

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



Instituto de Fisiología Celular

**ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN SINÁPTICA EN NEURONAS  
ACOPLADAS ELÉCTRICAMENTE**

Tesis que para obtener el grado de  
"Doctor en Ciencias Biomédicas"

presenta:

M. en I. María Elizabeth García Pérez

Comité Tutorial:

Dr. Francisco Fernández de Miguel (Director de Tesis)  
Dr. Antonmaria Minzoni Alessio  
Dr. Ismael Jiménez Estrada

Ciudad Universitaria, Mayo de 2004.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

En este trabajo se analizaron algunos mecanismos que participan en la integración sináptica de neuronas de sanguijuela acopladas eléctricamente. Las neuronas de Retzius están acopladas por una sinapsis eléctrica no rectificante. Registros simultáneos realizados en el soma de estas células muestran potenciales postsinápticos excitadores (PSEs) que varían en amplitud y tiempo al pico. Las distribuciones de amplitud de actividad espontánea obtenidas en presencia de TTX [300nM] muestran que la amplitud miniatura de la respuesta sináptica es de  $0.37 \pm 0.07$  mV. Para analizar si la amplitud de la respuesta sináptica producida cerca a la sinapsis eléctrica depende del grado de acoplamiento de las células se combinaron los resultados obtenidos de registros electrofisiológicos y del análisis morfológico en un modelo computacional. Utilizando el modelo se encontró que las entradas presinápticas están localizadas a  $7.5 \mu\text{m}$  de la sinapsis eléctrica y se demostró que cuando se modula la impedancia dendrítica, el acoplamiento eléctrico modula la amplitud de los PSEs de modo tal que la amplitud de los potenciales miniatura es proporcional a la resistencia de acoplamiento. Por otro lado, se observó que la propagación de PSEs de una neurona a la otra, debida al acoplamiento eléctrico, afecta la integración local de cada neurona. Esto sucede cuando la liberación de neurotransmisor se realiza de manera sincrónica y muy cerca al soma de cada célula. En este caso, la suma de PSEs produce una joroba en la fase de caída. Si la liberación de transmisor se realizó cerca al acoplamiento eléctrico, la suma produce un incremento en amplitud en ambos potenciales sinápticos. Esto fue confirmado utilizando PSEs artificiales, obtenidos a través de inyecciones intracelulares de corriente y con predicciones hechas por el modelo. La principal conclusión de este trabajo es que la sinapsis

eléctrica al modular la amplitud y cinética de la respuesta sináptica, modula, de manera significativa, el patrón de disparo de las neuronas de Retzius de la sanguijuela.

## **ABSTRACT**

In this work, we analyzed some of the mechanisms of synaptic integration in electrically-coupled Retzius neurons of the leech. Retzius cells are electrically coupled by a non-rectifying synapse and, simultaneous somatic recordings show excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) of varying amplitudes and rise times. The amplitude distributions of spontaneous activity of both cells were analyzed in presence of TTX in order to obtain the miniature amplitude of synaptic responses, which was  $0.37 \pm 0.07$  mV. To explore if the amplitude of synaptic responses produced near the electrical synapse depends on the degree of electrical coupling we combined electrophysiological and morphological experiments with modeling. We first demonstrated that chemical synaptic inputs are located at  $7.5 \mu\text{m}$  from the electrical synapse. Then we showed that by modulating the dendritic impedance, electrical coupling modulated the amplitude of EPSPs, in such a way that the amplitude of miniature potentials was proportional to the coupling resistance. Electrical coupling allowed EPSPs produced in one Retzius neuron to spread to the other Retzius neuron. This affected local integration since when the synaptic transmitter was synchronously release near to both somata, summation of synaptic potentials produced a hump in their decay phase. If the synaptic input were produced near to the electrical coupling, summation produced an increase in amplitude in both EPSPs. Production of artificial EPSPs by intracellular injection of current in addition to predictions by a model based on the morphological and electrophysiological characteristics of the Retzius cells reproduced these integrative properties. We concluded that, by modulating the amplitude of synaptic responses and their kinetics, electrical coupling plays a significant role modulating the firing patterns of Retzius neurons.

*A mi familia*

## **Agradecimientos**

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonmaria Minzoni, por la paciencia y las enseñanzas que me dio en este tiempo. Al Dr. Ismael Jiménez por la confianza y consejos que siempre me dio. Y a mi tutor, el Dr. Fernández de Miguel por todo lo que aprendí estando en su laboratorio.

Agradezco a todos los miembros del laboratorio, particularmente a Bruno, por estar siempre dispuesto a dar una mano y a los que ya no están también, por todos los momentos divertidos que pasamos.

Gracias también a la Unidad de Cómputo, especialmente a Juan.

# Índice

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>7</b>
I.1.	Transmisión sináptica	9
I.1.1.	Transmisión eléctrica	10
I.1.2.	Transmisión química	16
I.1.3.	Interacción entre sinapsis eléctricas y químicas	21
I.2.	Integración sináptica	23
I.2.1.	Modelos eléctricos de las propiedades funcionales de la neurona	24
I.2.2.	Canales iónicos como conductores y baterías	24
I.2.3.	Resistencia membranal	27
I.2.4.	Resistencia interna de la membrana	27
I.2.5.	Constante de longitud	28
I.2.6.	Capacitancia de la membrana	29
I.2.7.	Constante de tiempo	30
I.2.8.	Suma de potenciales sinápticos	31
I.3.	El sistema nervioso central de la sanguijuela	34
I.4.	Planteamiento del problema	37
<b>II.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>43</b>
<b>III.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>IV.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>47</b>
IV.1.	Preparación y disección	48
IV.2.	Registro intracelular	48
IV.2.1.	Electrodos intracelulares	48
IV.2.2.	Registros simultáneos intracelulares de las células de Retzius	49
IV.2.3.	Generación de potenciales sinápticos artificiales	49



IV.2.4. Sistema de registro	50
IV.3. Análisis de datos	50
IV.4. Modelo eléctrico del acoplamiento de las neuronas de Retzius	51
<b>V. Resultados</b>	<b>53</b>
V.1. Propagación de potenciales sinápticos	54
V.2. Modulación de amplitud de PSEs	58
V.3. Integración sináptica en las neuronas de Retzius	65
<b>VI. Discusión</b>	<b>76</b>
<b>VII. Referencias</b>	<b>85</b>
<b>VIII. Artículos publicados</b>	<b>103</b>
<b>IX. Apéndice</b>	<b>122</b>

# **I. Introducción**

## **I. INTRODUCCIÓN**

El sistema nervioso central es un conjunto de células (neuronas) que continuamente recibe información, la analiza y toma decisiones. Para llevar a cabo esta tarea, el sistema nervioso central controla grandes redes de neuronas que procesan información en forma de señales eléctricas transmitidas de una célula a otra mediante conexiones sinápticas. Cada neurona recibe cientos y hasta miles de entradas sinápticas que pueden ser químicas o eléctricas, algunas de las cuales son inhibitoras y otras son excitadoras. La activación de estas entradas produce un cambio en el potencial de membrana de la neurona llamado potencial sináptico. La propagación eléctrica de los potenciales sinápticos se realiza interactuando con las propiedades activas y pasivas de los árboles dendríticos. La transformación de la actividad sináptica en potenciales de acción se conoce como integración sináptica (Yuste y Tang, 1996; Midtgaard, 1996). El proceso integrativo es fundamental para modificar la información que reciben las neuronas para posteriormente generar impulsos eléctricos. Existen claras evidencias de que muchas neuronas del sistema nervioso central, tanto de invertebrados como de vertebrados, están acopladas eléctricamente (Eccles, 1976; Dermietzel y Spray, 1993; Bruzzone y Ressot, 1997; Thurbon et al, 1998). Más adelante se revisarán algunas consecuencias de la integración sináptica en neuronas acopladas eléctricamente.

Las propiedades eléctricas de las membranas neuronales son básicas para entender la integración sináptica, ya que de estas depende en gran medida la propagación de los potenciales sinápticos (Nicholls et al, 2001). Algunas de estas propiedades serán descritas más adelante.

El objetivo de este trabajo fue analizar el proceso de integración sináptica en neuronas de sanguijuela acopladas eléctricamente. Analizamos la propagación de potenciales sinápticos excitadores a través de la sinapsis eléctrica de las células de Retzius y sus efectos funcionales. Estudiamos electrofisiológicamente algunas de las propiedades eléctricas de las membranas celulares, la amplitud y cinética de los potenciales sinápticos y la manera en que se integra toda esta información. Como una herramienta necesaria para complementar este estudio, valorando algunas observaciones y más adelante prediciendo otras, diseñamos un modelo eléctrico del acoplamiento de las células de Retzius, basado en parámetros medidos experimentalmente. Con él se fundamentaron diferentes hipótesis acerca del modo de integración de las células de Retzius, entre estas, la modulación de amplitud de los PSEs debida al acoplamiento dendrítico, además del efecto de la suma de PSEs en el proceso de integración.

En el primer capítulo se revisan algunos conceptos básicos relacionados con el tema de esta tesis.

### ***1.1. Transmisión sináptica***

El término "**sinapsis**" se refiere al punto de contacto entre neuronas. La comunicación entre células nerviosas se lleva a cabo mediante sinapsis y el proceso con el que se transfiere información de una célula a otra es llamado **transmisión sináptica**.

La transmisión sináptica puede involucrar a más de un mecanismo y tener diferentes efectos en una célula postsináptica. Así, la transmisión sináptica puede ser clasificada de formas diferentes (Delcomyn, 1998). Una clasificación se basa en la transmisión de información, que puede ser eléctrica o química. Esto será revisado más

adelante.

Dentro de la transmisión química existen dos tipos de transmisión sináptica, una llamada directa, realizada en canales ionotrópicos, donde el neurotransmisor liberado de la célula presináptica (puede ser más de uno en una sola sinapsis) tiene efecto inmediato al llegar al receptor: cambia su conformación, abre el canal de manera directa, los iones fluyen y el potencial de membrana cambia. La transmisión indirecta se lleva a cabo en receptores metabotrópicos y se realiza a través de segundos mensajeros. En este caso el efecto no es inmediato, siendo más lenta que la transmisión directa (Nicholls et al, 2001).

Otra clasificación se basa en su efecto postsináptico, que puede ser excitador o inhibidor. La transmisión excitadora provoca una despolarización en la célula postsináptica, con lo que se incrementa la probabilidad de disparo. La inhibidora, provoca hiperpolarización de la neurona postsináptica, alejando al potencial de membrana de su umbral de disparo.

### ***1.1.1. Transmisión eléctrica***

La **transmisión eléctrica** ocurre en **sinapsis eléctricas** donde las membranas pre y post sinápticas están suficientemente cerca y unidas por canales que conectan los fluidos intracelulares de las dos células. Esta cercanía permite a la corriente propagarse directamente del interior de una célula a otra, sin intermediación de un transmisor químico (Nicholls et al, 2001). El flujo de corriente en estas sinapsis ocurre a través de **uniones comunicantes** (gap junctions), formadas por canales iónicos que permiten el flujo de iones, agua y moléculas pequeñas de una neurona a otra (Loewenstein, 1981). Morfológicamente no es posible determinar cuál es la terminal



(Furshpan y Potter, 1959) como se muestra en la Figura 1, aunque en algunos casos los ensanchamientos de la membrana celular provocan un pequeño retardo. Cada hemiconexón está formado por 6 subunidades estructurales (proteínas) que en el caso de los animales vertebrados reciben el nombre de **conexinas** (Bruzzone et al, 1996; Goodenough et al, 1996), mientras que para los invertebrados son llamadas **inexinas** (Phelan et al, 1998). En el centro de estos conexones se forma el poro o canal a través del cual fluyen iones o algunos otros tipos de moléculas.

El conexón puede ser de dos tipos, homomérico, cuando las 6 subunidades que lo forman son de la misma conexina o heteromérico, formado por diferentes conexinas. De esta forma se obtienen 3 tipos de canales intercelulares, homotípicos (formado por dos hemiconexones homoméricos), heterotípicos (un hemiconexón formado por un solo tipo de conexina y el otro hemiconexón formado también por una sola conexina pero diferente a la de la otra mitad) y heteroméricos (dos hemiconexones heteroméricos).

El diámetro del poro formado por las dos células es de aproximadamente 1.5-2.0 nm (Goodenough et al, 1996; Perkins et al, 1997) y se ha calculado que estos canales tienen una conductancia unitaria que depende del tipo de conexina por el cual estén formados pero se ha calculado que varía desde 15 hasta 310 pS (White y Paul, 1999). Se sabe que los poros son poco selectivos, permitiendo el flujo de cationes, aniones y de diferentes moléculas con pesos moleculares menores a 1200 Da (Simpson et al, 1977). De hecho, los canales formados por esta sinapsis son lo suficientemente grandes para permitir el paso de componentes orgánicos de tamaño moderado como lo son los segundos mensajeros (Loewenstein, 1999). Por ejemplo, la conductancia unitaria del poro formado por conexina 37 es de 219 pS

(Veenstra et al, 1994) y para la conexina 43 se ha medido en 50 pS (Veenstra y DeHaan, 1988). Sin embargo, algunos experimentos han mostrado que la permeabilidad de algunas células que expresan diferentes tipos de conexinas, depende precisamente del tipo de conexinas que están formando al conexón (Veenstra, 1996; Elfgang et al, 1995). Por ejemplo, conexones homoméricos formados por la conexina 32 son permeables a AMP-cíclico así como a GMP-cíclico, mientras que algunos conexones heteroméricos, como los formados con conexinas 32 y 26 pierden permeabilidad al AMP-cíclico pero no al GMP-cíclico (para una revisión ver White y Paul, 1999).

La composición molecular de las uniones comunicantes es muy importante ya que de ellas depende la permeabilidad y por consiguiente, la función fisiológica del acoplamiento. Actualmente se han clonado 14 conexinas de ratón y al menos otras 6 de otros vertebrados (para una revisión ver White y Paul, 1999). En invertebrados, al menos 25 inexas han sido clonadas (para una revisión ver White y Paul, 1999) y recientemente dos más, en la sanguijuela, han sido clonadas: la inexas *Hm-inx1*, que se expresa en todas las neuronas del sistema nervioso, pero no en la glía, y la *HM-inx2*, que se expresa en la glía, pero no en neuronas (Dykes et al, 2004).

En resumen, las propiedades principales de las sinapsis eléctricas son (Kandel et al, 1995):

- a) la distancia entre ambas membranas es alrededor de 3.5 nm;
- b) existe continuidad citoplásmica entre las células;
- c) sus componentes ultraestructurales son poros o canales
- d) prácticamente no se observa retardo sináptico y
- e) la transmisión puede ser unidireccional (sinapsis **rectificante**) o bidireccional (sinapsis **no rectificante**).



Como se menciona en el último punto, existen dos tipos de sinapsis eléctricas: rectificante, donde la conducción de corriente encuentra menos resistencia en una dirección que en la otra (Nicholls et al, 2001), vista en el axón gigante del acocil (Furshpan y Potter, 1959) y no rectificante, donde el flujo de corriente en ambas direcciones es similar, como en el ganglio cardíaco del camarón (Watanabe, 1958) y de las células de Retzius de la sanguijuela, involucradas en la liberación de serotonina (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963). Existe otro tipo de sinapsis eléctrica no muy común llamada sinapsis **doblemente rectificante**, que permite el paso de corrientes positivas en cualquier dirección, pero las negativas sólo en una dirección. Como ejemplo de este tipo de sinapsis se encuentra el acoplamiento eléctrico de las células T (touch) de la sanguijuela (Baylor y Nicholls, 1969). La transmisión en sinapsis eléctricas es también llamada **transmisión electrotónica**.

Las uniones eléctricas presentan cierta resistencia al paso de corriente de una célula a otra, por lo que se ha modelado como una resistencia eléctrica llamada **resistencia de acoplamiento** ( $r_c$ ). El flujo de corriente a través de esta resistencia produce una atenuación de voltaje producido en la célula postsináptica. Con base en esto, se puede calcular la tasa de acoplamiento a ambos lados de una sinapsis eléctrica como:

$$\text{Tasa de acoplamiento} = \frac{V_2}{V_1}$$

La tasa de acoplamiento puede ser modulada por una gran cantidad de factores celulares, como el pH (Spray et al, 1991; Church y Baimbridge, 1991; Pérez Velázquez et al, 1994; Rörig et al, 1996), el voltaje (Wang et al, 1992; Moreno et al, 1994) y mecanismos de fosforilación (Lasater, 1987; De Vries y Schwartz, 1989; Kwak et al, 1995), dependiendo de la sinapsis.

Algunas de las funciones fundamentales donde se ha descrito que participan las sinapsis eléctricas son:

- a) Respuestas de escape (supervivencia del animal), donde se requiere de una velocidad de respuesta rápida y por ende, la contracción casi simultánea de grupos musculares. Algunos ejemplos donde las sinapsis eléctricas están involucradas en la respuesta de escape son: el acocil (Furshpan y Potter, 1959), la carpa dorada (Furshpan y Furukawa, 1962; Korn y Faber, 1976), el cangrejo (Zucker, 1972) y el pez cebra (Hatta y Korn, 1998).
- b) Sincronización, cuando se realiza un procesamiento en paralelo en varias neuronas. Como ejemplos, las sinapsis eléctricas sincronizando células se han encontrado en el ganglio cardíaco del camarón (Watanabe, 1958) y en el pez gato eléctrico (Bennet et al, 1967). En la retina, las sinapsis eléctricas se han estudiado en conejos (Bloomfield et al, 1995), gatos (Kolb y Nelson, 1996), tortugas (Piccolino et al, 1982), monos (Packer y Dacey, 2002), etc.
- c) Refinamiento de los campos visuales en la retina, cuando el tamaño del campo receptivo depende de cuanto se extiende el acoplamiento eléctrico de las células horizontales.

Se ha demostrado también transmisión eléctrica en el sistema nervioso central de mamíferos, por ejemplo, en la oliva inferior del cerebelo de gatos donde las neuronas están conectadas eléctricamente (Llinás et al, 1974). Sin embargo, existe una nueva hipótesis de que el acoplamiento eléctrico no sólo sincroniza, sino que también es esencial para generar oscilaciones de tipo subumbral. Por ejemplo, diferentes tipos de actividad rítmica en neuronas parece estar asociado con funciones esenciales del sistema nervioso como atención, percepción, aprendizaje y sueño (Llinás, 1991; Yarom, 1991; Sherman y Rinzel, 1992; Lampl y Yarom, 1997; Manor et al, 2000).

En la corteza motora sensorial de monos y ratas (Sloper, 1972; Peinado et al, 1993) el acoplamiento eléctrico transitorio en la corteza en desarrollo participa en la comunicación de señales intercelulares, incluyendo actividad eléctrica subumbral, habilitando así la coordinación temporal de neuronas durante la formación de circuitos.

En el hipocampo de la rata (Fukuda y Kosaka, 2000) existe una red de interneuronas GABAérgicas que forman una densa capa de dendritas orientadas lateralmente, que está ligada a otra capa mediante sinapsis eléctricas. La red dendrítica es tan amplia que parece abarcar a todo el hipocampo. Adicionalmente, la misma población neuronal está conectada por sinapsis químicas axosomáticas. Los autores demostraron que esta red neuronal mixta no está restringida solamente al hipocampo, sino que parece ser también una estructura fundamental de la corteza cerebral y puede participar en la sincronización de la actividad de diversas redes neuronales.

### ***1.1.2. Transmisión química***

En la placa neuromuscular la sinapsis se forma entre la terminal de una neurona motora y una fibra muscular. Estructuralmente (Peters et al, 1991), una sinapsis contiene una zona activa, electro-densa, donde las membranas pre y post-sináptica están separadas por un espacio sináptico de entre 20 y 40 nm de espesor (ver Figura 2).

La llegada de un potencial de acción a una terminal presináptica desencadena una serie de eventos bioquímicos que producen la liberación de neurotransmisor en el espacio sináptico. Cuando el neurotransmisor llega a la terminal postsináptica, los receptores acoplados a canales se abren, de modo que los iones en la célula postsináptica provocan un cambio en el potencial de membrana de la

célula, llamado potencial postsináptico. El potencial postsináptico puede ser excitador o inhibitor, dependiendo de los iones que fluyan por el canal (Zucker et al, 1999).



**Figura 2. Estructura general de una sinapsis química. Las flechas marcan dos diferentes zonas activas, donde se observan la zona electrodensa, las membranas pre y post sinápticas, el espacio sináptico y las vesículas claras. También se observan algunas mitocondrias (tomado de Jones y Cowan, 1983).**

A diferencia de las sinapsis eléctricas, en las químicas no existe continuidad entre las neuronas pre y postsinápticas. De hecho, el espacio sináptico entre ambas membranas es de 20 a 40 nm. La membrana celular está morfológicamente especializada en el sitio de la sinapsis. Las terminales presinápticas contienen cantidades discretas de vesículas sinápticas, cada una de las cuales contiene miles de moléculas de neurotransmisores que son liberadas como se explicó anteriormente. Todos esos pasos colaboran al retardo sináptico en las sinapsis químicas, aunque principalmente se debe a la apertura de los canales de calcio presinápticos, retardo que regularmente es más o menos de varios milisegundos, pero también puede ser tan pequeño

como 0.3 ms. Existen dos tipos de vesículas en las terminales sinápticas, las claras y las de núcleo denso. Ambas contienen neurotransmisores, pero las de núcleo denso almacenan, además, algunos péptidos.

En resumen, las características morfológicas generales de la sinapsis química son (Peters et al, 1991; Figura 2):

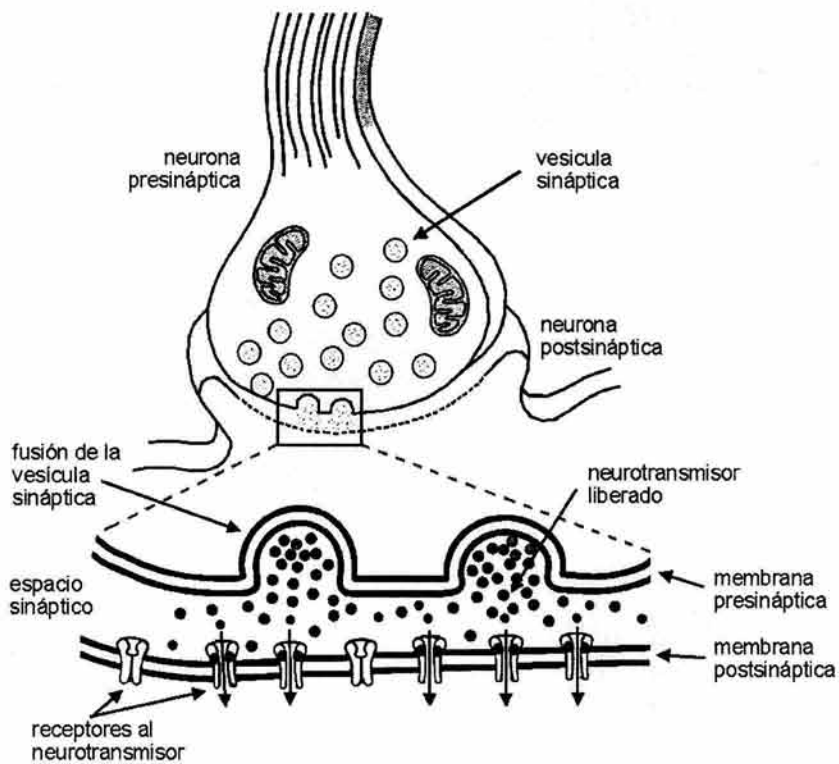
- a) la presencia de vesículas en el citoplasma de la terminal presináptica, algunas de ellas asociadas o muy cercanas a la membrana presináptica;
- b) zonas densas o engrosamiento de membranas en ambas terminales (aunque no siempre se observan);
- c) mitocondrias en el interior de la terminal presináptica.

La figura 3 muestra un esquema de la sinapsis química con algunas de las características mencionadas y la Tabla 1 resume algunas diferencias entre las sinapsis químicas y eléctricas.

### **Teoría cuántica de la liberación de transmisor**

La **sinapsis química** más y mejor estudiada es la **unión neuromuscular**, que conecta neuronas motoras y fibras musculares. El neurotransmisor en la unión neuromuscular es la ACh y cuando llega a la terminal postsináptica provoca un potencial sináptico seguido por un potencial de acción, con lo que se da la contracción del músculo. El estudio de la liberación de ACh en la unión neuromuscular desarrolló toda una teoría llamada la **teoría cuántica de liberación**, propuesta por Del Castillo y Katz (1954).

La idea básica de esta teoría es que el neurotransmisor es liberado de la terminal presináptica en unidades discretas llamadas **cuantos**. Un cuanto es la cantidad de neurotransmisor almacenado en una vesícula presináptica (Del Castillo y Katz, 1954).



**Figura 3. Esquema de una sinapsis química**

**Tabla 1. Diferencias entre sinapsis eléctricas y químicas.**

<b>Tipo de sinapsis</b>	<b>Distancia entre membranas</b>	<b>Continuidad entre membranas</b>	<b>Componentes ultraestructurales</b>	<b>Agente de transmisión</b>	<b>Retardo sináptico</b>	<b>Dirección de la transmisión</b>
<b>Eléctrica</b>	3.5 nm	Si	Uniones comunicantes	Corriente iónica	Ausente	Rectificante, no rectificante, doblemente rectificadora
<b>Química</b>	20-40 nm	No	Vesículas presinápticas y zonas activas; receptores postsinápticos	Transmisores químicos	0.3-5 ms o más	Rectificadora

Cuando un cuanto es liberado, cada paquete genera una pequeña señal postsináptica (un potencial postsináptico miniatura). En la actualidad existen evidencias de la naturaleza cuántica de la liberación de transmisores tanto en sinapsis periféricas como centrales de vertebrados e invertebrados (Cathala et al, 2003; Conti y Lisman, 2003; Cooper et al, 2003; Sokolov et al, 2003; Viele et al, 2003).

El modelo cuántico supone la presencia de un número discreto  $n$  de paquetes o cuantos de transmisor, que tienen una probabilidad  $p$  de ser liberados. El número promedio de cuantos liberados por impulso ( $m$ ) en una serie de intentos esta dado por:

$$m = np$$

Si la probabilidad promedio de liberación permanece constante, la frecuencia relativa de 0, 1, 2, 3,...,x liberaciones en una serie de intentos está dada por los términos de la expansión binomial:

$$(p + q)^x$$

donde  $q = 1 - p$  es la probabilidad promedio de que no se libere ningún cuanto (**fallas**). La probabilidad de que  $x$  cuantos sean liberados ( $p_x$ ) esta dada por:

$$p_x = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x q^{n-x}$$

expresada por una **distribución binomial**. Si la probabilidad de liberación es baja ( $p \rightarrow 0$ ) y el número de paquetes es grande ( $n \rightarrow \infty$ ), entonces la expresión binomial adquiere su forma límite, llamada **distribución de Poisson**, donde:

$$p_x = \frac{e^{-m} m^x}{x!}$$

Bajo estas circunstancias, la frecuencia relativa  $x$  (donde  $x=0, 1, 2, 3, \dots, n$ ) cuantos por estímulo en una serie de observaciones se puede predecir a partir de  $m$ , que es medible experimentalmente, en

contraste con la distribución binomial que requiere la determinación de  $n$  y  $p$  (Johnson y Wernig, 1971). Esto ha permitido predecir el comportamiento cuántico en diversas terminales en experimentos en los que se aumenta la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  o se disminuye la concentración de  $Ca^{2+}$ , con lo que se reduce la probabilidad de liberación (Del Castillo y Katz, 1954).

La naturaleza cuántica del proceso de liberación de transmisor influye en la integración a nivel de las dendritas. Las vesículas sinápticas contienen cantidades constantes de neurotransmisor, pero la amplitud del potencial postsináptico está definida por la terminal postsináptica. En otras palabras, factores como la cantidad de neurotransmisor que es capaz de llegar a los receptores o el número de receptores disponibles en la membrana postsináptica son los que determinan la amplitud de la respuesta cuántica. Adicionalmente, cuando las sinapsis químicas se encuentran interactuando con sinapsis eléctricas (esto se revisa en la siguiente sección) y dependiendo de su posición relativa, estas podrían afectar la amplitud del cuanto, sobre todo si se encuentran muy cercanas unas de otras. Este será un punto importante para analizar en los resultados de esta tesis.

### ***1.1.3. Interacción entre sinapsis eléctricas y químicas***

Existe una gran cantidad de evidencia experimental sobre la coexistencia de sinapsis eléctricas y químicas en el sistema nervioso de mamíferos (Bennett, 1977; Bosch, 1990; Peters et al, 1991; Sotelo y Korn, 1978; Survhev, 1992). La presencia de este tipo de interacciones de manera combinada ocasionaría una integración sináptica más compleja de la que ocurriría en ausencia de la sinapsis eléctrica.

Como ya se ha mencionado, las uniones eléctricas pueden ser



moduladas químicamente por transmisores, por mensajeros intracelulares o por cambios en la concentración interna de calcio o del pH, dependiendo de la sinapsis. Si la modulación de sinapsis químicas entre neuronas es un mecanismo fundamental que habilita al sistema nervioso central a responder a cambios inesperados, entonces la regulación de interacciones eléctricas y químicas a través de uniones eléctricas es importante, no sólo para el desarrollo del sistema nervioso, sino también para la modulación de la sincronización del disparo neuronal.

La sinapsis mixta fue descubierta por primera vez en el ganglio ciliar de aves (Martin y Pilar, 1963). Sin embargo, es frecuente que las neuronas postsinápticas reciban entradas sinápticas eléctricas y químicas. Por ejemplo, en la célula de Maüthner de los peces, convergen entradas de origen químico y eléctrico (Lin y Faber, 1988a, b).

Otro ejemplo de sinapsis mixta ha sido encontrado en la retina de la salamandra (Brivanlou, et al, 1998), donde pares de células ganglionares comparten una entrada excitatoria glutamatérgica que proviene de la misma célula bipolar. También comparten entradas del mismo fotorreceptor a través de células bipolares intermedias. La transmisión química en las células amácrinas generalmente es inhibitoria, pero estas mismas células también forman sinapsis eléctricas con células ganglionares, a través de las cuales generan excitación eléctrica. En los ganglios de la sanguijuela, tres células sensoriales de diferente modalidad convergen en una motoneurona con la que forman sinapsis químicas y eléctricas (Nicholls y Purves, 1972). También en cada ganglio de la sanguijuela existe un par de células de Retzius acopladas eléctricamente (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963), que permiten el flujo de potenciales sinápticos de

origen químico de una neurona a la otra (De-Miguel et al, 2001). El trabajo reportado en esta tesis está desarrollado en este par de células.

## ***1.2. Integración sináptica***

El término integración se refiere a la suma de las entradas excitadoras e inhibitoras que recibe y la síntesis de una nueva señal de salida (Nicholls et al, 2001). El conocimiento de las propiedades electrotónicas de la neurona nos permite entender como se lleva a cabo la integración sináptica. Varias propiedades intrínsecas de las neuronas intervienen en la propagación de los potenciales sinápticos y serán analizadas a continuación.

Los potenciales sinápticos propagados pasivamente a lo largo de las dendritas reducen su amplitud conforme se alejan del sitio de origen (Hodgkin y Rushton, 1946; Jack et al, 1975). Esta propiedad se aplica de igual manera tanto a potenciales sinápticos excitadores (PSEs) como a inhibidores (PSIs), así que sólo haré referencia a los primeros.

La amplitud de un PSE en una sinapsis está determinada por el flujo neto de iones positivos (cambio de voltaje) hacia el interior de la célula, a través de canales iónicos y por la resistencia de entrada de la dendrita. La amplitud del PSE registrado en cualquier sitio de la membrana depende de cuanta corriente llegó a ese lugar. Existen tres factores particularmente importantes que influyen en la pérdida de amplitud de los PSEs: la resistencia de la membrana al paso del ion, la resistencia del ion al fluir dentro de la célula y la capacidad de la membrana para almacenar la carga (Hodgkin y Huxley, 1952; Jack et al, 1975). Cada uno de estos parámetros eléctricos puede ser medido o calculado como se describe en la siguiente sección.

### ***1.2.1. Modelos eléctricos de las propiedades funcionales de la neurona***

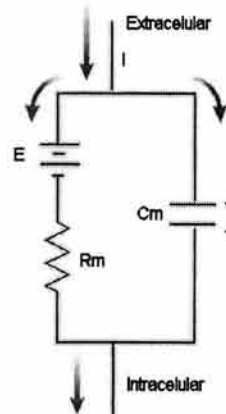
El **modelo eléctrico de la membrana**, también llamado circuito equivalente, es un sencillo modelo matemático derivado de circuitos eléctricos que representa a las tres características eléctricas principales de una neurona: los canales iónicos, los gradientes de concentración de los iones, y la habilidad de la membrana para almacenar carga. En este modelo, las propiedades funcionales de una neurona pueden ser representadas por un circuito eléctrico formando por resistencias, baterías y capacitores como el que se muestra en la figura 4. El primer paso al desarrollar el modelo es relacionar las propiedades físicas discretas de la membrana a sus propiedades eléctricas y esto se explica a continuación.

### ***1.2.2. Canales iónicos como conductores y baterías***

Como ya se ha mencionado, la bicapa lipídica de la membrana es un mal conductor de corriente pues no es permeable a iones. Gracias a los canales iónicos que atraviesan la membrana, los iones pueden moverse a través de la membrana. En el circuito equivalente (ver figura 4), cada canal se puede representar como una resistencia, de tal manera que el flujo de corriente a través del canal se puede calcular utilizando la ley de Ohm:

$$V = R_m I$$

donde:  $V$  es el voltaje;  
 $R$  es la resistencia;  
 $I$  es la corriente.



**Figura 4. Modelo eléctrico de la membrana. La fuente  $E$  representa el potencial de equilibrio de los diferentes iones, la  $R_m$  representa la resistencia (o conductancia  $G=1/R_m$ ) de los canales de la membrana y  $C_m$  representa la capacitancia de la bicapa lipídica para almacenar cargas.**

Típicamente, los canales son descritos en términos de su conductancia ( $G=1/R$ ), porque esto nos da una medida directa de la eficiencia del canal en la conducción de iones ante un intervalo de voltajes. Como la conductancia es inversamente proporcional a la resistencia, su expresión de acuerdo con la ley de Ohm es:

$$I = VG$$

La conductancia de una membrana (o de un solo canal) a un ion es similar a la permeabilidad de la membrana (o del canal) pues ambas medidas nos dicen con que facilidad el ion cruza hacia el interior. Estrictamente, la permeabilidad se define como la facilidad con que un ion puede cruzar una unidad de área de membrana, expresada en centímetros por segundo. Incrementando la permeabilidad de la membrana a un ion particular, se incrementa también la conductancia eléctrica (Amperes/Volts). La combinación de todas las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana determina el potencial de reposo. El potencial de equilibrio de un ion se puede conocer a partir de sus concentraciones a ambos lados de la membrana aplicando la ecuación de Nernst:

$$E_i = (RT/zF) \ln ([I]_o/[I]_i)$$

donde  $E_i$  es el potencial de equilibrio del ion; R es la constante de los gases; T es la temperatura en grados Kelvin; z es la valencia del ion; F es la constante de Faraday;  $[I]_o$  es la concentración iónica extracelular y  $[I]_i$  es la concentración iónica intracelular.

Este principio permite realizar el cálculo del potencial de membrana en cualquier momento (tiempo), pero si se quiere considerar también las concentraciones y permeabilidades de otros iones, se debe utilizar la ecuación de Goldman, Hodgkin y Katz (Hodgkin y Katz, 1949; Hille, 2001), que se basa en la ecuación de Nernst y que considera el gradiente de concentración y la permeabilidad de la membrana para cada ion ( $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$ ):

$$E_m = 58 \log ((P_{Na}[Na]_o + P_{K}[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i) / (P_{Na}[Na]_i + P_{K}[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o))$$

donde P es la permeabilidad de cada ion y el resto de los parámetros son los mismos que para la ecuación de Nernst.

En términos eléctricos se puede representar a un potencial eléctrico (E; Figura 4) como una batería. Dado que una célula tiene diferentes tipos de canales se necesita una combinación de conductores en serie con baterías para representar a la conductancia total. Sin importar el tipo de canal del que se trate, todos pueden ser modelados de esta manera, así que podemos tener la representación eléctrica de los canales de potasio, cloro y sodio.

Además de la batería y la conductancia, otra propiedad eléctrica pasiva de la neurona es la capacitancia, que se define más adelante. La capacitancia membranal puede ser incorporada en el circuito equivalente quedando como el de la figura 4.

### ***I.2.3. Resistencia membranal***

La **resistencia membranal** ( $r_m$ , Rall, 1964, 1967; Rall et al, 1967) es una medida de la oposición al flujo de corriente transmembranal (Jack et al, 1975). Como los iones cruzan a través de canales, los canales cerrados presentan una barrera para el flujo de iones y producen una resistencia membranal muy grande. Mientras mayor sea el número de canales abiertos, menor es la resistencia membranal y viceversa. Cada célula tiene una densidad característica de canales por lo que la resistencia de membrana de cada célula es diferente. Incluso en la misma célula, la resistencia puede cambiar. De la resistencia membranal depende en parte la caída en amplitud del PSE a lo largo de las dendritas, si la resistencia es baja, más rápidamente decae el PSE. La resistencia membranal se define como:

$$r_m = \frac{R_m}{2\pi r} \quad [M\Omega\text{cm}]$$

donde:  $R_m$  es la resistencia específica de la membrana y  $r$  es el radio.

### ***I.2.4. Resistencia interna de la membrana***

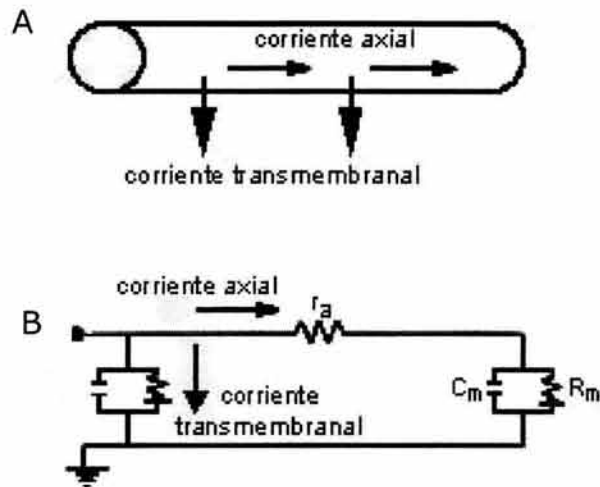
Otra propiedad eléctrica que afecta la propagación de un PSE y por lo tanto, la integración, es la **resistencia axial** (o longitudinal, Rall, 1964, 1967; Rall et al, 1967) del citoplasma ( $r_a$ ). Se define como:

$$r_a = \frac{R_i}{\pi r^2} \quad \left[ \frac{\Omega}{\text{cm}} \right]$$

donde:  $R_i$  es la resistencia intracelular. La figura 5 muestra una representación eléctrica de la resistencia axial.

Una resistencia axial muy grande favorece que los iones fluyan hacia afuera (el lugar con menos resistencia), a través de la resistencia membranal provocando que el potencial decaiga muy cerca al sitio

donde fue generado. En el caso contrario, si la resistencia es baja, los iones pueden fluir a lo largo del interior de las dendritas, recorriendo una distancia mayor.



**Figura 5. Resistencia axial de la membrana. A. Representación esquemática de un axón. Se muestra el flujo de corriente axial (longitudinal) y la corriente transmembranal. B. Representación eléctrica de A. Se muestra la representación de la membrana como un circuito RC y la resistencia al flujo axial de corriente, representado como  $r_a$  (modificado de Johnston and Wu, 1995).**

### ***1.2.5. Constante de longitud***

Los parámetros definidos anteriormente se asocian en la **constante de longitud** (o de espacio). La distancia que un PSE puede recorrer a lo largo de una dendrita antes de caer al 37% ( $1/e$ ) de su amplitud original es la constante de longitud, definida como:

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i}} \quad [\mu\text{m}]$$

donde:  $r_m$  es la resistencia de la membrana y  
 $r_i$  es la resistencia interna de la membrana.

Si  $r_m$  es grande, entonces  $\lambda$  es grande y el PSE puede propagarse lejos porque muy pocos iones se están perdiendo a través

de la membrana. Si  $r_m$  es pequeña, entonces habrá una fuga sustancial de iones y  $\lambda$  se vuelve pequeña. Con respecto a  $r_a$ , si su valor es muy grande, como se ha encontrado en axones con diámetros internos pequeños, no permite el paso de iones y entonces la constante de longitud se vuelve pequeña. En el caso contrario, el PSE puede propagarse sin problema y  $\lambda$  se vuelve grande. Las constantes de espacio varían desde cientos de micrómetros hasta milímetros. La longitud real de un cable, definida en términos de  $\lambda$ , es una unidad adimensional, definida como:

$$L = \frac{\ell}{\lambda}$$

llamada longitud característica o electrotónica (Rall, 1969). Este parámetro es importante porque, para efectos de modelado,  $L$  puede ser usado para reducir un árbol de dendritas a un solo cable (o cilindro equivalente) de diámetro  $d$ . Por ejemplo, si se tienen varias dendritas, cada una con diferente longitud y diferente constante de tiempo, la suma de la longitud característica de cada dendrita, será la longitud característica del cable final.

### ***1.2.6. Capacitancia de la membrana***

La **capacitancia de la membrana** ( $c_m$ , Rall, 1964, 1967; Rall et al, 1967) es otra propiedad eléctrica pasiva. Dado que la membrana puede almacenar cargas a ambos lados de ella, se comporta como un capacitor. Como las membranas tienen más o menos el mismo grosor, entonces la diferencia en capacitancia entre células depende fundamentalmente de su área. Si la membrana es grande se tiene una gran capacidad de almacenar carga. En cambio si la superficie membranal es pequeña se almacenan unos cuantos iones y los demás pueden fluir a lo largo de las dendritas. Formalmente, la capacitancia



(medida en Faradios) se define como:

$$c_m = \frac{q}{V} \quad [F]$$

donde:  $q$  es la carga y  
 $V$  es el voltaje.

Y la corriente a través de un capacitor se define como:

$$i_c = c_m \frac{dV}{dt}$$

donde:  $\frac{dV}{dt}$  es el cambio de voltaje en el capacitor (o en la membrana) con respecto al tiempo. El valor típico de capacitancia específica ( $C_m$ ) para cualquier célula es de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Como se puede observar de la ecuación anterior, la cantidad de carga almacenada por la membrana afecta la amplitud de un PSE en un lugar particular y afecta también su curso temporal.

### ***1.2.7. Constante de tiempo***

De la resistencia y capacitancia membranal se desprende otro parámetro que interviene en la propagación de PSEs, la **constante de tiempo** ( $\tau$ ), definida como el tiempo que tarda un voltaje en caer al 37% de su valor inicial. Esta constante depende de  $r_m$  y  $c_m$ , de modo que:

$$\tau = r_m c_m = R_m C_m$$

donde  $R_m$  y  $C_m$  son la resistencia y capacitancia específica de la membrana, respectivamente.

La resistencia membranal específica puede variar mucho de célula a célula, pero no la capacitancia específica, que como ya se mencionó, se considera de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , por lo que las variaciones en la resistencia son las que contribuyen más a los cambios en la constante

de tiempo.

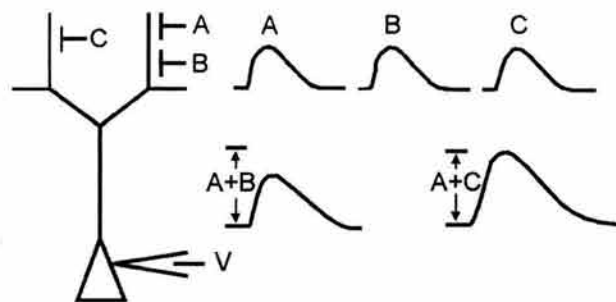
### ***1.2.8. Suma de potenciales sinápticos***

Las propiedades eléctricas de la membrana así como las propiedades pasivas de cable son importantes para entender la función de las dendritas y el modo en que los PSEs se propagan. Todos esos mecanismos, ya descritos, forman parte de los efectos pre-sinápticos participantes en una sinapsis. La suma de potenciales sinápticos es el efecto postsináptico combinado de dos o más entradas presinápticas. En muchas neuronas, la amplitud de un solo PSE es menor al umbral de excitación de la célula postsináptica, de tal manera que por sí mismo no puede generar un potencial de acción. Sin embargo, los PSEs se pueden sumar con otros y alcanzar el umbral en el sitio de generación del disparo. Cuando diferentes sinapsis son activadas simultáneamente, la despolarización resultante depende en parte del tipo de suma que se realiza. Existen dos tipos de suma de potenciales sinápticos que a continuación se describen.

#### **Suma espacial**

La suma espacial ocurre cuando PSEs subumbral se producen simultáneamente en diferentes puntos a lo largo de la membrana postsináptica, combinándose para producir una despolarización que alcanza el umbral de excitación generando un potencial de acción. Por otro lado, si los PSEs se combinan con PSIs se pueden cancelar y al no alcanzar el umbral, no se genera el potencial de acción. En general, la suma de PSEs es no lineal y esto depende en parte del cambio en la fuerza iónica durante la respuesta sináptica sumada. La fuerza iónica o fuerza impulsora del ion es un índice de la fuerza con que un ion tiende a moverse. Esta fuerza es la diferencia entre el potencial de membrana

y el potencial de equilibrio del ion, por lo que esta fuerza influye en la suma de PSEs cuando son generados en la misma dendrita, ya que el primer PSE modifica el potencial de membrana de la célula, afectando así la suma del segundo PSE al cambiar el potencial de membrana de la célula. Por otro lado, la suma de PSEs también depende de la distancia electrotonica que hay entre las entradas. Esto quiere decir que la suma espacial está directamente influenciada por el valor de la constante de longitud, que determina qué tan efectivas pueden ser las sinapsis lejanas. Por ejemplo, la cantidad resultante de una suma, vista en el soma, de dos entradas sinápticas localizadas en diferentes dendritas, será mayor que la suma de dos entradas en la misma dendrita. La figura 6 muestra un ejemplo de esto.

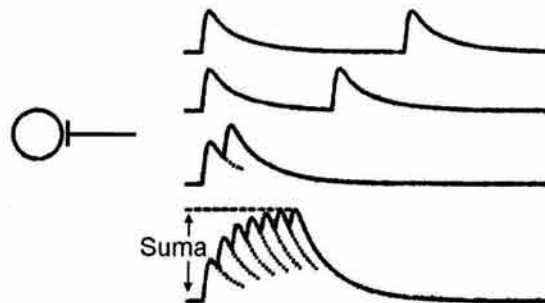


**Figura 6. Suma espacial (no lineal) con sinapsis en la misma y en diferentes dendritas. En general,  $A+C$  producen una suma más grande que  $A+B$ . (Tomado de Johnston y Wu, 1995).**

### Suma temporal

Este tipo de suma de entradas sinápticas se realiza en la misma dendrita, por potenciales que no son generados de manera sincrónica. La suma temporal se refiere a la suma de potenciales producidos por la misma entrada o por entradas muy cercanas activadas a diferentes tiempos. Esta suma está en función de la constante de tiempo, mientras más larga sea, más tiempo tarda en caer el potencial y por lo tanto, tiene más probabilidad para sumarse con otras entradas que se

generen después. Esto se muestra en a figura 7.



**Figura 7. Suma temporal de entradas sinápticas.** La suma de todas las estimulaciones recibidas en la misma dendrita es observada en el soma como se muestra en el último panel de la figura (Tomado de Johnston y Wu, 1995).

### **Fenómenos lineales y no lineales**

Las neuronas reciben miles de entradas sinápticas en complicados árboles dendríticos. Si consideramos solamente las propiedades pasivas, se puede predecir que los PSEs producidos en sitios cercanos al soma tienen, al ser registrados, cinéticas más rápidas y amplitudes mayores que aquellos generados en entradas lejanas. Esta atenuación dependiente de la posición se debe a la estructura del cable dendrítico, que filtra las ondas de voltaje. Estudios realizados en los años 70's (Jack et al, 1975; Iansek y Redman, 1973), muestran que para entradas sinápticas pequeñas, los árboles dendríticos se comportan principalmente como cables con propiedades pasivas. Sin embargo, en años recientes se ha incrementado la cantidad de evidencias que muestran que algunas dendritas no conducen de manera puramente pasiva, sino que están dotadas con una variedad de conductancias activas distribuidas a lo largo de los ejes dentro-somáticos (Stricker, 2002). Entre ellas se encuentran conductancias que proveen o eliminan cargas (para una revisión, ver Johnston et al, 1996).

El análisis *in vivo*, de potenciales sinápticos de motoneuronas, muestran potenciales que al ser sumados resultan menores de lo esperado (Burke, 1967; Kuno y Miyahara, 1969). Esta discrepancia es descrita como interacciones sublineales entre sinapsis cercanas. Sin embargo, *in vitro*, las células del hipocampo se suman linealmente (Langmoen y Andersen, 1983). Paradójicamente, en células piramidales del hipocampo, las conductancias activas en las dendritas contribuyen a la suma lineal de las entradas sinápticas (Cash y Yuste, 1999), donde esta "linealidad activa" se puede predecir con la teoría de cable y reconcilia los experimentos realizados *in vivo* con aquellos *in vitro*.

### ***1.3. El sistema nervioso central de la sanguijuela***

A través de los años, la sanguijuela ha ocupado un lugar importante en la medicina. Su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades inició a suscitar gran interés en la Biología contemporánea, estimulando el estudio de su reproducción, desarrollo y anatomía.

La organización del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* ha sido ampliamente estudiada (Müller et al, 1981). Tanto su cuerpo como su sistema nervioso central están rigurosamente segmentados y consisten de un número de unidades repetidas a todo lo largo del animal. Está formado por una cadena de 21 ganglios casi idénticos, cada uno conteniendo alrededor de 400 células. Cada ganglio inerva un segmento de piel formado por 5 anulos. El anulo central de cada segmento está marcado por terminales sensoriales que responden al tacto y a la luz.

La apariencia morfológica repetida, de ganglio a ganglio, en conjunto con el tamaño de las células hace que el sistema nervioso de

la sanguijuela sea ideal para estudiar la función de cada célula o para estudiarlas electrofisiológicamente. Otra característica importante del sistema central de la sanguijuela es que muchas de las células pueden ser identificadas, ya sea por su forma o por su posición en el ganglio. Adicionalmente, cada tipo de célula tiene un patrón de disparo característico, que permite confirmar la identificación visual cuando son registradas intracelularmente (Müller et al, 1981).

Las células de la sanguijuela están divididas en diferentes grupos: sensoriales, motoras, interneuronas y células neurosecretoras.

El limitado repertorio de movimientos relativamente simples de la sanguijuela, es llevado a cabo por grupos neuronales que controlan diferentes grupos de músculos. Los músculos de la sanguijuela están organizados en tres capas principales, los músculos circulares, los oblicuos y los longitudinales. Las neuronas sensoriales de cada ganglio distinguen entre estímulos táctiles ligeros (células T), a presión (células P) y a estímulos dolorosos (células N).

Las células motoras, más de 20 pares en cada ganglio, soportan a los grupos de músculos que hacen que el cuerpo de la sanguijuela se aplane, se alargue o comprima.

Adicionalmente, cada ganglio contiene un par de células de Retzius, llamadas así por el anatomista que las descubrió. Estas células se pueden distinguir fácilmente por su tamaño (entre 40 y 120  $\mu\text{m}$ ) y posición en el ganglio. Contienen más del 50% de la serotonina del sistema nervioso de la sanguijuela y participan en diversas funciones, como secreción de glándulas mucosas de la piel, modulación tónica del nado y relajación de músculos longitudinales (Lent, 1973; Mason y Leake, 1978; Mason et al, 1979; Muller et al, 1981, Brodfhuerer et al, 1995; Szczupak y Kristan, 1995).

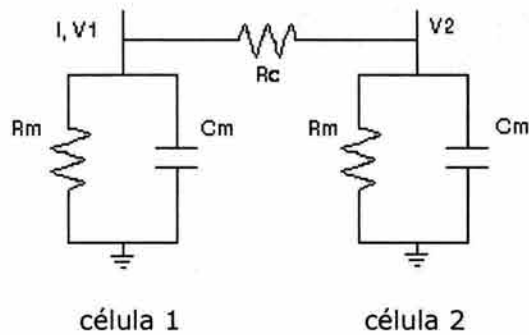
Las células de Retzius están acopladas por una sinapsis eléctrica

no rectificante (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963, French y DiCaprio, 1975), lo que permite a los PSEs viajar de un lado a otro de la sinapsis e intervenir en el proceso de integración de la célula vecina (De-Miguel et al, 2001).

Existen algunos trabajos en los cuales se intentó analizar este acoplamiento eléctrico (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963, French y DiCaprio, 1975). Estos autores examinaron la dependencia de la frecuencia de la función de transferencia, que en términos simples, es la relación entrada-salida de un sistema. En este caso y considerando el acoplamiento eléctrico de las células de Retzius como un sistema, los autores analizaron la dependencia de la frecuencia de las células de Retzius cuando se les inyectan corrientes senoidales a diferentes frecuencias y observaron la respuesta. De esta manera, concluyeron que el acoplamiento entre células de Retzius es esencialmente resistivo, proponiendo así un modelo eléctrico donde se tienen dos somas idénticos modelados como un circuito RC, acoplados por una resistencia. Este modelo se muestra en la figura 8.

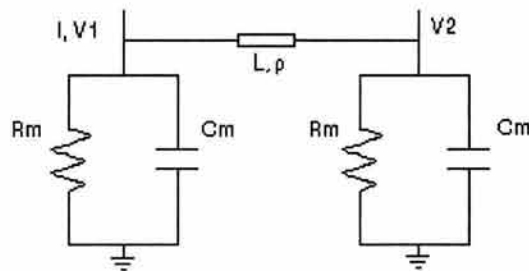
Posteriormente, Yang y Chapman (1983) agregaron neuritas como cables pasivos y compararon los datos obtenidos experimentalmente con las funciones de transferencia y de impedancia de cada uno de los modelos. Se concluye que el modelo que más de aproxima a los datos biológicos es el que se muestra en la figura 9, donde se sustituye la resistencia de acoplamiento por un cable modelado por la ecuación de Hodgkin y Rushton (1946).

Estos trabajos son interesantes porque de alguna manera se trata de analizar el proceso de propagación de PSEs en células acopladas eléctricamente y que han mostrado que el acoplamiento somático depende de las propiedades pasivas del cable y de la resistencia de acoplamiento.



**Figura 8.** Modelo propuesto por Hagiwara y Morita (1962), Eckert (1963), French y DiCaprio, (1975) para modelar el acoplamiento eléctrico de las células de Retzius como una resistencia.

Sin embargo, todos estos modelos no consideran que existe una entrada presináptica química, común a ambas células de Retzius que libera neurotransmisor sobre ambas células y por lo tanto, aún no se ha encontrado el modelo que mejor se ajusta a los datos reales.



**Figura 9.** Uno de los modelos del acoplamiento de las células de Retzius propuesto por Yang y Chapman (1983). En este caso se propone el acoplamiento a través de un cable.

#### **1.4. Planteamiento del problema**

En las secciones anteriores se ha presentado información referente a los mecanismos pre y postsinápticos que participan en la transmisión sináptica química, incluyendo la naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor. Adicionalmente se han revisado algunas propiedades de cable y las características y funciones de las sinapsis



eléctricas. Como también se ha mencionado, las neuronas del sistema nervioso central tienen árboles dendríticos que reciben miles de entradas y el conocimiento de algunas propiedades anteriores nos ayuda a entender la base de la integración sináptica. Sin embargo, en algunas especies de invertebrados este problema puede ser mejor estudiado debido a la relativa "simplicidad" de su sistema nervioso, comparado con el de los vertebrados.

En este trabajo se utilizaron células de Retzius de la sanguijuela mexicana *Haementeria officinalis* cuya organización del sistema nervioso es muy parecida a la de la *Hirudo medicinalis*, con la diferencia de que los ganglios contienen alrededor de 320 células (Izquierdo y De-Miguel, sin publicar). Además del acoplamiento eléctrico, las neuronas de la sanguijuela mexicana *Haementeria officinalis*, también presentan potenciales sinápticos excitatorios espontáneos y potenciales de acción.

La presencia de PSEs simultáneos en el soma de las células de Retzius sugiere la presencia de una entrada común a ambas células (De-Miguel et al, 2001). Estos PSEs varían en amplitud y cinética de un evento al otro y entre células, lo que sugiere que esta entrada común es el efecto de la liberación de neurotransmisor y por consiguiente, el efecto de una sinapsis química sobre un acoplamiento eléctrico.

La coexistencia de sinapsis eléctricas y químicas fue encontrada por primera vez en el ganglio ciliar de aves (Martin y Pilar, 1963), como también ya fue descrito en las secciones anteriores. En la sanguijuela, existen varias células que están acopladas eléctricamente (Müller et al, 1981).

Actualmente se sabe que durante el desarrollo, el acoplamiento eléctrico es mucho más pronunciado de lo que se creía (Guthrie y

Gilula, 1989; Kandler y Katz, 1995) siendo mucho más fuerte durante la formación de sinapsis, es decir, en el establecimiento inicial de circuitos neuronales. De este modo, la comunicación a través de sinapsis eléctricas puede generar actividad bioquímica o eléctrica coordinada antes del inicio de la transmisión sináptica. Un aparente decremento en el acoplamiento de células puede ser el resultado de varios mecanismos celulares, incluyendo un cambio en el nivel de expresión de uniones comunicantes o un cambio en el tipo de canal (Dermietzel et al, 1989; Brissette et al, 1994) o a modificaciones de las propiedades del canal.

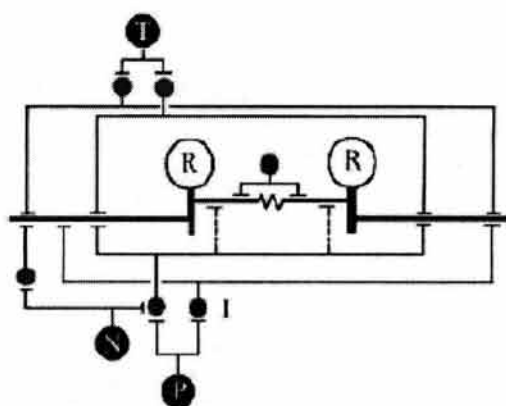
Sin embargo, el papel del acoplamiento eléctrico en la producción de funciones neuronales, particularmente en vertebrados recién nacidos y maduros incluyendo mamíferos no está claro. Estudios recientes muestran que el acoplamiento eléctrico tiene un papel muy importante en la generación y coordinación motora (Cazalets et al, 1998; Kiehn y Kjaerulff, 1996; Schmidt et al, 1998; Shapovalop y Shiriaev, 1980; Christensen, 1983; Fetcho, 1991).

Experimentos realizados en sanguijuelas adultas (Fernández de Miguel, 1996) han detectado la presencia de potenciales sinápticos espontáneos excitadores en los somas de las células de Retzius, midiendo la distancia entre los somas, la constante de tiempo ( $\tau$ ) y la constante de longitud ( $\lambda$ ). También ha sido posible detectar el flujo de potenciales sinápticos de una neurona a la siguiente a través de la sinapsis eléctrica.

Las mismas células pueden mantenerse en cultivo, donde a pesar de ser adultas conservan sus propiedades de membrana y sintetizan los mismos canales, transmisores y receptores que en el ganglio. Además, pueden crecer y formar conexiones sinápticas en cultivo (Ready y Nicholls, 1979). Esto ha permitido estudiar en detalle

las etapas de la formación de sinapsis, los mecanismos de liberación de serotonina y la distribución de canales y receptores con una sensibilidad que en otras preparaciones sería extraordinariamente difícil (Fernández de Miguel y Drapeau, 1995).

Recientemente se ha descubierto (Velazquez-Ulloa et al, 2003) que tres tipos de neuronas mecanosensoriales de la sanguijuela (T, P y N) están conectadas polisinápticamente con las células de Retzius y que regulan su actividad eléctrica (ver figura 10).



**Figura 10. Representación esquemática de un modelo de regulación de la actividad eléctrica de las células de Retzius (R). Las células ipsilaterales mecanosensoriales T, P y N están conectadas con más de una interneurona (I), que a su vez forma contactos a diferentes distancias, con las dendritas no acopladas de las células de Retzius, aunque algunos contactos también se realizan con las dendritas acopladas (líneas punteadas). Las células P y N siguen caminos diferentes pero también convergen en interneuronas comunes. La distancia de la conexión con las células de Retzius es arbitraria. Todas las dendritas de las células de Retzius se conectan con el axón primario, donde se lleva a cabo la integración (Tomado de Velazquez-Ulloa et al, 2003).**

La estimulación de estas neuronas sensoriales produce respuestas variables en las células de Retzius, algunas de las cuales producen PSEs con tiempos al pico cortos mientras que otras muestran PSEs lentos y un tercer grupo, una combinación de ambos, sugiriendo que algunas de estas neuronas sensoriales convergen en las mismas interneuronas.

La comparación de las conexiones de las células P y N a las células de Retzius sugiere que estas células mecanosensoriales utilizan una combinación de circuitos paralelos que convergen sobre las mismas interneuronas. Si las neuronas sensoriales están conectadas a las células de Retzius a través de interneuronas independientes, el sistema puede tener diferentes posibilidades de integración. Por ejemplo, eventos sinápticos facilitados pueden actuar en paralelo en lugar de hacerlo en serie. Dado que los tiempos al pico de los PSEs producidos por entradas mecanosensoriales son más grandes que los de los PSEs espontáneos, puede ser que las sinapsis con las células de Retzius sea en las dendritas no acopladas. La figura 10 muestra un modelo propuesto por Velazquez-Ulloa y cols (2003) que resume todos estos resultados.

Por otro lado, se sabe que las células de Retzius liberan grandes cantidades de serotonina de vesículas densas y que esta liberación es dependiente de la frecuencia (Trueta et al, 2003). Esta podría ser la fuente de serotonina que modula el nado en la sanguijuela.

La distribución de entradas a partir de células mecanosensoriales sugiere que las células de Retzius poseen diferentes modos de integración, siendo estas entradas las responsables de los disparos a altas frecuencias (Velazquez-Ulloa et al, 2003) y probablemente, de la liberación de grandes cantidades de neurotransmisor del soma a partir de vesículas densas (Trueta et al, 2003). Por otro lado, los PSEs espontáneos producidos en las dendritas acopladas (donde la sinapsis eléctrica se ve involucrada) son integrados por ambas células de Retzius y producen disparos a baja frecuencia, liberando neurotransmisor esencialmente de vesículas claras (Trueta et al, en preparación).

Un caso de particular interés para esta tesis es la situación en

que una sinapsis eléctrica, como la formada por las células de Retzius de la sanguijuela, se encuentra modulada por una sinapsis química. De igual importancia fue analizar las consecuencias de esta modulación en el proceso de integración sináptica. Dado que el acoplamiento eléctrico puede ser modulado por neurotransmisores y segundos mensajeros (Colombaioni y Brunelli, 1988; DeVries y Schwartz, 1989; Carystinos et al, 2001), en este trabajo se analizó si las variaciones en el grado de acoplamiento pueden afectar el flujo de PSEs a través de la sinapsis eléctrica y si los resultados de esta modulación son variables al momento de la integración. De este modo, la combinación de estos dos tipos de sinapsis complica el estudio de la integración sináptica, pues no sólo se deben considerar las propiedades de cable de la sinapsis eléctrica, sino adicionalmente, los efectos que la activación de la sinapsis química pueda tener sobre la sinapsis eléctrica. Es decir, en este caso e independientemente del tipo de acoplamiento eléctrico que se tenga, las células comienzan a integrar la información que les llega de sus propias dendritas, la que viene de la célula acoplada, más la información producida por la sinapsis química que puede modular el acoplamiento eléctrico, cambiando así las propiedades del sistema.

Entender el modo en que toda esta información es integrada es de vital importancia para todas las especies en las cuales el acoplamiento eléctrico regulado por una sinapsis química participa de manera importante, tanto en la sincronización como en las reacciones de supervivencia del animal, que se traducen en actividades motoras.

## **II. HIPÓTESIS**

## **II. HIPÓTESIS**

La integración de PSEs en las neuronas de Retzius, acopladas eléctricamente, está determinada por diversos factores. En primer lugar, existe una entrada pre-sináptica común a ambas neuronas de Retzius, que libera neurotransmisor sobre las dendritas acopladas y esta liberación modifica la amplitud de los PSEs. Este efecto puede ser debido principalmente a dos cosas. La primera es que la liberación de neurotransmisor es cuántica, lo que implica una liberación probabilística e independiente, liberando diferentes contenidos cuánticos por evento e incluso en algunos casos, fallando la liberación sobre alguna de las dendritas acopladas, con lo cual se observan PSEs propagados de la neurona donde si hubo liberación.

En segundo lugar, el grado de acoplamiento eléctrico modula la amplitud de los PSEs al regular la cantidad de corriente que deja pasar de una neurona a otra. Pero este efecto depende de la posición de las entradas pre-sinápticas. Si estas entradas se encuentran localizadas muy cerca de la resistencia de acoplamiento, entonces la amplitud de los PSEs unitarios se modifica, al regular la cantidad de corriente que se queda en una de las neuronas y la que pasa a la neurona acoplada. De este modo se observaría también una modulación en el patrón de disparo de las neuronas de Retzius. En el caso contrario, cuando las entradas se encuentran cerca al soma de las neuronas, la suma de PSEs se vería afectada observándose PSEs con una fase de caída alargada.

### **III. Objetivos**



### **III. OBJETIVOS**

#### ***III.1 Objetivo general:***

Analizar la contribución de las sinapsis eléctricas y químicas en los mecanismos de integración de neuronas acopladas eléctricamente.

#### ***III.2 Objetivos Particulares:***

1. Analizar el papel del acoplamiento eléctrico en la propagación de potenciales sinápticos.
2. Determinar la contribución de las propiedades pasivas membranales, la resistencia de acoplamiento y la localización de las entradas pre-sinápticas a la propagación de potenciales sinápticos excitadores entre neuronas acopladas eléctricamente.
3. Analizar la influencia del acoplamiento eléctrico en la integración de potenciales sinápticos excitadores, producidos en pares de neuronas acopladas y su efecto en el proceso de integración.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***IV.1. Preparación y disección***

Todos nuestros experimentos se realizaron en ganglios de la sanguijuela mexicana *Haementeria officinalis*. Estos se obtienen abriendo al animal por la parte ventral y cortando los nervios conectivos que unen ganglio con ganglio, formando así la cadena del sistema nervioso de la sanguijuela. El ganglio ya aislado se coloca en una caja de Petri con fondo de silicón y solución fisiológica para sanguijuelas. Se fija con minucias de acero inoxidable y como la cápsula de tejido que envuelve al ganglio es muy dura, se retira con unas pinzas para exponer y registrar a las células de Retzius. Estas son identificadas por su tamaño y posición en el ganglio. La solución fisiológica en que se coloca a los ganglios contiene (mM): NaCl, 115; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; glucosa, 11; Tris Maleato 10, ajustada a un pH de 7.4 (Müller et al, 1981).

### ***IV.2. Registro intracelular***

#### ***IV.2.1. Electrodo intracelulares***

Para realizar los registros intracelulares simultáneos se utilizaron tubos capilares de vidrio de borosilicato (FHC) de 1 mm de diámetro exterior y 0.75 mm de diámetro interno. Estos tubos capilares fueron estirados en un puller P97 (Sutter Instruments) hasta lograr una punta adecuada para no dañar a las células y una resistencia del electrodo entre 18 y 25 M $\Omega$  cuando se llenan con KCl (3 mM).

#### ***IV.2.2. Registros simultáneos intracelulares de las células de Retzius***

Los registros intracelulares simultáneos se realizaron en solución fisiológica, descrita anteriormente. En algunos experimentos se utilizó tetrodotoxina (TTX, 300 nM) que bloquea la generación de potenciales de acción y de esta manera se puede observar la actividad espontánea de las células de Retzius. Como un método para verificar si las células estaban en buenas condiciones, la TTX se agregó a la solución fisiológica 15 minutos después del inicio del registro y se mantuvieron así entre 30 y 80 minutos.

Para el análisis cuántico, se registró a las células de Retzius en presencia de cloruro de magnesio (2 mM) y la concentración de cloruro de calcio se disminuyó a 1 mM, bajando de esta manera la probabilidad de liberación de neurotransmisor de la célula presináptica (ver introducción). En estos experimentos se utilizaron puentes de agar (KCl 3% y Agar-agar 8%) como un método para equilibrar la fuerza iónica entre la solución de registro y la del electrodo ya que esto permite una conexión eléctrica del electrodo con la solución del baño, pero minimiza la transferencia de iones.

#### ***IV.2.3. Generación de potenciales sinápticos artificiales***

Se realizaron experimentos para comprobar la propagación de potenciales sinápticos de una célula a otra y su suma. Para esto, primero se generaron potenciales sinápticos artificiales a través de la inyección de corriente en los somas de las células de Retzius, utilizando el programa Axoscope (Axon Instruments), con amplitud y cinética muy similar a los naturales. Estos se inyectaron en una célula y se registraron en ambas, midiendo su tasa de acoplamiento y se comparó con la de PSEs naturales. De la misma manera se generaron potenciales artificiales con una joroba en la fase de caída, se inyectaron en una de las dos Retzius y se registraron en ambas para

observar y comprobar la suma de potenciales sinápticos. Se promediaron las respuestas de 20 réplicas.

#### ***IV.2.4. Sistema de registro***

Las señales simultáneas registradas de ambas células fueron amplificadas y posteriormente filtradas (filtros Bessel) a una frecuencia de corte de 400 Hz. Los datos fueron adquiridos por una tarjeta convertidora analógica/digital Digidata 1200, a una frecuencia de muestreo de 20 KHz y almacenados en una PC para su análisis posterior. Como condición inicial, el potencial de membrana de las células se mantuvo entre -45 y -50 mV, pasando corriente cuando fue necesario para que el potencial de ambas células de Retzius fuera el mismo. La duración de los registros fue desde 30 minutos hasta 2 horas, tiempo en el que no se observó deterioro alguno en las células.

### ***IV.3. Análisis de datos***

El ruido del registro fue de 0.15 mV pico a pico, mientras que la amplitud de los potenciales sinápticos es alrededor de 0.4 mV, por lo que los PSEs pudieron ser observados sin dificultad.

Los tiempos al pico y las amplitudes de los potenciales sinápticos se midieron manualmente utilizando el Axoscope 8.0 y el Clampfit 8.0. Las gráficas de distribuciones de amplitud y tiempos al pico fueron hechas en Sigma Plot 3.0 y Origin 5.0.

Como convención,  $V_1$  es la amplitud registrada en la neurona en la cual se inyectó corriente o en la que se produjo un potencial sináptico y  $V_2$  es el voltaje registrado en la otra neurona. La tasa de acoplamiento en estado estacionario -inyectando un pulso de corriente suficientemente largo para alcanzar el estado estacionario en una de las células- o de un par de potenciales sinápticos simultáneos -

amplitud del evento propagado entre la amplitud del original- se calculó como:

$$\text{Tasa de acoplamiento} = \frac{V_2}{V_1}$$

Los pulsos de corriente inyectados tuvieron una duración de 400 ms y 3 nA de amplitud. Sin embargo, se debe considerar que el valor obtenido está afectado por la resistencia de acoplamiento y por las dendritas de ambas neuronas.

#### ***IV.4. Modelo eléctrico del acoplamiento de las células de Retzius***

Se realizaron dos modelos eléctricos del acoplamiento de las células de Retzius, uno en el dominio senoidal y otro en el dominio temporal para reproducir la forma de los PSEs. Ambos modelos incluyen componentes resistivos para el acoplamiento, cables para su conexión y los somas están representados por un circuito RC.

La ecuación que representa al sistema entrada-salida (ver apéndice) se programó en Matlab 5.0. Para comparar la respuesta del modelo en el dominio senoidal con la respuesta de las células de Retzius, se inyectó una corriente senoidal a diferentes frecuencias sobre una de las células y se obtuvo la tasa de acoplamiento de ambas. Se observaron ambas respuestas en una gráfica doble-logarítmica.

El modelo en el dominio temporal, que es el que reproduce la forma del potencial sináptico, se obtiene a partir del modelo en el dominio senoidal. También se programó en Matlab y la respuesta fue comparada con PSEs artificiales y naturales, cambiando la posición de generación del potencial de origen. De esta manera se pueden simular diferentes potenciales sinápticos en diferentes condiciones. Este

programa también se utilizó para simular la suma de PSEs.

## **V. RESULTADOS**



## V. RESULTADOS

Algunos de los resultados de este trabajo están en extenso, en los artículos anexados al final de esta tesis. Por ello, en esta sección describo, a manera de resumen, los principales resultados generados con esta tesis (los experimentos con que fueron obtenidos están explicados en cada artículo), ya que los artículos contienen información adicional cuyos resultados fueron obtenidos en el laboratorio por algunos otros colegas y serán señalados en su momento. Adicionalmente, en la última parte se describen algunos experimentos y resultados que aún no han sido publicados.

### ***V.1. Propagación de potenciales sinápticos***

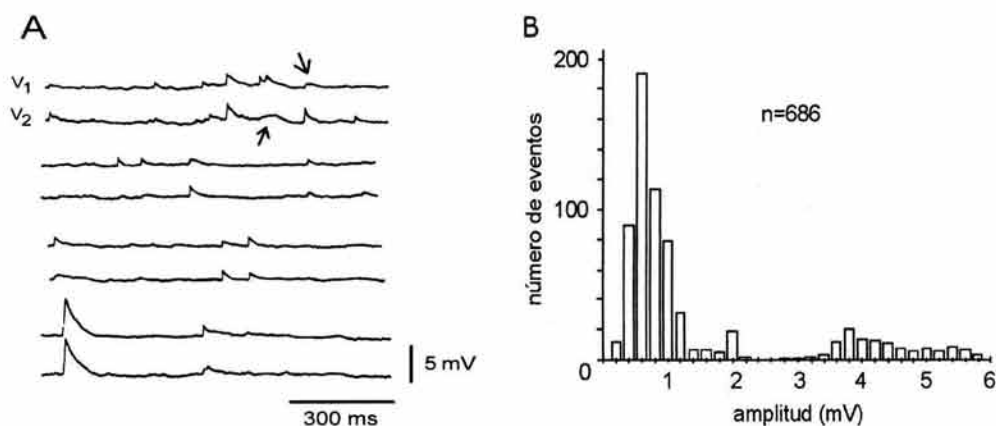
La primera parte de esta tesis consistió en analizar de qué manera el acoplamiento eléctrico de las neuronas de Retzius determina la propagación de los potenciales sinápticos. También se analizó el efecto de las propiedades de membrana, la resistencia de acoplamiento y la posición de las entradas presinápticas en el proceso de integración de las neuronas de Retzius.

En el soma de estas neuronas se pueden registrar PSEs espontáneos a una frecuencia promedio de  $3.36 \pm 0.12$  Hz. Esta actividad puede ser **sincrónica**, si ambas neuronas producen PSEs casi simultáneos (con una diferencia promedio, entre ellos, de 3 ms) y con tiempos al pico similares (5.6 ms en promedio, De-Miguel et al, 2001; García-Pérez et al, 2004). La transmisión también puede ser **asincrónica** cuando el PSE de las características anteriores es producido únicamente en una neurona y la otra actúa como seguidora pasiva, produciendo en el soma una pequeña deflexión con tiempo al pico grande (PSE propagado). Estos datos muestran que existe una

entrada común a ambas neuronas de Retzius, que esta liberando neurotransmisor de manera cuántica, razón por la que los PSEs no son siempre sincrónicos.

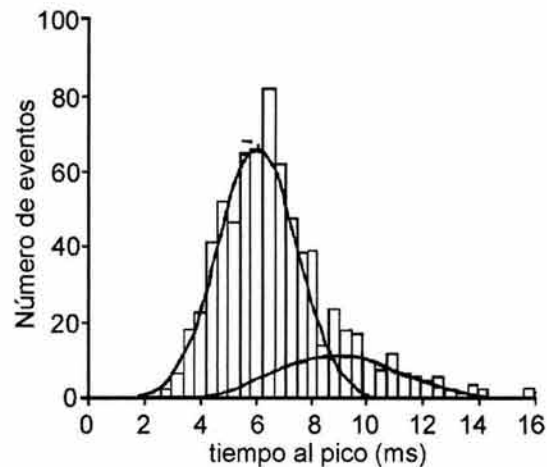
La actividad eléctrica es bloqueada casi completamente de manera reversible, sustituyendo el  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\text{Mg}^{2+}$  en la solución fisiológica o añadiendo tetrodotoxina (TTX), que bloquea canales de sodio dependientes de voltaje, inhibiendo así la producción de potenciales de acción. Esto demuestra que se trata de actividad sináptica y el remanente se ha interpretado como potenciales espontáneos, cuya amplitud promedio es de  $0.37 \pm 0.07$  mV ( $n=500$ ).

Los PSEs espontáneos varían en amplitud, como se muestra en la figura 11A (figura 3A en: De-Miguel et al, 2001). El registro simultáneo de pares de neuronas mostrado en la figura 11A, muestra las variaciones de amplitud de un evento a otro registrado en la misma célula y de una célula a otra. La distribución de amplitudes de la figura 11B muestra dos poblaciones, una con eventos pequeños y otra con eventos grandes.



**Figura 11. Registro simultáneo de actividad espontánea de las células de Retzius. A. Los PSEs espontáneos varían en amplitud de un evento a otro registrado en la misma célula y de una célula a otra. B. Distribución de amplitudes de PSEs que muestra dos poblaciones, una con eventos pequeños y otra con eventos grandes.**

Adicionalmente, la distribución de tiempos al pico de la figura 12, muestra dos componentes Gaussianas, que sugieren dos entradas sinápticas, una en cada neurona de Retzius.

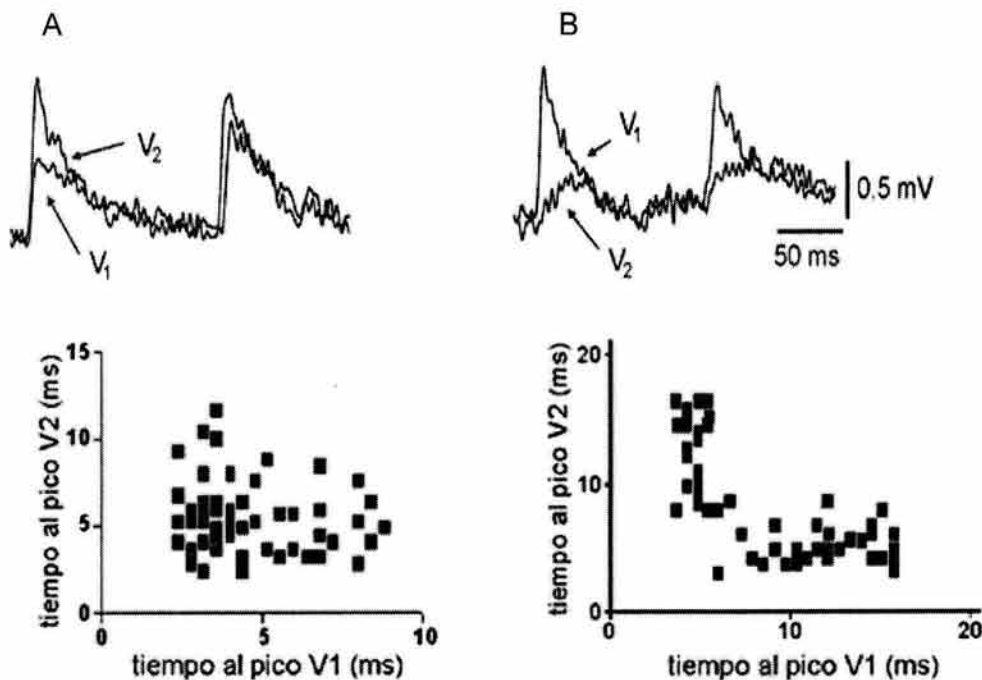


**Figura 12. Distribución de tiempos al pico de PSEs espontáneos. Se observan dos componentes Gaussianas sugiriendo dos entradas presinápticas.**

En el caso de la liberación de transmisor asincrónica, los tiempos al pico cortos de una célula están correlacionados con los tiempos al pico largos de la otra, sugiriendo la propagación de PSEs de un lado a otro de la sinapsis eléctrica. Una demostración de esta propagación se realizó produciendo, en el soma de estas neuronas, potenciales sinápticos artificiales con las mismas características cinéticas de los PSEs naturales. Estos sinápticos fueron generados intracelularmente por inyección de corriente. Este experimento fue realizado por Francisco Fernández de Miguel y muestra que al inyectar corriente en el soma de una de las neuronas, ésta se propaga a la otra, generando un cambio de potencial, con tiempo al pico largo y una tasa de acoplamiento menor a la de los sinápticos naturales, demostrando que las entradas sinápticas se localizan a lo largo de las dendritas acopladas.

El experimento concluyente para demostrar la propagación de PSEs de una célula a otra sería el desacoplamiento eléctrico, sin embargo, los desacoplantes clásicos como el heptanol, octanol y ácido acético (experimentos realizados por Francisco Fernández de Miguel), además de la serotonina y octopamina (probadas por mí), no lograron desacoplar a esta sinapsis eléctrica.

La figura 13 (figura 5 en: De-Miguel et al., 2001) muestra la correlación que existe entre los tiempos al pico de ambas neuronas. Por ejemplo, cuando los PSEs son sincrónicos y registrando en solución ringer normal, los tiempos al pico cortos de una neurona están correlacionados con los tiempos al pico largos de la otra, como lo muestra la gráfica de correlación en el panel inferior de la figura 13A.



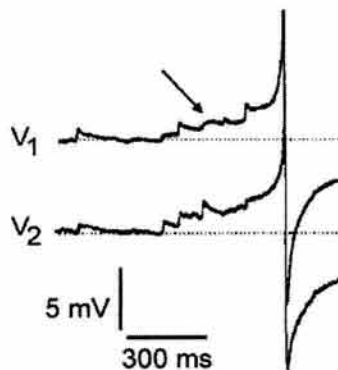
**Figura 13. Correlación de tiempos al pico entre ambas neurona de retzius. A. El panel superior muestra dos PSEs sincrónicos, uno registrado en  $V_1$  y el otro en  $V_2$ . El panel inferior muestra la correlación de tiempos al pico para 60 pares de PSEs. B. PSEs asincrónicos y su clara correlación (panel inferior) entre tiempos. A tiempos cortos en  $V_1$  corresponden tiempos largos en  $V_2$  y viceversa.**

Más claramente, cuando los sinápticos son asincrónicos (13B) es evidente la correlación de tiempos cortos en una célula con los tiempos largos de la otra. Esto también apoya la idea de la propagación de PSEs de una neurona a la otra.

## **V.2. Modulación de amplitud de PSEs**

El objetivo de esta parte del trabajo fue analizar la contribución del acoplamiento eléctrico a la integración sináptica en las neuronas de Retzius (García-Pérez et al, 2004). Para ello se combinaron estudios morfológicos desarrollados por Mariana Vargas, Francisco Fernández de Miguel y Norma Velázquez, con experimentos electrofisiológicos y modelaje matemático.

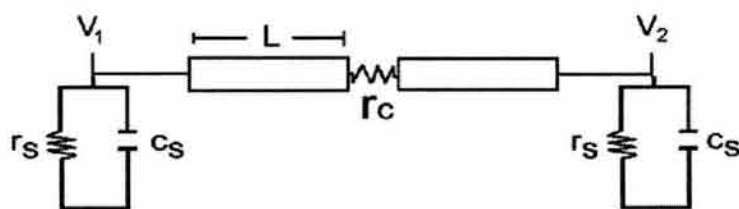
La electrofisiología mostró que los potenciales de acción registrados en cada célula de Retzius son el resultado de la suma local de PSEs, producidos en la propia célula y con los provenientes de la célula acoplada. En todos los casos, independientemente de la tasa de acoplamiento, los potenciales de acción de cada neurona son seguidos por la neurona acoplada con un retardo variable de 2 a 6 ms (ver figura 14).



**Figura 14. Potenciales de acción espontáneos registrados en ambas células de Retzius. Estos potenciales de acción son el resultado de la suma local de PSEs producidos en la propia célula y en la célula acoplada. La flecha en V<sub>1</sub> señala un PSE propagado.**

De la morfología se obtuvo que los posibles sitios de contacto ( $45.42 \pm 2.63$ , promedio  $\pm$  desviación estándar) entre ambas neuronas se encuentran en dendritas con longitudes de  $50 \mu\text{m}$  y el 70% de ellas no tienen ramificaciones. El diámetro de estas dendritas es de  $1.08 \mu\text{m}$ , siendo constante a lo largo de toda la dendrita. Estos resultados permitieron modelar a las dendritas como cables de diámetro constante ( $1 \mu\text{m}$ ), longitud definida ( $50 \mu\text{m}$ ) y sin ramificaciones.

Adicionalmente, se obtuvieron rangos de valores para los diferentes parámetros eléctricos del soma, como son la resistencia ( $r_s$ ) y capacitancia ( $c_s$ ) de la membrana del soma, la constante de espacio ( $\lambda$ ), la distancia electrotónica ( $L$ ) definida como  $L = \ell / \lambda$  y la constante de tiempo ( $\tau$ ). Los valores para la  $r_s$  y la  $\tau$ , fueron obtenidos a partir de mediciones realizadas en somas cultivados, dado que bajo estas condiciones, las células son isopotenciales (Ross et al, 1987). Los rangos de valores obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 2 (también en García-Pérez et al., 2004). El modelo final, basado en todos estos parámetros y observaciones, se encuentra en la figura 15. Los somas están representados como un circuito RC, acoplados entre sí por cables con una resistencia  $r_c$ .



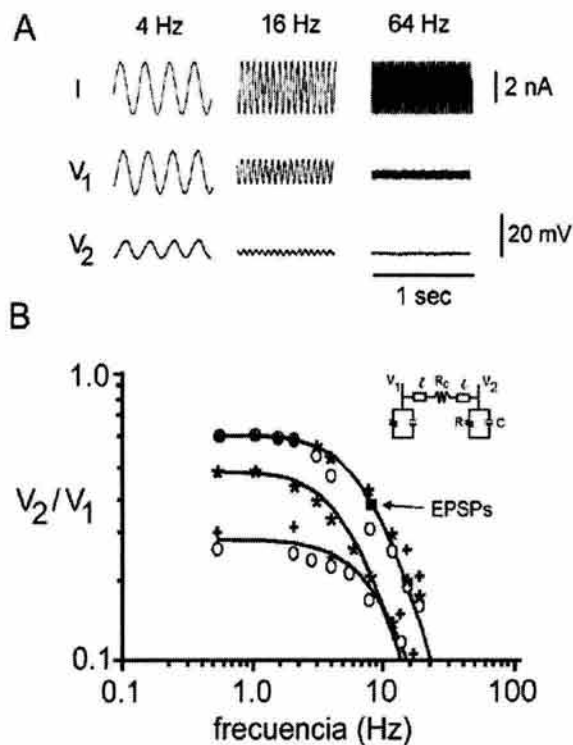
**Figura 15. Modelo eléctrico de un par de neuronas de Retzius. Los somas están modelados como circuitos con  $r_s$  y  $c_s$  en paralelo. Cada soma está conectado a las neuritas, representadas como un cable finito con longitud electrotónica  $L$ . Las neuritas de ambas células están conectadas a través de una resistencia ( $r_c$ ).**

**Tabla 2. Definición de símbolos y valores estimados para el modelo.**

<b>Símbolo</b>	<b>Definición (dimensión)</b>	<b>Soma</b>	<b>Neuritas</b>
$C_s$	Capacitancia específica del soma ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	1	-
$c_s$	Capacitancia del soma ( $\mu\text{F}$ )		
$D$	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	60-80	1.08
$\ell$	Longitud del cable ( $\mu\text{m}$ )	-	50
$\lambda$	Constante de longitud ( $\mu\text{m}$ )	-	100
$L = \ell / \lambda$	Longitud electrotónica	-	0.5
$r_a$	Resistencia axial $r_a = 4\ell R_a / \pi d^2$ ( $\text{G}\Omega/\text{cm}$ )	-	85-1273
$r_c$	Resistencia de acoplamiento	-	30-340
$R_s$	Resistencia específica del soma ( $\Omega\text{cm}^2$ )	18-40	-
$r_s$	Resistencia del soma ( $\text{M}\Omega$ )	90-150	-
$\tau$	Constante de tiempo del soma (ms) soma $\tau = r_m c_m = R_m C_m$ (ms)	18-40	-
$T$	Tiempo de subida de los PSEs (ms)		
	PSEs cortos	$5.6 \pm 0.24$	-
	PSEs largos	$9.6 \pm 0.33$	
$V_1$	Respuesta en voltaje de la neurona $V_1$ (mV)		
$V_2$	Respuesta en voltaje de la neurona $V_2$ (mV)		
$X$	Distancia entre somas ( $\mu\text{m}$ )		

Para comprobar las predicciones hechas por el modelo, los valores estimados para los parámetros ya mencionados y calcular los valores de  $\lambda$  y  $r_c$ , se observó la tasa de acoplamiento de las neuronas

de Retzius al inyectar corrientes senoidales a diferentes frecuencias, ya que el modelo fue realizado en el dominio de la frecuencia. Lo que se obtuvo es que la respuesta de las neuronas es similar a la de un filtro pasa-bajas de primer orden (experimento realizado por Francisco Fernández de Miguel, figura 16A).



**Figura 16. Respuesta en frecuencia de las neuronas de Retzius y del modelo. A. Ejemplos de corriente senoidal ( $I$ , panel superior) a diferentes frecuencias inyectada en el soma de las neuronas de Retzius. El segundo y tercer panel muestran los registros de voltaje observados en  $V_1$  y  $V_2$  después de la inyección de corriente en  $V_1$ . B. Comparación de la respuesta de 6 pares de neuronas de Retzius (cada par representado con un símbolo diferente) con la respuesta del modelo. Las tasas de acoplamiento estacionario de los 6 pares de neuronas se encontraron entre 0.26 y 0.62. El modelo utilizado para hacer los ajustes se encuentra en el recuadro y los parámetros utilizados están en la tabla 2.**

Cuando se comparó la respuesta del modelo, formado sólo con componentes pasivos (figura 16B), con la respuesta experimental se observó que ambas respuestas son muy similares. La respuesta en frecuencia de este modelo ajusta muy bien a la respuesta



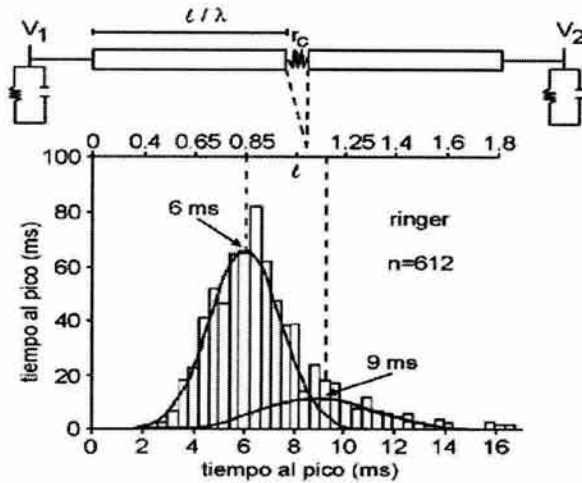
experimental de 6 pares de neuronas con tasa de acoplamiento estacionaria entre 0.26 y 0.62, eliminando la posibilidad de que existan componentes activos que afecten la propagación de los PSEs. Obtuvimos el mejor ajuste con  $\lambda=2\ell$ .

Para  $r_c$ , el rango de valores encontrado fue de 30 a  $340M\Omega$ , en pares de neuronas con tasas de acoplamiento estacionarias entre 0.72 y 0.22, respectivamente. La tasa de acoplamiento afecta la amplitud de los PSEs miniatura al modificar la impedancia dendrítica y la distribución de corriente sináptica en ambas dendritas acopladas. Por tanto, la impedancia, dependiente de la frecuencia, es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento estacionaria, pero directamente proporcional a los valores de  $r_c$ .

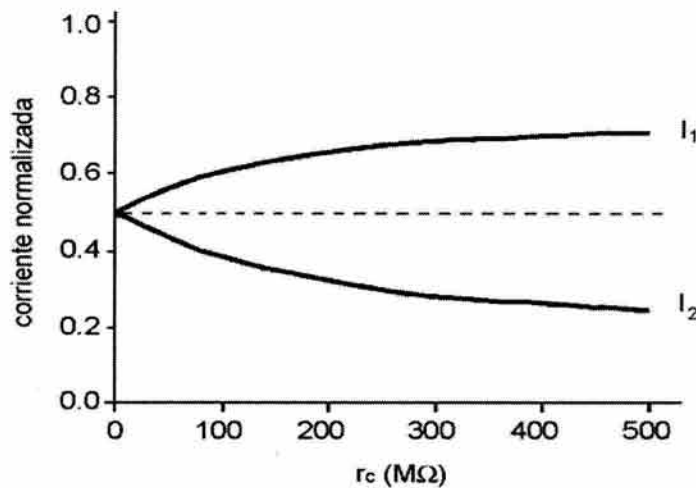
La entradas presinápticas a las neuronas de Retzius, se encuentran a  $0.15\pm 0.05\ell$  del punto de contacto de ambas dendritas (equidistantes). Este dato se obtuvo variando el coeficiente  $\ell/\lambda$  en el modelo para ajustar los tiempos de subida promedio de las distribuciones Gaussianas de los PSEs registrados intracelularmente en los somas de las neuronas de Retzius (ver figura 17).

El acoplamiento eléctrico de las neuritas afecta principalmente dos variables importantes que determinan la amplitud de los PSEs. Una es la distribución de las corrientes presinápticas (entrada química) y la segunda es la impedancia de las dendritas. La distribución de corrientes sinápticas a ambos lados de la sinapsis eléctrica fue calculada con el modelo, a partir de ajustes de datos en el dominio senoidal. Solamente cuando  $r_c=0$ , la corriente fluye en igual cantidad hacia ambos lados de la sinapsis (ver figura 18) pues las neuritas se comportarían como un solo cable. La asimetría mostrada en la gráfica

es debida a la localización de la entrada, a  $0.15\ell$  de la sinapsis eléctrica.



**Figura 17. Localización de entradas sinápticas.** Las distribuciones de tiempos al pico se combinaron con el modelo para predecir la localización de las entradas sinápticas a lo largo de las neuritas acopladas. Utilizando el modelo se ajustó el coeficiente  $\ell/\lambda$  y se obtuvo la distancia, a partir de la sinapsis eléctrica donde se localizan estas entradas (escala superior).



**Figura 18. Predicción del modelo para la distribución de corriente sináptica a ambos lados de la sinapsis eléctrica como función del valor de la resistencia de acoplamiento.**  $I_1$  es la corriente de la una neurona e  $I_2$  es la corriente de la neurona acoplada. La asimetría de las curvas es debida a la localización de la entrada presináptica química. La corriente se normalizó con respecto a cuando  $r_c=0$ .

Para valores grandes de  $r_c$ , la dendrita donde hubo liberación de transmisor reduce el flujo de corriente sináptica a la dendrita acoplada al incrementar su impedancia. Con esto se producen potenciales sinápticos mayores. Para la dendrita acoplada, la reducción de corriente sináptica debida a una  $r_c$  grande es compensada por el incremento en impedancia, produciendo PSEs de amplitud constante para todos los valores en el rango de la  $r_c$ , aunque el decaimiento en amplitud de los PSEs a lo largo de la dendrita depende del coeficiente  $l/\lambda$ .

Como conclusión principal de esta parte del trabajo se obtuvo que el acoplamiento eléctrico entre las neuronas de Retzius modula la amplitud de los PSEs en  $V_1$ , mientras que los de  $V_2$ , independientemente del valor de la resistencia de acoplamiento, permanecen constantes debido a que el incremento en la impedancia de las dendritas compensa la reducción en la cantidad de corriente que pasa a través de la resistencia de acoplamiento. Esta modulación puede cambiar la frecuencia de disparo de las neuronas, pues a valores altos para la resistencia de acoplamiento, se generan PSEs de mayor amplitud, incrementando la probabilidad de alcanzar el umbral de disparo.

En ausencia de actividad inhibitoria, la sinapsis eléctrica desempeña múltiples funciones, regulando la frecuencia de disparo a través de la modulación de la amplitud de los PSEs. Por otro lado, debido a que los PSEs se producen en diferentes dendritas, su suma no está afectada por cambios en la membrana y por lo tanto, es lineal. Además, si los PSEs son producidos de manera sincrónica en ambos lados de la sinapsis, no se modula la amplitud de los PSEs al permanecer ambas dendritas isopotenciales. Todos estos resultados

muestran un nuevo mecanismo de integración en neuronas acopladas por una sinapsis eléctrica.

### ***V.3. Integración sináptica en las neuronas de Retzius***

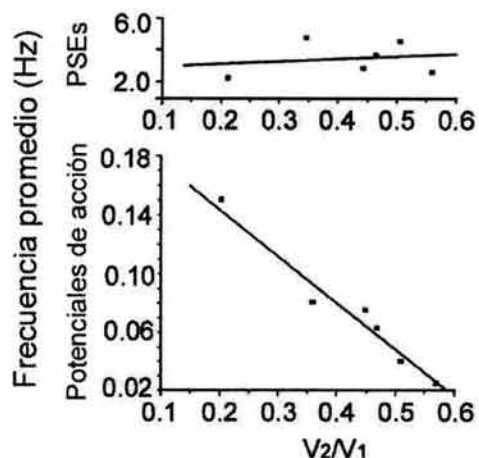
Hasta este momento demostramos que los PSEs se propagan de una neurita a otra a través de la sinapsis eléctrica, que existe una entrada sináptica química común a ambas neuronas de Retzius y que esta entrada modula la frecuencia de disparo de ambas neuronas. Para analizar los efectos de estos resultados en la integración de cada célula, es necesario analizar en detalle algunos otros datos obtenidos en registros espontáneos simultáneos.

Se encontró que la frecuencia promedio de los PSEs no está correlacionada con la tasa de acoplamiento de las neuronas de Retzius (coeficiente de correlación de 0.21). Por otra parte, la frecuencia de disparo promedio de las neuronas de Retzius es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento (coeficiente de correlación de -0.98), y decrece linealmente con una pendiente de  $-0.31$  (de 0.15 a 0.025 Hz) mientras que la tasa de acoplamiento se incrementa de 0.21 a 0.72. Esto se muestra en la figura 19.

Las distribuciones de tiempos al pico de los PSEs muestran dos picos Gaussianos, uno en  $5.6 \pm 0.24$  ms (error estándar) y otro en  $9.6 \pm 0.33$  ms, correspondientes, como ya se había mencionado, a las dos diferentes entradas sinápticas químicas.

Las distribuciones de amplitud de los PSEs, con tiempos al pico similares, muestran tres picos Gaussianos, cuya amplitud en el pico es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento estacionaria de las neuronas de Retzius (coeficiente de correlación de  $-0.93$ ). Por otro lado, la distribución de amplitudes de los PSEs miniatura muestra una

amplitud promedio de  $0.37 \pm 0.07$  mV, con una frecuencia de aparición de  $0.39 \pm 0.1$  Hz.



**Figura 19. Correlación entre la frecuencia promedio de aparición y la tasa de acoplamiento para los potenciales de acción y los PSEs. La frecuencia de disparo promedio es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento y decrece linealmente con una pendiente de  $-0.31$ , mientras que la tasa de acoplamiento se incrementa de  $0.21$  a  $0.72$ . La frecuencia promedio de los PSEs no está correlacionada con la tasa de acoplamiento de estas neuronas, como se muestra en la gráfica superior.**

Con todos los datos anteriores y suponiendo que cada dendrita recibe sólo una entrada presináptica, la probabilidad de aparición de un evento unitario por dendrita es de  $0.022$  ( $1/45$ ) y para una liberación doble o triple, la probabilidad es aún más baja, por lo que concluimos que los eventos dobles o triples de la distribución de amplitudes tienen que ser necesariamente debidos a la suma de sinápticos unitarios producidos paralelamente en diferentes dendritas.

Para demostrar lo anterior, se realizaron algunos experimentos cambiando el potencial de membrana de la neurona para observar si la propagación de un sináptico artificial inyectado en una neurona se veía afectada. Sin embargo, la amplitud y cinética de los sinápticos artificiales no sufrió cambio alguno. Adicionalmente, la participación de canales de sodio dependientes de voltaje y/o de calcio en la

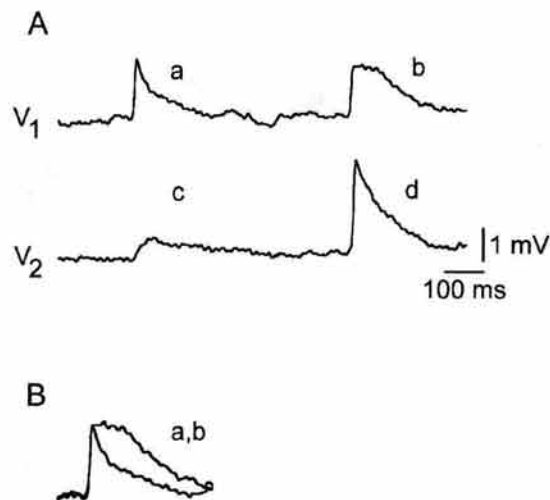
propagación de PSEs fue también descartada al agregar TTX o cobalto, respectivamente, a la solución salina. Basándonos en todos estos resultados, en las propiedades de cable obtenidas, los registros electrofisiológicos, los datos de la morfología y las predicciones realizadas por el modelo, podemos decir que la integración de los PSEs en las células de Retzius es lineal (pasiva) y que la suma ocurre en los axones primarios.

El siguiente paso de este trabajo fue analizar cómo la relación espacio temporal que existe entre los potenciales sinápticos producidos en las dendritas acopladas y no acopladas contribuye a la integración.

Existen varios tipos de sincronía de PSEs que hemos observado y que ya han sido señalados. El primer caso es el mencionado a lo largo de toda esta tesis, una liberación de neurotransmisor y su propagación a la célula acoplada. La figura 20A muestra un registro simultáneo de las neuronas de Retzius. El primer par de PSEs asincrónicos (a,c) corresponde al caso en que se realiza una falla en la liberación de transmisor y el PSE registrado en  $V_1$  se propaga a  $V_2$ , donde se observa disminuido en amplitud (potenciales asimétricos) y con un tiempo al pico más largo que el original, en este caso con una tasa de acoplamiento sináptica de 0.35. Otro caso que también se había mencionado son los PSEs sincrónicos con el mismo tiempo al pico y amplitud (potenciales sincrónicos simétricos) o amplitudes diferentes (potenciales sincrónicos asimétricos), como el segundo par mostrado en la figura 20A (marcados como b y d) que muestra una fase de caída sostenida largo tiempo. Este tipo de potenciales, con una joroba en la fase de caída, pueden deberse a las diferentes relaciones temporales y de amplitud que intervienen en la suma de potenciales sinápticos realizada en el axón principal de cada neurona. Para analizar estos

efectos en la integración, se diseñó un nuevo experimento cuyo protocolo se describe a continuación.

Nuevamente se utilizaron potenciales sinápticos artificiales y para obtenerlos, se realizaron inyecciones de corriente sobre el soma de ambas neuronas.



**Figura 20. Suma de PSEs. A. Registro simultáneo de las neuronas de Retzius en solución salina donde se muestran dos pares de PSEs. El primer par muestra un PSE en V<sub>1</sub>, marcado como 'a' y su propagación a la célula acoplada, marcada como 'c'. El segundo par simultáneo de PSEs, uno marcado como 'b' y generado en V<sub>1</sub>, muestra una fase de caída muy larga, mientras que 'd' es un PSE generado en V<sub>2</sub> con tiempo al pico corto. B. Superposición de los PSEs 'a' y 'b', normalizados, mostrando que tienen el mismo tiempo al pico pero diferente fase de caída. Nótese que d es mucho mayor que c.**

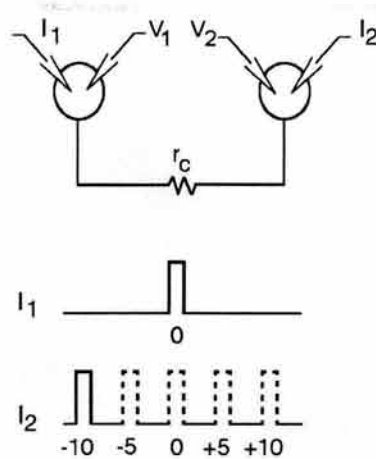
Se produjeron potenciales sinápticos artificiales en ambas neuronas. De acuerdo con su relación de amplitudes y tamaños, se clasificaron en sincrónicos, asincrónicos, simétricos y asimétricos. Los sinápticos artificiales donde el retardo entre la inyección de uno y otro  $\Delta T$  se modifica, son llamados **asincrónicos**; si las amplitudes son iguales son **simétricos**. En el segundo caso, los retardos varían de la misma manera que en el experimento anterior pero las amplitudes de los pulsos de corriente son diferentes, por lo que se les denominó **potenciales asimétricos**. De esta manera se probó el efecto de las

relaciones temporales y de amplitudes en la integración. Cabe aclarar que las inyecciones de corriente fueron realizadas con electrodos independientes a los electrodos de registro. Esto se explica más claramente a continuación.

En el protocolo de inyección de corriente para generar sinápticos artificiales se utilizaron retardos de diferentes tamaños para observar el efecto de la suma espacio-temporal. Uno de los pulsos de corriente se mantuvo fijo, es decir, no se movió en el tiempo ( $I_1$ ,  $T=0$ ), mientras que el otro pulso ( $I_2$ ) se movía en múltiplos de  $\Delta T=5$  ms con respecto a  $I_1$ . Un  $\Delta T$  negativo significa que el pulso  $I_2$  precedió al de  $I_1$ . El tiempo  $T=0$  indica que los dos pulsos de corriente fueron sincrónicos y  $\Delta T$  positivo indica que  $I_2$  fue inyectado después que el de  $I_1$ . Cabe aclarar que sólo se inyecta un pulso de corriente por célula, y se promediaron 10 trazos de voltaje en cada prueba. Adicionalmente colocamos un segundo electrodo en cada célula, para registrar el cambio de voltaje producido por la inyección de corriente del primer electrodo. Este protocolo se muestra en la figura 21.

Los resultados obtenidos con este experimento fueron comparados con la inyección de corriente hecha sobre una de las células y de esta manera se observaron los cambios en amplitud y/o cinética. La figura 22 muestra el resultado promedio de 10 réplicas de uno de los 6 experimentos realizados con sinápticos artificiales simétricos, donde se incluyen tanto los potenciales asincrónicos como los potenciales sincrónicos. Se muestra el resultado sólo de una célula, pues al ser simétrica la inyección de corriente, en la otra célula se observa el mismo efecto.

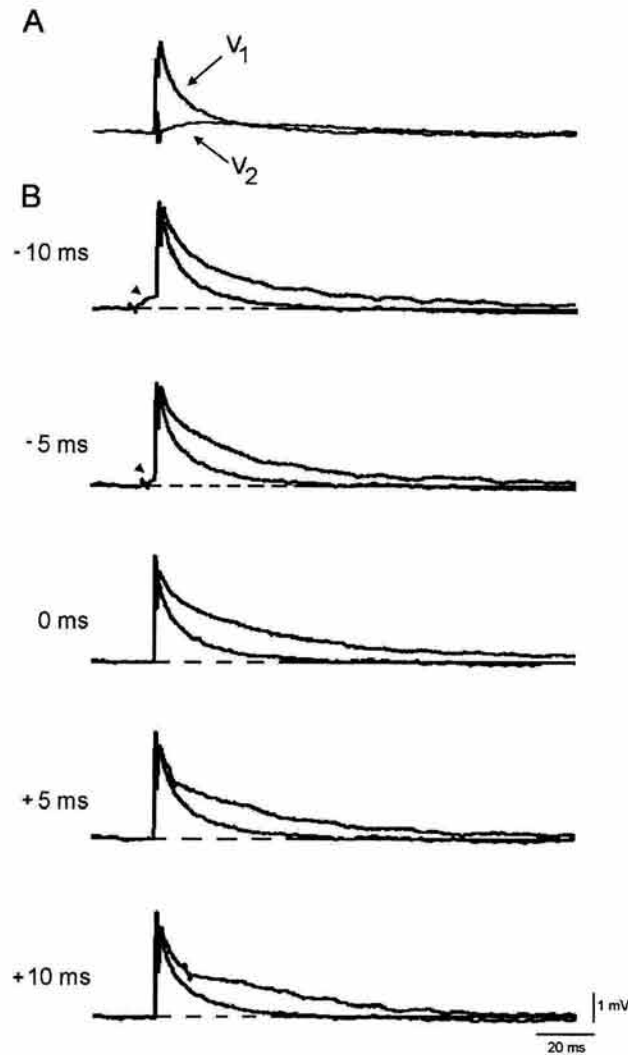




**Figura 21. Protocolo de inyección de corriente para analizar la relación espacio-temporal de los PSEs de las células de Retzius. Se utilizaron 2 electrodos por célula, uno para inyectar corriente ( $I_1$ ,  $I_2$ ) y el otro para registrar el cambio de voltaje ( $V_1$ ,  $V_2$ ) debido a la inyección de corriente. Se muestran los pulsos de corriente con la misma amplitud para  $I_1$  e  $I_2$ , que representa al caso de los potenciales simétricos. Para el caso de los potenciales asimétricos, la amplitud del pulso en  $I_1$  es el doble de tamaño que la de  $I_2$ . Ver el texto para más detalles.**

La figura 22A muestra la inyección de corriente en  $V_1$  y su propagación sobrepuesta, registrada en  $V_2$ . El sináptico artificial señalado como  $V_1$  fue sobrepuesto en todos los registros mostrados en la figura 22B. Cuando el pulso en  $V_2$  es inyectado primero que el de  $V_1$  (ambos con la misma amplitud), correspondiente en la figura 22B a los retardos negativos, la amplitud y la fase de caída se ven incrementadas.

El cambio en amplitud se observa al inicio de la fase de subida y está señalado con una cabeza de flecha. El cambio en la fase de caída es evidente cuando se sobrepone el sináptico artificial  $V_1$  de la figura 22A. Para los tres últimos casos de 22B, cuando el sináptico artificial en  $V_2$  se inyecta después o al mismo tiempo que el de  $V_1$ , la amplitud no se ve afectada, permaneciendo constante.



**Figura 22. Efecto del acoplamiento eléctrico en la suma de potenciales sinápticos artificiales (asíncronos-simétricos). A. Respuesta a la inyección de corriente en una de las neuronas ( $V_1$ ) y su propagación, a la neurona contralateral ( $V_2$ ). B. Potenciales sinápticos artificiales registrados en  $V_1$  después de la colisión de corrientes inyectadas con diferentes tiempos entre sí. Se observan cambios en amplitud (marcados con una cabeza de flecha) y fases de caída (visibles al sobreponer el artificial  $V_1$  de A). Los artefactos en cada panel muestran el instante de la estimulación.**

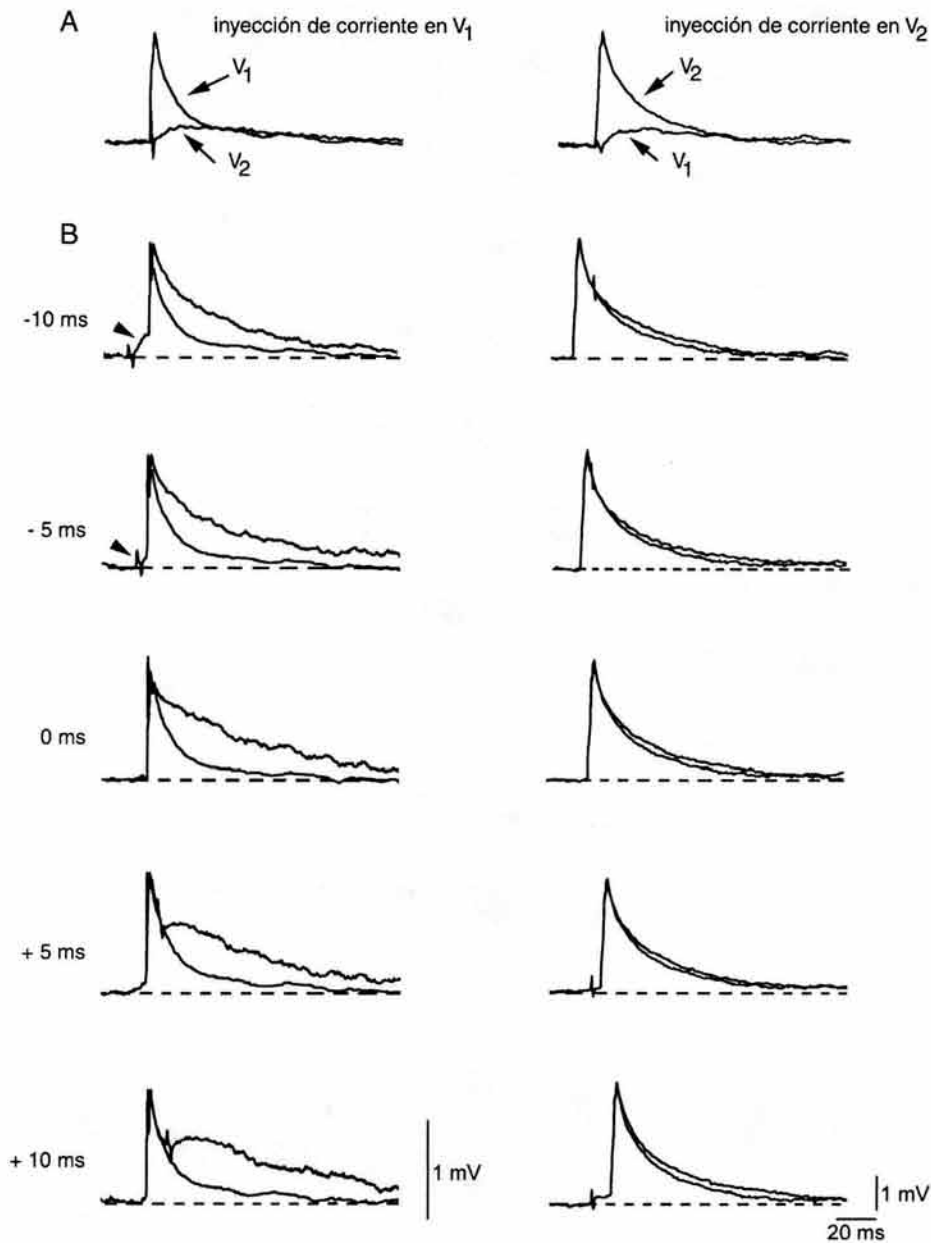
Sin embargo, la fase de caída se ve claramente modificada. En resumen, el resultado de este experimento es que cuando dos sinápticos simétricos provenientes de diferentes neuritas acopladas son integrados en el segmento inicial de una célula, independientemente del momento en que son generados, la fase de

caída se ve afectada. Por otra parte, si la célula que integra (local,  $V_1$ ) genera un PSE después del de la neurona acoplada, además del cambio en la fase de caída, el potencial compuesto resultante será de mayor amplitud.

El experimento realizado para los PSEs artificiales asimétricos se muestra en la figura 23. Nuevamente el panel A muestra la inyección de corriente en una de las células y su propagación registrada en la otra. Como en el caso anterior, se muestra el resultado promedio de 10 réplicas pero ahora para las dos células ya que siendo asimétricos, el resultado obtenido en cada célula es diferente. Por esta razón se analizará cada célula por separado. El PSE artificial generado en  $V_1$  (figura 23A) está sobrepuesto para toda la columna uno mientras que para la segunda columna, se sobrepuso el generado en  $V_2$ .

Para el caso de  $V_1$  en la figura 23B se obtiene el mismo resultado que para los potenciales simétricos. Sin embargo, el resultado de  $V_2$  amplía la conclusión anterior. En este caso y dado que el potencial artificial generado en  $V_2$  es más grande en amplitud (el doble) que el de  $V_1$ , no se observan cambios significativos en amplitud o fase de caída. De este modo la conclusión se generaliza al decir que cuando una neurona integra dos sinápticos -uno local y uno propagado de igual o mayor amplitud al local- provenientes de diferentes neuritas acopladas, independientemente del momento en que son generados la fase de caída se ve afectada.

Del mismo modo, si la célula que integra genera un PSE después del de la neurona acoplada, además del cambio en la fase de caída, se observará un incremento en amplitud. Sin embargo, cuando la neurona que integra recibe un sináptico de otra dendrita acoplada, pero de menor amplitud, el potencial no se afectará ni en amplitud ni en la fase de caída.



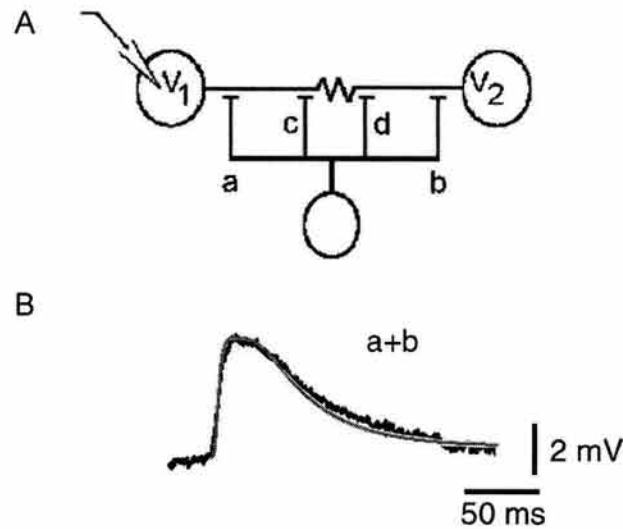
**Figura 23. Efecto del acoplamiento eléctrico en la suma de potenciales sinápticos artificiales (potenciales asincrónicos-asimétricos). A. Respuesta a la inyección de corriente sobre una sola de las neuronas y su propagación a la neurona contralateral. B. Potenciales sinápticos artificiales registrados en cada célula después de la colisión de corrientes inyectadas con diferentes tiempos entre sí. Se observan cambios notables en amplitud y fase de caída para  $V_1$ , mientras que  $V_2$  no se ve afectada. Note la diferencia en escala de amplitud para  $V_1$  y  $V_2$ .**

Otro factor que influye de manera importante en la suma de potenciales sinápticos es la distancia entre los sitios de iniciación de los PSEs. Dada la limitante experimental de no poder realizar inyecciones de corriente directamente en las dendritas, un modo indirecto de analizar este efecto es a través de nuestro modelo. Para esto, se simularon entradas sinápticas a diferentes distancias de la resistencia de acoplamiento (ver figura 24A) cuya inyección de corriente se propagaba hacia los somas, donde era observado el efecto de la distancia entre entradas. Estas simulaciones fueron comparadas con potenciales sinápticos que presentaban una fase de caída alargada.

Inicialmente simulamos el caso mostrado experimentalmente en el que la entrada presináptica está muy cerca al soma de cada célula, marcado como a, b en la figura 24. Los resultados de esta simulación reprodujeron la forma de los potenciales con fase de caída alargada. Los ajustes muestran que con 3 ms de retardo entre una y otra liberación y una relación de amplitudes de 1:2 se pueden obtener PSEs simulados, muy similares a los obtenidos de manera espontánea en el soma de las neuronas de Retzius, lo que se muestra en el trazo de la figura 24B.

Evidentemente, los PSEs con una fase de caída alargada tienen una tasa de acoplamiento mayor (68% en promedio) en comparación con los sinápticos sin joroba y por lo tanto, una mejor propagación hacia la neurona acoplada.

Cuando las entradas se localizan en la posición c y d, el resultado es un cambio en la frecuencia de disparo de las neuronas de Retzius, como se explicó anteriormente.



**Figura 24. Efecto de la distancia entre los sitios de iniciación en la suma de potenciales sinápticos. A. Modelo esquemático de las células de Retzius que muestra la posición en que fueron simuladas las entradas a lo largo de las dendritas; a y b señalan una entrada muy cercana al soma de cada célula, mientras que c y d son entradas cercanas a la resistencia de acoplamiento. B. Resultado de la simulación. El sináptico en color negro fue registrado intracelularmente, de manera espontánea, en el soma  $V_1$ , mientras que el ajuste en gris fue obtenido a partir de la simulación de las entradas presinápticas colocadas en la posición a y b.**

Resumiendo, la localización de las entradas sinápticas regula la propagación de PSEs. Por un lado, si las entradas se localizan cerca a la sinapsis eléctrica, existe un flujo de corriente hacia ambos lados de la sinapsis, afectando la frecuencia de disparo, por otro, las entradas cercanas al soma se integran alargando la fase de caída del PSE resultante permitiendo así una eficiente propagación a la neurona acoplada, por supuesto siempre apoyado por el alto coeficiente  $l/\lambda$  encontrado para estas neuritas.

## **VI. DISCUSIÓN**

## VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la contribución de las sinapsis eléctricas a los mecanismos de integración de las células de Retzius. Los principales resultados obtenidos son: a) el acoplamiento eléctrico entre ambas células permite la propagación de potenciales sinápticos de una neurona a otra; b) sabemos de la existencia y localización (a  $7.5 \mu\text{m}$  de la sinapsis eléctrica) de entradas presinápticas que liberan neurotransmisor sobre ambas células de Retzius; c) la resistencia de acoplamiento participa en la modulación de la amplitud de los PPSEs afectando tanto a la distribución de corriente sináptica en ambas neuritas como a la impedancia, esto podría determinar la frecuencia de disparo basal de las neuronas de Retzius; d) las particulares propiedades de cable de estas células como son el coeficiente  $\ell/\lambda$  (0.5) y el coeficiente de conductancia somatodendrítica ( $0.005 < \rho < 0.15$ ) permiten la propagación de PSEs entre las neuritas acopladas de ambas células, que actúan en serie; e) la suma de potenciales sinápticos generados en diferentes dendritas se realiza en el axón, muy cerca al soma, reduciendo los efectos no lineales que habrían si la suma se llevara a cabo en la misma neurita.

Las sinapsis eléctricas acoplan la actividad eléctrica de neuronas en sistemas nerviosos y periféricos de vertebrados e invertebrados (Bennett et al, 1963; Auerbach y Bennett, 1969; Baker y Llinás, 1971; Llinás et al, 1974) y la interacción entre sinapsis químicas y eléctricas sincroniza y modula la actividad de grupos de neuronas (Marder y Eisen, 1984, Relá y Szczupak, 2003; Galarreta y Hestrin, 1999, 2001; Gibson et al, 1999). En las neuronas de Retzius, el acoplamiento



eléctrico, no rectificante, permite la propagación de PSEs de una neurona a la otra. De este modo, las neuritas integran información producida por ambas neuronas, funcionando como un sistema en serie. Un fenómeno similar ha sido observado en el sistema estomatogástrico de crustáceos (Marder y Eisen, 1984), donde la propagación de PSIs a través de neuronas acopladas contribuye a la regulación del ritmo pilórico.

La presencia de PSEs sincrónicos en las neuronas de Retzius sugiere una entrada presináptica, no identificada, pero común a ambas neuronas. Esto ha sido observado también en las neuronas de Retzius y en las células T de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (Baylor y Nicholls, 1969). Las variaciones en amplitud de los PSEs en una célula y entre células sugieren una liberación de neurotransmisor (de manera independiente y probabilística) sobre ambas neuronas de Retzius. Por lo tanto, la sinapsis eléctrica entre estas neuronas está modulada por una sinapsis química, que afecta el proceso de integración de ambas neuronas.

La conducción pasiva de PSEs permite que estos lleguen al sitio de integración de la neurona acoplada. La posición de las entradas presinápticas (cerca de la resistencia de acoplamiento) asegura la distribución de corriente hacia ambos lados de la sinapsis. El hecho de que la suma de PSEs se lleve a cabo muy cerca al soma contribuye a que las neuronas de Retzius integren no sólo los PSEs que vienen de las neuritas acopladas, sino también aquellos que son generados en las no acopladas, evitando los efectos no lineales en la suma.

Así, el impacto de cualquier sinapsis en la frecuencia de disparo de cada neurona depende principalmente de la localización de la sinapsis a lo largo de la dendrita, considerando un filtrado pasivo del cable. De hecho, los potenciales de acción aparecen con un retardo de

2-6 ms entre cada célula y su frecuencia es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento.

La teoría de cable (Rall, 1959) predice que la transmisión a lo largo de las dendritas es pasiva, con lo cual la variabilidad dependiente de la posición de las entradas sinápticas químicas es clara. En este trabajo hemos modelado la sinapsis eléctrica de las células de Retzius basándonos en la teoría de cable y en los parámetros obtenidos a partir de la morfología y de la electrofisiología. El modelo propuesto reprodujo de manera precisa lo observado experimentalmente.

De hecho los árboles dendríticos de muchas neuronas se comportan de manera pasiva (lineal) como ha sido ampliamente descrito (Iansek y Redman, 1973; Sayer et al, 1990; Egelhaaf et al, 1994). Sin embargo, en varios tipos de células, como en el hipocampo, en células piramidales y en neuronas motoras (Iansek y Redman, 1973; Andersen et al, 1980; Jack et al, 1981; Stricker et al, 1996; Frick et al, 1998; Pettit y Augustine, 2000; Magee y Cook, 2000) las dendritas no son puramente pasivas y la integración depende tanto de los mecanismos dendríticos (pasivos y activos) como sinápticos. Esto reduce la variabilidad de las respuestas sinápticas a lo largo de las dendritas. Por otra parte, recientemente se ha acumulado gran cantidad de evidencias (para una revisión ver Stricker, 2002) que muestran que efectivamente algunas interacciones no lineales participan en la propagación de PSEs. En nuestro caso y basándonos en los resultados obtenidos de la morfología, sabemos que la mayoría de las dendritas de una célula de Retzius que hacen contacto con la otra no tienen ramificaciones y que sus diámetros son casi constantes, de este modo, pudieron ser modeladas como cables pasivos. Como los PSEs parecen ser producidos en diferentes dendritas y con una

probabilidad muy baja, su suma es lineal ya que como se había mencionado, ésta se realiza muy cerca al soma.

La morfología de las células de Retzius fue demostrada a través de los colorantes amarillo Lucifer y rojo de Texas. Clásicamente, el acoplamiento eléctrico es demostrado por inyecciones intracelulares de amarillo Lucifer. En nuestro caso, este colorante no cruza la sinapsis eléctrica. Sin embargo, ha sido reportado que el amarillo Lucifer no cruza todas las sinapsis eléctricas (ver Bodmer et al, 1988, Pérez-Armendariz et al, 1991), ya que su molécula (457 Da) puede ser más grande que la conductancia del poro del canal. De este modo, la ausencia de propagación del amarillo Lucifer a través de la sinapsis eléctrica de las neuronas de Retzius no implica que no haya acople eléctrico, ya que esto fue demostrado electrofisiológicamente. Otro aspecto importante que debe ser considerado es que la permeabilidad del amarillo Lucifer depende también de la composición molecular del canal. En nuestro caso, el que el amarillo Lucifer en combinación con el rojo de Texas no crucen la sinapsis fue útil para determinar los puntos de contacto entre las neuritas de ambas células. Así se determinaron las propiedades morfológicas que sirvieron de base al modelo, como son, que los puntos de contacto se realizan en neuritas sin ramificaciones y de diámetros constantes.

En las células de Retzius, algunas de las propiedades de cable son diferentes a las reportadas en la literatura. El diámetro del soma de estas células está entre 60 y 80  $\mu\text{m}$ . Por el contrario, el diámetro de las dendritas es en promedio, de 1.08  $\mu\text{m}$  y por lo tanto, el cable equivalente resulta ser mucho menor en área si se compara con el soma. Tomando en cuenta estas dos diferencias en superficie se tiene una tasa de conductancia somato-dendrítica (Rall, 1959) entre 0.005 y 0.15, que también es muy diferente a los valores encontrados en otras

especies. Por ejemplo, en el humano adulto el valor promedio para  $\rho$  es de 10.6 (Chu, 1954) y en el gato adulto,  $\rho=2.2-2.6$  (Eccles, 1957; Coombs et al., 1959). El valor de  $\rho$  encontrado para las células de Retzius se debe al hecho de que el soma tiene un área muy grande comparada con el área del cable equivalente. En principio,  $\rho=0.005-0.15$  implicaría una fuerte caída de potencial en el paso de los PSEs de las dendritas al soma. Sin embargo, es posible registrar PSEs en el soma. Esto se debe principalmente a que la integración se lleva a cabo muy cerca al soma axón y gracias a la eficiente propagación de las dendritas, la llegada de los PSEs al sitio de integración está asegurada.

Como se mencionó, las células de Retzius tienen una entrada presináptica común, que libera neurotransmisor sobre ambas células. Aquí demostramos que estas entradas están en las neuritas acopladas. Cuando los eventos provenientes de la célula acoplada son eliminados agregando  $Mg^{2+}$  y disminuyendo la concentración de  $Ca^{2+}$ , en las distribuciones de amplitud se ven picos Gaussianos en amplitudes múltiples de la amplitud miniatura, mostrando que la liberación es cuántica, similar a la demostrada en otras sinapsis centrales (Kuno, 1964, 1971; Edwards et al, 1976a,b; Nicholls y Wallace, 1978; Jack et al, 1981; Hess et al, 1987; Korn y Faber, 1987; Walmsley et al, 1987; Lin y Faber, 1988a, para una revisión ver Redman, 1990).

El desacoplamiento de las neuronas de Retzius, para demostrar de manera más clara la naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor no fue posible realizarlo, al menos no con aminos como la serotonina y octopamina, cambiando el pH, heptanol y octanol. Se ha reportado que la serotonina modula el nado (Glover y Kramer, 1982; Hashemzadeh-Gargari y Friesen, 1989) y por lo tanto, debería tener un efecto sobre las células de Retzius. Adicionalmente, la octopamina tiene los mismos efectos que la serotonina, pero la

modulación del nado es más sensible a serotonina. Otro estudio (Crisp y Mesce, 2003) ha demostrado que cuando la serotonina y/o octopamina, son aplicadas de manera local al ganglio de la cabeza (ganglio 1), el nado ficticio es inhibido. Por el contrario, si se quitan estas aminas, el nado se induce. Sin embargo, en este trabajo, la aplicación de aminas al ganglio falló al desacoplar la sinapsis eléctrica.

Se sabe que el heptanol y el octanol son dos agentes que reducen la conductancia de las sinapsis eléctricas en células beta del páncreas de ratón (Pérez-Armendariz et al, 1991) y en vertebrados en general. Sin embargo, en la sanguijuela no tuvieron efectos significativos. Este resultado no es sorprendente ya que se ha reportado que las sinapsis eléctricas de invertebrados responden de manera variada a los antagonistas de uniones comunicantes (Adler y Woodruff, 2000).

Adicionalmente cambios intracelulares de pH suelen desacoplar sinapsis eléctricas al incrementar la resistencia de acoplamiento (Giaume et al, 1980). Para las neuronas de Retzius el modelo predijo que los cambios en la resistencia de acoplamiento modulan el paso de corriente de una célula a otra modulando así la amplitud de los PSEs. Sin embargo, el modelo también predice que la amplitud de los PSEs en la neurita acoplada es siempre la misma para todos los valores de la resistencia de acoplamiento ya que la reducción de corriente que pasa a la neurona acoplada al incrementarse la resistencia de acoplamiento es compensada al incrementarse la impedancia. Esta pudiera ser la razón por la cual no se observó desacoplamiento cuando se cambio el pH intracelular. El único experimento que puede desacoplar a la sinapsis eléctrica de las neuronas de Retzius es la fotoablación de una de ellas, experimento que aún deberá hacerse

para futuros trabajos donde se haga a fondo el análisis cuántico de la liberación de neurotransmisor.

La identidad de la entrada presináptica es desconocida, pero combinando datos obtenidos experimentalmente con el modelo, fue posible determinar la localización de las entradas sinápticas químicas en las dendritas acopladas. La estimulación de las neuronas sensoriales de la sanguijuela (T, P y N), producen efectos diferentes en las células de Retzius (Velazquez-Ulloa et al, 2003), pero estas entradas presinápticas parecen tener una actividad basal muy baja, dependiente de la estimulación sensorial, como para ser consideradas la principal fuente de liberación de neurotransmisor sobre estas células.

La eficiencia en la conducción electrotónica se ve reforzada por un fenómeno de suma de PSEs producidos en ambas neuronas, que se realiza muy cerca al soma, donde llegan también los PSEs provenientes de neuritas no acopladas. Dependiendo de la relación tanto temporal como de amplitudes entre potenciales sinápticos, el proceso de integración se va afectado de diversas maneras, como ya fue revisado en los resultados. Pero la conclusión importante de estos experimentos, sumada a las particulares propiedades de cable ya descritas, es que el proceso de propagación e integración en estas células es a tal grado eficiente que ambas células integran los PSEs locales y acoplados, sin perder la información proveniente de neuritas no acopladas.

En vertebrados, gran cantidad de estudios han establecido la importante participación del acoplamiento eléctrico al controlar la actividad sincronizada de algunas neuronas (Llinás et al, 1974, De Zeeuv et al, 1996). En la sanguijuela, el alto grado de acoplamiento eléctrico en las células de Retzius muestra la importancia en la

regulación de la respuesta final. Este acoplamiento en conjunto con la liberación de serotonina dependiente de frecuencia (Trueta et al, 2003), puede ser la fuente que modula el nado entre otras conductas. Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo y en todos los ya mencionados, la integración sináptica funciona de manera diversa en diferentes tipos neuronales, pero el estudiarla en pequeñas especies da la pauta para entender a las más desarrolladas.

Para finalizar, un punto que es importante señalar es que para entender sistemas biológicos complejos se requiere de la integración del conocimiento tanto experimental como computacional. La Biología Computacional tiene dos ramas diferentes, una es el descubrimiento del conocimiento (i.e. el significado de los datos), que extrae esta información a partir de grandes cantidades de datos experimentales, generando hipótesis como resultado y la otra, el análisis basado en la simulación, que prueba las hipótesis, generando predicciones para ser probadas en nuevos experimentos (Kitano, 2002).

A lo largo de este trabajo se combinaron los resultados de diferentes áreas, la electrofisiología, la morfología y el modelado y uso de la computadora para confirmar datos y/o obtener nueva información. Tal es el caso del valor de la resistencia de acoplamiento. El rango de valores obtenidos para esta resistencia fue el resultado del modelado y simulación del acoplamiento eléctrico de las células de Retzius. Actualmente se combinan diferentes áreas para obtener resultados más completos, pero debemos aclarar que el modelaje requerirá siempre de la parte experimental para obtener resultados reales, dentro de intervalos biológicos y que posteriormente pueda obtener resultados nuevos, pero confiables.

## **VII. REFERENCIAS**



## VII. REFERENCIAS

1. Adler EL, Woodruff RI (2000). Varied effects of 1-octanol on gap junctional communication between ovarian epithelial cells and oocytes of *Oncopeltus fasciatus*, *Hyalophora cecropia*, and *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 43, 22-32.
2. Andersen P, Silfvenius H, Sundberg SH, Sveen O (1980). A comparison of distal and proximal dendrite synapses on CA1 pyramids in guinea pig hippocampal slices *in vitro*. *J Physiol (Lond.)* 307, 273-299.
3. Auerbach AA, Bennett MVL (1969). A rectifying electrotonic synapse in the central nervous system of a vertebrate. *J Gen Physiol* 53, 211-237.
4. Baker R, Llinás R (1971). Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *J Physiol (London)* 212, 45-63.
5. Baylor DA, Nicholls JG (1969). Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurones in the central nervous system of the leech. *J Physiol* 203, 591-609.
6. Bennet M, Nakajima Y, Pappas GD (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. III. Giant electromotor neurons of *Malapterurus electricus*. *J Neurophysiol* 30, 209-235.
7. Bennett MVL, Aljure E, Nakajima Y, Pappas GD (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science* 141, 62-263.
8. Bennett MVL. Electrical transmission: a functional analysis and comparison to chemical transmission. In E.R. Kandel (ed). Cellular Biology of neurons v1, section 1, Handbook of Physiology. The Nervous System. Williams and Williams. Baltimore, MD. 357-

416. 1977.
9. Bloomfield SA, Xin D, Persky SE (1995). A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 12, 985-99.
  10. Bodmer R, Verselis V, Levitan IB, Spray DC (1988). Electrotonic synapses between *Aplysia* neurons in situ and in culture: aspects of regulation and measurements of permeability. *J Neurosci* 8, 1656-70.
  11. Bosch E (1990). Ultrastructure of the electrotonic and chemical components of the later-to-motor and medial-to-motor synapses in crayfish nerve cord. *J Comp Neurol* 299, 446-461.
  12. Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE, Dotto GP (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6453-6457.
  13. Brivanlou Y, Warland D, Meister M (1998). Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells. *Neuron* 20, 527-539.
  14. Brodfhuerer PD, Bebski EA, O'Gara BA, Friesen Wo (1995). Neuronal control of leech swimming. *J Neurobiol* 27, 403-418.
  15. Bruzzone R, Ressot C (1997). Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 9, 1-6.
  16. Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238, 1-27.
  17. Burke RE (1967). Composite nature of the monosynaptic excitatory postsynaptic potential. *J Neurophysiol* 30, 1114-1137.
  18. Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Phipps J, Yen L, Batist G (2001). Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity

- in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 47, 126-32.
19. Cash S and Yuste R (1999). Linear summation of excitatory inputs by CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 22, 383-394.
  20. Cathala L, Brickley S, Cull-Candy S, Farrant M (2003). Maturation of EPSCs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 23, 6074-6085.
  21. Cazalets JR, Bertrand S, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1998). GABAergic control of spinal locomotor networks in the neonatal rat. *Ann NY Acad Sci* 860, 168-180.
  22. Christensen BN (1983). Distribution of electrotonic synapses on identified lamprey neurons: a comparison of a model prediction with an electron microscopic analysis. *J Neurophysiol* 49, 705-16.
  23. Chu LW (1954). A cytological study of anterior horn cells isolated from human spinal cord. *J Comp Neurol* 100, 381-413.
  24. Church J, Baimbridge K (1991). Exposure to high-pH medium increases the incidence and extent of dye coupling between rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *J Neurosci* 11, 3289-3295.
  25. Colombaioni L, Brunelli M (1988). Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the CNS of *Hirudo medicinalis*. *Exp Biol* 47, 139-44.
  26. Conti R, Lisman J (2003). The high variance of AMPA receptor- and NMDA receptor-mediated responses at single hippocampal synapses: evidence for multiquantal release. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4885-90.
  27. Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC (1959). The electrical constants of the motoneurone membrane. *J Physiol* 145, 505-28.
  28. Cooper RL, Donmezer A, Shearer J (2003). Intrinsic differences in sensitivity to 5-HT between high- and low-output terminals innervating the same target. *Neurosci Res* 45, 163-72.

29. Crisp KM, Mesce KA (2003). To swim or not to swim: regional effects of serotonin, octopamine and amine mixtures in the medicinal leech. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189, 461-70.
30. De Zeeuw CI, Lang EJ, Sigihara I, Ruigrok TJH, Eisenman LM, Mugnaini E, Llinás, R (1996). Morphological correlates of bilateral synchrony in the rat cerebellar cortex. *J Neurosci* 16, 3412-3426.
31. Del Castillo J, Katz B (1954). Quantal component of the end-plate potential. *J Physiol* 124, 560-573.
32. Delcomyn F. Foundations of Neurobiology. First ed. WH Freeman and Company. New York. 1998.
33. De-Miguel F, Vargas-Caballero M, García-Pérez E (2001) Spread of synaptic potentials through electrical synapses in Retzius neurons of the leech. *J Exp Biol* 204, 3241-3250.
34. Dermietzel R, Spray D (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *TINS* 16, 186-192.
35. Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MVL, Spray DC, Willecke K (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10148-10152.
36. DeVries SH, Schwartz EA (1989). Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol Lond* 414, 351-375.
37. Dykes IM, Freeman FM, Bacon JP, Davies JA (2004). Molecular basis of gap junctional communication in the CNS of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Neurosci* 24, 886-94.
38. Eccles J (1976). From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes Rec R Soc Lond* 30, 219-230.
39. Eccles JC (1957). The clinical significance of research work on the chemical transmitter substances of the nervous system.

*Med J Aust* 44, 745-53.

40. Ecker R (1963). Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J Gen Physiol* 46, 573-587.
41. Edwards FR, Redman SJ, Walmsley B (1976a). Statistical fluctuations in charge transfer at Ia synapses on spinal motoneurons. *J Physiol* 259, 665-688.
42. Edwards FR, Redman SJ, Walmsley B (1976b). Non-quantal fluctuations and transmission failures in charge transfer Ia synapses on spinal motoneurons. *J Physiol* 259, 689-704.
43. Egelhaaf M, Haag J, Borst A (1994). Processing of synaptic information depends on the structure of the dendritic tree. *NeuroReport* 6, 205-208.
44. Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129, 805-17.
45. Fernández de Miguel F (1996). Synaptic integration in electrically coupled neurons. Society for Neuroscience, 26th Annual Meeting. Washington, DC.
46. Fernández de Miguel F, Drapeau P (1995). Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. *J Neurobiol* 27, 367-379.
47. Fetcho JR (1991). Morphological variability, segmental relationships, and functional role of a class of commissural interneurons in the spinal cord of goldfish. *J Comp Neurol* 299, 283-98.
48. French AS, DiCaprio RA (1975). The dynamic electrical behavior of the electrotonic junction between Retzius cells in the leech. *Biol Cybern* 17, 129-135.
49. Frick A, Ziegelgansberger W, Dodt HU (1998). The

- subcellular distribution of glutamate receptors in layer V pyramidal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 24, 325.
50. Fukuda T, Kosaka T (2000). Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci* 20, 1519-1528.
  51. Furshpan EJ, Furukawa T (1962). Intracellular and extracellular responses of the several regions of the Mauthner cell of the goldfish. *J Neurophysiol* 25, 732-771.
  52. Furshpan EJ, Potter DD (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol* 145, 289-325.
  53. Galarreta M, and Hestrin S (2001). Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292, 295-9.
  54. Galarreta M, Hestrin S (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402, 72-75.
  55. Garcia-Perez E, Vargas-Caballero M, Velazquez-Ulloa N, Minzoni A, De-Miguel FF (2004). Synaptic integration in electrically-coupled neurons. *Biophys J* 86, 646-655.
  56. Giaume C, Spira ME, Korn H (1980). Uncoupling of invertebrate electrotonic synapses by carbon dioxide. *Neurosci Lett* 17, 197-202.
  57. Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75-79.
  58. Glover JC, Kramer AP (1982). Serotonin analog selectively ablates identified neurons in the leech embryo. *Science* 216, 317-9.

59. Goodenough DA, Goliger JA, Paul, D (1996). Connexins, connexons and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65, 475-502.
60. Guthrie SC, Gilula NB (1989). Gap-junctional communication and development. *Trends Neurosci* 2, 12-16.
61. Hagiwara S, Morita H (1962). Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion. *J Neurophysiol* 25, 721-731.
62. Hashemzadeh-Gargari H, Friesen WO (1989). Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamine. *Comp Biochem Physiol C* 94, 295-302.
63. Hatta K, Korn H (1998). Physiological properties of the Mauthner system in the adult zebrafish. *J Comp Neurol* 395, 493-509.
64. Hess G, Kuhnt U, Voronin LL (1987). Quantal analysis of paired pulse facilitation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Lett* 77, 187-192.
65. Hille, B (2001). *Ionic Channels in Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
66. Hodgkin AL, Katz B (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol (Lond)* 108, 37-77.
67. Hodgkin AL, Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-44.
68. Hodgkin AL, Rushton WAH (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc Royal Soc* 133, 444-479.
69. Iansek R, Redman, SJ (1973). The amplitude, time course and charge of unitary excitatory post-synaptic potentials evoked in spinal motoneuron dendrite. *J Physiol* 234, 665-688.

70. Jack JB, Redman SJ, Wong K (1981). The components of synaptic potentials evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group 1a afferents. *J Physiol (Lond)* 321, 65-96
71. Jack JJ, Noble D, Tsien RW. Electric Current Flow in Excitable Cells. Oxford: Clarendon Press, 1975.
72. Jack JJ, Redman SJ, Wong K (1981). The components of synaptic potentials evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group Ia afferents. *J Physiol (Lond)* 321, 65-96.
73. Johnson EW, Wernig A (1971). The binomial nature of transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 218, 757-767.
74. Johnston D, Wu SMS. Foundations of Cellular Neurophysiology, MIT Press, Cambridge, 1995.
75. Johnston D, Magee JC, Colbert CM, Christie BR (1996). Active properties of neuronal dendrites. *Annu Rev Neurosci* 16, 165-186.
76. Jones EG, Cowan WM. The nervous tissue. In The structural basis of Neurobiology. Jones EG Ed. McMillan Press, London. Pp 282-370. 1983.
77. Kandel E, Schwartz J, Messell T Eds. Essentials of neural science and behavior. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange. 1995.
78. Kandler K, Katz LC (1995). Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5, 98-105.
79. Kiehn O, Kjaerulff O (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the *in vitro* neonatal rat. *J Neurophysiol* 75, 1472-82.
80. Kitano H (2002). Computational systems biology. *Nature* 420, 206-210.



81. Kolb H and Nelson R (1996). Hyperpolarizing, small-field, amacrine cells in cone pathways of cat retina. *J Comp Neurol* 29, 371, 415-36.
82. Korn H, Faber DS (1976). Vertebrate central nervous system: same neurons mediate both electrical and chemical inhibitions. *Science* 194, 1166-9.
83. Korn H, Faber DS (1987). Regulation and significance of probabilistic release mechanisms at central synapses. In *Synaptic Function*, eds GM Edelman, WE Gall and WN Cowan, pp 57-108. New York: John Wiley and Sons.
84. Korn H. in Central Synapses: Quantal Mechanisms and Plasticity (Eds. Faber DS, Korn H, Redman SJ, Thompson SM & Altman JS). 19-23 (Human Frontier Science Program, Strasbourg, France, 1998).
85. Kuno M (1964). Quantal components of excitatory synaptic potentials in spinal motoneurons. *J Physiol* 175, 81-99.
86. Kuno M (1971). Quantum aspects of central and ganglionic synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev* 51, 647-678.
87. Kuno M, and Miyahara JT (1969). Non-linear summation of unit synaptic potentials in spinal motoneurons of the cat. *J Physiol* 201, 465-477.
88. Kwak BR, Hermans MMP, De Jonge HR, Lohmann SM, Jongsma HJ, Chanson M (1995). Differential regulation of distinct types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. *Mol Biol Cell* 6, 1707-1719.
89. Lampl I, Yarom Y (1997). Subthreshold oscillations and resonant behavior: two manifestations of the same mechanism. *Neurosci* 78, 325-341.
90. Langmoen IA, Andersen P (1983). Summation of excitatory postsynaptic potentials in spinal motoneurons of the cat. *J*

*Neurophysiol* 50, 1320-1329.

91. Lasater EM (1987). Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7319-7323.
92. Lent CM (1973). Retzius cells from segmental ganglia of four species of leeches: comparative neuronal geometry. *Comp Biochem Physiol* 44, 35-40.
93. Lin JW, Faber DS (1988). Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials. *J Neurosci* 8, 1302-1312.
94. Lin JW, Faber DS (1988). Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. II. Plasticity of excitatory postsynaptic potentials. *J Neurosci* 8:1313-1325.
95. Llinás R, Baker R, Sotelo C (1974). Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J Neurophysiol* 37, 560-571.
96. Llinás R. The noncontinuous nature of movement execution. In: Motor control: concepts and issues (Humphrey DR, Freund H-J, eds), pp 223-242. New York: Wiley. 1991.
97. Loewenstein W (1981). Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 829-913.
98. Loewenstein W. The touchstone of life. Oxford Univ Press, New York. 1999.
99. Magee JC, Cook EP (2000). Synaptic weight is independent of synapse location in CA1 pyramidal neurons. *Nature Neurosci* 3, 895-903.
100. Manor Y, Yarom Y, Chorev E, Devor A (2000). To beat or not to beat: a decision taken at the network level. *J Physiol (Paris)* 94:375-390.

101. Marder E, Eisen JS (1984). Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to the same physiological inputs and neurotransmitters. *J Neurophysiol* 51, 1362-1373.
102. Martin AR, Pilar G (1963) Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J Physiol* (London) 168, 443-463.
103. Mason A, Leake LD (1978). Morphology of leech Retzius cells demonstrated by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Comp Biochem Physiol* 61A, 213-216.
104. Mason A, Sunderland AJ, Leake LD (1979). Effects of the leech Retzius cells on body wall muscles. *Comp Biochem Physiol* 63C, 359-361.
105. Midtgaard J. (1996). Active membrane properties and spatiotemporal synaptic integration in dendrites of vertebrate neurones. *Acta Physiol Scand* 157, 395-401.
106. Moreno AP, Rook MB, Fishman GI, Spray DC (1994). Gap junctions channels: distinct voltage-sensitive and insensitive conductance states. *Biophys J* 67, 113-119.
107. Müller K, Nicholls JG, Stent GS. Eds. (1981). Neurobiology of the leech. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.
108. Murray J. Asymptotic Analysis. New York: Springer Verlag. 1984.
109. Neyton J, Trautmann A. (1985). Single channel currents of an intercellular junction. *Nature* 317, 331-335.
110. Nicholls J, Purves D (1972). A comparison of chemical and electrical synaptic transmission between single sensory cells and a motoneurone in the central nervous system of the leech. *J Physiol* (London) 225, 637-656.
111. Nicholls J, Wallace BG (1978). Quantal analysis of

- transmitter release at an inhibitory synapse on the central nervous system of the leech. *J Physiol* (London) 281, 171-185.
112. Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, Fuchs PA. From Neuron to Brain. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 2001.
  113. Packer OS, Dacey DM (2002). Receptive field structure of H1 horizontal cells in macaque monkey retina. *J Vis* 2, 272-92.
  114. Peinado A, Yuste R, Katz LC (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10, 103-114.
  115. Pérez Velázquez JL, Valiante TA, Carlen PL (1994). Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J Neurosci* 14, 4308-4317.
  116. Perez-Armendariz M, Roy C, Spray DC, Bennett MV (1991). Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys J* 59, 76-92.
  117. Perkins G, Goodenough DA, Sosinsky G. (1997). Three dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys J* 72, 533-544.
  118. Peters A, Palay SL, Webster H. The fine structure of the nervous system. Oxford University Press. New York, NY. 1991. 494 pp.
  119. Pettit DL, Augustine GJ (2000). Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* 84, 28-38.
  120. Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, Baines RA, Barnes TM, Ford C, Hekimi S, Lee R, Shaw JE, Starich TA, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ. (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14,

348-9.

121. Piccolino M, Neyton J, Witkovsky P, and Gerschenfeld HM (1982). Gamma-Aminobutyric acid antagonists decrease junctional communication between L-horizontal cells of the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3671-3675.
122. Rall W (1959). Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp Neurol* 1, 491-527.
123. Rall W (1967). Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* 30, 1138-1168.
124. Rall W, Burke RE, Smith TG, Nelson P and Frank K (1967). Dendritic location of synapses and possible mechanisms for the monosynaptic EPSP in motoneurons. *J Neurophysiol* 30, 1169-1193.
125. Rall W. (1969). Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophys J* 9, 1483-508.
126. Rall W. In Reiss RF (Ed): Neural Theory and Modelling. Stanford University Press, Palo Alto CA. 1964.
127. Ready DF; Nicholls JG (1979). Identified neurons isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature* 281, 67-69.
128. Reedman S (1990). Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol Rev* 70, 165-198.
129. Relá L, Szczupak L (2003). Coactivation of motoneurons regulated by a network combining electrical and chemical synapses. *J Neurosci* 23, 682-92.
130. Rörig B, Klaus G, Sutor B (1996). Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 490, 31-49.
131. Ross WN, Arechiga H, Nicholls JG (1987). Optical recording

- of calcium and voltage transients following impulses in cell bodies and processes of identified leech neurons in culture. *J Neurosci* 7, 3877-87.
132. Sayer RJ, Friedlander MJ, Redman SJ (1990). The time course and amplitude of EPSPs evoked at synapses between pairs of CA3/CA1 neurons in the hippocampal slice. *J Neurosci* 10, 826-836.
133. Schmidt BJ, Hochman S, MacLean JN (1998). NMDA receptor-mediated oscillatory properties: potential role in rhythm generation in the mammalian spinal cord. *Ann NY Acad Sci* 860, 189-202.
134. Shapovalov AI, Shiriaev BI (1980). Dual mode of junctional transmission at synapses between single primary afferent fibres and motoneurons in the amphibian. *J Physiol (London)* 306, 1-15.
135. Sherman A, Rinzel J (1992). Rhythmogenic effects of weak electrotonic coupling in neuronal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2471-2474.
136. Simpson I, Rose B, Loewenstein WR (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*. 195, 294-6.
137. Sloper JJ (1972). Gap junctions between dendrites in the primate neocortex. *Brain Res* 44, 641-646.
138. Sokolov MV, Rossokhin AV, Kasyanov AM, Gasparini S, Berretta N, Cherubini E, Voronin LL (2003). Associative mossy fibre LTP induced by pairing presynaptic stimulation with postsynaptic hyperpolarization of CA3 neurons in rat hippocampal slice. *Eur J Neurosci* 17, 1425-1437.
139. Sotelo C, Korn H (1978). Morphological correlates of electrical and other interactions through low-resistance pathways

- between neurons of the vertebrate central nervous systems. *Int Rev Cytol* 55, 67-107.
140. Spray D, Harris C, Bennet MVL (1991). Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science* 211, 712-715.
141. Stricker C (2002). Central synaptic integration: linear after all? *News Physiol Sci* 17, 138-143.
142. Stricker C, Field AC, Redman SJ (1996). Statistical analysis of amplitude fluctuations in EPSCs evoked in rat CA1 pyramidal neurones *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 490, 419-441.
143. Survhev L (1992). Freeze-etched postsynaptic membranes in the visual cortex reveal different types of synapses including mixed synapses. *Brain Res* 573, 174-178.
144. Szczupak L, Kristan WB (1995). Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *J Neurophysiol* 74, 2614-2624.
145. Thurbon D, Luscher HR, Hofstetter T, Redman SJ (1998). Passive electrical properties of ventral horn neurons in rat spinal cord slices. *J Neurophysiol* 80, 2485-502.
146. Trueta C, Mendez B, De-Miguel FF (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J Physiol (London)* 547(Pt 2), 405-16.
147. Veenstra RD (1996). Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* 28, 327-37.
148. Veenstra RD, DeHaan RL (1988). Cardiac gap junction channel activity in embryonic chick ventricle cells. *Am J Physiol* 254(Pt 2), H170-80.
149. Veenstra RD, Wang HZ, Beyer EC, Ramanan SV, Brink PR (1994). Connexin37 forms high conductance gap junction

- channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities. *Biophys J* 66, 1915-1928.
150. Velazquez-Ulloa N, Blackshaw SE, Szczupak L, Trueta C, Garcia E, De-Miguel FF (2003). Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *J Neurobiol* 54, 604-17.
  151. Viele K, Stromberg AJ, Cooper RL (2003). Estimating the number of release sites and probability of firing within the nerve terminal by statistical analysis of synaptic charge. *Synapse* 47, 15-25.
  152. Walmsley B, Edwards FR, Tracey DJ (1987). The probabilistic nature of synaptic transmission at a mammalian central synapse. *J Neurosci* 7, 1037-1046.
  153. Wang H, Li Z, Lemanski LF, Veenstra RD (1992). Gating of mammalian cardiac gap junction channels by transjunctional voltage. *Biophys J* 63, 139-151.
  154. Watanabe A. (1958). The interaction of electrical activity among neurons of lobster cardiac ganglion. *Jpn J Physiol* 8, 305-318.
  155. White TW, Paul DL (1999). Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol* 61, 283-310.
  156. Yang J, Chapman KM (1983). Frequency domain analysis of electrotonic coupling between leech Retzius cells. *Biophys J* 44, 91-99.
  157. Yarom Y (1991). Rhythmogenesis in a hybrid system-interconnecting an olivary neuron to an analog network of coupled oscillators. *Neuroscience* 44, 263-275.
  158. Yuste R, Tank D (1996). Dendritic integration in mammalian neurons. *Neuron* 16, 701-716.



159. Zucker RS (1972). Crayfish escape behavior and central synapses. 3. Electrical junctions and dendrite spikes in fast flexor motoneurons. *J Neurophysiol* 35, 638-51.
160. Zucker RS, Kullman DM, Bennett, M. Release of neurotransmitters. In Fundamental Neuroscience. Zigmond MJ, Bloom, FE, Roberts JL, Landis SC, Squire LR Eds. Academic Press San Diego CA. 1999.

## **VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS**

## SPREAD OF SYNAPTIC POTENTIALS THROUGH ELECTRICAL SYNAPSES IN RETZIUS NEURONES OF THE LEECH

Francisco F. De-Miguel\*, Mariana Vargas-Caballero and Elizabeth García-Pérez

*Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510, D.F., México*

\*e-mail: ffernand@ifisiol.unam.mx

Accepted 6 July 2001

### Summary

We studied the spread of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) through electrical synapses in Retzius neurones of the leech *Haementeria officinalis*. The pair of Retzius neurones in each ganglion is coupled by a non-rectifying electrical synapse. Both neurones displayed synchronous EPSPs of varying amplitudes and rise times. The kinetics of synchronous EPSPs was similar in 79% of the EPSP pairs. In the remaining 21%, one EPSP was smaller and slower than the other, suggesting its passive spread from the other neurone. The proportion of these events increased to 75% in the presence of  $Mg^{2+}$  in the bathing fluid. This spread of EPSPs from one neurone to another was tested by producing artificial EPSPs by

current injection into the soma of one Retzius neurone. The artificial EPSPs were smaller and arrived more slowly at the soma of the coupled neurone. The coupling ratios for the EPSPs were proportional to the coupling ratio for long steady-state pulses in different neuronal pairs. Our results showed that EPSPs spread from one Retzius neurone to the other and support the idea that EPSP spread between electrically coupled neurones may contribute to the integration processes of neurones.

Key words: synapse, electrical synapse, integration, leech, gap junction, *Haementeria officinalis*.

### Introduction

Electrical activity patterns in neurones arise from the integration of multiple synaptic inputs acting in concert. The original concept of integration predicts that one neurone summates the excitatory and inhibitory influences converging upon it to produce a new output signal (Fatt, 1957; Coombs et al., 1957; for reviews, see Nicholls et al., 1992; Yuste and Tank, 1996). Diverse mechanisms contribute to the integration process in single neurones, including the production of dendritic spikes (Spencer and Kandel, 1961; Andersen et al., 1966; Llinás and Nicholson, 1971; Llinás and Hess, 1976; Llinás and Sujimori, 1980), the activation of voltage-dependent  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents (Deisz et al., 1991; Hirsch and Gilbert, 1991; Schwandt and Crill, 1995; Stuart and Sakmann, 1995; Haag and Borst, 1996; Lipowsky et al., 1996; Gillissen and Alzheimer, 1997; Scamans et al., 1997; Margulis and Tang, 1998) and non-linear summation of EPSPs (Wessel et al., 1999).

The fact that many central neurones of adult invertebrates and vertebrates are electrically coupled (Bennett et al., 1963; Auerbach and Bennett, 1969; Baker and Llinás, 1971; Nicholls and Purves, 1972; Korn et al., 1973; Llinás et al., 1974; Schmalbruch and Jahnsen, 1981; Marder and Eisen, 1984; Abbott et al., 1991; McMahon, 1994; Hatton and Yang, 1994; Wolszon et al., 1995; Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999) makes it possible that the arrival of synaptic potentials from other neurones will affect the integration

process. One clear example is the stomatogastric system of crustaceans, where the spread of inhibitory postsynaptic potentials through electrically coupled neurones contributes to the regulation of the timing of the pyloric rhythm (Marder and Eisen, 1984).

In this paper, we studied the spread of synaptic potentials from one neurone to another in pairs of electrically coupled Retzius neurones in the Mexican leech *Haementeria officinalis*. Each of the 21 segmental ganglia of the leech central nervous system contains a strikingly similar number of neurones distributed in a stereotyped manner (Payton, 1981). Retzius cells are the largest neurones in each ganglion and release most of the serotonin in the animal (Willard, 1981; Henderson, 1983). This modulates behaviour patterns such as swimming (Willard, 1981; Nusbaum and Kristan, 1986; Nusbaum et al., 1987), shortening (Sahley, 1995) and local bending (Kristan, 1982; Lockery and Kristan, 1990). The two Retzius neurones in each segmental ganglion are coupled by a non-rectifying electrical synapse, presumably formed by contacts between the neuropilar branches (Lent, 1973; Smith et al., 1975; Mason and Leake, 1978), and display spontaneous synchronous EPSPs (Hagiwara and Morita, 1962; Eckert, 1963) from which they produce action potentials. In addition, they receive a polysynaptic input from pressure-sensitive neurones (Szczipak and Kristan, 1995). By collecting simultaneous recordings from both Retzius neurones of a pair

under different experimental conditions and producing artificial EPSPs by current injection into one of the neurones, we have shown that EPSPs spread from one Retzius neurone to the other. The possible effects of this spread of EPSPs on integration are discussed.

## Materials and methods

### Preparation and dissection

Experiments were carried out in isolated ganglia from adult leeches *Haementeria officinalis* at room temperature (20–25 °C). Intersegmental ganglia were dissected out and pinned in Sylgard-coated dishes containing leech Ringer composed of (mmol l<sup>-1</sup>): NaCl, 115; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; glucose, 11; Tris maleate 10, buffered to pH 7.4. Since the ganglia capsules were extremely hard and resisted cell impalements by microelectrodes, they were opened with forceps and the soma of Retzius neurones were exposed to the bathing fluid. Retzius neurones could be unequivocally identified by their characteristic size and position in the ganglion.

### Morphology

The morphology of Retzius neurones and the possible locations of their contacts in the ganglion were studied by double intracellular staining, with Lucifer Yellow injected into one neurone and Texas Red into the other. Neither of these dyes crossed from one neurone to the other (see Fig. 1), as has previously been shown for Lucifer Yellow injections into Retzius neurones (Stewart, 1978). The dyes were pressure-injected into the soma of each neurone, and 30 min later the ganglia were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 2–12 h before being mounted in methyl salicylate and examined by confocal microscopy (Biorad, Hemel Hempstead, UK). Three-dimensional reconstructions of the branching patterns of single neurones or pairs of Retzius neurones were made from serial images taken every 0.5 µm. Reconstructions were carried out using Confocal Assistant 4.02 (Hemel Hempstead, UK) and Metamorph Imaging System 3.6 software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Final images were produced using Adobe Photoshop 5.0 software (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

### Intracellular recordings

Microelectrodes for intracellular recordings were made with borosilicate glass of 1 mm exterior diameter and 0.75 mm internal diameter pulled in a P97 puller (Sutter Instruments). The microelectrodes had resistances of 18–25 MΩ when filled with 3 mol l<sup>-1</sup> KCl. The presence of inhibitory synaptic potentials was explored using microelectrodes filled with 4 mol l<sup>-1</sup> potassium acetate. Since there was no evidence of such activity and recordings were noisier than with KCl, the results presented here were obtained with electrodes filled with KCl.

Separate electrodes were used to inject current and to record

voltage. This procedure was preferred over single-electrode current-clamp because, in many cases, fast and large biphasic current pulses were applied to produce artificial synaptic potentials and the speed of the switch mode limited the amount of current injected. A constraint of this technique is the decrease in somatic resistance caused by the penetration of the microelectrodes. Nevertheless, after a few minutes of recording, the membrane time constant and the amplitudes and kinetics of synaptic potentials were similar using one or two electrodes, and recordings could be maintained for several hours, suggesting a recovery of the input resistance. Intracellular recordings of up to 4 h showed no decrease in the resting potential, the somatic coupling ratio or the shape of the synaptic potentials.

Recordings were filtered using a custom-designed Bessel filter with a cut-off frequency of 600 Hz, which did not affect the rise time of the synaptic potentials. Data were acquired by an analog-to-digital board Digidata 1200 (Axon Instruments) at a sampling frequency of 20 kHz, using Axoscope software (Axon Instruments), and stored in a PC. Under these conditions, the recording noise was approximately 0.15 mV peak-to-peak, while the amplitudes of the smaller synaptic potentials were approximately 0.4 mV.

### Data analysis

The rise times and the amplitudes of EPSPs were measured manually using Axoscope 8.0 and Clampfit 8.0 software (both from Axon Instruments). To express data, a convention was adopted in which  $V_1$  was the voltage recording from the neurone into which current was injected or in which a synaptic potential was produced and  $V_2$  was the voltage recording from the follower neurone. The coupling ratio either for steady-state voltages or for EPSPs was defined as the ratio of the amplitude of the follower voltage to that of the driving voltage,  $V_2/V_1$ . In the case of steady-state responses, these values were the voltage changes at the end of long current steps. In recordings of spontaneous activity, the nomenclature was used arbitrarily. Data are expressed as mean values ± the standard error of the mean (S.E.M.). Steady-state coupling ratios do not present variability, since only two or three measurements were made in every pair of neurones. The data presented are from the first test of the recording; one or two subsequent tests were made as controls at variable periods.

## Results

### Electrical coupling and potential contact sites between Retzius neurones

The characteristics of the steady-state electrical coupling between pairs of Retzius neurones, studied in 16 ganglia by simultaneous voltage recordings following current injection into either neurone, reproduced the earlier observations made in the leech *Hirudo medicinalis* (Hagiwara and Morita, 1962; Eckert, 1963). The resting potential of Retzius neurones was between -55 and -50 mV, which is close to the threshold for action potentials (-45 mV). Positive or negative currents

injected into the soma of either neurone spread equally well in both directions, suggesting no rectification. This was confirmed by the linear relationships between voltage and current amplitudes and between the amplitudes of the voltage changes in both somata ( $V_1$  and  $V_2$ ).

The possible sites of electrical contact between Retzius neurones were studied using three-dimensional confocal reconstruction of the arborizations of both neurones after one had been filled with Lucifer Yellow and the other with Texas Red. Presumably, the confocal overlap between the two neurones reflects possible areas of electrical coupling. Individual neurones were also filled with either dye to confirm that this would not spread to the adjacent neurone. Fig. 1A shows a three-dimensional reconstruction of one neurone injected with Lucifer Yellow. Although the soma of the other neurone can be seen, this was the result of intrinsic fluorescence and not of diffusion of dye from one neurone to the other. Similar images were obtained with both dyes, except that the intrinsic fluorescence was more intense in the fluorescein range. The shapes of both neurones were mirror images of each other and, in general, were very similar to the morphology of Retzius neurones in the leech *Hirudo medicinalis* (Lent, 1973; Smith et al., 1975; Mason and Leake, 1978). A primary process emerged from the cell body and produced four major secondary branches, one to the anterior ganglia, one to the posterior ganglia and the other two travelling to the periphery through the nerve roots. The primary process gave rise to multiple neurites that elongated within the neuropil.

In double-staining experiments, there was extensive overlap in the neuropilar arborizations of pairs of Retzius neurones. Since the somata produced severe optical interference, they were removed mechanically for confocal observations after aldehyde fixation. Fig. 1B shows one example in which the branches in yellow were filled with Lucifer Yellow and the branches in blue were filled with Texas Red. The white dots identify potential contact sites between the two neurones. The number of potential contact sites obtained from 18 different preparations ranged between 90 and 120, all established by fine neurites within the neuropil. Potential contact sites were absent from the somata or large processes of the neurones, suggesting that electrical coupling was restricted to the neuropil.

#### Synaptic activity of Retzius neurones

Spontaneous pairs of synchronous EPSPs, appearing at an average frequency of  $3.36 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$  ( $N=6$ ), were recorded simultaneously from the soma of both Retzius neurones, suggesting a shared common input (Hawigara and Morita, 1962). Fig. 2A shows sequential series of simultaneous recordings from both somata. As can be seen, EPSPs could be abolished in a reversible manner when  $\text{Ca}^{2+}$  was substituted by  $\text{Mg}^{2+}$  in the external solution (Fig. 2B,C). Synaptic activity was always excitatory, and the characteristics of the EPSPs were similar when the recording electrodes were filled with potassium acetate or

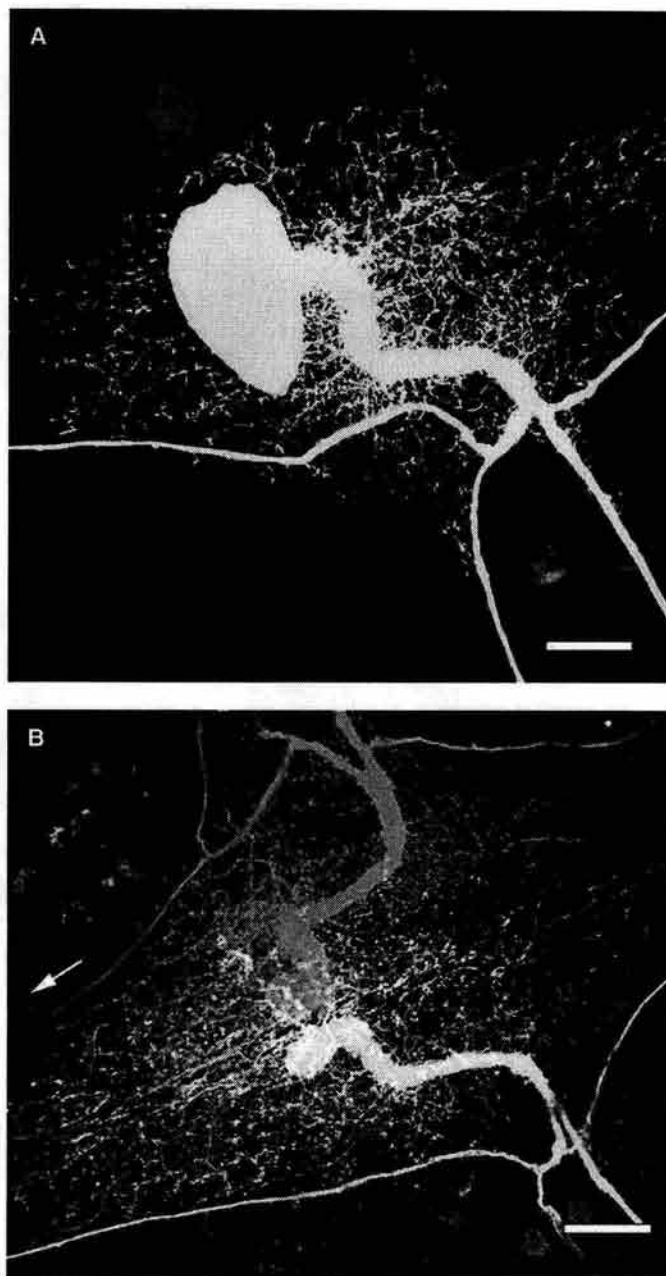


Fig. 1. Morphology and potential contact sites of Retzius neurones. (A) Three-dimensional reconstruction from serial confocal images of one Retzius neurone filled with Lucifer Yellow showing multiple fine neurites emerging from the primary process. The visualization of the somata of the contralateral neurone and of two small neurones in the lower right-hand corner resulted from autofluorescence. Anterior is to the left. (B) Three-dimensional confocal reconstruction of the dendritic arborization of a pair of Retzius neurones. The neurone coloured yellow was stained with Lucifer Yellow, while the blue neurone was injected with Texas Red. The somata were removed to avoid optical interference. Note the extensive dendritic overlap. The white dots are potential contact sites between the neurones. Autofluorescent somata of multiple neurones served to outline the ganglion. The arrow points to the anterior. Scale bar for both images, 30  $\mu\text{m}$ .

with potassium chloride. In addition, synaptic events were not reversed when the resting potential of the neurones was held at voltage levels ranging from  $-80$  to  $-40$  mV by direct current injection into both somata (not shown), excluding the possibility of inhibitory synaptic potentials.

Excitatory postsynaptic potentials varied in their amplitude and kinetics from one event to the next. Fig. 3A shows a typical series of simultaneous recordings from a pair of Retzius neurones. As can be seen, the amplitudes of the synchronous EPSPs varied from one neurone to the other and from one event to the next. The simultaneous recordings at the top of Fig. 3A contain two pairs of synchronous EPSPs with inverse relationships in their amplitudes (marked with the asterisks). While the first EPSP in  $V_2$  was approximately twice the amplitude of the corresponding EPSP in  $V_1$ , the following pair of EPSPs had the opposite relationship. In addition, there were synchronous events in which one EPSP was slower and smaller than that in the other neurone, as indicated by the arrows in Fig. 3A. An interpretation of these observations was that, when asynchronous transmission occurred, the fast EPSPs spread to the other neurone. The fluctuations in the amplitudes and kinetics of the synchronous EPSPs suggested that transmitter release onto each of the neurones was independent and variable, so that when it failed for one of the neurones an asynchronous EPSP was observed in dual recordings. Therefore, upon failures onto either neurone, the asynchronous EPSP could be recorded from both neurones.

In addition to the small EPSPs already described, approximately 15% of the total number of events had much larger amplitudes. An example of this is shown in the bottom traces of Fig. 3A. Thus, when the distribution of the amplitudes of the EPSPs was plotted, two components were observed, as shown in Fig. 3B. One component had amplitudes ranging from 0.3 to 2.5 mV while the other had amplitudes ranging from 3.0 to 6.0 mV. While the small EPSPs had monotonic rising phases (Fig. 3C), the large EPSPs had complex rising phases, suggesting the summation of several small synaptic potentials (Fig. 3D). For this reason, only the population of low-amplitude events was used to test whether EPSPs spread from one neurone to another in the rest of this study.

#### Rise time distribution of EPSPs

The variations in the amplitude of the EPSPs and the possible sources for this variability (different quantal contents, different initiation sites and their spread through the gap junction) made it difficult to base our analysis on amplitude measurements. Instead, we used the rise times of EPSPs as the main source of information about their initiation sites and their spread to the contralateral neurone.

The rise time of EPSPs was variable, suggesting that they were produced at different electrotonic distances. Fig. 4A shows four EPSPs with different rise times and amplitudes (a–d), all recorded from the same neurone. The differences in the rise times could be an indication of the electrotonic distance at which they were produced. The rise times of EPSPs analysed in 22

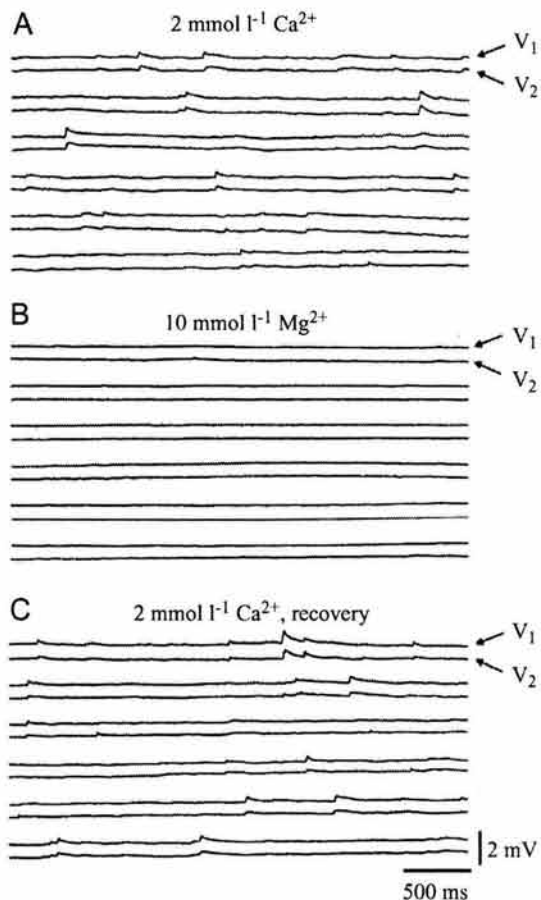


Fig. 2. Spontaneous synaptic activity in Retzius neurones. (A) Simultaneous somatic recordings of Retzius neurones in leech Ringer's solution showing spontaneous and synchronous excitatory postsynaptic potentials.  $V_1$  is the recording from one of the neurones and  $V_2$  is the recording from the other. Six consecutive series are shown. (B) Partial substitution of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Mg}^{2+}$  in the Ringer's solution abolished the spontaneous activity in both neurones. (C) Synaptic activity was restored in normal Ringer's solution.

Retzius neurones ranged from 2 to 14 ms and were distributed in two populations when Gaussian functions were fitted to the data. One population had a major peak at  $5.6 \pm 0.24$  ms ( $N=11$ ) and the other had a smaller peak at  $9.6 \pm 0.33$  ms containing 10–12% of the events. An example of the rise time distribution of one neurone recorded in saline solution, is shown in Fig. 4B. The arrows indicate statistically significant peaks, the first at 5.97 ms and the second at 8.75 ms. When recordings were made with an external solution containing  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  and  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ , instead of the usual  $1.8 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ , the proportion of slow rising events increased to nearly 40%, as shown in Fig. 4C. In this case, the fast rising peak was at 4.45 ms and the more slowly rising peak at 8.14 ms.

These results suggested that there were two major input domains to Retzius neurones. The fast-rising EPSPs were produced electrotonically closer to the recording site than those with the longer rise times. Considering that long-rise-time

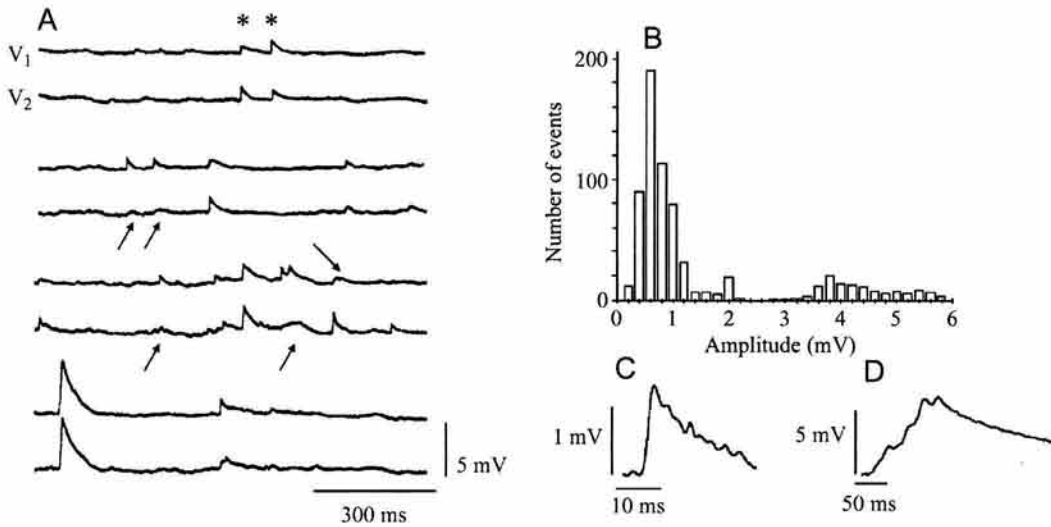
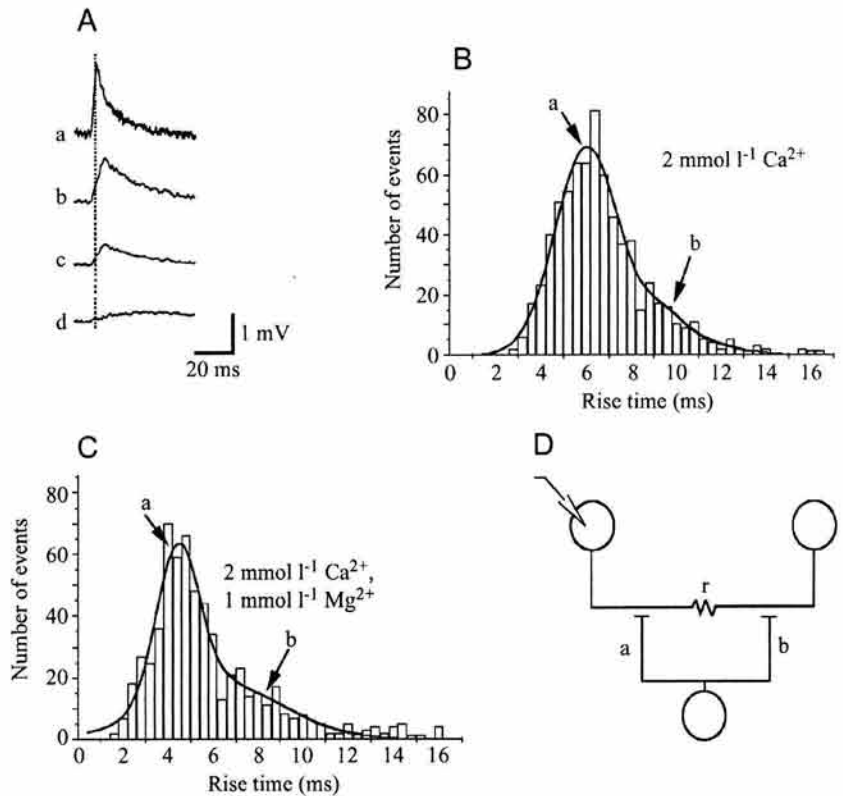


Fig. 3. Synaptic events in Retzius neurones. (A) Selected simultaneous recordings from a pair of Retzius neurones. V<sub>1</sub> is the recording from one of the neurones and V<sub>2</sub> is the recording from the other. The amplitudes of excitatory synaptic potentials (EPSPs) varied from one neurone to the other and from one event to the next in the same neurone (examples are marked by the asterisks). The arrows point to events that are slower and smaller than those in their contralateral partners, suggesting their spread from the other neurone. An example of a large EPSP can be seen at the bottom of the figure. (B) Amplitude distribution of EPSPs showing populations of small and large events ( $N=686$ ). (C) The small events had monotonic rise times. (D) The large EPSPs had complex rising phases, suggesting the summation of several EPSPs. Note the scale differences between C and D.

Fig. 4. Rise times of synaptic potentials. (A) Four excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) with different rise times recorded from the same neurone. The dotted line passes through the peak of the fastest EPSP (a). The EPSPs shown in b and c had similar rise times but different amplitudes, suggesting either that they had been produced in the same site with different quantal contents or that the two EPSPs had been produced on different sides of the gap junction. The EPSP shown in d was smaller and slower, suggesting that it was produced electrotonically at a point more distant from the soma being recorded. (B) Characteristic rise time distribution of one Retzius neurone recorded in normal saline solution. The distribution had two Gaussian components marked by the arrows. (C) The EPSP rise time distribution of a Retzius neurone recorded in the presence of  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$  in the external fluid. Again, two Gaussian peaks, which are marked by the arrows, were present. In this case, the peak at the long rise time was clearer. (D) Theoretical model showing two Retzius neurones with dendrites coupled by a resistance ( $r$ ) and sharing a common presynaptic input. The lettering of the inputs corresponds to those in B and C and has as reference the recording electrode.



EPSPs could have arrived from the contralateral neurone, the clear separation between the two peaks suggested that most inputs were located between the gap junction and the soma of

each Retzius neurone. A hypothetical circuit consisting of the pair of electrically coupled Retzius neurones, sharing a common synaptic input, is presented in Fig. 4D.

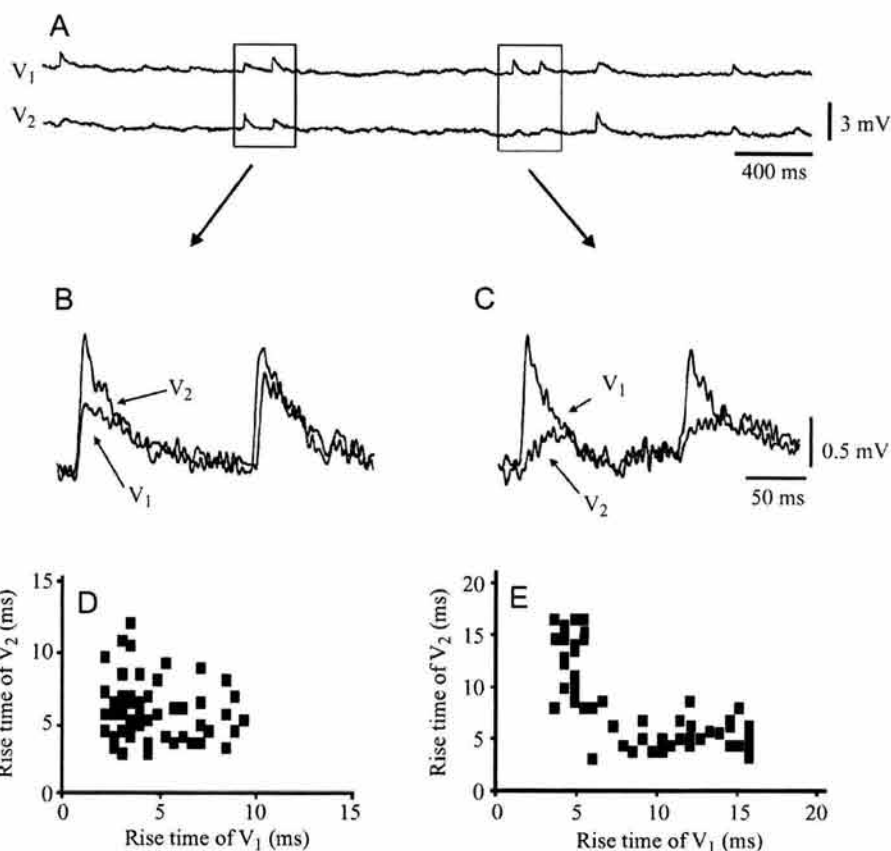


Fig. 5. Different relationships between pairs of synchronous excitatory postsynaptic potentials (EPSPs).  $V_1$  is the recording from one of the neurones and  $V_2$  is the recording from the other. (A) Simultaneous recordings from paired neurones showing pairs of synchronous EPSPs. (B) Amplification of two pairs of EPSPs from the first traces boxed in A, with different amplitudes but similar rise times. (C) In the second two pairs of synchronous EPSPs boxed in A, the amplitudes of EPSPs in  $V_2$  were fractions of those in  $V_1$  and the EPSPs had slower rise times, suggesting their propagation from  $V_1$ . (D) The relationship between the rise times of synchronous pairs of EPSPs in normal saline solution ( $N=60$ ). (E) The relationship between the rise times of synchronous pairs of EPSPs in the presence of  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$  in the external solution in a different neurone ( $N=52$ ). Fast times in  $V_1$  clearly correlated with slow times in  $V_2$  and *vice versa*.

#### Rise time relationships between synchronous EPSPs

To test whether the slowly rising EPSPs had their origin in the contralateral neurone, the kinetics of synchronous pairs of EPSPs were compared. The rise times of synchronous EPSPs showed two types of relationships. In 79% of the synchronous pairs, both EPSPs had similar rise times. The two first pairs of synchronous EPSPs (boxed in Fig. 5A and amplified in Fig. 5B) varied in their amplitudes but had similar rise times. In the remaining 21% of synchronous EPSP pairs, one EPSP had a fast rise time, which fell within the left side of the rise time distribution shown in Fig. 3B, and the other had a slow rise time. In addition, the amplitude of the slow EPSP was always a fraction of that of the fast one. Fig. 5C shows another segment of the recording shown in Fig. 5A. The amplitudes of the two slow EPSPs illustrated were 43 and 50% of the amplitudes of their respective large EPSPs. A plot correlating the rise times of 60 pairs of subsequent EPSPs recorded in saline solution is presented in Fig. 5D. When  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  was substituted for  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$  in the external solution, the percentage of pairs with one fast and one slow EPSP increased to 75.39%. Under these conditions, there was a good correlation between the fast rise times in one neurone and the slow rise times in the other. One example is shown in Fig. 5E and represents 11 pairs of neurones.

#### Spread of artificial EPSPs

Indirect evidence that the slower and smaller EPSPs had

arrived from the contralateral neurone came from the spread of artificial EPSPs produced by injection of brief biphasic current pulses into the soma of one neurone. Fig. 6A shows the protocol for current injection used to produce the artificial EPSPs. Note the scale values compared with the duration of the EPSPs. As shown in Fig. 6B, the shape of artificial EPSPs was similar to that of natural EPSPs recorded at the soma. In seven pairs of Retzius neurones, artificial synaptic potentials arrived at the contralateral soma attenuated and delayed. In the example shown in Fig. 6C, the coupling ratio of the artificial EPSP was  $0.31 \pm 0.04$  ( $N=10$ ), smaller than the  $0.42 \pm 0.01$  ( $N=32$ ) coupling ratio of pairs of naturally occurring EPSPs (Fig. 6D), and both were smaller than the 0.59 steady-state coupling ratio in these neurones, as expected for a passive spread of EPSPs through dendrites.

#### Steady-state and EPSP coupling ratios

To provide further information about the transynaptic flow of EPSPs, we tried to uncouple the electrical synapse pharmacologically. Unfortunately, heptanol, octanol and acetic acid, which uncouple gap junctions in other preparations, had no effect on this synapse at concentrations ranging from 0.1 to  $20 \text{ mmol l}^{-1}$ . Moreover, serotonin and octopamine, which modulate the electrical coupling in Retzius cells of the leech *Hirudo medicinalis* (Colombaioni and Brunelli, 1988), also failed in our hands. As an alternative, we compared the



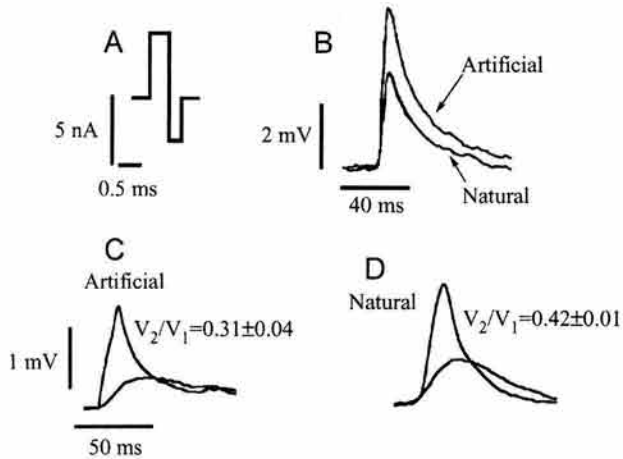


Fig. 6. Spread of artificial excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) from one neurone to the other. (A) Current protocol used to produce artificial EPSPs in the soma of one of the neurones. (B) Artificial EPSP with a similar shape to natural EPSPs in the same neurone. (C) Artificial EPSPs arriving at the contralateral soma were smaller and had a slower rise time. The coupling ratio  $V_2/V_1$ , defined as the follower voltage ( $V_2$ ) divided by the driving voltage ( $V_1$ ), in these neurones was  $0.31 (N=10)$ . (D) The coupling ratio of natural EPSPs was  $0.42 (N=32)$ , greater than that of artificial EPSPs, as expected because of the different distances that each EPSP had to spread. Values given in the figure are means  $\pm$  S.E.M.

coupling ratios of EPSP in pairs of neurones with different steady-state coupling ratios. In the 12 pairs tested, the rise time distributions and the range of amplitudes of EPSPs were very similar. We expect, therefore, that the variations in the steady-state coupling ratios were due to the coupling resistance and not to the dendritic membrane properties.

The results showed that, as expected, in these 12 pairs of Retzius neurones, the coupling ratios of EPSPs were always smaller than the steady-state coupling ratios. For example, in

a pair of neurones that had a steady-state coupling ratio of 0.62 in the first 5 min of recording and at the end of the recording, the average coupling ratio of 34 EPSPs at the peak voltage values was  $0.45 \pm 0.04$ . In the example shown in Fig. 7A, the steady-state coupling ratio was 0.31, while the coupling ratios of EPSPs were between 0.20 and 0.26 (Fig. 7B). Note that, despite the low coupling ratio, the amplitudes and shapes of EPSPs corresponded to those described above. Mean coupling ratios of 35 EPSPs in 12 different pairs of neurones with coupling ratios from 0.31 to 0.72 are plotted in Fig. 7C. A line of slope 1 is drawn to highlight the fact that the coupling ratios of EPSPs were, in all cases, smaller than those of steady-state pulses.

Discussion

We have shown that electrical coupling between Retzius neurones serves as a bridge for EPSP spread from one neurone to another. The presence of synchronous EPSPs in pairs of Retzius neurones suggests a common and as yet unidentified synaptic input (or inputs) with spontaneous activity. Similar results were obtained in Retzius neurones (Hagiwara and Morita, 1962) and touch-sensitive neurones of the leech *Hirudo medicinalis* (Baylor and Nicholls, 1969). The amplitudes of synchronous EPSPs varied independently from one neurone to the other and from one event to another, suggesting probabilistic release of transmitter from presynaptic endings. These variations also suggest that asynchronous transmission may result from transmission failures onto either of the neurones. This is supported by the increase in the proportion of asynchronies in the presence of  $Mg^{2+}$  in the recording solution.

The rise time distribution of EPSPs recorded from individual neurones suggests two major input domains. Excitatory postsynaptic potentials with short rise times could, therefore, be produced by inputs between the gap junction and the

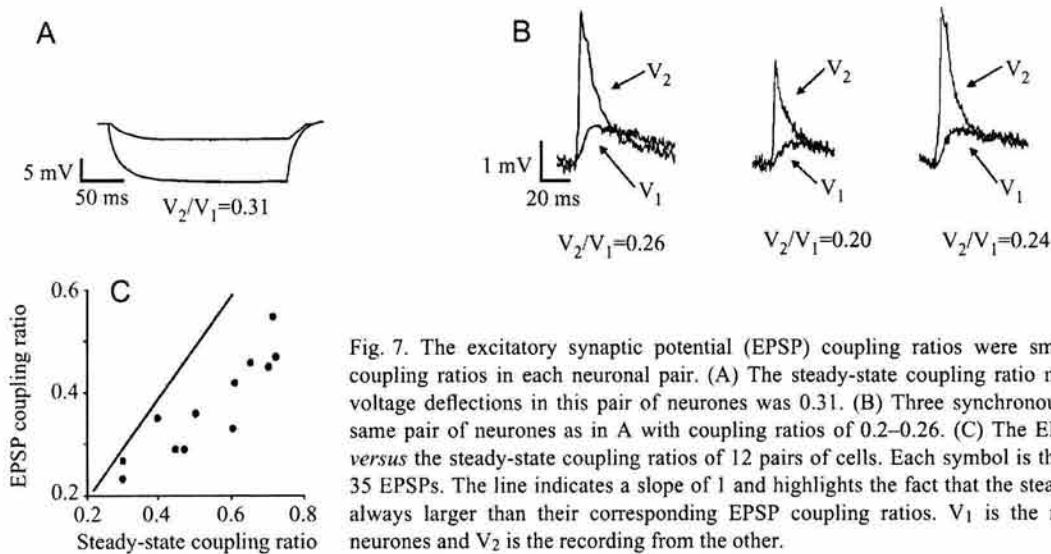


Fig. 7. The excitatory synaptic potential (EPSP) coupling ratios were smaller than the steady-state coupling ratios in each neuronal pair. (A) The steady-state coupling ratio measured by the end of the voltage deflections in this pair of neurones was 0.31. (B) Three synchronous pairs of EPSPs from the same pair of neurones as in A with coupling ratios of 0.2–0.26. (C) The EPSP coupling ratios plotted versus the steady-state coupling ratios of 12 pairs of cells. Each symbol is the average coupling ratio of 35 EPSPs. The line indicates a slope of 1 and highlights the fact that the steady-state coupling ratios are always larger than their corresponding EPSP coupling ratios.  $V_1$  is the recording from one of the neurones and  $V_2$  is the recording from the other.

recording electrode. The equivalent input to the other neurone would produce the long-rise-time EPSPs (see Fig. 4). The overlapping zones of the rise time distribution may reflect inputs closer to the gap junctions. Since the kinetics of these EPSPs would be very similar in both neurones, without pharmacological uncoupling it is extremely difficult to determine on which side of the gap junction they were produced.

#### *Electrical properties and coupling resistance of Retzius neurones*

Fundamental factors for the integrative processes are the electrical properties of the neuronal membranes. Contact sites between Retzius neurones in other species are supposed to be established by proximal dendrites rising from the primary segmental axon of the neurones (Lent, 1973; Smith et al., 1975; Mason and Leake, 1978). Our morphological analysis suggests that EPSPs have to spread for distances of between 100 and 200  $\mu\text{m}$  to arrive at the soma. Since action potentials are initiated in the primary process of these neurones (F. F. De Miguel, unpublished observation), the spread of EPSPs to the soma predicts a large space constant. However, the fact that the coupling ratio of natural or artificial EPSPs was smaller than the steady-state coupling ratio indicates that membrane filtering contributes to the EPSP coupling ratio.

Our evidence also supports a contribution of the coupling resistance to the somatic coupling ratio. First, since EPSPs are produced relatively close to the gap junction, their decay to both somata should be similar and, therefore, a large proportion of their coupling ratio must be due to the coupling resistance. Second, the coupling ratios of EPSPs and steady-state pulses of different pairs of neurones with similar electrophysiological properties suggest that these differences arise from the coupling resistance value. This is in agreement with previous evidence showing the combined contribution of cable properties and coupling resistance to the somatic coupling of Retzius neurones (Yang and Chapman, 1983).

#### *Expected effects of electrical coupling to integration*

An expected effect of the coupling resistance value is that, when it is high, the dendritic impedance will increase, tending to the formation of a 'sealed end' (Rall, 1958), improving current spread towards the soma of the same neurone. In these conditions, each Retzius neurone would integrate almost independently from the other. In contrast, when the coupling resistance value is low, the two dendrites would tend to be in electrical continuity, thus resembling a semi-infinite cable and leading to reduced dendritic impedance but improved trans-junctional current spread. The EPSPs arriving from the other neurone (alien EPSPs) would, therefore, be more influential for integration. A benefit of a low coupling resistance would be that the firing frequency of the neurone would increase as a result of summation of local with alien EPSPs.

An expected consequence of the synchrony of most EPSPs in Retzius neurones is that, if the inputs were distant from each other, part of the current of one EPSP would flow towards the

contralateral soma, adding mostly to the decay phase of the other EPSP. This would reduce the membrane filtering effect of the EPSPs, improving their conduction. In contrast, if synchronous EPSPs were produced on either side of the gap junction, the summation would affect the amplitudes and not the wave shape. Therefore, with short distances between the initiation sites of EPSPs, summation of EPSPs would affect the gain, whereas an increase in the distance between the inputs would reduce the effect on the amplitude and would affect the decay phase. Experiments combining artificial synaptic potentials with computational modelling should help to solve this problem.

The different electrotonic distances at which EPSPs are produced and their flow through gap junctions may explain why the amplitude distribution of the population of EPSPs does not reflect a quantal phenomenon (Fig. 3B). The increasing evidence of electrical coupling between mammalian neurones makes it interesting to explore whether, in some of the quantal analysis mismatches in central vertebrate neurones, electrical coupling has obscured the interpretation of results (for a review, see Faber et al., 1998).

#### *Possible general significance*

An increasing amount of evidence from electrophysiological experiments and from the expression patterns of gap junction proteins indicates that a large proportion of central neurones in embryonic and adult nervous systems of vertebrates, including mammals, display electrical coupling (Bruzzone et al., 1996; Nadarajah et al., 1996; for a review, see Dermietzel and Spray, 1993). Among the functions of electrical synapses, the mediation of fast behavioural responses in crustaceans (Furshpan and Potter, 1959) and fishes (Lin and Faber, 1988) and also the synchronization of groups of neurones in vertebrates, including mammals (Christie et al., 1989; Valiante et al., 1995; Ishimatsu and Williams, 1996; Mann-Metzer and Yarom, 1999; Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999), have been demonstrated. Other possible functions, including transmitter coupling (Vaney et al., 1998) and second-messenger coupling (Dermietzel and Spray, 1993), have also been proposed. Even though electrical coupling in invertebrates is mediated by a different set of proteins (Bacon et al., 1998), the fact that some functions of electrical coupling are conserved between invertebrates and vertebrates makes it very likely that EPSP spread may also be conserved in higher animals.

We are greatly indebted to Mr Bruno Mendez for his invaluable technical assistance in our experiments. We also wish to acknowledge the Computing and Microscopy Units at our Institute for their continuous support during this project. We thank Dr Lidia Szczupak for her critical discussion on the data. E.G.P. was supported by CONACYT and DGEP fellowships. M.V.C. and E.G.P. received complementary fellowships from a Human Frontiers Science Program grant (RG-162/98) to F.F.M. Human Frontiers Science Program (RG-162/98), CONACYT (1285-N9204) and PAPIIT (IN-207593) grants to F.F.M. have supported this project.

## References

- Abbott, L. F., Marder, E. and Hooper, S. L. (1991). Oscillating networks: control of burst duration by electrically coupled neurons. *Neural Comput.* **3**, 487–497.
- Andersen, P., Holmqvist, B. and Voorhoeve, P. E. (1966). Excitatory synapses on hippocampal apical dendrites activated by entorhinal stimulation. *Acta Physiol. Scand.* **66**, 461–472.
- Auerbach, A. A. and Bennett, M. V. L. (1969). A rectifying electrotonic synapse in the central nervous system of a vertebrate. *J. Gen. Physiol.* **53**, 211–237.
- Bacon, J. P., Phelan, P., Davies, J., Stebbings, L. and Toodmand, M. G. (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junctions proteins. *Trends Genet.* **14**, 477–483.
- Baker, R. and Llinás, R. (1971). Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *J. Physiol., Lond.* **212**, 45–63.
- Baylor, D. A. and Nicholls J. G. (1969). Chemical and electrical synaptic connections between cutaneous mechanoreceptor neurons in the central nervous system of the leech. *J. Physiol., Lond.* **203**, 591–609.
- Bennett, M. V. L., Aljure, E., Nakajima, Y. and Pappas, G. D. (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science* **141**, 262–263.
- Bruzzone, R., White, T. W. and Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **238**, 1–27.
- Christie, M. J., Williams, J. T. and North, R. A. (1989). Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons *in vitro* from neonatal rats. *J. Neurosci.* **9**, 3584–3589.
- Colombaioni, L. and Brunelli M. (1988). Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the CNS of *Hirudo medicinalis*. *Exp. Biol.* **47**, 139–144.
- Coombs, S. J., Curtis, D. R. and Eccles, J. C. (1957). The interpretation of spike potentials of motoneurons. *J. Physiol., Lond.* **139**, 198–231.
- Deisz, R. A., Fortin, G. and Zieglgansberger, W. (1991). Voltage dependence of excitatory synaptic potentials in rat neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* **65**, 371–382.
- Dermietzel, R. and Spray, D. C. (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* **16**, 186–192.
- Eckert, R. (1963). Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J. Gen. Physiol.* **46**, 573–587.
- Faber, D., Korn, H., Redman, S. J., Thompson, S. C. and Altman, J. (1998). *Central Synapses, Quantal Mechanisms and Plasticity*. Human Frontiers Science Program Workshop Reports. Strasbourg: The Human Frontiers Science Program.
- Fatt, P. (1957). Sequence of events in synaptic activation of a motoneuron. *J. Neurophysiol.* **20**, 61–80.
- Furshpan, E. J. and Potter, D. D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol., Lond.* **145**, 289–325.
- Galarreta, M. and Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* **402**, 72–75.
- Gibson, J. R., Beierlein, M. and Connors, B. W. (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* **402**, 75–79.
- Gillessen, T. and Alzheimer, C. (1997). Amplification of EPSPs by low Ni<sup>2+</sup> and amiloride-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **77**, 1639–1643.
- Haag, J. and Borst, A. (1996). Amplification of high frequency synaptic inputs by active dendritic membrane processes. *Nature* **379**, 639–641.
- Hagiwara, S. and Morita, H. (1962). Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion. *J. Neurophysiol.* **25**, 721–731.
- Hatton, G. I. and Yang, Q. Z. (1994). Incidence of neuronal coupling in supraoptic nuclei of virgin and lactating rats: estimation by neurobiotin and Lucifer Yellow. *Brain Res.* **650**, 63–69.
- Henderson, L. (1983). The role of 5-hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurons in culture. *J. Physiol., Lond.* **339**, 311–326.
- Hirsch, J. A. and Gilbert, C. D. (1991). Synaptic physiology of horizontal connections in the cat's visual cortex. *J. Neurosci.* **11**, 1800–1809.
- Ishimatsu, M. and Williams, J. T. (1996). Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J. Neurosci.* **16**, 5196–5204.
- Korn, H., Sotelo, C. and Crepel, F. (1973). Electronic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus. *Exp. Brain Res.* **16**, 255–275.
- Kristan, W. B. (1982). Sensory and motor neurons responsible for the local bending response in leeches. *J. Exp. Biol.* **96**, 161–180.
- Lent, C. M. (1973). Retzius cells from segmental ganglia of four species of leeches: comparative neuronal geometry. *Comp. Biochem. Physiol.* **44A**, 35–40.
- Lin, J. W. and Faber, D. (1988). Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials. *J. Neurosci.* **8**, 1302–1312.
- Lipowsky, R., Gillessen, T. and Alzheimer, C. (1996). Dendritic Na<sup>+</sup> channels amplify EPSPs in hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **4**, 2181–2191.
- Llinás, R., Baker, R. and Sotelo, C. (1974). Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J. Neurophysiol.* **37**, 560–571.
- Llinás, R. and Hess, R. (1976). Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* **2**, 112.
- Llinás, R. and Nicholson, C. (1971). Electroresponsive properties of dendrites and somata in alligator Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* **34**, 532–551.
- Llinás, R. and Sugimori, M. (1980). Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cells in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol., Lond.* **305**, 197–213.
- Lockery, S. R. and Kristan, W. B. (1990). Distributed processing of sensory information in the leech. II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J. Neurosci.* **10**, 1816–1829.
- Mann-Metzer, P. and Yarom, Y. (1999). Electrotonic coupling interacts with intrinsic properties to generate synchronized activity in cerebellar networks of inhibitory interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 3298–3306.
- Marder, E. and Eisen, J. S. (1984). Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to the same physiological inputs and neurotransmitters. *J. Neurophysiol.* **51**, 1362–1373.
- Margulis, M. and Tang, C. M. (1998). Temporal integration can readily switch between sublinear and supralinear summation. *J. Neurophysiol.* **79**, 2809–2813.
- Mason, A. and Leake, L. D. (1978). Morphology of leech Retzius cells demonstrated by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* **61A**, 213–216.
- McMahon, D. G. (1994). Modulation of synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. *J. Neurosci.* **14**, 1722–1734.
- Nadarajah, B., Thomaidou, D., Evans, W. H. and Parnavelas, P. G. (1996). Gap junctions in the adult cerebral cortex: regional differences in their distribution and cellular expression of connexins. *J. Comp. Neurol.* **376**, 326–342.
- Nicholls, J., Martin, A. R. and Wallace, B. G. (1992). *From Neuron to Brain*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Nicholls, J. G. and Purves, D. (1972). A comparison of chemical and electrical synaptic transmission between single sensory cells and a motoneuron in the central nervous system of the leech. *J. Physiol., Lond.* **225**, 637–656.
- Nusbaum, M. P., Friesen, W. O., Kristan, B. W. and Pierce, R. A. (1987). Neural mechanisms generating the leech swimming rhythm. *J. Comp. Physiol.* **161A**, 355–366.
- Nusbaum, M. P. and Kristan, B. W. (1986). Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61. *J. Exp. Biol.* **122**, 277–302.
- Payton, B. (1981). The structure of the leech nervous system. In *Neurobiology of the Leech* (ed. K. J. Muller, J. G. Nicholls and G. S. Stent), pp. 35–50. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Rall, W. (1958). Mathematical solutions for passive electrotonic spread between a neuron soma and its dendrites. *Fedn. Proc.* **17**, 127.
- Sahley, C. L. (1995). What we have learned from the study of learning in the leech. *J. Neurobiol.* **27**, 434–445.
- Schmalbruch, H. and Jahnson, H. (1981). Gap junctions on CA3 pyramidal cells of guinea pig hippocampus shown by freeze–fracture. *Brain Res.* **217**, 175–178.
- Schwindt, P. C. and Crill, W. E. (1995). Amplification of synaptic current by persistent sodium conductance in an apical dendrite of neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* **74**, 2220–2224.
- Seamans, J. K., Gorelova, N. A. and Yang, C. R. (1997). Contributions of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the proximal versus distal dendrites to synaptic integration in prefrontal cortical neurons. *J. Neurosci.* **17**, 5936–5948.
- Smith, P. A., Sunderland, L. D., Leake, L. D. and Walker, R. J. (1975). Cobalt staining and electrophysiological studies of Retzius cells in the leech *Hirudo medicinalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **51A**, 665–661.
- Spencer, W. A. and Kandel, E. R. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. IV. Fast prepotentials. *J. Neurophysiol.* **24**, 272–285.

- Stewart, W. W.** (1978). Intracellular marking of neurons with a highly fluorescent naphthalimide dye. *Cell* **14**, 741–759.
- Stuart, G. and Sakmann, B.** (1995). Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* **15**, 1065–1076.
- Szczupak, L. and Kristan, W. B.** (1995). Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *J. Neurophysiol.* **74**, 2614–2624.
- Valiante, T. A., Pérez-Velázquez, J. L., Jahromi, S. S. and Carlen, P. L.** (1995). Coupling potentials in CA1 neurons during calcium-free-induced field burst activity. *J. Neurosci.* **15**, 6946–6956.
- Vaney, D. T., Nelson, J. C. and Pow, D. V.** (1998). Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J. Neurosci.* **18**, 10594–10602.
- Wessel, R., Kristan, W. B. and Kleinfeld, D.** (1999). Supralinear summation of synaptic inputs by an invertebrate neuron: dendritic gain is mediated by an 'inward rectifier' K<sup>+</sup> current. *J. Neurosci.* **19**, 5875–5888.
- Willard, A. L.** (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* **1**, 936–944.
- Wolszon, L. R., Passani, M. B., Macagno, E. R.** (1995). Interactions during critical period inhibit bilateral projections in embryonic neurons. *J. Neurosci.* **15**, 1506–1515.
- Yang, J. and Chapman, K. M.** (1983). Frequency domain analysis of electrotonic coupling between leech Retzius cells. *Biophys. J.* **44**, 91–99.
- Yuste, R. and Tank, D. W.** (1996). Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* **16**, 701–716.

## Synaptic Integration in Electrically Coupled Neurons

Elizabeth García-Pérez,\* Mariana Vargas-Caballero,\* Norma Velazquez-Ulloa,\* Antonmaria Minzoni,<sup>†</sup> and Francisco F. De-Miguel\*

\*Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, and <sup>†</sup>FENOMECE (IIMAS), UNAM, 04510 D.F., México

**ABSTRACT** Interactions among chemical and electrical synapses regulate the patterns of electrical activity of vertebrate and invertebrate neurons. In this investigation we studied how electrical coupling influences the integration of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs). Pairs of Retzius neurons of the leech are coupled by a nonrectifying electrical synapse by which chemically induced synaptic currents flow from one neuron to the other. Results from electrophysiology and modeling suggest that chemical synaptic inputs are located on the coupled neurites, at 7.5  $\mu\text{m}$  from the electrical synapses. We also showed that the space constant of the coupled neurites was 100  $\mu\text{m}$ , approximately twice their length, allowing the efficient spread of synaptic currents all along both coupled neurites. Based on this cytoarchitecture, our main finding was that the degree of electrical coupling modulates the amplitude of EPSPs in the driving neurite by regulating the leak of synaptic current to the coupled neurite, so that the amplitude of EPSPs in the driving neurite was proportional to the value of the coupling resistance. In contrast, synaptic currents arriving at the coupled neurite through the electrical synapse produced EPSPs of constant amplitude. This was because the coupling resistance value had inverse effects on the amount of current arriving and on the impedance of the neurite. We propose that by modulating the amplitude of EPSPs, electrical synapses could regulate the firing frequency of neurons.

### INTRODUCTION

Electrical synapses couple the electrical activity of neurons in central and peripheral nervous systems of vertebrates and invertebrates (Bennett et al., 1963; Auerbach and Bennett, 1969; Baker and Llinás, 1971; Llinás et al., 1974; Nicholls and Purves, 1972; Korn et al., 1973; Schmalbruch and Jahnsen, 1981; McMahon, 1994). Interactions of chemical and electrical synapses synchronize the activity of groups of neurons, from invertebrate (Marder and Eisen, 1984; Rela and Szczupak, 2003) to mammalian central neurons (Galarreta and Hestrin, 1999, 2001; Gibson et al., 1999; Tamas et al., 2000; Szabadics et al., 2001). The co-localization of chemical and electrical synapses in dendrites offers the possibility that the flow of synaptic currents across the electrical synapse may reduce the amplitude of the chemically induced synaptic responses in the driving dendrite, in proportion to the degree of electrical coupling. Another effect would be the spread of the chemically induced synaptic responses to the coupled dendrite, which, by receiving these inputs, extends its effective dendritic tree.

We analyzed these possibilities in pairs of electrically coupled Retzius neurons of the Mexican leech *Haementeria officinalis*. Each of the 21 segmental ganglia of this species contains nearly 325 neurons distributed in a stereotyped manner (E. Izquierdo, and F. F. De-Miguel, unpublished). Retzius neurons are the largest in each ganglion and release serotonin from presynaptic endings (Henderson, 1983) and from the soma (Trueta et al., 2003), by which they modulate

swimming (Willard, 1981; Nusbaum and Kristan, 1986), local bending (Kristan, 1982; Lockery and Kristan, 1990), and learning (Burrell et al., 2001). The pair of Retzius neurons in each segmental ganglion is coupled by a nonrectifying electrical synapse (Hagiwara and Morita, 1962; Eckert, 1963), which is presumably formed between neurites arising from the primary axon (Lent, 1973; Mason and Leake, 1978; De-Miguel et al., 2001). In addition, both Retzius neurons receive a common chemical synaptic input (Hagiwara and Morita, 1962) which produces EPSPs that spread to the other neuron through the electrical synapse (De-Miguel et al., 2001).

To explore how electrical coupling affects the integration of EPSPs, we measured morphological and biophysical parameters of Retzius neurons to design a mathematical model that reproduced their electrical responses. The model was combined with experimental evidence to calculate the location of the presynaptic chemical inputs onto the neurites, the space constant of the neurites, and the coupling resistance value. We also made quantitative simulations as to how chemically induced synaptic currents produced by such inputs are distributed in both coupled neurites. As our main finding we show that the leak of synaptic currents from one neuron to another may determine the amplitude of the EPSPs in the driving neurite.

### MATERIALS AND METHODS

#### Preparation

Experiments were carried out in isolated ganglia of adult leeches *H. officinalis*, at room temperature (20–25°C). Intersegmental ganglia were dissected out and pinned in Sylgard-coated dishes containing leech Ringer fluid composed of (mM): NaCl, 115; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; glucose, 11; Tris maleate 10 buffered to pH 7.4 (J.T. Baker D.F., Mexico). Ganglion capsules were extremely hard and resisted cell impalements by microelectrodes. For this reason, the capsules were opened with forceps, and the somata of

Submitted June 26, 2003, and accepted for publication August 19, 2003.

Address reprint requests to Dr. Francisco F. De-Miguel, Dept. de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510 D.F., México. Tel.: 525-622-5622; Fax: 525-622-5607; E-mail: ffermand@ifisiol.unam.mx.

© 2004 by the Biophysical Society

0006-3495/04/01/646/10 \$2.00

Retzius neurons were exposed to the bathing fluid. The somata of Retzius neurons could be unequivocally identified by their characteristic size and position in the ganglion.

## Electrophysiological techniques

Intracellular recordings were made with borosilicate glass microelectrodes (FHC, Bowdoinham, ME) and were filled with 3 M KCl. Their tip resistances ranged from 18 to 25 M $\Omega$ . The microelectrodes were coupled to preamplifiers (Almost Perfect Electronics, Basel, Switzerland), and recordings were filtered by a custom-designed Bessel filter with a cutoff frequency of 400 Hz. Data were acquired by an analog-to-digital board Digidata 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA) using Axoscope 8.0 or Pclamp 8.0 and stored in a PC for further analysis.

For current injection, we used an independent microelectrode. This was preferred over single-electrode current clamp in switch-mode because of the need to inject large amounts of current. A constraint of this method was the possible somatic "shunt" produced by each microelectrode. However, after five minutes of recording, the membrane sealed around the electrode tip, allowing accurate estimates of the membrane properties (Fig. 4). Artificial synaptic potentials similar to natural EPSPs were produced by injecting 300–500  $\mu$ s depolarizing current pulses into one of the neurons. The amount of current was adjusted to produce voltage amplitudes of 1–2 mV. The membrane time constant defined the decay phase of the artificial EPSP (Fig. 6).

The coupling coefficient was defined as  $V_2/V_1$ , where  $V_1$  is the voltage of the driving neuron (in which current was injected, or in which a synaptic potential was produced), and  $V_2$  is the voltage of the coupled neuron. Therefore, the coupling coefficient was defined as  $V_2/V_1$ . For recordings of spontaneous activity this nomenclature was used arbitrarily.

## Morphology

The morphology of Retzius neurons was studied by double staining of pairs of neurons. We injected lucifer yellow (LY) into one neuron and Texas Red (TR) or horseradish peroxidase (HRP) (LY, TR, and HRP, Sigma, St. Louis, MO) into the other neuron. None of these dyes cross through the electrical synapse (Muller and McMahan, 1976; Stewart, 1978; De-Miguel et al., 2001). HRP injections were made following the procedure of Muller and McMahan (1976). The rest of the procedure was performed as described by Macagno et al. (1981). Pairs of fluorescent neurons were imaged in serial  $z$  series taken at 1.0  $\mu$ m intervals under calibrated confocal optics (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) using fluorescein and rhodamine emission wavelengths and a Nikon X40 oil immersion objective.

The quantitative analysis of the neurite length and diameter, and of the number of sites of contact of pairs of neurons was made from deconvolved (X-Cosm free software; <http://ibc.wustl.edu/bcl/xcosm/xcosm.html>; Biomedical Computer Laboratory, Washington University, St. Louis, MO) confocal  $z$  series, taken using a Nikon X100 oil immersion objective (NA 1.25). Calibration of confocal images and the choice of the number of iterations of the deconvolution process were made using yellow-green- or red-fluorescent carboxylate-modified microspheres of 2.0 and 0.5  $\mu$ m diameter (Fluo-Spheres, Molecular Probes, Eugene, OR; Fig. 2). Measurements were made manually using Confocal Assistant 4.02 (Bio-Rad) and Metamorph Imaging System 3.6 software (Universal Imaging, West Chester, PA).

## Cell culture

The membrane time constant of the soma was measured from neurons that were isolated and kept in culture. The isolation procedure was slightly different from the original one (Dietzel, et al. 1986; Trueta et al., 2003) in that L-15 culture medium (Gibco, D.F., Mexico) was diluted in leech Ringer solution (1:1). To obtain spherical somata without processes, the treatment with 2 mg/ml collagenase/dispase (Boehringer-Mannheim, Darmstadt, Germany) lasted only 25–30 min. After the enzyme treatment, the somata

of Retzius neurons were sucked out one by one and sterilized by rinsing them several times in culture solution. Neurons were plated in plastic culture dishes coated with concanavalin A (Sigma). To restrict neurite outgrowth, neurons were plated with their stumps pointing upward. In these conditions the neurons survived for more than a week and kept their resting potentials between  $-50$  and  $-55$  mV. The low density of sodium channels in the soma of Retzius neurons (García, et al., 1990) made it hard for them to produce action potentials in response to injection of positive current pulses. However, neurons that retained their excitability were excluded from our analysis.

## Electron microscopy

Cultured neurons were washed with 0.08 M cacodylate buffer (Sigma) and fixed for 10 min with 0.6% glutaraldehyde (Sigma) and 0.4% paraformaldehyde in 0.08 M cacodylate buffer, pH 7.4. Postfixation was made with 1% osmium tetroxide (Fluka, St. Louis, MO) in cacodylate buffer. Thin sections were counterstained with uranyl acetate for 10 min and with lead citrate for 2.5 min. Observations were made in a Jeol 1010 electron microscope (Jeol USA, Peabody, MA). Measurements of the membrane perimeter were made from digitized images using Metamorph Imaging System 3.6 software (Universal Imaging).

## Modeling

A model of electrically coupled Retzius neurons was designed using linear cable theory applied to circuits representing the somata linked with neurites. A detailed description of the model and the mathematics used for this design are in Appendix 1 of the Supplementary Material. The strategy for designing the model was based on our own morphological evidence and on the approach of Yang and Chapman (1983). We considered the cell soma as a circuit with parallel capacitance and resistance, the neurites as finite cables with electrotonic length  $L = \ell/\lambda$ , and the electrical synapse as a coupling resistance ( $r_c$ ) connecting neurites of both Retzius neurons (Fig. 2). The parameters used in the model are defined in Table 1. Simulations of chemically induced synaptic currents were made assuming that inputs were established onto single electrically coupled neurites. It is also noteworthy that electrically coupled neurites were in parallel (Fig. 3); therefore, when current was injected into the soma of one neuron, all of the neurites displayed the same voltage changes.

The transfer function of the model was obtained by using Laplace transforms (Jack et al., 1975; see Supplemental Material). The values of the coupling resistance and the space constant of the neurites were estimated by fitting the transfer function of the model to experimental data (see Fig. 4) using least-square estimates. The dependence of the EPSP rise time and amplitude on the location of the presynaptic inputs along the neurites was analyzed by using the saddle point method (Jack et al., 1975). To test the accuracy of our model, the predicted shapes of EPSPs at the cell somata were compared with artificial EPSPs produced by current injection into the soma of one neuron.

## RESULTS

### Synaptic activity of Retzius neurons

During simultaneous recordings from pairs of Retzius neurons, EPSPs arrived in synchrony (less than 5 ms in between) at the soma of both neurons (Fig. 1, A and B), supporting the idea of a common presynaptic chemical input onto both coupled neurons (Hagiwara and Morita, 1962; De-Miguel et al., 2001). EPSPs were classified into two populations according to their rise times. Seventy-nine percent

**TABLE 1** Definition of symbols and values estimated and used in the model

Symbol	Definition (dimension)	Soma	Neurites
$C_s$	Specific membrane capacitance of the soma ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	1	—
$c_s$	Capacitance of the soma ( $\mu\text{F}$ )	—	—
$D$	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	60–80	1.08
$\ell$	Cable length ( $\mu\text{m}$ )	—	50
$\lambda$	Space constant ( $\mu\text{m}$ )	—	100
$L = \ell/\lambda$	Electrotonic length	—	0.50
$r_a$	Axial resistance $r_a = 4\ell R_a/\pi d^2$ ( $\text{G}\Omega/\text{cm}$ )	—	85–1273
$r_c$	Coupling resistance ( $\text{M}\Omega$ )	—	30–340
$R_s$	Specific membrane resistance of the soma ( $\Omega\text{cm}^2$ )	18–40	—
$r_s$	Membrane resistance of the soma ( $\text{M}\Omega$ )	90–150	—
$\tau$	Membrane time constant of the soma $\tau = r_m c_m = R_m C_m$ (ms)	18–40	—
T	Rise time of EPSPs (ms); peak 1 peak 2	$5.6 \pm 0.24$ ; $9.6 \pm 0.33$	—
$V_1$	Voltage response of the driving cell (mV)	—	—
$V_2$	Voltage response of the follower cell (mV)	—	—
X	Distance between the somata ( $\mu\text{m}$ )	—	—

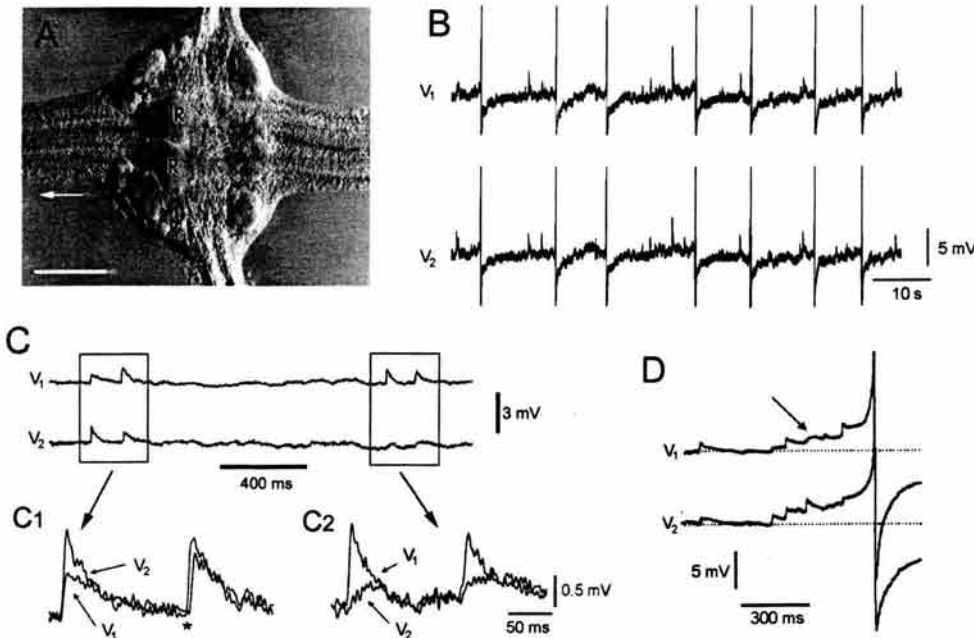
of the pairs of synchronous EPSPs had similar ( $5.6 \pm 0.24$  ms;  $n = 11$  neurons) rise times in both neurons, suggesting that they were produced by a chemical input common to both neurons. The amplitudes of these EPSPs varied between both neurons and from one EPSP to the next in the same neuron, presumably because of presynaptic fluctuations in the

amount of transmitter being released (Fig. 1C<sub>1</sub>; De-Miguel et al., 2001). The EPSPs of the second population had slower ( $9.6 \pm 0.33$  ms) rise times and were always paired with a fast EPSP in the coupled neuron. The proportion of slow EPSPs was increased from 21% to 40% by reducing the presynaptic release probability with an external solution containing 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Since this manipulation reduced the average amplitude of the EPSPs without changing their kinetics, we conclude that the slow EPSPs were produced by an input onto the coupled neuron and that they were detected due to a local transmission failure (Fig. 1C<sub>2</sub>; De-Miguel et al., 2001). Accordingly, the rise time distribution of EPSPs was bimodal (Fig. 7B), supporting the idea that the EPSP populations were produced by an input onto each of the coupled neurons. Action potentials were produced in either neuron from the summation of both types of EPSPs (Fig. 1D), and in every case they were followed by another action potential in the coupled neuron after a lag of several milliseconds.

### Model design

Since the site of EPSP initiation was not accessible for recordings, we developed a model as a complementary tool to analyze the spread of EPSPs. The model was based on the morphology and passive electrical properties of the neurons. We estimated experimentally the time constant, the resistance and capacitance of the soma, as well as the length and the geometry of the neurites.

The morphology of 17 pairs of neurons filled with intracellular dyes was similar to those previously described



**FIGURE 1** Electrical activity of Retzius neurons. (A) Nomarski image of a leech ganglion showing the somata of the pair of electrically coupled Retzius neurons (*R*). Arrow points anterior. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . (B) Simultaneous recordings from both Retzius neurons in one ganglion.  $V_1$  and  $V_2$  are the voltage recordings from each neuron. Synchronous action potentials (large truncated spikes) and EPSPs (small spikes) composed the spontaneous electrical activity pattern of these neurons. (C) Superposition of pairs of EPSPs recorded simultaneously from both neurons. The EPSPs boxed are amplified in C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>. (C<sub>1</sub>) The amplitudes of EPSPs varied from one EPSP to the next and from one neuron to the other, although their rise and decay times were similar, suggesting presynaptic variations of transmitter release. (C<sub>2</sub>) Upon transmission failures onto either of the neurons, EPSPs produced in the

other neuron could be recorded from both somata. EPSPs arriving from the coupled neuron (marked as  $V_2$ ) were slower and were also attenuated in amplitude. (D) Action potentials were produced by summation of EPSPs produced locally with those arriving from the coupled neuron (arrow). The following EPSPs produced an action potential in  $V_1$  (truncated spike), which was followed by another action potential in the coupled neuron.

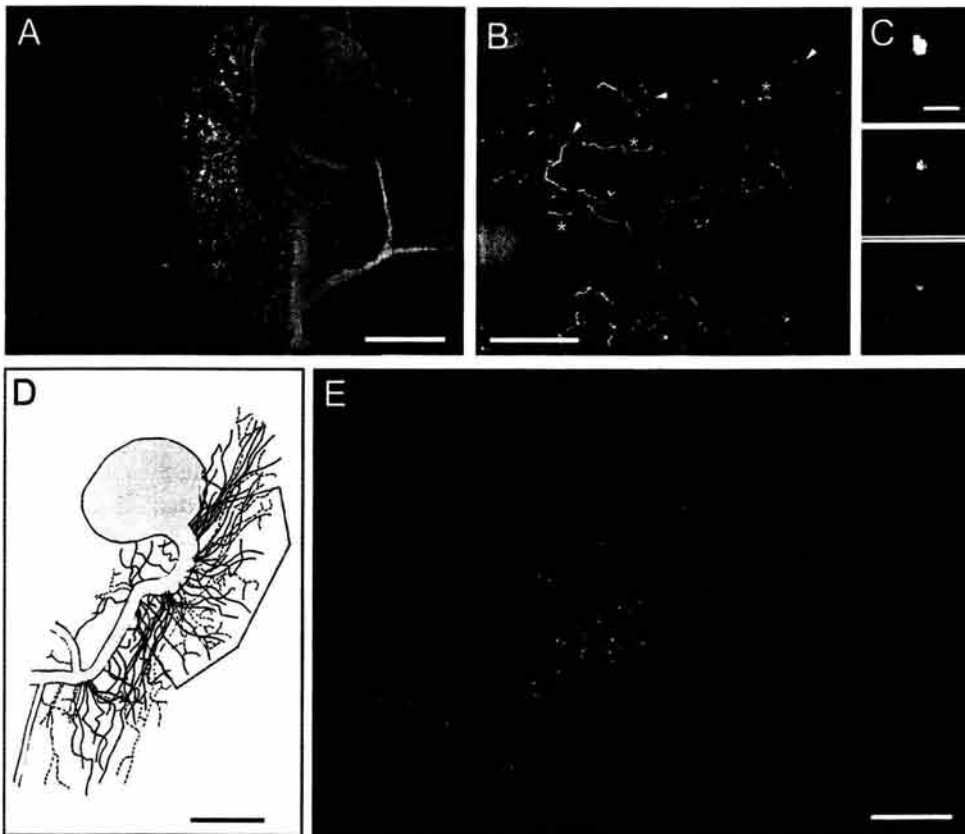
(Lent, 1973; Mason and Leake, 1978; De-Miguel et al., 2001). Both neurons in each ganglion were a mirror image of each other. The 60–80  $\mu\text{m}$  soma was connected to a primary axon from which multiple neurites were sent in all directions. Branches of the primary axon traveled out of the ganglion through the connective nerves and through the nerve roots (Fig. 2 A).

In seven pairs of neurons studied by double staining, the contact sites were formed by neurites sent to the central region of the neuropile (Fig. 2; De-Miguel et al., 2001). The length of this population of neurites was  $49.93 \pm 5.7 \mu\text{m}$  ( $n = 90$  neurites). After the deconvolution process to the  $z$  series of images, we found that neurites making contact had constant diameters with an average value of  $1.08 \pm 0.03 \mu\text{m}$ .

Most of the  $45.4 \pm 2.6$  contact sites were at the tips of the neurites and had the same diameter (Fig. 2 B); thus, for modeling purposes, we considered that the contact sites did not contribute to the capacitance of the circuit. As seen by comparing the responses of the model and neurons shown in Figs. 5 and 6, this was a good approximation. Our measurements were within the linear range of resolution of our optical system, as shown by the calibration with fluorescent beads of 0.5 and 2.0  $\mu\text{m}$  and emission wavelengths in the rhodamine and fluorescein ranges (Fig. 2 C), similar to those of the fluorescent dyes injected into the neurons. Fig. 2 D shows a partial reconstruction of a neurone with the region of neurites making contact surrounded by the red lines. In three neurons,

the percentage of neurites without branches making contact with the coupled neuron was 71%, 76%, and 63%, respectively ( $n = 204$  neurites). The rest of the neurites making contact ( $n = 59$ ; discontinuous lines in Fig. 2 D) had one (91%) or more (9%) branches, all of which had the same diameter as the mother neurites, thus failing to follow the  $3/2$  power rule for an electrotonically equivalent cable (Rall, 1959). The distribution of the contact sites in the arborization of a Retzius neuron is shown in Fig. 2 E. Note that most of the contact sites were established by neurites proximal to the soma.

Based on this morphology, we modeled the neuronal somata as circuits with parallel resistance ( $r_s$ ) and capacitance ( $c_s$ ) (Fig. 3) coupled directly to the neurites. The large axons were included in our original version of the model, although they were excluded from the rest of the analysis since, as shown by Yang and Chapman (1983), they did not have a significant contribution to the somatic coupling, presumably because they are isopotential with the soma (Ross et al., 1987). The large proportion of nonbranched neurites making contact allowed us to model the whole population as homogeneous cables with length  $\ell = 50 \mu\text{m}$  and space constant  $\lambda$ . The electrotonic distance of the neurites was defined as the  $\ell/\lambda$  coefficient (Fig. 3). The cables from each neuron were coupled by a resistor ( $r_c$ ). Note that with this configuration, artificial or simulated synaptic potentials produced at one soma would give the same voltage changes along all of the coupled neurites, as they are connected in parallel.



**FIGURE 2** Morphology of Retzius neurons. (A) Three-dimensional confocal reconstruction of a pair of Retzius neurons. The green neuron was filled with Texas red, and the purple neuron was filled with lucifer yellow. Images were not deconvolved. Scale = 40  $\mu\text{m}$ . (B) Deconvolved partial (10  $\mu\text{m}$  depth) reconstruction of the arborization of a Retzius neuron (blue). The contact sites are digitally superimposed (pink). Scale = 15  $\mu\text{m}$ . (C) Confocal images of fluorescent beads of 0.5 (green) and 2.0 (red)  $\mu\text{m}$  diameters. Image on top was before deconvolution. The images in the middle and bottom were deconvolved with 20 and 50 iterations, respectively. Scale = 2.0  $\mu\text{m}$ . (D) Partial reconstruction of a Retzius neuron. The area of contact is surrounded by the red lines. Neurites without branches are the continuous lines, and neurites with branches are the dotted lines. Scale = 40  $\mu\text{m}$ . (E) Reconstruction of a Retzius neuron from confocal  $z$  series of deconvolved images. The yellow spots are contact sites digitally superimposed. Note that contact sites were restricted to an area proximal to the soma. Scale = 40  $\mu\text{m}$ .



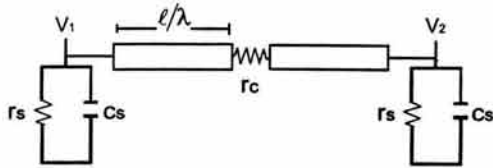


FIGURE 3 Electrical model of a pair of Retzius neurons. The somata, which were isopotential with the large primary axons, are represented as circuits with parallel resistance ( $r_s$ ) and capacitance ( $C_s$ ). Each soma is connected to neurites, one of which is represented as a finite cable of length  $l$  and space constant  $\lambda$ . The electrotonic distance of the neurites is defined as  $l/\lambda$ . Neurites from both neurons are connected by a coupling resistance ( $r_c$ ).

### Electrical parameters of the soma

The contribution of the soma to EPSP integration was determined by its impedance,  $Z_{\text{soma}} = r_s / (1 + j\omega\tau)$  (see the Supplementary Material, in which the intrinsic parameters were  $r_s$  (the soma membrane resistance) and  $\tau$  (the time constant; Table 1; see Supplementary Material). Both parameters were measured from somata that were isolated and kept in culture (Fig. 4 A) where they maintained their resting potential values similar to those of neurons in the ganglion.

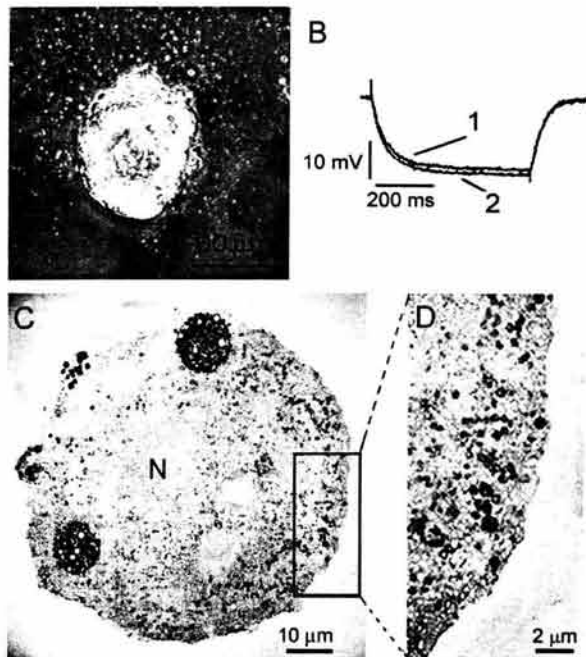


FIGURE 4 Estimates of the somatic time constant and membrane area. (A) Phase contrast image of the soma of a Retzius neuron in culture. (B) The time constant of neurons in culture was measured from the exponential decay time of the voltage response to the injection of square hyperpolarizing current pulses. The time constant was similar before (1) and after (2) a second electrode had impaled the neuron, showing that the soma "shunt" effect was minimal. The artifacts in trace 1 are due to bridge balance and show the beginning and end of the current pulse. (C) Electron micrograph of the soma of a Retzius neuron in culture showing invaginations of the plasma membrane. The nucleus (N) can also be seen. (D) Higher magnification of the region boxed in C.

A  $\tau$  value of  $20.8 \pm 3.4$  ms (ranging from 18 to 40 ms) was obtained from exponential fits to the steady-state voltage responses at the end of square hyperpolarizing current pulses of 500 ms (Fig. 4 B) in 12 neurons maintained at  $-60$  mV by the injection of negative DC current. The soma shunt produced by the microelectrode was minimal, since the values of  $\tau$  before and 5 min after the insertion of a second electrode were similar (Fig. 4 B), showing that the cell membrane sealed around the electrode. Therefore, we assumed that our estimates gave an accurate approximation to the real value of  $\tau$ . Data from neurons that failed to recover after the second impalement were excluded from our analysis.

The values of the membrane resistance ( $r_s$ ), were obtained from the formula  $r_s = \tau / (\text{soma surface area}) (C_s)$ , where  $C_s$  is the specific membrane capacitance ( $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Since the membrane infoldings could have a significant contribution to the surface area, estimates of this parameter were made from electron micrographs (Fig. 4, C and D). The amount of infolding of these neurons was similar to that of neurons in the ganglion (V. H. Hernandez, M. Morales, and F. F. De-Miguel, unpublished). The radius obtained from the real perimeters were used to calculate the total surface area, assuming that the neurons were spherical. In eight neurons, the areas obtained by this method ranged between  $1.13 \times 10^{-4}$  and  $3.14 \times 10^{-4}$   $\text{cm}^2$ , and were 25% larger than those calculated from images obtained under phase contrast optics. The corresponding values of  $r_s$  were between 90 and 150  $\text{M}\Omega$  (Table 1).

### Sinusoidal domain responses of neurons and model

To test the accuracy of the model and the values of the parameters estimated above (Table 1), we studied the frequency responses to injection of sine wave currents of six pairs of neurons with steady-state coupling ratios between 0.26 and 0.63. These responses were compared with model simulations (Fig. 5; Eq. 14 of the Supplementary Material). The model predictions compared well with the frequency responses of every pair of neurons and were similar to the responses of a first-order, low-pass filter, demonstrating that the system operated linearly. The best fits of the experimental data with the model predictions in every pair of neurons were obtained when  $\lambda = 100 \mu\text{m}$ , that is, twice the individual neurite length ( $50 \mu\text{m}$ ;  $l/\lambda$  ratio of 0.5), but similar to the distance between both somata. This low  $l/\lambda$  coefficient guaranteed an efficient EPSP conduction along the neurites.

The  $r_c$  values calculated ranged from 30  $\text{M}\Omega$  when the coupling ratio was 0.72, to 340  $\text{M}\Omega$  when the coupling ratio was 0.22. Two extreme conditions of the model (Yang and Chapman, 1983) failed to fit with our data. If  $\lambda$  is infinite, a fair representation of the circuit is with both somata bound directly by  $r_c$  (Fig. 5 C, left inset). The second condition occurred when the  $r_c$  value is so low that both somata are coupled by a continuous cable (Fig. 5 C, right inset).

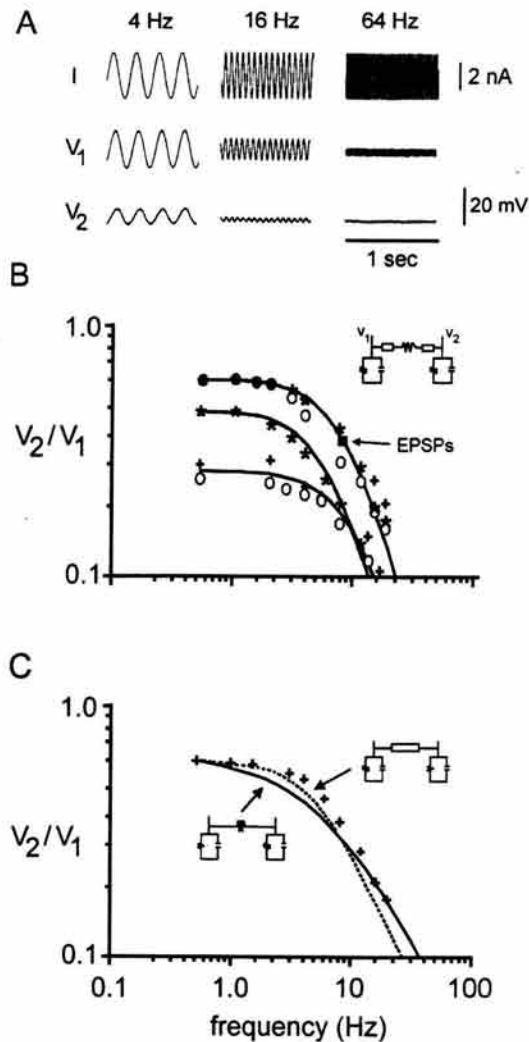


FIGURE 5 Frequency responses of neurons and model. (A) Sine wave currents ( $I$ ) of different frequencies (top traces) injected into the soma of a Retzius neuron and voltage responses in the driving ( $V_1$ ) and coupled ( $V_2$ ) neurons. The amplitude and phase shift of the voltage responses of both neurons were frequency dependent. (B) Responses of six pairs of neurons with steady-state coupling ratios between 0.62 and 0.26 are presented with different symbols. The continuous lines are best fits of these responses with the predictions of the model shown in the inset. The parameter values used are in Table 1. (C) The two extreme conditions of the model shown in the insets failed to fit with the experimental data.

To show the effect of  $\lambda$  and  $r_c$  on the spread of EPSPs along the neurites, the shape and amplitude of artificial EPSPs at both somata were compared with model simulations. Fig. 5 shows an example in which the steady-state coupling ratio was 0.35. The amplitude of the simulated EPSPs was fixed at  $V_1$ , and the  $r_c$  values were changed between 15 (below the value estimated for this coupling ratio) and 80 M $\Omega$  (Fig. 6). When the  $\ell/\lambda$  coefficient was fixed at 0.5 and the  $r_c$  value at 30 M $\Omega$ , the shape of the simulated responses reproduced that of artificial EPSPs. As expected, changing the  $r_c$  value produced an inversely proportional change in the amplitude of the EPSP at  $V_2$  without affecting its kinetics.

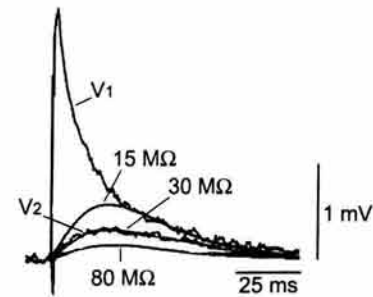


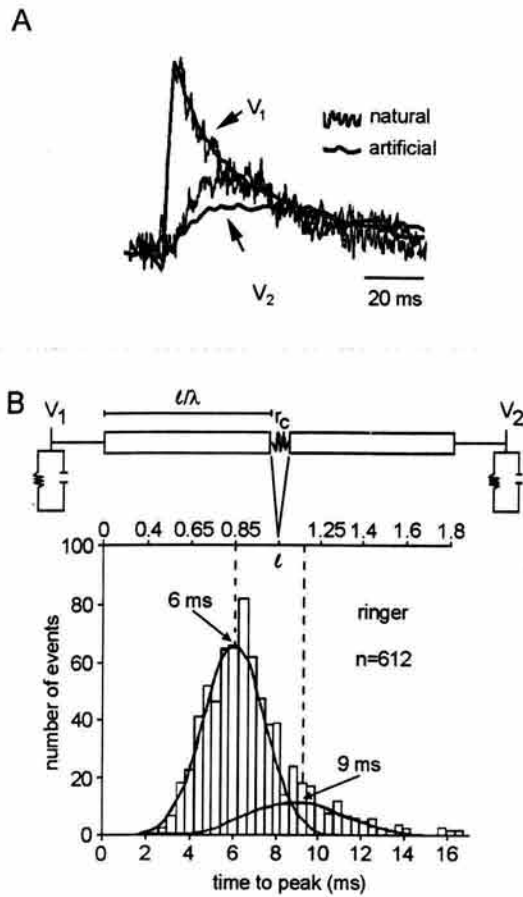
FIGURE 6 Effect of coupling resistance in the spread of EPSPs. Computer simulations reproduced the spread of artificial EPSPs from the soma of the driving neuron ( $V_1$ ) to the soma of the coupled neuron ( $V_2$ ). Changing the coupling resistance value in the simulations from 15 to 30 and 80 M $\Omega$  modified the amplitude but not the shape of the EPSPs in  $V_2$ .

### Location of presynaptic inputs in the coupled neurites

To estimate the location of presynaptic chemical inputs, we compared the somatic coupling ratio of natural and artificial EPSPs (Fig. 6). Owing to the passive properties of the neurites, a chemical input located right beside the electrical synapse should produce the largest somatic EPSP coupling ratio. This ratio should decrease as the input is more proximal to the soma. For this reason, the coupling ratio of EPSPs produced in the coupled neurites should be larger than that of artificial EPSPs produced at the soma. On the other extreme, the coupling ratio of EPSPs produced in noncoupled neurites should be smaller than that of artificial EPSPs.

In seven pairs of neurons the coupling ratio of artificial EPSPs was smaller than that of natural EPSPs, as expected for inputs located in the coupled neurites. Fig. 7 A superimposes natural and artificial EPSPs from a pair of neurons with a steady-state coupling ratio of 0.56. The amplitudes were normalized for comparison of their kinetics. In this representative pair of neurons, the coupling ratio of 10 averaged artificial EPSPs was 0.28, whereas the average coupling ratio of 30 natural EPSPs was  $0.41 \pm 0.04$ .

From the bimodal experimental rise time distribution of EPSPs recorded at the soma of one neuron (Fig. 7 B), we assumed that one input to each neuron was located symmetrically on each side of the electrical synapse. The exact location of both presynaptic chemical inputs was determined by simulating the somatic rise time of EPSPs in terms of the electrotonic distance along the coupled neurites. Since the rise time dependence of the input position comes from the  $\ell/\lambda$  coefficient, its value was adjusted in the model to calculate the input locations which produced EPSPs with somatic rise times of 5.6 and 9.6 ms. The  $\ell/\lambda$  coefficient which gave the best fits was  $0.45 \pm 0.7$ , and the distance from the electrical synapse to the chemical inputs was  $0.15 \pm 0.05 \ell$ , or 7.5  $\mu\text{m}$ , assuming that  $\ell = 50 \mu\text{m}$  ( $n = 7$  neurons). These results were similar if the rise time distributions of EPSPs were obtained using a physiological (1.8 mM) calcium concentration (Fig. 7 B) or if the presynaptic release

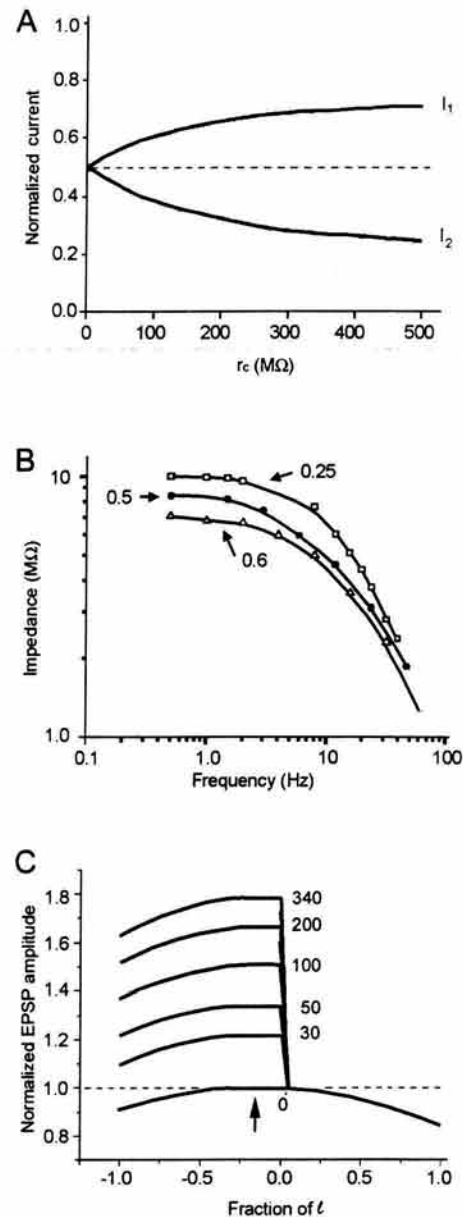


**FIGURE 7** Location of synaptic inputs. (A) The coupling ratio of artificial EPSPs produced in the soma ( $V_1$ ) was smaller than the coupling ratio of natural EPSPs produced in one of the neurons showing that synaptic inputs were in the coupled neurites. (B) The model simulations were combined with the rise time distributions of EPSPs to predict the locations of the inputs along the coupled neurites. The rise time distributions of natural EPSPs recorded in the soma of one of the neurons ( $V_1$ ) had two Gaussian peaks, suggesting two major input domains. By adjusting the  $\ell/\lambda$  coefficient, the model translated the rise time distributions to equivalent electrotonic distances equidistant from the electrical synapse (*top scale*). The distance from the electrical synapse to the presynaptic chemical inputs was  $0.15 \ell$  ( $17.5 \mu\text{m}$ ).

probability was reduced by using a solution with 1.0 mM calcium and 2.0 mM magnesium during the recordings (not shown).

### Electrical coupling modulates the amplitude of EPSPs

Electrical coupling of the neurites affected two variables that determined the amplitude of EPSPs. One was the distribution of chemically induced synaptic currents in both coupled neurites, and the second was their impedance. The distribution of synaptic currents as a function of the value of  $r_c$  was calculated by the model (Fig. 8 A). As expected, when  $r_c = 0 \text{ M}\Omega$ , both neurites behaved as a continuous cable, and



**FIGURE 8** Modulation of the EPSP amplified by electrical synapses. (A) Model predictions for the distribution of synaptic current on both sides of the electrical synapse as a function of the coupling resistance value.  $I_1$  is the current in the driving neurite, and  $I_2$  is the current in the coupled neurite. The asymmetry of the curves is due to the location of the presynaptic chemical input at  $0.15 \ell$  from the electrical synapse. Currents were normalized to those when the  $r_c = 0 \text{ M}\Omega$ . (B) Reciprocal relationship between the frequency-dependent impedance ( $Z = V_1/I$ ) and the steady-state coupling ratio. Symbols represent experimental measurements taken from neurons with coupling ratios of 0.25, 0.50, and 0.6. The lines were traced freehand after the data points were obtained. (C) The amplitude of EPSPs (*arrow*) depended on the value of the coupling resistance. The horizontal axis is the distance along both coupled neurites, assuming that ( $\ell = 0$ ) is the electrical synapse and that the somata are connected at distances  $\ell = -1$  (driving neuron) and  $\ell = 1$  (coupled neuron). The origin of EPSPs was at a distance  $\ell = -0.15$  (*arrow*). The amplitude of EPSPs was normalized to that when  $r_c = 0$ . The amplitude of the EPSP produced in the coupled neurite from current produced in the driving neurite was the same for all of the coupling resistance values. The decay of EPSPs along the neurites had the same Gaussian shape for all of the coupling resistance values.

current spread equally well toward both somata. For this reason, the current values at different  $r_c$  values were normalized to those calculated when  $r_c = 0$ . The asymmetry of the curves in Fig. 8 A was due to the input location at  $0.15 \ell$  from the electrical synapse.

The effect of electrical coupling on the impedance ( $Z = V/I$ ) is shown in Fig. 8 B. The plot of the frequency-dependent impedance was obtained experimentally by injection of sine wave currents to pairs of neurons with steady-state coupling values of 0.25, 0.5, and 0.6. As expected, the impedance was inversely proportional to the steady-state coupling ratio, and directly proportional to the estimated  $r_c$  values, which were 62, 100, and 250 M $\Omega$ , respectively. Since by Ohm's law the amplitude of the EPSPs in the driving neurite was dependent on the product of the impedance and the current, increasing the  $r_c$  value produced larger EPSPs. Again, the values presented in Fig. 8 C were normalized to those predicted when  $r_c = 0$  M $\Omega$ . As can be seen, the EPSP amplitude was 80% larger when the coupling resistance was 340 M $\Omega$ . Fig. 8 C also shows that the EPSP amplitude decayed along the neurites in a Gaussian manner independently on the  $r_c$  value because of the frequency dependence of EPSP passive spread (Jack et al., 1975).

Interestingly, our model predicted that the amplitude of EPSPs produced in the coupled neurite by the arrival of synaptic current from the driving neurite was the same at all values of  $r_c$  (Fig. 8 C). This was because at high  $r_c$  values, the impedance increase compensated for the reduction of the amount of current leaking through the coupling resistance. Simulations of EPSPs arriving at the somata of both coupled dendrites at different coupling resistance values and placing the inputs at both different distances from the electrical synapse of one neuron are shown in Fig. 9.

## DISCUSSION

We studied how electrical coupling affects the integration of EPSPs. As our main finding we predicted that electrical coupling modulates the amplitude of EPSPs in the driving neurite. Our results were highly dependent on the cytoarchitecture of the neurons. The location of presynaptic inputs near the electrical synapse and the 0.5 value of the  $\ell/\lambda$  coefficient of the coupled neurites allowed synaptic currents produced in either neurite to arrive at the soma of both neurons. In the driving neurite, the EPSP amplitude was dependent on the coupling resistance value. In the coupled neurite, the amplitude of EPSPs produced by synaptic currents arriving from the driving dendrite was constant at all coupling resistance values.

### Possible functional significance

Retzius neurons generate action potentials from the summation of EPSPs produced at their coupled neurites (Fig. 1). Therefore, the amplitude modulation of EPSPs in the driving

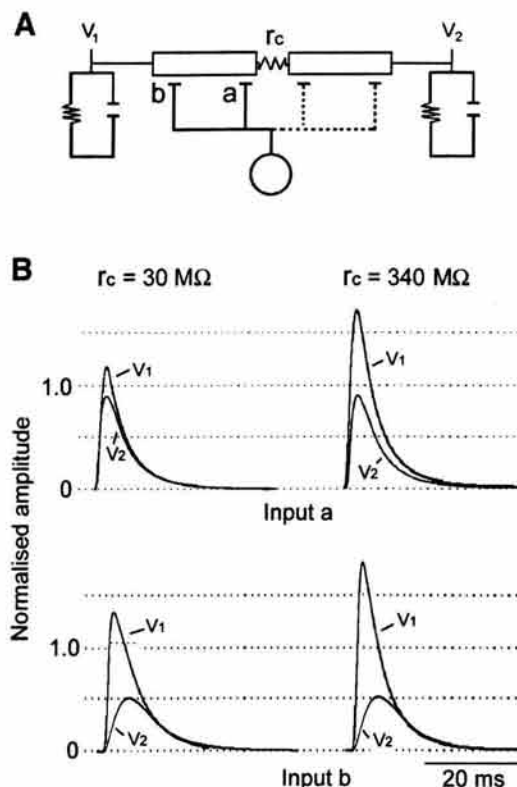


FIGURE 9 Effect of coupling resistance and input location on EPSPs arriving at both somata. (A) Diagram of the circuit with two presynaptic inputs at 0.15 and 0.85  $\ell$  from the electrical synapse. (B) Simulations of EPSPs produced by Input a (top) and Input b (bottom), arriving at both somata are superimposed. The coupling resistance values used were 30 (left) and 340 M $\Omega$  (right). The amplitudes were normalized to those of EPSPs produced when  $r_c = 0$  M $\Omega$ .

neurite by the electrical synapse could influence the firing frequency of the neurons, because summation of larger EPSPs produced at high  $r_c$  values would increase the probability of reaching the threshold for action potentials. In the coupled neuron, the constant-amplitude EPSPs arriving from the driving neuron regardless of the coupling resistance value guarantees that each EPSP produced in the coupled neurite may take part in the integration process. In addition, currents produced by action potentials in the primary axon back-propagate to the coupled neuron through the electrical synapse (Fig. 1 D). Therefore, this combination of chemical and electrical synapses with purely passive membrane properties allows several effects on integration.

Other evidence contributes to the understanding of how EPSPs are integrated by these neurons: 45 of the neurites make contact with the coupled neuron, suggesting a similar number of electrical synapses. Since several, if not all, of them may have chemical inputs, the dominance of unitary events in the amplitude distributions of EPSPs (F. F. DeMiguel and E. García-Perez, unpublished) makes it probabilistically very unlikely that double or triple synaptic events are produced at individual neurites. As a consequence of this,

the summation of unitary EPSPs arriving from different coupled neurites must occur at the primary axon. An advantage of this design would be a reduction of nonlinear effects produced by temporal summation in the same neurite (Magee, 2000).

It is remarkable that the cytoarchitecture of the coupled neurites is designed to function as a single unit. For example, the 0.5  $\ell/\lambda$  coefficient of a single coupled neurite is half of those of mammalian or lamprey motoneurons (Christensen and Teubl, 1979; Gustafsson and Pinter, 1984; Bras et al., 1987), lateral geniculate neurons of the cat (Bloomfield et al., 1987), guinea pig cerebellar Purkinje cells (Rapp et al., 1994), or electrically coupled photoreceptor cells in the turtle retina (Detwiler and Hodgkin, 1979). In Retzius neurons this small coefficient allows pairs of coupled neurites to act in series, integrating EPSPs produced by both neurons, regardless on the value of the coupling resistance.

Another aspect of the cytoarchitecture that is relevant from the functional point of view concerns the large areas of the soma and axons as compared with those of the fine neurites. Retzius neurons take advantage of their soma surface to release large amounts of serotonin upon high-frequency trains of impulses (Trueta et al., 2003). The large membrane area of the soma and primary axon as compared with that of the neurites produces a very low somatodendritic conductance coefficient ( $\rho \approx 10^{-2}$  to  $10^{-1}$ ; see the Supplementary Material). This relationship is opposite to that of vertebrate neurons, in which the surface area of the soma is only a fraction of that of the dendrites (Rall, 1959). The low  $\rho$  value suggests that the specific membrane resistance of the soma and primary axon is larger than that of the neurites and explains why, despite such morphology, it is possible to record from the soma the EPSPs produced in the small neurites. This coefficient also suggests that EPSPs recorded at the soma are attenuated as they arrive at the primary axon.

### Possible general significance

An increasing amount of evidence from electrophysiological experiments and from the expression patterns of gap junction proteins indicates that a large proportion of central neurons of vertebrates and invertebrates are electrically coupled (for a review, see Dermietzel and Spray, 1993). Some of the functions of electrical synapses, such as the mediation of fast behavioral responses and the synchronization of groups of neurons, are common to invertebrates and vertebrates, including mammals (Furshpan and Potter, 1959; Lin and Faber, 1988; Christie et al., 1989; Valiante et al., 1995; Ishimatsu and Williams, 1996; Mann-Metzer and Yarom, 1999; Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999), and so are their modulatory capabilities (Colombaioni and Brunelli, 1988; DeVries and Schwartz, 1989). In addition, the coexistence of chemical and electrical synapses is well-established in the vertebrate nervous systems (Martin and Pilar, 1963). Therefore, even though electrical coupling in

invertebrates is mediated by a different set of proteins (Phelan et al., 1998), it is likely that EPSP spread through electrical synapses may also be conserved as part of the integrative mechanisms of neurons of higher animals. Therefore, our prediction of an amplitude modulation of synaptic potentials by electrical synapses may be a first approximation to the understanding of a common mechanism of synaptic integration in the nervous system.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

An online supplement to this article can be found by visiting BJ Online at <http://www.biophysj.org>.

We are greatly indebted to Mr. Bruno Mendez for his invaluable technical assistance in our experiments.

The Computing and Microscopy Units at our Institute provided continuous support during this project. E.G.P. was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Dirección general de estudios de posgrado. M.V.C. and E.G.P. received complementary fellowships from a Human Frontiers Science Program grant (RG-162/98) to F.F.M. Human Frontiers Science Program (RG-162/98), CONACYT (1285-N9204), and Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (IN-207593) grants to F.F.M. gave support to this project.

### REFERENCES

- Auerbach, A. A., and M. V. L. Bennett. 1969. A rectifying electrotonic synapse in the central nervous system of a vertebrate. *J. Gen. Physiol.* 53:211–237.
- Baker, R., and R. Llinás. 1971. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *J. Physiol. (London)* 212:45–63.
- Bennett, M. V. L., E. Aljure, Y. Nakajima, and G. D. Pappas. 1963. Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science*. 141:262–264.
- Bloomfield, S. A., J. E. Hamos, and S. M. Sherman. 1987. Passive cable properties and morphological correlates of neurones in the lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Physiol.* 383:653–692.
- Bras, H., P. Gogan, and S. Tyc-Dumont. 1987. The dendrites of single brain-stem motoneurons intracellularly labeled with horseradish peroxidase in the cat. Morphological and electrical differences. *Neuroscience*. 22:947–970.
- Burrell, B. D., C. L. Sahley, and K. J. Muller. 2001. Non-associative learning and serotonin induce similar bi-directional changes in excitability of a neuron critical for learning in the medicinal leech. *J. Neurosci.* 21:1401–1412.
- Christensen, B. N., and W. Teubl. 1979. Estimates of cable parameters in lamprey spinal cord neurons. *J. Physiol.* 297:299–318.
- Christie, M. J., J. T. Williams, and R. A. North. 1989. Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. *J. Neurosci.* 9:3584–3589.
- Colombaioni, L., and M. Brunelli. 1988. Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the CNS of *Hirudo medicinalis*. *Exp. Biol.* 47:139–144.
- De-Miguel, F. F., M. Vargas-Caballero, and E. Garcia-Perez. 2001. Spread of potentials through electrical synapses in Retzius neurones of the leech. *J. Exp. Biol.* 204:3241–3250.
- Dermietzel, R., and D. C. Spray. 1993. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16:186–192.
- Detwiler, P. B., and A. L. Hodgkin. 1979. Electrical coupling between cones in turtle retina. *J. Physiol.* 291:75–100.

- DeVries, S. H., and E. A. Schwartz. 1989. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J. Physiol.* 414:351–375.
- Dietzel, I. D., P. Drapeau, and J. G. Nicholls. 1986. Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.* 372:191–205.
- Eckert, R. 1963. Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J. Gen. Physiol.* 46:573–587.
- Furshpan, E. J., and D. D. Potter. 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145:289–325.
- Galarreta, M., and S. Hestrin. 1999. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature.* 402:72–75.
- Galarreta, M., and S. Hestrin. 2001. Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science.* 292:2295–2299.
- García, U., S. Grumbacher-Reinert, R. Bookman, and H. Reuter. 1990. Distributions of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in soma, axons and growth cones of leech Retzius neurones in culture. *J. Exp. Biol.* 150:1–17.
- Gibson, J. R., M. Beierlein, and B. W. Connors. 1999. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature.* 402:75–79.
- Gustafsson, B., and M. J. Pinter. 1984. Relations among passive electrical properties of lumbar  $\alpha$ -motoneurons of the cat. *J. Physiol.* 356:401–431.
- Hagiwara, S., and H. Morita. 1962. Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion. *J. Neurophysiol.* 25:721–731.
- Henderson, L. 1983. The role of 5-hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurons in culture. *J. Physiol.* 339:311–326.
- Ishimatsu, M., and J. T. Williams. 1996. Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J. Neurosci.* 16:5196–5204.
- Jack, J. J., D. Noble, and R. W. Tsien. 1975. *Electric Current Flow in Excitable Cells.* Clarendon Press, Oxford.
- Korn, H., C. Sotelo, and F. Crepel. 1973. Electronic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus. *Exp. Brain Res.* 16:255–275.
- Kristan, W. B. 1982. Sensory and motor neurons responsible for the local bending response in leeches. *J. Exp. Biol.* 96:161–180.
- Lent, C. M. 1973. Retzius cells from segmental ganglia of four species of leeches: comparative neuronal geometry. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 44:35–40.
- Lin, J. W., and D. Faber. 1988. Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials. *J. Neurosci.* 8:1302–1312.
- Llinás, R., R. Baker, and C. Sotelo. 1974. Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J. Neurophysiol.* 37:560–571.
- Lockery, S. R., and W. B. Kristan. 1990. Distributed processing of sensory information in the leech. II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J. Neurosci.* 10:1816–1829.
- Macagno, E. R., K. J. Muller, W. B. Kristan, S. A. Deriemer, R. Stewart, and B. Granzow. 1981. Mapping of neuronal contacts with intracellular injection of horseradish peroxidase and Lucifer yellow in combination. *Brain Res.* 217:143–149.
- Magee, J. 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat. Neurosci.* 1:181–190.
- Mann-Metzer, P., and Y. Yarom. 1999. Electrotonic coupling interacts with intrinsic properties to generate synchronized activity in cerebellar networks of inhibitory interneurons. *J. Neurosci.* 19:3298–3306.
- Marder, E., and J. S. Eisen. 1984. Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to the same physiological inputs and neurotransmitters. *J. Neurophysiol.* 51:1362–1374.
- Martin, A. R., and G. Pilar. 1963. Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol.* 168:443–463.
- Mason, A., and L. D. Leake. 1978. Morphology of leech Retzius cells demonstrated by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 61:213–216.
- McMahon, D. G. 1994. Modulation of synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. *J. Neurosci.* 14:1722–1734.
- Muller, K. J., and U. J. McMahan. 1976. The shapes of sensory and motor neurones and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 194:481–499.
- Nicholls, J. G., and D. Purves. 1972. A comparison of chemical and electrical synaptic transmission between single sensory cells and a motoneurone in the central nervous system of the leech. *J. Physiol.* 225:637–656.
- Nusbaum, M. P., and B. W. Kristan. 1986. Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61. *J. Exp. Biol.* 122:277–302.
- Phelan, P., J. P. Bacon, J. A. Davies, L. A. Stebbings, M. G. Toodmand, L. Avery, R. A. Baines, T. M. Barnes, C. Ford, S. Hekimi, R. Lee, J. E. Shaw, T. A. Starich, K. D. Curtin, Y. Sun, and R. J. Wyman. 1998. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* 14:348–349.
- Rall, W. 1959. Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp. Neurol.* 1:491–527.
- Rapp, M., I. Segev, and Y. Yarom. 1994. Physiology, morphology and detailed passive models of guinea-pig cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 474:101–118.
- Rela, L., and L. Szczupak. 2003. Coactivation of motoneurons regulated by a network combining electrical and chemical synapses. *J. Neurosci.* 23:682–692.
- Ross, W. N., H. Aréchiga, and J. G. Nicholls. 1987. Optical recording of calcium and voltage transients following impulses in cell bodies and processes of identified leech neurons in culture. *J. Neurosci.* 7:3877–3887.
- Schmalbruch, H., and H. Jahnsen. 1981. Gap junctions on CA3 pyramidal cells of guinea pig hippocampus shown by freeze-fracture. *Brain Res.* 217:175–178.
- Stewart, W. W. 1978. Intracellular marking of neurons with a highly fluorescent naphthalimide dye. *Cell.* 14:741–759.
- Szabadics, J., A. Lorincz, and G. Tamas. 2001. Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *J. Neurosci.* 21:5824–5831.
- Tamas, G., E. H. Buhl, A. Lorincz, and P. Somogyi. 2000. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat. Neurosci.* 3:366–371.
- Trueta, C., B. Mendez, and F. F. De-Miguel. 2003. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J. Physiol.* 547(Pt 2):405–416.
- Valiante, T. A., J. L. Pérez-Velázquez, S. S. Jahromi, and P. L. Carlen. 1995. Coupling potentials in CA1 neurons during calcium-free-induced field burst activity. *J. Neurosci.* 15:6946–6956.
- Willard, A. L. 1981. Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* 1:936–944.
- Yang, J., and K. M. Chapman. 1983. Frequency domain analysis of electrotonic coupling between leech Retzius cells. *Biophys. J.* 44:91–99.

## **IX. APÉNDICE**

## IX. APÉNDICE

### Modelaje

La respuesta eléctrica de las neuronas de Retzius fue predicha utilizando la teoría lineal de cable, y se aplicó para resolver el circuito de la figura 15. Para diseñar el modelo, se combinaron las evidencias morfológicas y electrofisiológicas con los resultados obtenidos por Yang and Chapman (1983). Las variables, terminus y valores usados se encuentran en la tabla 2.

El soma tiene una impedancia  $Z_{\text{soma}} = r_s / (1+s)$ , donde  $s = j\omega\tau$ , es la variable de la transformada de Laplace,  $\omega$  es la frecuencia en radianes ( $2\pi f$ ) y  $r_s$  es la resistencia del soma. Los somas fueron colocados en  $x=0$  y  $x=2\ell$ , respectivamente y cada uno fue acoplado con una neurita, representada como un cable de longitud finita  $\ell$  (Rall, 1959; Yang y Chapman, 1983). Las neuritas de ambas neuronas fueron conectadas en serie a través de la resistencia de acoplamiento ( $r_c$ ; Fig. 15). Los axones primarios y secundarios no se incluyeron en la última versión del modelo debido a que no afectan la tasa de acoplamiento de las neuronas de Retzius, como Yang y Chapman (1983) probaron.

La longitud del cable 1 se encuentra entre  $0 \leq x \leq \ell$  y su voltaje fue definido como  $V^-(x, t)$ . El cable 2 se encuentra en  $\ell \leq x \leq 2\ell$  y su voltaje es  $V^+(x, t)$ . Los valores iniciales para  $V^-(x,0) = V^+(x,0)$  se suponen cero y  $V^-(0,t) = V_1(t)$  se produjo experimentalmente (Jack et al, 1975). Las ecuaciones que se resolvieron, adimensionales, son:

$$\bar{X} = x/\lambda \quad (1)$$



$$\tilde{T} = t/\tau \quad (2)$$

donde  $\tilde{X}$  es la distancia adimensional a lo largo del cable, y  $\tilde{T}$ , es el tiempo adimensional definido como:

$$V_{\tilde{T}}^- = V_{\tilde{X}\tilde{X}}^- - V^- \quad \text{for } 0 \leq X \leq \ell/\lambda = L \quad (3)$$

$$V_{\tilde{T}}^+ = V_{\tilde{X}\tilde{X}}^+ - V^+ \quad \text{for } L \leq X \leq 2L \quad (4)$$

Como la sinapsis eléctrica actúa como una resistencia pasiva, el voltaje a través de ella se puede expresar como la ley de Ohm:

$$V^+ - V^- = r_c I^+ = r_c I^- \quad (5)$$

También, suponiendo que no hay pérdida de carga en la sinapsis eléctrica, la corriente, expresada en términos de voltajes, resistencia axial ( $r_a$ ) y constante de espacio de las neuritas fue:

$$I^- = -(1/r_a \lambda) (\partial V^+ / \partial x) \Big|_{x=L} = I^+ = -(1/r_a \lambda) (\partial V^- / \partial x) \Big|_{x=L} \quad (6)$$

La solución para  $V^-$  y  $V^+$  se obtuvo utilizando la transformada de Laplace como:

$$V^\pm(x, t) = (1/2\pi i) \int_c e^{st} \tilde{V}^\pm(x, s) ds \quad (7)$$

El límite de integración  $c$  lleva a la derecha de todas las singularidades de  $\tilde{V}^\pm$ . Las funciones  $\tilde{V}^\pm(x, s)$  se determinaron a partir de las ecuaciones 3 y 4 y las condiciones de frontera definidas en las ecs. 5 y 6, como en Jack et al, (1975). Resolviendo las ecuaciones y haciendo  $\tilde{V}_1(s)$  igual a la transformada de Laplace de  $V_1(t)$ , se obtiene:

$$V_2(t) = V^+(2L, t) = (1/2\pi i) \int_c e^{st} G(s) \tilde{V}_1(s) ds \quad (8)$$

La función  $G(s)$  obtenida al resolver la ecuación diferencial para las variables transformadas y las condiciones de frontera fue:

$$G(s) = P(s)Q(s)\operatorname{sech}2\gamma L \quad (9)$$

donde:

$$P(s) = \frac{Z_{\text{soma}}(s)}{Z_{\text{soma}}(s) + (r_a \lambda / \gamma) \tanh 2\gamma L}; \quad (10)$$

$$Q(s) = \left( \frac{1}{1 - (r_c \gamma / r_a \lambda) (\sinh \gamma L + F(s) \cosh \gamma L) \cosh \gamma L} \right) \quad (11)$$

y

$$\gamma = \sqrt{1 + s} \quad (12)$$

La función  $F(s)$ , responsable para el acoplamiento eléctrico fue:

$$F(s) = - \frac{\cosh 2\gamma L + \gamma (Z_{\text{soma}} / r_a \lambda) \sinh 2\gamma L}{\sinh 2\gamma L + \gamma (Z_{\text{soma}} / r_a \lambda) \cosh 2\gamma L} \quad (13)$$

La tasa de acoplamiento en el dominio senoidal se obtuvo suponiendo que:

$$V_2 / V_1 = H(\omega) = |G(i\omega)| \quad (14)$$

Los parámetros libres fueron  $\lambda$  y la resistencia de acoplamiento  $r_c$ , dado que los valores de  $\ell$ ,  $\tau$ , y  $r_s$  se obtuvieron experimentalmente, como se describe en el texto. Diferentes valores para los parámetros fueron probados en el modelo y la función  $H(\omega)$ , en el dominio de la frecuencia, se comparó con los valores de  $V_2/V_1$  obtenidos experimentalmente como se describe en el texto. Los valores de  $r_c$  se obtuvieron ajustando las simulaciones del modelo a los datos experimentales (Figura 16).

Un aspecto importante es que la conductancia somato-dendrítica:  $\rho = r_s / r_a \lambda$  estuvo en el rango de 0.005 to 0.15, que es marcadamente diferente

de sus valores usuales en neuronas de vertebrados (Rall, 1959). Esto se debe a que la superficie del área del soma de las neuronas de Retzius es muy grande comparado con la superficie de las neuritas. La función  $H(\omega)$  es del mismo orden de magnitud que  $\rho$ . Sin embargo, dado que el experimento se realizó inyectando corriente en el soma y que  $|H(\omega)|$  se calculó suponiendo un voltaje dado en el cable, la función de transferencia de los voltajes así como entran al cable fue calculada dividiendo el voltaje en el soma por  $\rho$ . Esta función modificada fue la que se ajustó a los datos experimentales.

### Simulación de PSEs

Para simular la propagación de PSEs a lo largo de las neuritas, se utilizó la aproximación del punto silla (Murray, 1984). La integración se llevó a cabo en la región  $s \rightarrow \infty$ , así  $\text{sech} 2\gamma L = e^{-2\sqrt{s+1}L}$ . Los puntos silla se determinaron desde el extremo en  $s$  de la fase  $-2\sqrt{s+1}L + st$ . También se muestra en la figura 15 que el valor de la función de transferencia en  $s=0$  se controló por la resistencia de acoplamiento. Así, cuando  $s=0$ , la ecuación 12 adquiere la forma:

$$Q = 1/(1 + r_c / (r_a \lambda)) \quad (15)$$

De los cálculos de la forma de los PSEs se obtuvieron dos resultados importantes que no serían accesibles sin la solución detallada de la ecuación diferencial parcial. El primero fue la dependencia no lineal de la amplitud de los PSEs de  $r_c$ . El segundo fue la dependencia del tiempo al pico de los PSEs (y por lo tanto, de su forma) de su posición a lo largo del cable mientras se propagan desde la entrada hacia ambos somas. Utilizando estas aproximaciones, cuando

la entrada presináptica se localiza en  $x=0$  y la salida en  $x=2L$ , el sistema se modeló como:

$$V_2(t) = S(t)(t/\tau)^{3/2} e^{-t/\tau} e^{-L^2\tau/t} \quad (16)$$

donde  $\tau$  es la constante de tiempo de la membrana. La función  $S(t)$  esta dada por:

$$S(t) = (A/1 + (r_c / r_a \lambda)) P (L\tau/t) \quad (17)$$

donde  $A$  es la amplitud del voltaje en la entrada y  $P$  se definió en la ecuación 10.

La fase de subida simulada de los PSEs cuando la corriente se inyectó al soma se determinó utilizando  $t^{3/2}e^{-L^2\tau/t}$ , y la fase de caída se definió como  $e^{-t/\tau}$  (Fig. 19).

Para simular la propagación de PSEs producida a diferentes posiciones a lo largo de las dendrites, la ecuación 16 se modificó resolviendo las ecuaciones 3 y 4 con las condiciones de frontera adecuadas cuando la entrada es colocada en las neuritas. En este caso, la forma simulada de los PSEs esta dada por:

$$V_2(t) = S(t)(t/\tau)^{-1/2} e^{-t/\tau} e^{-(Lx/2)^2 \tau/t} \quad (18)$$

donde el producto  $Lx$  fue la posición a lo largo de la dendrita (ecuación 3).

Se debe notar que la dependencia en  $t^{-1/2}$  da una fase de subida más rápida que  $t^{3/2}$  porque los tiempos de subida del los PSEs simulados en las neuritas fueron más rápidos debida a la pérdida del filtrado en el circuito RC del soma, que afecta los PSEs artificiales producidos en el soma. Una segunda característica descrita por la dependencia en  $t^{-1/2}$  fue la sensibilidad de la fase de subida de los PSEs con respecto a la posición de la entrada.

Como una aproximación para estudiar la parte de corriente sináptica que

se propaga a la neurona acoplada, se consideró que la entrada presináptica se encuentra en la neurita a  $7.5 \mu\text{m}$  de la resistencia de acoplamiento (ver el texto y la figura 17). Para una corriente dada en el sitio de la entrada sináptica, la máxima amplitud de los PSEs a una distancia  $x$  de la entrada está dada por:

$$\max_{0 \leq t \leq \infty} \left( \frac{1}{1 + (1/(r_c / (r_a \lambda) + 1))} \right) S(t) (t/\tau)^{-1/2} e^{-t/\tau} e^{-(Lx/2)^2 \tau/t} \quad (19)$$

Como se puede ver en la figura 8 del artículo, la amplitud de los PSEs en el origen (Eq. 19) se incrementa conforme  $r_c \rightarrow \infty$ . Contrariamente, cuando  $r_c \rightarrow 0$ , la misma cantidad de corriente sináptica se propaga hacia ambas somas, de la misma manera que responde un cable continuo (Hodgkin and Rushton, 1946). Cuando  $x > \ell$ , la caída de corriente sináptica cuando se propaga hacia ambas somas, produce PSEs de forma similar, pero más pequeños en amplitud en la neurita acoplada. Esto se debe al coeficiente  $r_c/r_a$ , expresado como el factor

$$\left( \frac{1}{r_c / r_a \lambda + 1} \right) \left( \frac{1}{1 + 1/(r_c / r_a \lambda + 1)} \right).$$

Note que cuando  $r_c \rightarrow \infty$ , este factor va a cero y que cuando  $r_c \rightarrow 0$ , la amplitud de los PSEs en ambas neuritas es igual. La ecuación 19 también predice que debido a las respuestas en frecuencia cuando la corriente fluye a través de las neuritas, la amplitud de los PSEs decae de manera Gaussiana, (Jack et al, 1975) en lugar de hacerlo exponencialmente en función de la distancia, que caracteriza a las respuestas en voltaje en estado estacionario (Hodgkin and Rushton, 1946). Finalmente, se debe remarcar que las amplitudes y formas de los PSEs fueron dependientes de tres parámetros: la longitud

eléctrotónica de las neuritas ( $L = \ell/\lambda$ ); la constante de tiempo de la membrana y el coeficiente de la resistencia de acoplamiento con la resistencia axial multiplicada por la constante de espacio ( $r_c/r_a\lambda$ ). el coeficiente  $\lambda/\tau$  influencia la forma de los PSEs, a condición de que la entrada esté localizada en el cable y  $r_c/r_a\lambda$  module la amplitud de los PSEs.