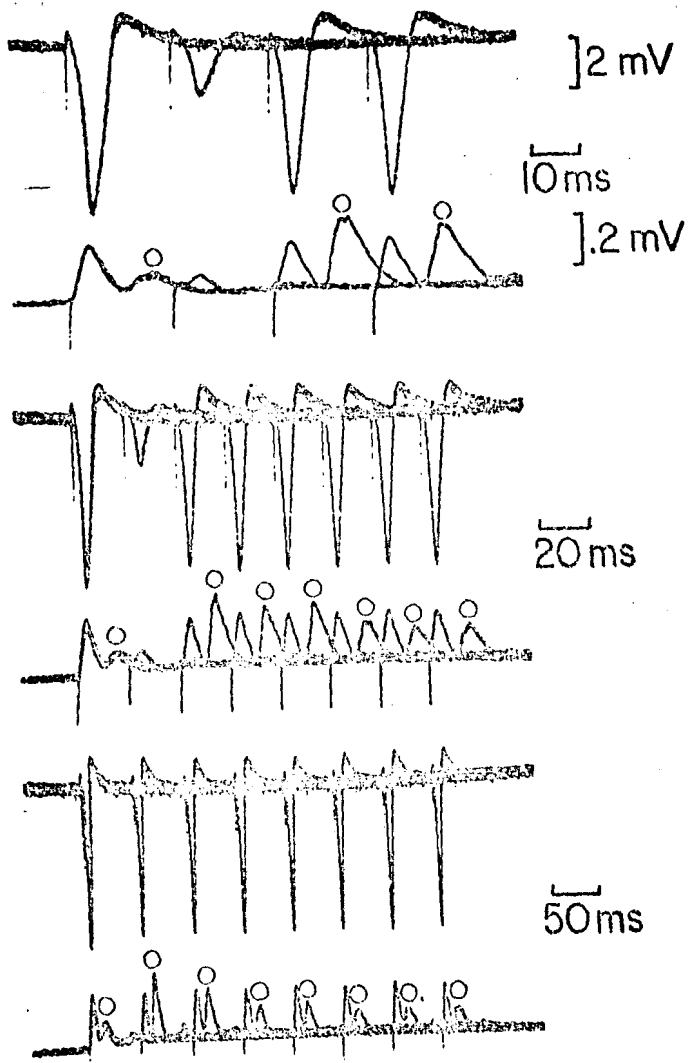


Figura 16.

Figura 16.--

Efecto que sobre el VR-DRPII tiene la aplicación de dos estímulos a intervalos variables en la raíz ventral. De cada par de registros, el trazo superior es el potencial de campo antidrómico y el inferior es el potencial de raíz. La estimulación condicionante de la raíz ventral ocasiona que la amplitud del VR-DRPII producido por el segundo estímulo sea mayor con respecto a la del VR-DRPII control. Los círculos señalan al VR-DRPII. Después de que la facilitación alcanza un máximo, ésta decae. Obsérvese que tanto el potencial de campo como el VR-DRPI no muestran facilitación. Los registros se obtuvieron en Ringer cobalto a 5°C.

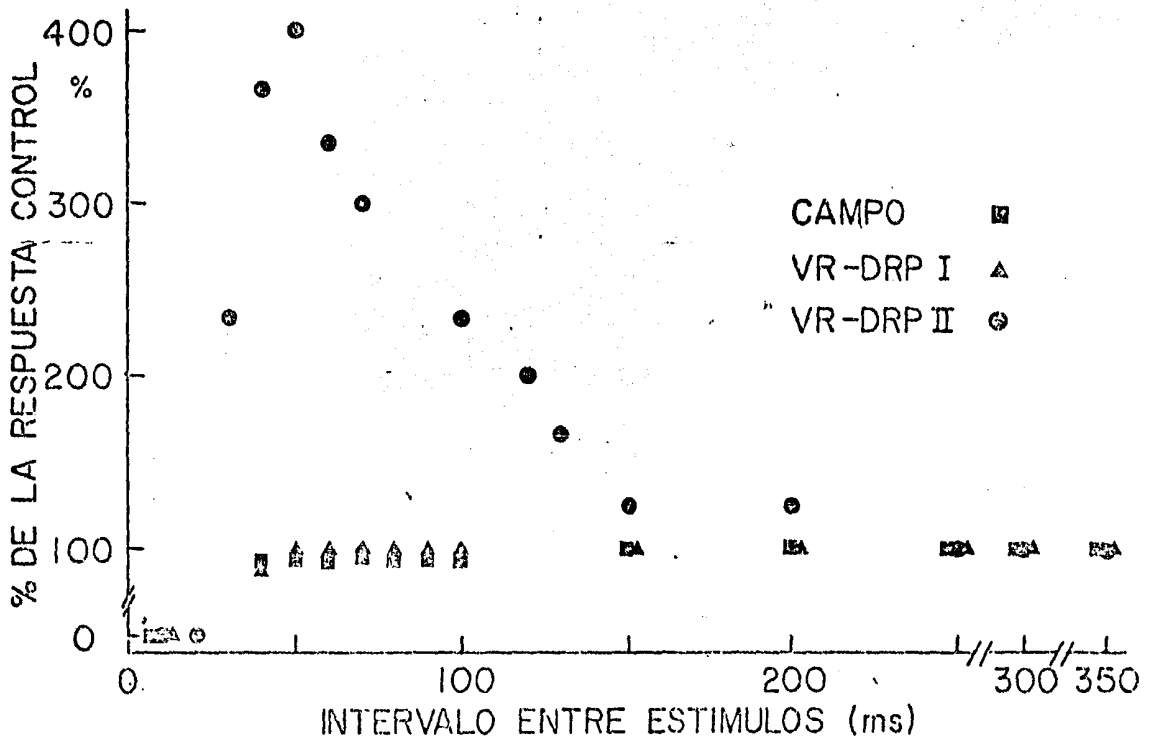


Figura 17.

Curso temporal de la facilitación del VR-DRP II. En esta gráfica se muestra el curso temporal del proceso de facilitación del VR-DRP II (círculos). Después de un periodo de oclusión se instala la facilitación alcanzando rápidamente su valor máximo y enseguida decae. El fenómeno de facilitación dura hasta 200 mseg. En todos los intervalos de tiempo explorados, ni el VR-DRP I (triángulos) ni el potencial de campo antidrómico (cuadros) mostraron facilitación. Los puntos aquí graficados corresponden a los registros de la figura 16.

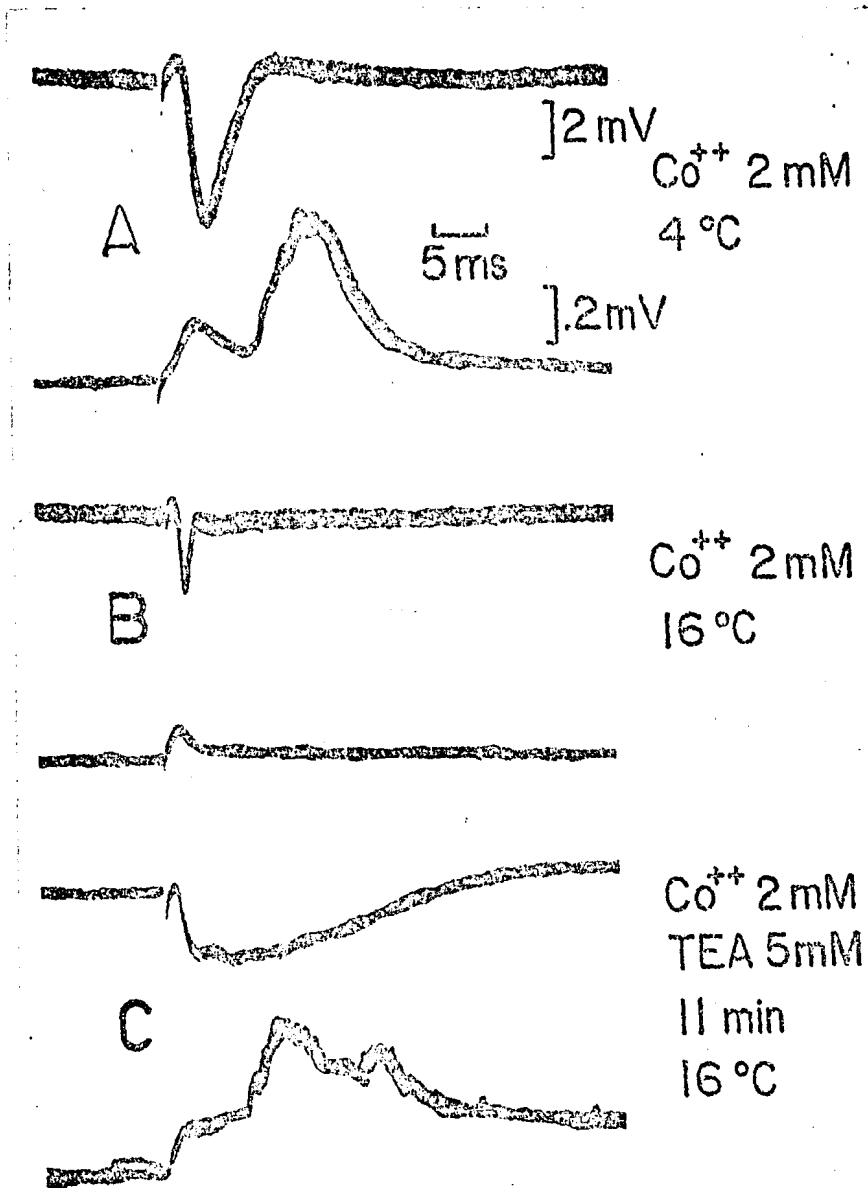


Figura 18.

Figura 18.-

Acción del tetraetilamonio (TEA) sobre el campo antidrómico, el VR-DRPI y el VR-DRPII. En A se muestran los registros control del campo (trazo sup.) y de los potenciales de raíz (trazo inf.). En B se observa el resultado que se tiene de aumentar la temperatura hasta 16°C. Nótese que a esta temperatura, el VR-DRPII desaparece mientras que la amplitud y duración de los otros potenciales se ven disminuidas. En C se muestra el efecto que a la misma temperatura tiene el añadir 5 mM de TEA al Ringer cobalto. El TEA ocasiona un aumento en la duración del potencial de campo antidrómico pero -- además activa un potencial que aparece después del VR-DRPI. Por su caracter fluctuante, el potencial inducido por TEA se asemeja al VR-DRPII.

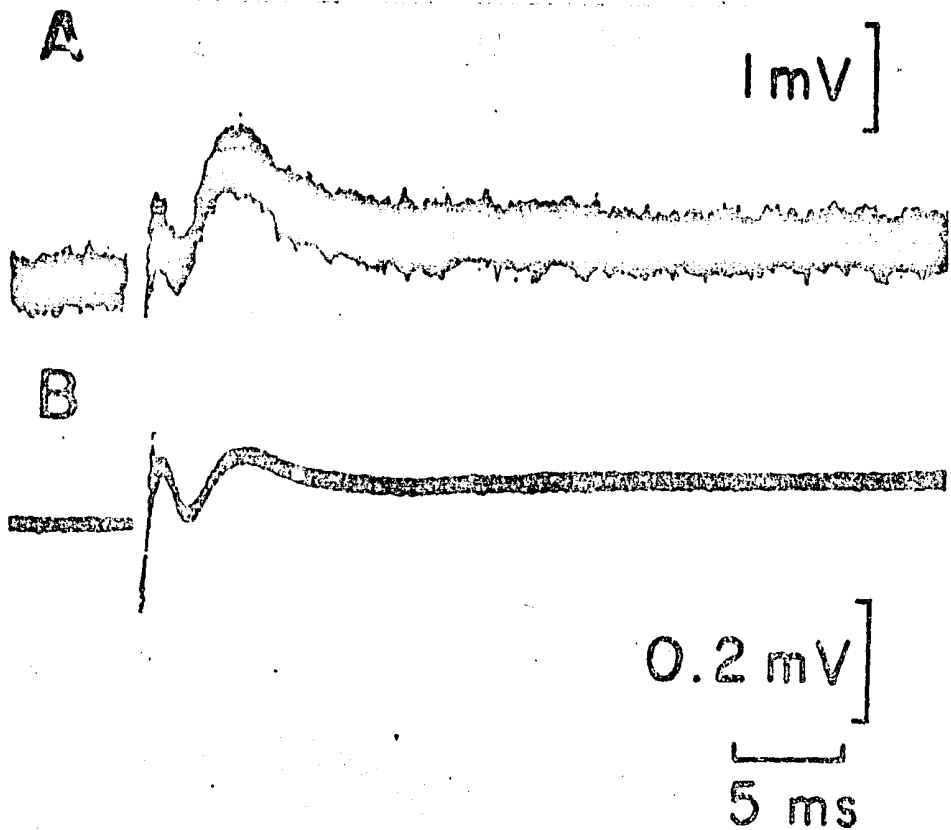


Figura 19.

Potenciales ortodrómicos de raíz ventral resistentes a la ausencia de Ca^{++} y a la presencia de Co^{++} en la solución de perfusión. La figura ilustra la semejanza en latencia y curso temporal del Ia-PPE eléctrico (trazo superior) registrado en una motoneurona y el DR-VRP eléctrico (trazo inferior) registrado en la raíz ventral del mismo segmento.

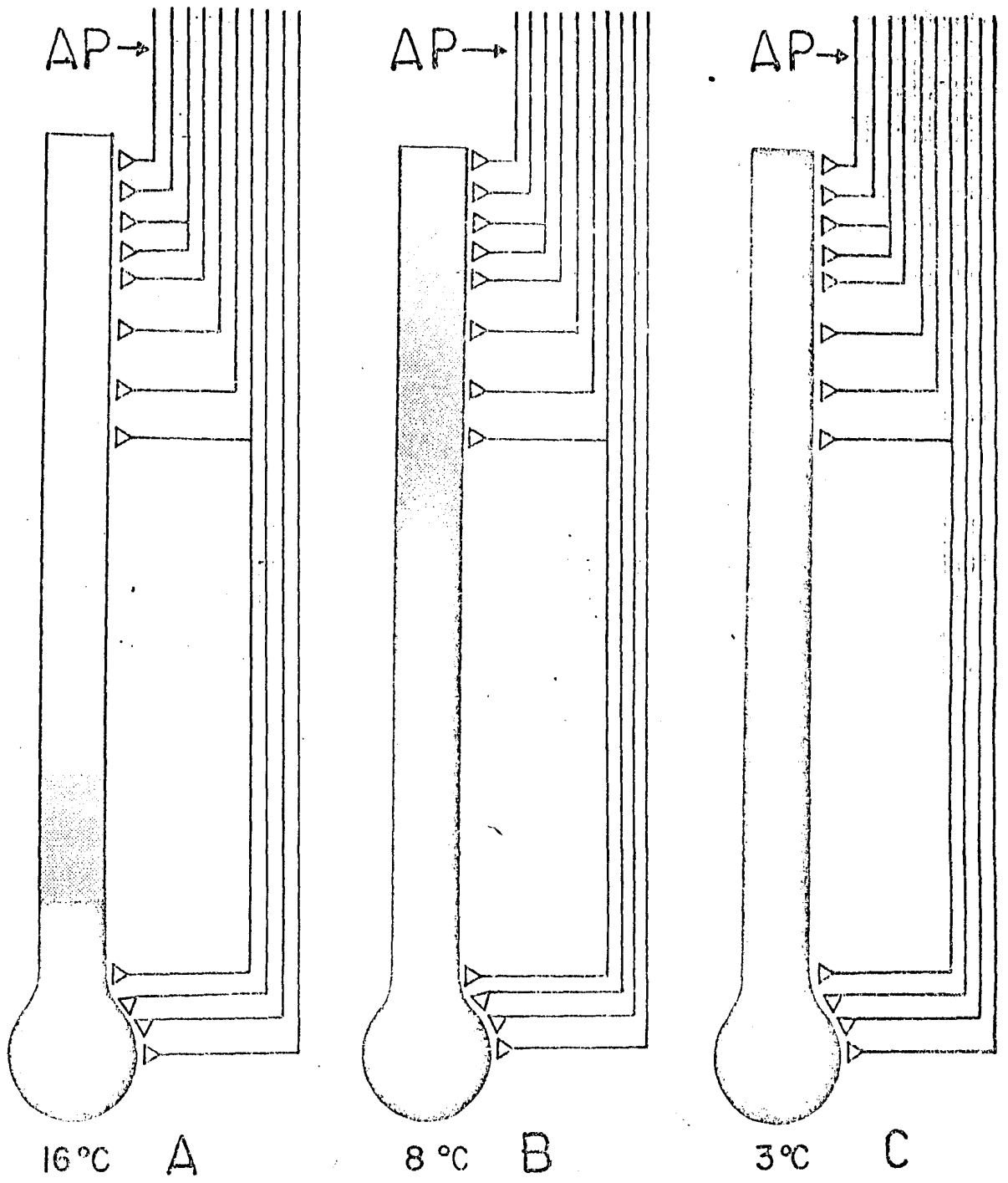


Figura 20