



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
NEUROCIENCIAS

“REGULACIÓN DE LA CONDUCCIÓN PASIVA DURANTE EL CRECIMIENTO NEURONAL”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ADRIANA DE LA ROSA TOVAR

DR. FRANCISCO RAFAEL FERNÁNDEZ DE MIGUEL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX,

OCTUBRE DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico esta tesis doctoral a mis hijos: Carlos Armando, Adriana Sofía y Arturo Andrei como prueba material de que los sueños se pueden cumplir cuando trabajamos y perseveramos para conseguirlo.

Este largo y minucioso trabajo de investigación es el fruto de la herencia que mis padres inyectaron en mis genes y constituye un amoroso regalo para ambos: la Q.I. María de la Luz Tovar González (q.e.p.d) y el Entomólogo Armando de la Rosa Luévano.

¡¡Gracias por ayudarme a alcanzar mis sueños!!.

Con mucho cariño y amor para Carlos, mi compañero de aventura, de aprendizaje, de sociedad en la crianza de nuestro invaluable tesoro genético: Nuestros hijos.

Para Arturo, Luchita y Manuel, quienes fueron la inspiración y el apoyo crucial para que esta ambición de convertirme en investigadora se cristalizara.

Con especial respeto para Doña Conchita Leyva q.e.p.d.

A la memoria de mi querido amigo, maestro y terapeuta Víctor Manuel Maldonado Quiróz.

He realizado esta tesis de neurobiología-biofísica, con la intención de que los estudiantes de ingeniería y de áreas afines, encuentren un material didáctico sencillo para comprender la manera en que las neuronas se comunican y cómo se lleva a cabo la regulación de sus propiedades pasivas durante el crecimiento.

Dedico esta tesis doctoral a mis alumnos de los laboratorios de Física Experimental, Electricidad y Magnetismo, Principios de Termodinámica y Electromagnetismo y Taller de Física Experimental de la Facultad de Ingeniería de la UNAM, y también a mis alumnos de la materia Introducción a la Teoría Electromagnética de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAEM, materias que impartí desde 1995 hasta 2016.

AGRADECIMIENTOS

Inicié esta aventura retomando mis viejas ambiciones y sueños de realizar estudios de posgrado, algo extraño, extravagante para una mujer profesionista, madre de 3 hijos y con bastantes ocupaciones y poco tiempo para pensar en otra cosa que las obligaciones familiares. A pesar de eso, tengo por costumbre escuchar los presentimientos que suelen hablarme desde el inconsciente mientras duermo. Confieso que el miedo me impedía tomar la decisión de llevar a cabo mis planes, pero la repentina e inesperada muerte de un ser querido fue el detonante que me aventó al precipicio y al vértigo de la ciencia, y que irremediamente me hacía pensar que no había marcha atrás. Cada una de las dificultades con las que me encontré en el camino moldearon el carácter y la persona en quien me convertí en mi experiencia frente a la ciencia. En cada uno de éstos pasos me encontré con cómplices, amigos y maestros que fungieron como impulsores para llevar a cabo mi sueño: Agradezco infinitamente la confianza que mis padres depositaron en mí : la herencia y el amor por los conocimientos que me inculcaron desde niña, el punto de vista objetivo y científico de mi madre María de la Luz Tovar González y la curiosidad y la paciencia de mi padre: Armando de la Rosa Luévano, entomólogo, pionero en la observación y el comportamiento del mosquito Aenofeles *Aedes* y vehículo importante en la instauración de medidas sanitarias públicas en la sierra norte de Puebla y en el estado de Morelos durante la epidemia del paludismo bajo la responsabilidad del Instituto de Enfermedades Tropicales por medio de la CNEP en los años 50's y 60's del siglo XX.

Quiero agradecer especialmente a mi esposo Carlos Rojas Leyva, por haber sido copartícipe involuntario de esta locura, por ser mi brazo fuerte en el cuidado de nuestros hijos durante el tiempo que me dediqué a mis estudios, y por ser el testigo mudo de la evolución que experimentamos los dos a nuestro paso por la ciencia y con quien compartí muchas experiencias, conocimientos y puntos de vista que sirvieron para dar sostén a la educación y el amor que han recibido nuestros tres hijos: Carlitos, Sofi y Arturito, cuyos frutos empezamos a cosechar ahora y de lo cual ambos nos sentimos profundamente orgullosos.

Agradezco también a mi tutor, el Dr. Francisco Fernández de Miguel, un mentor exigente como pocos pero al mismo tiempo excelente persona, quien nunca me permitió dejarme vencer ni asumir conductas derrotistas al enfrentarme con las incontables dificultades por las que atravesé durante mis estudios doctorales y que desde el primer momento de nuestro encuentro me brindó tanto su confianza plena como las llaves de su laboratorio. Algo por lo que me encuentro en deuda permanente con él.

Asimismo, expreso mi más sincero agradecimiento a mis tutores: Dr. Antonmaría Minzoni del IIMAS de la UNAM (q.e.p.d.) y al Dr. Ismael Jiménez del CINVESTAV del IPN por la discusión de las ideas inherentes al proyecto de investigación, por

compartir conmigo su experiencia que ayudaron a que el proyecto saliera adelante y por su enorme calidad humana.

Quiero agradecer también a mis colegas: al Ing. Bruno Méndez, técnico académico del laboratorio por haberme invitado a conocer su lugar de trabajo y por su compañía durante todo este tiempo y a quien agradezco la valiosa ayuda que me prestó en la implementación del instrumental electrofisiológico requerido; al biólogo Prashant Kumar Mishra, colega experimental, compañero de infortunios y excelente amigo, a Javier Vargas por su amabilidad y paciencia para compartir conmigo sus conocimientos y experiencia en el estudio y la técnica de la disección de la sanguijuela. A mis queridas compañeras: Paula Noguéz, Montserrat Guerrero Cercós, Gabriela Torres Platas y Carolina León, por compartir buenos y malos momentos, así como a mis colegas de la Facultad de Ingeniería de la UNAM y estudiantes de servicio social que estuvieron trabajando a mi cargo : Susana Yañez Martínez y Mónica Meztli Oropeza quienes colaboraron conmigo en la construcción de un generador de ruido blanco, parte medular del éxito que tuvieron nuestros estudios electrofisiológicos en células de Retzius de sanguijuela, objetivo que parecía imposible de lograr y que al cabo de un par de años pudimos sacar adelante acoplándolo al amplificador construido por el Ing. Bruno Méndez.

Quiero agradecer también al personal administrativo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su apoyo moral y técnico como la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, directora del mismo, a los técnicos administrativos del laboratorio: Lino Méndez y Sara Flores, Miriam Morales, Olivia Farfán, Sara Méndez Ibañez, a la Maestra Ana María Escalante, jefa de la Unidad de Cómputo del área de neurociencias del Instituto de Fisiología Celular y especialmente al Ing. Francisco Pérez Eugenio por su gran apoyo en la resolución de los problemas técnicos relativos a mi trabajo de investigación, quien además de colega se convirtió en un gran amigo.

Por otro lado, deseo agradecer de manera especial a mis hermanos: Armando, Paty, Luis Francisco, Sergio, Mónica y Jorge, quienes han sido mis compañeros de ruta todo el tiempo y quienes me han ayudado en momentos difíciles y con quienes comparto, reparto y reparto mis buenos y malos momentos desde que tengo uso de razón.

Adriana

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN -----	12
II.	EL CONCEPTO DE INTEGRACIÓN SINÁPTICA -----	14
III.	FISIOLOGÍA DE LA SANGUIJUELA -----	15
IV.	FISIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE RETZIUS-----	16
V.	INTEGRACIÓN SINÁPTICA (TEORÍA DE SISTEMAS)-----	18
VI.	PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NEURONAS-----	19
	VI.1 CONSTANTE DE ESPACIO-----	20
	VI.2 CONSTANTE DE TIEMPO-----	20
	VI.3 LONGITUD CARACTERÍSTICA-----	21
VII.	HIPÓTESIS INICIALES -----	21
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS-----	22
	VIII.1 MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE RETZIUS -----	22
	VIII.2 ELECTROFISIOLOGÍA-----	24
	VIII.3 CÁLCULOS DE LAS RESPUESTAS PASIVAS-----	25

VIII.4 CÁLCULOS DE LOS PARÁMETROS	
	BIOFÍSICOS ----- 26
VIII.5 MODELADO MATEMÁTICO-----	29
IX. RESULTADOS-----	30
IX.1.ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LAS NEURONAS	
	DE RETZIUS----- 30
IX.2.ESTIMACIONES DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS	
	PASIVAS----- 31
IX.3.ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SINÁPTICA	
	ESPONTÁNEA----- 35
IX.3.1.MECANISMOS PRESINÁPTICOS SUBYASCENTES	
	A LA INTEGRACIÓN SINÁPTICA DURANTE EL
	CRECIMIENTO ----- 35
IX.1.2. FRECUENCIA DE LOS AP´S Y LOS EP´S-----	38
X. DISCUSIÓN-----	40
XI. BIBLIOGRAFÍA-----	43

GLOSARIO

C_m	Capacitancia específica de la membrana
$C_m \text{ soma}$	Capacitancia de la membrana somática
λ	Constante de espacio
L	Longitud característica
l	Longitud dendrítica
r_c	Resistencia de acoplamiento
r_{dend}	Resistencia de la membrana dendrítica
r_m	Resistencia de la membrana somática
τ	Constante de tiempo de la membrana somática

RESUMEN

En este trabajo estudiamos cómo un circuito neuronal simple compuesto de solo tres neuronas conectadas entre sí mediante sinapsis químicas y eléctricas, mantiene constantes sus capacidades integrativas durante el crecimiento. Para ello, combinamos experimentos electrofisiológicos con modelado matemático en 9 pares de neuronas de Retzius de sanguijuelas desde post-natales hasta adultas (21-75 micras). Las dendritas acopladas eléctricamente de ambas neuronas reciben un entrada química presináptica común. Los potenciales sinápticos excitadores (EPSPs) producidos en las dendritas de ambas neuronas se suman para producir los potenciales de acción característicos de la actividad basal de las neuronas serotoninérgicas. En este circuito estudiamos como se adaptan la conducción pasiva y las conexiones químicas y eléctricas al crecimiento geométrico del circuito.

Primero estudiamos las características de las conexiones químicas y eléctricas sobre las dendritas acopladas de pares neuronales con diámetros somáticos de 21 a 75 μ m. Encontramos que los EPSPs registrados en los somas fueron similares sin importar el tamaño neuronal. Sin embargo, la tasa de acoplamiento de las neuronas variaba independientemente de su tamaño. Para comprender qué factor daba lugar a estas propiedades, obtuvimos los valores de la resistencia de la membrana del soma (r_m) y de las dendritas (r_{dend}), la resistencia de acoplamiento de las dendritas (r_c), su constante de espacio (λ), y longitud dendrítica característica ($L = l / \lambda$). Para ello alimentamos un modelo matemático con las variables biofísicas obtenidas al inyectar corrientes de ruido en el soma de una de las neuronas y medimos los cambios de voltaje registrados en ambas neuronas acopladas. Encontramos que incrementos en la resistencia de la membrana de las dendritas compensan el efecto del crecimiento geométrico de las neuronas, incrementando el valor de λ manteniendo así la longitud dendrítica efectiva. El descubrimiento más relevante de nuestro trabajo fue mostrar que con el simple hecho de incrementar la resistencia dendrítica, este circuito mantiene constantes sus capacidades integrativas durante el crecimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Nuestro objetivo fue analizar la integración sináptica durante el crecimiento de un circuito. Las neuronas procesan la información y dan una salida integrada en respuesta, a la cual se conoce como integración sináptica (Cooke and Lipkin., 1972). Este procesamiento de información es de vital importancia para la comunicación en el sistema nervioso.

Muchos circuitos neuronales son completamente funcionales al momento de nacer mucho tiempo antes de que el cerebro alcance sus dimensiones finales. El crecimiento del cerebro después del nacimiento y durante la evolución impone un gran reto a los circuitos que deben mantener su relación entrada / salida mientras las neuronas individuales crecen.

Este escalamiento dinámico de tamaño tiene otras expresiones comunes en neurobiología. Por ejemplo, un perro chihuahua adulto es de la mitad de tamaño que la cabeza de un perro gigante de los pirineos. A pesar de tales diferencias de tamaño, las funciones elementales de sus circuitos cerebrales se despliegan con precisiones similares.

Por otro lado, los circuitos que se encuentran bien preservados de una especie a otra también despliegan amplias diferencias de tamaño en especímenes adultos, por ejemplo, ciertas neuronas que desempeñan la misma función en ratones o en elefantes tienen radicalmente distintas dimensiones.

En todos esos casos las propiedades eléctricas de las neuronas y sus conexiones deben compensar la expansión progresiva del soma, las dendritas y los axones.

Las adaptaciones eléctricas de algunas neuronas individuales durante el crecimiento se han estudiado a cierto nivel (Hochner and Spira, 1987; Kepler et al., 1990; Edwards et al., 1994 a,b; Picones et al., 2003; Atkinson and Williams, 2009).

Aún más, se ha demostrado que la fuerza sináptica química se modula mientras que el circuito crece (Peng et al., 2009) y que algunos, si no es que muchos circuitos neuronales también incorporan conexiones eléctricas (Furshpan and Potter, 1959; Llinás et al., 1974; Korn and Faber, 1976; Wine and Krasne, 1982; Galarreta and Hestrin, 1999).

Este estudio se diseñó para encontrar la relación entrada/salida de un circuito neuronal incorporando sinapsis químicas y eléctricas durante el crecimiento.

Para este estudio, el sistema nervioso central de la sanguijuela ofrece varias ventajas, debido a que cada ganglio intermedio contiene únicamente alrededor de

400 neuronas, muchas de las cuales se han identificado funcionalmente (Blackshaw and Nicholls, 1995; Friesen and Kristan, 2007).

El par de neuronas serotoninérgicas de Retzius es fácilmente identificable debido a su gran tamaño en el soma de cada ganglio. Cada par de neuronas de Retzius se encuentra acoplado eléctricamente por una sinapsis eléctrica no-rectificante (Hagiwara and Morita, 1962; Eckert, 1963).

La tasa de acoplamiento es similar entre neuronas del mismo animal pero varía de un animal a otro debido presumiblemente a estados moduladores intrínsecos (De-Miguel et al., 2001).

La sinapsis eléctrica se establece entre las dendritas de ambas neuronas (García-Pérez et al., 2004). Adicionalmente, las dendritas acopladas de ambas neuronas producen potenciales sinápticos excitadores (EPSPs) cerca de la sinapsis eléctrica (De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al., 2004). La identidad y el número de neuronas contribuyendo a esta entrada permanece aún sin identificar. Sin embargo, debido a que los EPSPs que tienen amplitudes variables aleatoriamente se producen simultáneamente en ambas neuronas, la misma entrada parece ser común a ambas células.

Los EPSPs producidos en cada neurona se propagan al soma, pero también atraviesan la sinapsis eléctrica y se propagan a la neurona acoplada en donde se suman con los EPSPs producidos localmente para generar los potenciales de acción que caracterizan la baja frecuencia de disparo de esas neuronas serotoninérgicas (De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al., 2004; Vázquez et al., 2009).

Debido a que la sinapsis eléctrica (r_c) permite la propagación de corrientes sinápticas a la neurona acoplada, la amplitud de los EPSPs es inversamente proporcional al valor de la resistencia de acoplamiento (García-Pérez et al., 2004; Vázquez et al., 2009).

El acoplamiento eléctrico de las neuronas de Retzius con las otras neuronas serotoninérgicas en el ganglio (Lent and Frazer, 1977) y también las entradas químicas poli-sinápticas sobre las dendritas no acopladas de las neuronas de Retzius también han sido caracterizadas (Velázquez-Ulloa et al., 2003), sin embargo, no contribuyen a la integración estudiada aquí (De-Miguel et al., 2001). Por lo tanto, el circuito más simplificado posible se esquematiza en la **Figura 2**.

El origen embrionario de las neuronas de Retzius se ha trazado a etapas tempranas del desarrollo (Weisblat, 1981; Stuart et al., 1987) y el patrón morfológico de las neuronas de Retzius es modulado por interacciones embrionarias entre ellas (Todd et al., 2010) y con sus blancos (Jellies et al., 1987; Loer et al., 1987). Sin embargo, las neuronas de Retzius antes de nacer ya han formado sus conocidas sinapsis químicas y eléctricas (Reese and Drapeau, 1988; Todd et al., 2010; Baker

and Macagno, 2014), y al tiempo de nacer su patrón de arborización ya es notablemente similar al del sistema nervioso adulto (Jellies et al., 1987).

Tomando como base el amplio conocimiento que se tiene acerca del sistema formado por las neuronas de Retzius y a sus propiedades biofísicas en estado adulto estudiadas en nuestro laboratorio (García et al., 2004), medimos las diferentes variables contribuyendo a la integración sináptica de neuronas de Retzius con rangos somáticos de 21 a 75 μm , para poder determinar cuál o cuales de ellas eran responsables de regular la integración neuronal durante el crecimiento.

II. EL CONCEPTO DE INTEGRACIÓN SINÁPTICA

Para entender este concepto, es necesario comprender como se propagan pasivamente las corrientes a lo largo de una fibra nerviosa. Es indispensable mencionar que a medida que una corriente se propaga a lo largo de un axón nervioso o dendrita, se atenúa con la distancia, debido a las propiedades eléctricas de la membrana, es decir: su resistencia y su capacitancia, (Hermann 1905. Hodgkin and Rushton., 1946., Rall, 1959).

Por otro lado, Hodgkin y Rushton en 1946 estudiaron la propagación de corriente sub-umbral en el axón de la pierna caminadora de la langosta *Homus vulgaris* y establecieron la formulación matemática que permite calcular las constantes de tiempo y espacio de las fibras axonales.

Dicha teoría se denomina “de Cable” o electrotónica, y predice que en la propagación pasiva de potenciales en fibras nerviosas intervienen los parámetros eléctricos de las neuronas (resistencia y capacitancia de la membrana, y resistencia interna de la fibra) cuyos valores determinan las constantes de tiempo y de espacio de las células.

Esta teoría fue ampliada más adelante por Rall (1959), al incluir la geometría de motoneuronas de humano y de gato como son su diámetro, longitud y espesor. Rall propuso ecuaciones en las que tomó en cuenta al soma y la arborización dendrítica.

Para contestar la pregunta de nuestro proyecto, utilizamos pares de células de Retzius de sanguijuela *Haementeria officinalis*.

Algunas ventajas de utilizar este tipo de neuronas son su gran tamaño y ubicación al centro del ganglio, lo cual permite su fácil identificación (Figura 3B) y, la inserción de electrodos intracelulares para realizar estudios electrofisiológicos y morfológicos. Además se cuenta con un amplio conocimiento acerca de sus conexiones sinápticas y su función en el animal.

III.FISIOLOGÍA DE LA SANGUIJUELA

La sanguijuela es un anélido segmentado (Figura 1, 3A). Virtualmente todas las sanguijuelas despliegan movimientos de búsqueda o exploración. Tales movimientos incrementan la entrada de información sensorial concerniente al ambiente, así como de fuentes locales de perturbación. El comportamiento exploratorio se expresa en respuesta a una variedad de estímulos, especialmente perturbación acuática e intensidad de luz (Sawyer, R.T, 1970).

El sistema nervioso de la sanguijuela está formado por una cadena de 21 ganglios que corre a lo largo del animal (Payton,1981), cada ganglio de la especie *Haementeria Officinalis* (Figura 3A) contiene aproximadamente 325 neuronas (Izquierdo E y De- Miguel FF, sin publicar), con las que lleva a cabo un limitado repertorio de comportamientos estereotipados como son el nado (Willard.,1981), la alimentación (Lent et al.,1984), el acortamiento (Sahley,1995), la secreción de moco (Lent,1973), el aprendizaje (Burrell et al., 2002) o el reflejo de escape.

El principal modulador de dichas conductas es la serotonina (Willard., 1981) que a la vez actúa como neuro-hormona al ser liberada masivamente del cuerpo neuronal (Trueta et al., 2003). Además, las conductas antes mencionadas están presentes desde el nacimiento (Jellies et al., 1987), lo cual nos hizo pensar que para nuestro estudio posiblemente la integración sináptica sería constante a lo largo del crecimiento de los circuitos.

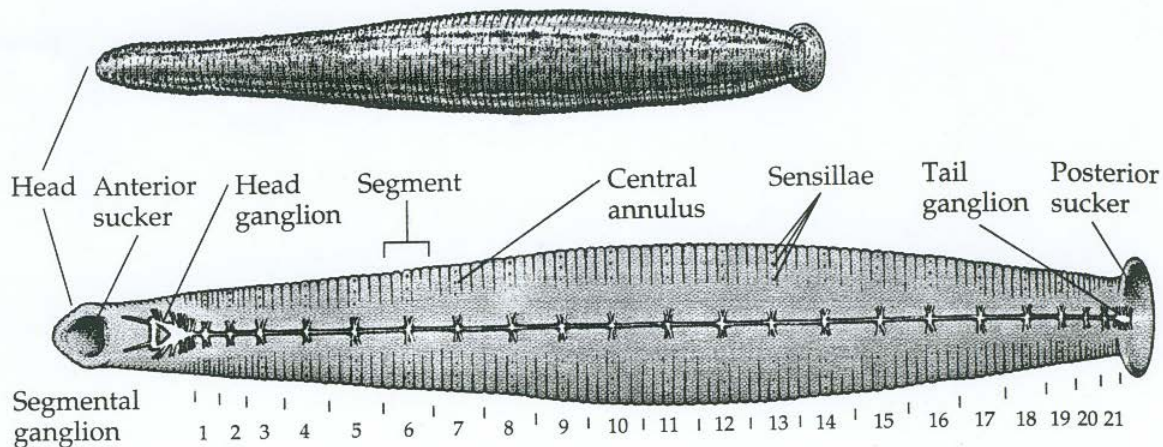


Figura 1. El sistema nervioso central de la sanguijuela consiste de una cadena de 21 ganglios segmentales, una cabeza ganglionar y una cola ganglionar. (Tomado de Nicholls et al., 2003)

IV. FISIOLÓGÍA DE LAS CÉLULAS DE RETZIUS

Hay un par de neuronas de Retzius en cada ganglio (Figura 3B). Éstas se encuentran acopladas entre sí por medio de una sinapsis eléctrica no rectificante (Hagiwara y Morita., 1962; Eckert, 1963; De-Miguel et al., 2001) que permite la comunicación bidireccional entre ellas.

Las dendritas acopladas de cada neurona reciben una entrada química común que produce potenciales sinápticos excitadores (EPSPs) continuos y sincronos en ambas neuronas, aunque con amplitudes que varían al azar (sugiriendo cantidades diferentes de serotonina siendo liberada). Cada EPSP se propaga al soma de ambas neuronas. La amplitud de los EPSPs en la neurona que los produjo es inversamente proporcional al valor de la resistencia de acoplamiento de las dendritas. Este efecto se debe a que la cantidad de corriente sináptica que se fuga a través de la sinapsis eléctrica es proporcional a la tasa de acoplamiento e inversamente proporcional a la resistencia de acoplamiento (García-Pérez et al., 2004; Vázquez et al., 2009).

El acoplamiento eléctrico de las neuronas de Retzius es similar de un ganglio a otro en un mismo animal pero varía de una sanguijuela a otra, debido presumiblemente a modulación intrínseca en cada animal (De-Miguel et al., 2001).

Se han estudiado las características electrofisiológicas pasivas y activas de las conexiones sinápticas de neuronas Retzius adultas en el ganglio y en cultivo con

gran detalle (Stewart, 1978; Nicholls et al., 1990; Kleinhaus et al., 1995; García-Pérez et al., 2004; Vázquez et al., 2009).

Las neuronas Retzius junto con otras neuronas serotoninérgicas (neuronas no acopladas) en el ganglio también reciben conexiones sinápticas excitadoras de cada neurona mecanosensorial susceptible al tacto (células T), la presión (células P) o a estímulos nocivos (células N) (Velázquez- Ulloa et al., 2003).

Al incrementarse la frecuencia de disparo de las células de Retzius, fenómeno que se observó y analizó en nuestro laboratorio, la serotonina se libera masivamente del soma (Trueta et al., 2003), de tal manera que las células de Retzius, son interneuronas que además funcionan como neuro-hormonas.

La estimulación eléctrica de las neuronas de Retzius incrementa los niveles de serotonina circulante en el ganglio y además modula el acortamiento local (Lockery et al., 1990) y la alimentación (Lent et al., 1984). Además, se ha trazado el origen embrionario de las células de Retzius en las etapas tempranas del desarrollo (Weisblat, 1981), observándose que durante este periodo su patrón morfológico es modulado por interacciones con su blancos (Jellies et al., 1987) y que las células Retzius forman terminaciones pre-sinápticas sobre neuronas sensibles a la presión (Reese and Drapeau, 1988).

Al momento de nacer, el patrón de arborización de las neuronas de Retzius es notablemente similar la del estado adulto (Jellies et al., 1987). En la **Figura 3A** se muestran sanguijuelas *Hamenteria officinalis*, así como ganglios de los diferentes tamaños analizados en el presente estudio.

El circuito eléctrico formado por las neuronas Retzius ha sido bien caracterizado y puede describirse por dos circuitos RC representando las membranas somáticas de ambas células. Cada soma está unido al axón, y del axón surgen dos cables que describen las dendritas acopladas de ambas neuronas. El acoplamiento ocurre mediante un resistor (r_c) que corresponde a la sinapsis eléctrica (García et al., 2004). Contamos con los valores característicos de los parámetros pasivos en estado adulto, obtenidos a partir de datos experimentales en combinación con un modelo matemático (García et al., 2004). Ésto nos permitió extender el estudio a la integración en el circuito formado por pares de neuronas de diferentes tamaños, que reciben una entrada sináptica común (**Figura 2**).

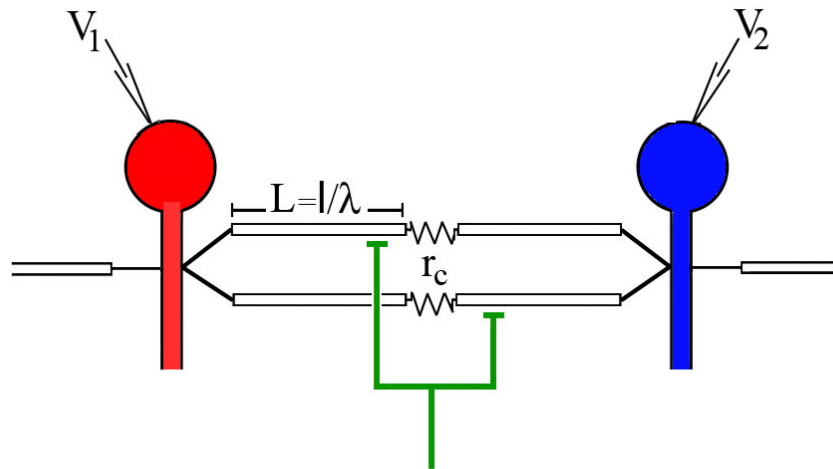
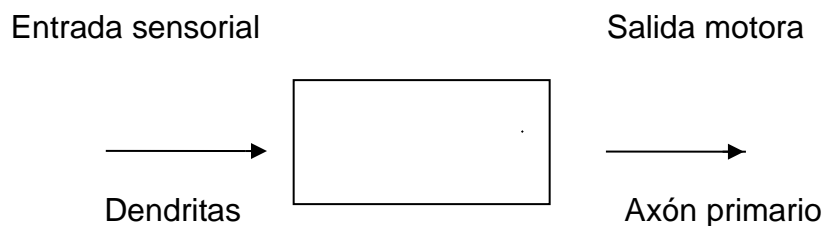


Figura2. Representación esquemática de las neuronas de Retzius acopladas eléctricamente y su entrada sináptica química común (Aún sin identificar). La neurona manejadora se muestra en color rojo, en la cual se hizo la inyección de corriente. La neurona seguidora se representa en color azul. Las respuestas de voltaje debidas a la inyección de corriente se registraron en ambas neuronas por medio de un microelectrodo insertado en cada soma. El electrodo para el registro de voltaje en la neurona manejadora es V_1 y el electrodo de registro de voltaje de la neurona seguidora es V_2 . Las dendritas se indican como los cilindros blancos de longitud $L = l / \lambda$. Las sinapsis eléctricas que acoplan las dendritas de ambas neuronas se indican como una resistencia de acoplamiento (r_c). La interneurona (dibujada en color verde) está conectada químicamente a las dendritas acopladas de ambas neuronas de Retzius y produce los EPSPs síncronos que se propagan a ambos somas. Las dendritas no acopladas se indican como cilindros abiertos.

V. INTEGRACIÓN SINÁPTICA (TEORÍA DE SISTEMAS)

La integración sináptica es el procesamiento ordenado de entradas para producir una salida (Cooke I, Lipkin M., 1972).

De manera esquemática, la integración sináptica puede describirse en términos de la teoría de sistemas, como un sistema lineal o una caja negra donde:



La teoría de sistemas lineales, particularmente el análisis de circuitos eléctricos aplicada a la integración neuronal permite conocer la relación entrada – salida de un circuito al estimular con una señal de corriente con distintos valores de frecuencia, o ruido (Wright et al., 1996) mediante pulsos de corriente que producen respuestas que llegan a un estado estacionario.

En neuronas acopladas eléctricamente **la tasa de acoplamiento es la función de transferencia del sistema, refleja la eficiencia con la que las señales se propagan entre ambas células en los rangos de frecuencia específicos para cada protocolo.**

Al obtener la tasa de acoplamiento usando el análisis de ruido, aplicando análisis de Fourier al circuito eléctrico, se determina la relación entrada / salida en función de la respuesta en frecuencia del sistema.

Al mantener libres algunos parámetros de la función y alimentarlos con otros obtenidos de manera experimental como la constante de tiempo y la tasa de acoplamiento estable, es posible determinar parámetros cuyos valores son relevantes para entender la integración (ver la parte concerniente al modelado matemático), con la gran ventaja de que podemos determinar valores difíciles de medir como son la resistencia de acoplamiento de las células (r_c) y la constante de espacio (λ) y por consiguiente la longitud característica del sistema biológico formado por las neuronas de retzius en particular, pero que podrían aplicarse también a otros sistemas celulares.

VI. PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NEURONAS

Las propiedades pasivas de las células son un conjunto de características geométricas y eléctricas que tienen todas las neuronas que incluyen Los diámetros somáticos y dendríticos, la longitud de las fibras dendríticas, así como las resistencias y capacitancias de las membranas somáticas y dendríticas, comprendiendo también el tipo de arborización o terminación que no se estudiará aquí (FF De Miguel et al., 2001).

Las propiedades pasivas son de especial importancia para nuestro estudio debido a que determinan la forma y la propagación de los potenciales (EPSPs).

La propagación de los EPSPs a lo largo de las dendritas o cables se lleva a cabo de manera similar a la forma en cómo Fourier estudió la propagación de calor a través de un cable, por lo cual este tipo de Análisis matemático es aplicable a la propagación de potenciales sinápticos a través de fibras dendríticas (Nicholls., 2001, FF De Miguel et al., 2001).

Al aplicar una magnitud de corriente en un punto determinado de una fibra nerviosa (axón o dendrita) o cable, se producen señales de voltaje que se propagan de forma longitudinal en el tiempo y el espacio dependiendo de su diámetro, las resistencias y la capacitancia que en conjunto determinan las constantes de tiempo y de espacio de la fibra y que se denominan también propiedades electrotonicas de las células.

VI.1.CONSTANTE DE ESPACIO DE LA FIBRA

Es la distancia a la cual el voltaje estacionario cae al 37% de su valor en el origen. La constante de espacio puede obtenerse por medio de la expresión:

$$\lambda = (r_m / r_i)^{1/2}$$

donde:

r_m = resistencia de la membrana [Ω .cm]

r_i = resistencia del axoplasma interna, resistencia axial [Ω /cm]

VI.2. CONSTANTE DE TIEMPO

Es el tiempo al cual el potencial cae al 63% de su valor inicial. Se calcula por medio de la expresión:

$$\tau = r_m C_m \text{ [ms]}$$

donde:

τ = constante de tiempo de la membrana [ms]

r_m = resistencia de la membrana [Ω .cm]

c_m = capacitancia de la membrana [nF]

VI.3. LONGITUD CARACTERÍSTICA

Permite medir la eficiencia sináptica y es de particular utilidad debido a que se encuentra normalizada a la longitud dendrítica.

$$L = l / \lambda$$

Donde:

L= Longitud característica [adimensional]

l= Longitud dendrítica o axonal [cm], [μm]

λ = Constante de espacio de la fibra [cm], [μm].

VII. HIPÓTESIS INICIALES

Las sanguijuelas al nacer son organismos completamente autónomos en los que sus circuitos, a pesar de no haber alcanzado las proporciones del adulto, son completamente funcionales, en lo que respecta al nado, la alimentación, el reflejo de escape, lo cual nos sugirió que sus capacidades integrativas estaban completamente desarrolladas al nacer, conduciendo a que:

1.- La integración sináptica se mantendría constante durante el crecimiento, de la misma manera que en neuronas adultas.

Por otro lado, la primera aproximación más simple fue considerar las propiedades pasivas que involucraban los tamaños del soma neuronal, por lo que:

2.- El diámetro de una neurona pequeña tendría una constante de tiempo pequeña, mientras que una neurona adulta tendría una tau grande(Liu et al., .)

- 3.-Suponiendo que la segunda hipótesis fuera cierta, y suponiendo que la c_m permaneciera constante, la resistencia de la membrana somática de las neuronas pequeñas sería mayor que la de las adultas.
- 4.-Supusimos que existiría una tendencia generalizada de alguna o algunas de las propiedades pasivas que se expresara como una ley general aplicable a neuronas de Retzius durante el crecimiento.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1. MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE RETZIUS

Disecamos ganglios provenientes del cordón nervioso de animales de entre 1.5 y 8 cm de longitud. Sujetamos los ganglios con las pinzas y los fijamos con pines metálicos a la base de silicón sylgard de platos de plástico preparados para tal fin, manteniendo a los ganglios dentro de solución Ringer normal (115mM NaCl, 4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 11mM glucosa, 10mM trismaleato, amortiguado a un pH de 7.5); posteriormente procedimos a descapsular los ganglios, es decir, a retirar la película transparente que los rodea, con la finalidad de poder introducirles electrodos de registro intracelular.

Mediante una cámara digital motic adaptada al microscopio de disección tomé imágenes de los ganglios como los mostrados en la (Figura 3B). Éstas se almacenaron en una computadora y posteriormente medí los ejes mayor y menor de las células Retzius por medio del programa de software Motic Images Plus 2.0 (China) y debido a que una gran mayoría de las células tenía forma elíptica, utilizamos la relación:

$$(A = \pi a.b)$$

correspondiente al área de una elipse (A), donde a, b son los ejes mayor y menor de la célula.

Para determinar el diámetro considerando una geometría somática neuronal esférica (García et al., 2004), utilizamos la relación:

A) $d = (A / \pi)^{1/2}$

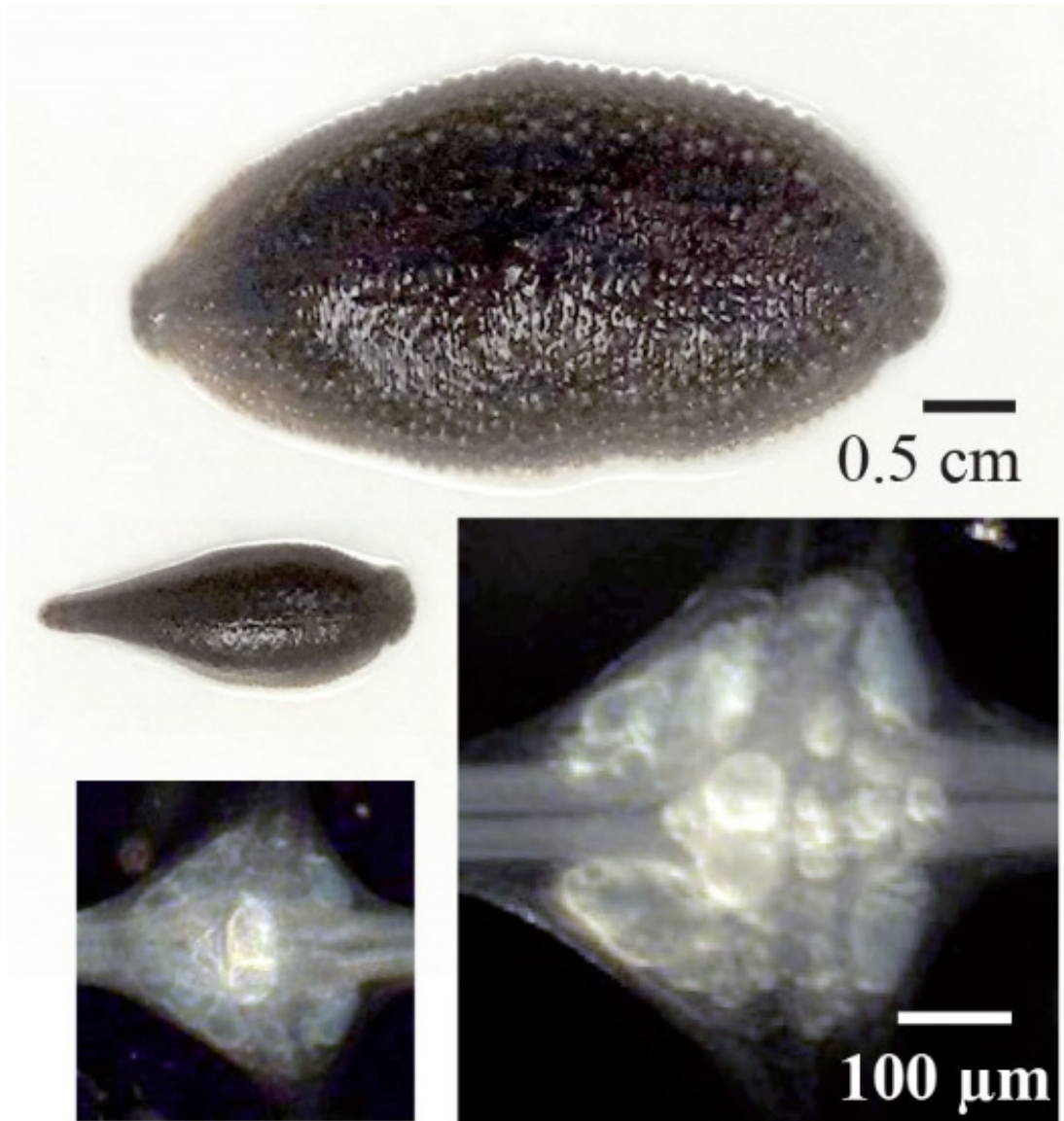


Figura 3. Diferentes tamaños de sanguijuelas, sus ganglios y las neuronas de Retzius. Arriba se muestran ejemplos de sanguijuelas *Haementeria officinalis* pequeñas y adultas, de los tamaños extremos utilizados en este estudio. Sus ganglios centrales se muestran abajo. Los somas de las neuronas de Retzius en cada ganglio son las más grandes y brillantes al centro de cada ganglio. Las imágenes de los ganglios se tomaron utilizando un condensador de campo oscuro. La misma barra de escala es útil para ambas sanguijuelas o para ambos ganglios.

Por otra parte, Basados en el mismo estudio previo, calculamos la longitud de las dendritas acopladas (l) de cada neurona suponiendo crecimiento isométrico con una proporción de 0.83 veces el diámetro somático ($l_{\text{dend}} = 0.83$ (diámetro somático)).

VIII.2. ELECTROFISIOLOGÍA

Para llevar a cabo estos estudios, utilizamos una de las células como comando (**Figura 2**), en la cual se inyectaron dos tipos de corrientes de estimulación:

- a) Pulsos cuadrados de corriente
- b) Corrientes de ruido (corrientes con distintos contenidos de amplitud y frecuencia)

Pudiendo medir voltajes de respuesta tanto en la neurona comando (V_1) como en la neurona seguidora (V_2).

A la relación entrada-salida (V_2 / V_1) la denominamos tasa de acoplamiento (**Figura 2, p 18**), obteniéndola tanto para estado estable como para análisis de ruido.

Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo usando electrodos intracelulares de vidrio de borosilicato con valores de resistencia en el rango de 16 a 24 M Ω usando un estirador de pipetas (puller) Sutter 95 (Novato, CA). Rellenamos los electrodos con 3M KCl e insertamos uno dentro de cada neurona. Para el registro intracelular utilizamos un amplificador axoclamp en modalidad de fijación de corriente en modo discontinuo a una frecuencia de 900 Hz para la célula comando y en seguidor de voltaje para la neurona seguidora. Los datos se almacenaron en una PC usando el programa AXOCLAMP.

Para conocer la dependencia de la frecuencia de la tasa de acoplamiento y calcular la constante de tiempo de las neuronas, la resistencia de su membrana y la resistencia de acoplamiento, hicimos inyecciones de corrientes de ruido. Para ello diseñé y construí con algunos colaboradores, un generador de ruido con base en un procesador digital de señales (DSPC50) de Texas Instruments, en el que programamos en lenguaje ensamblador, una secuencia generadora de números pseudoaleatorios con frecuencias de 0.1 a 100 Hz, basada en el algoritmo matemático de Lehmer. Enviamos dichas señales de ruido con amplitudes de -10 a 10 nA al amplificador de registro intracelular o setup, obteniendo señales como las presentadas en la (**Figura 5, p26**). En el diseño y fabricación de dicho instrumento participamos las siguientes personas: Adriana de la Rosa Tovar y dos estudiantes

de servicio social de la Facultad de Ingeniería de la UNAM: Clara Susana Yañez Martínez y Mónica Meztli Oropeza Cruz, con ayuda del Ing. Bruno Méndez Ambrosio, técnico académico del laboratorio.

VIII.3. CÁLCULO DE LAS RESPUESTAS PASIVAS

Una vez que contamos con el valor del diámetro celular, Inyectamos 16 escalones de corriente de forma gradual hasta llegar a -2 nA de amplitud con duraciones de 200 ms en la neurona comando y registramos las respuestas de voltaje en ella (V_1) y en la neurona seguidora (V_2).

La constante de tiempo de la membrana somática se midió a partir de un ajuste exponencial sencillo de la descarga de la membrana pasiva al final de los pulsos cuadrados negativos de corriente (Figura 4).

Es conveniente destacar el hecho de que aun cuando esas descargas contienen información de las propiedades membranales del árbol dendrítico, expresado como una serie combinada de exponenciales (Rall, 1969), el gran soma de las neuronas Retzius, que se encuentra conectado isopotencialmente con el axón es dos órdenes de magnitud mayor que las delgadas dendritas (1 μm de diámetro). Por lo tanto, el compartimiento soma axón domina la carga y descarga de la membrana en el sitio de registro (García-Pérez et al., 2004; Vázquez et al., 2009). En el modelo el soma se encuentra conectado isopotencialmente al axón y ambos se representan como un circuito paralelo formado de una resistencia de la membrana y un capacitor.

Por otro lado, considerando $C_m = 1\mu\text{F} / \text{cm}^2$, así como la relación $\tau = R_m C_m$, obtuvimos los valores de c_m y r_m en cada neurona de estudio. Cabe mencionar que los registros simultáneos de ambas neuronas requerían una duración de al menos 20 minutos bajo condiciones óptimas, durante las cuales repetimos tres veces una adquisición de cinco minutos de EPSPs que aparecían simultáneamente.

Este protocolo nos permitió además, medir la resistencia de entrada de las células y la tasa de acoplamiento estacionaria o de estado estable para cada experimento, además de la ya mencionada constante de tiempo de la membrana somática.

En la última parte de la secuencia aplicamos corrientes de ruido con una duración de 60 s para determinar las respuestas de voltaje de cada par de neuronas.

El criterio de inclusión para el análisis de los datos fue la constante de tiempo de la membrana del soma, la resistencia de entrada de la neurona comando y el mantenimiento del tiempo al pico y la amplitud de los EPSPs.

Este análisis nos sirvió además, para conocer sus distribuciones de amplitudes y de tiempos al pico, medir la frecuencia de los potenciales de acción e investigar los mecanismos subyacentes a la integración sináptica, que se encuentra en la última parte de la descripción de los experimentos.

VIII.4. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS BIOFÍSICOS

La lista de los parámetros estimados en este estudio se presenta en la [Tabla 1](#).

TABLA 1

PARAMETROS		UNIDADES
C_m	Capacitancia específica de la membrana	$\mu\text{F} / \text{cm}^2$
$C_m \text{ soma}$	Capacitancia de la membrana somática	μF
λ	Constante de espacio	μm
L	Longitud característica	$(1/\lambda)$
l	Longitud dendrítica	μm
r_c	Resistencia de acoplamiento	$\text{M}\Omega$
r_{dend}	Resistencia de la membrana dendrítica	$\text{M}\Omega.\text{cm}$
r_m	Resistencia de la membrana somática	$\text{M}\Omega.\text{cm}$
τ	Constante de tiempo de la membrana	ms

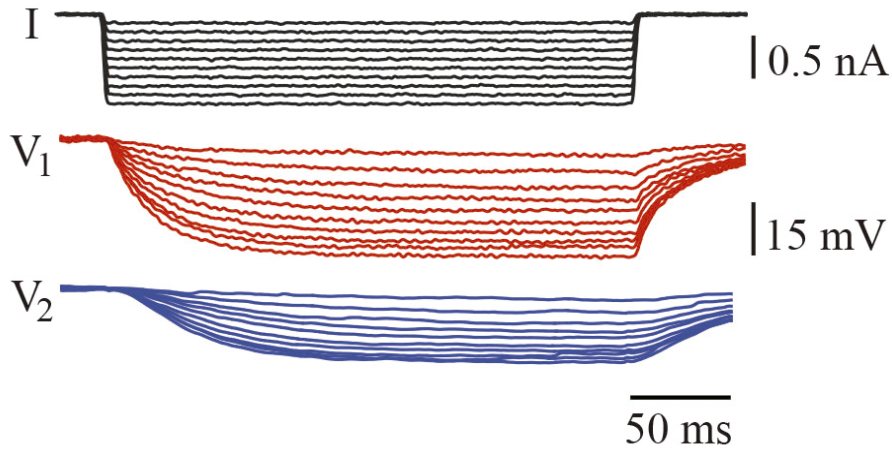


Figura 4. Protocolo electrofisiológico de estado estable. Inyectamos 16 pulsos de corriente cuadrada hiperpolarizante en la neurona comando y medimos respuestas de voltaje tanto en la neurona comando (V_1) como en la neurona seguidora (V_2).

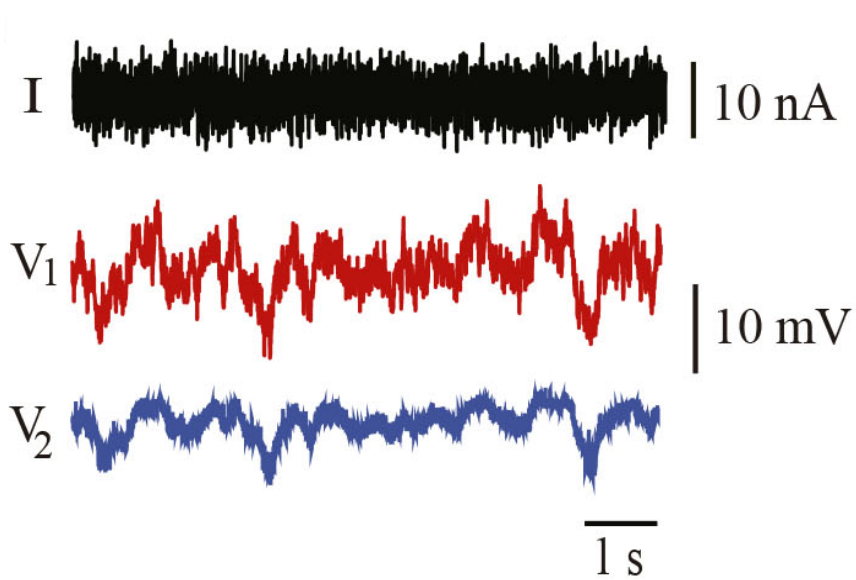


FIGURA 5. Protocolo de corrientes de ruido. Inyectamos corrientes de ruido de distintas amplitudes y frecuencias hasta de -10nA en la neurona comando y medimos voltajes producidos en respuesta a estas corrientes tanto en la neurona comando (V_1) como en la neurona seguidora (V_2), obteniendo registros en ambas neuronas como se muestra en la figura.

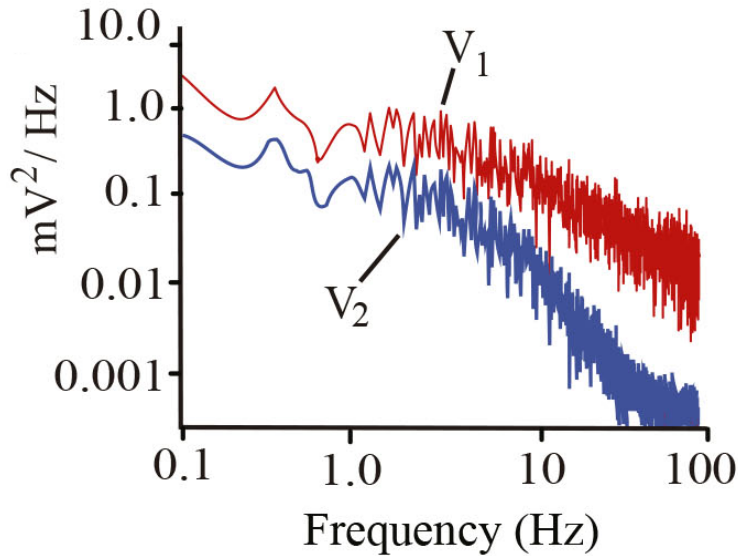


FIGURA 6. Obtención de espectros de Potencia de las dos señales medidas en el protocolo de ruido. Por medio del programa clampfit, determinamos el espectro en potencia de ambas señales y determinamos el cociente V_2 / V_1 , conocido como tasa de acoplamiento o función de transferencia de nuestro sistema biológico formado por las neuronas de Retzius.

Las tasas de acoplamiento obtenidas de esa manera (Figuras 4 y 6) permitieron ajustar los parámetros libres del programa pudiendo determinar los parámetros pasivos responsables de modular la respuesta pasiva de las neuronas de Retzius durante el crecimiento.

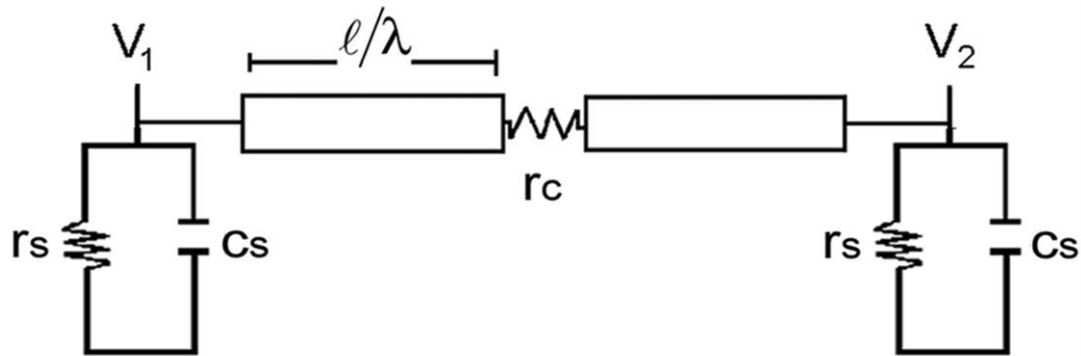
Por otro lado, los valores de la constante de espacio dendrítica (λ), la constante de tiempo somática (τ) y la resistencia de acoplamiento (r_c) se obtuvieron ajustando las respuestas en frecuencia de las neuronas al modelo matemático de neuronas de Retzius acopladas eléctricamente basado en teoría de sistemas lineales (García-Pérez et al., 2004., Vázquez et al., 2009). En el modelo el soma se encuentra conectado isopotencialmente al axón y ambos se representan como un circuito paralelo formado de una resistencia de la membrana y un capacitor.

Las dendritas de cada neurona se representan por cilindros con una longitud de 0.83 veces el diámetro del soma (García-Pérez et al., 2004). Un extremo de las dendritas se comunica al compartimiento soma/axón y el otro lado se conecta a las dendritas de la neurona acoplada a través de un resistor representando a la sinapsis eléctrica.

Las tasas de acoplamiento obtenidas de esa manera permitieron ajustar los parámetros libres del programa pudiendo determinar los parámetros pasivos responsables de modular la respuesta pasiva de las neuronas de Retzius durante el crecimiento.

VIII.5 MODELADO MATEMÁTICO

El diagrama eléctrico que representa al sistema biológico formado por las dos neuronas de Retzius, sus troncos dendríticos y su sinapsis eléctrica (r_c) se muestra a continuación:



Como parte del trabajo experimental realizado en nuestro laboratorio en neuronas de Retzius adultas (García et al., 2004), contamos con un profundo conocimiento de este circuito. En dicho estudio, se calculó matemáticamente la función de transferencia o relación entrada salida del mismo (García et al., 2004), misma que se programó en matlab y permitió obtener modelados matemáticos (curvas predictivas) al variar cada uno de los parámetros involucrados en esta función matemática. Esta herramienta nos resultó de mucha utilidad ya que pudimos determinar variables difíciles de medir como la constante de espacio o la resistencia de acoplamiento entre las dos neuronas, pudiendo alimentar este modelo con las mediciones morfológicas y los estudios de estado estable.

IX.RESULTADOS

IX.1 ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LAS NEURONAS DE RETZIUS

La **Figura 3A** muestra sanguijuelas representativas de los tamaños extremos en nuestro estudio. También se muestran los ganglios aislados en la **Figura 3B**.

La actividad registrada en 9 pares de neuronas de Retzius con diámetros somáticos entre 21 y 75 μm en los cuales los registros se mantuvieron a lo largo del experimento fue similar a la ya descrita en neuronas adultas (Hagiwara and Morita, 1962; De-Miguel et al., 2001), consistentes en un potencial de reposo entre -55 y -60 mV, sobre el que aparecieron EPSPs espontáneos a frecuencias promedio relativamente fijas de un par neuronal a otro en el rango de 0.5 y 1.7 s^{-1} (**Figuras 5,7**), gráfica en la **Figura 12**.

Los EPSPs aparecieron simultáneos en ambos somas con amplitudes que variaron aleatoriamente (**Figura 7**), sugiriendo variaciones presinápticas en la liberación de transmisor (De-Miguel et al., 2001).

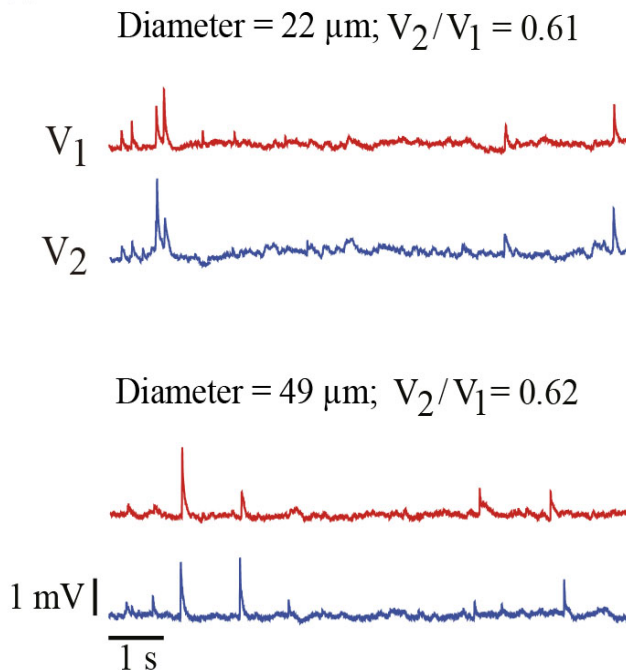


FIGURA 7 Actividad eléctrica espontánea de neuronas de Retzius. (A). Actividad sináptica espontánea registrada simultáneamente en un par de neuronas con diámetro somático de 22 μm y una tasa de acoplamiento de 0.61. El registro de la neurona manejadora (V_1) se muestra en el trazo rojo mientras que el registro de la neurona seguidora (V_2) se muestra en azul. (B) Se observan registros de voltaje similares en un par de neuronas de 49 micras y tasa de acoplamiento de 0.62. Las características de los EPSPs en términos de su amplitud y frecuencia son similares a los mostrados en (A). La escala es la misma para los trazos en (A, B). (C) Variaciones de amplitudes en pares subsecuentes de EPSPs producidos simultáneamente. Esas diferencias de amplitud sugieren distintas cantidades de transmisor liberadas de terminales presinápticas bajo impulsos subsecuentes, Las puntas de flechas indican la llegada de EPSPs de la neurona acoplada

bajo una falla local en la transmisión. Es importante notar que los EPSPs propagados son más pequeños y más lentos que los originados en la neurona de registro. Sus tiempo al pico más largos y sus amplitudes más pequeñas se deben a la propagación a lo largo de las dendritas desde el sitio de origen en la neurona acoplada y a través de la sinapsis eléctrica (De-Miguel et al., 2001). (D) Los EPSPs producidos en ambas neuronas se suman y contribuyen a la producción de potenciales de acción

Por otro lado, la distribución de los tiempos al pico de los EPSPs tuvo dos valores. Una población de EPSPs (59%) tuvo un tiempo al pico rápido en el rango de 3.63 ± 0.05 a 5.83 ± 0.09 ms (Figura 8A), indicando que éstos fueron producidos en la neurona comando. Una segunda población de EPSPs (41%) con tiempos al pico más lentos en el rango entre 7.33 ± 0.16 y 9.13 ± 0.3 ms (Figura 8B) llegó de las dendritas de la neurona acoplada a través de la sinapsis eléctrica, lo cual correlaciona con los experimentos realizados en nuestro laboratorio (De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al., 2004). Los rangos de esos valores de tiempos al pico que obtuvimos en nuestro estudio fueron similares a los descritos previamente en neuronas adultas (García-Pérez et al., 2004).

Con el objetivo de realizar una descripción más profunda acerca de estos resultados y de sus implicaciones en la integración sináptica durante el crecimiento, ahondaré con mayor detalle en la parte concerniente a la investigación de los mecanismos presinápticos subyacentes a la integración, y al análisis de la fuerza sináptica en la parte final del análisis de los resultados.

Por ahora, continuaré con los resultados obtenidos de las propiedades pasivas y su relación con el diámetro.

IX.2. ESTIMACIONES DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS PASIVAS

Una vez que calculamos los diámetros neuronales promedio de las células que estudiamos, y considerando el valor estándar de la capacitancia específica de la membrana como $C_m = 1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$ pudimos determinar la capacitancia somática (cática (C_m)) y una vez que obtuvimos la constante de tiempo estacionaria a partir de la caída exponencial de cambios de voltaje estacionarios debidos a la inyección de pulsos de corriente cuadrados (Figura 4), y haciendo uso de la expresión: $\tau = r_m C_m$ [ms] obtuve el valor de la resistencia de la membrana del soma. Para obtener la longitud de las dendritas, utilizamos la expresión: $l_{\text{dend}} = 0.83 \text{Diam somático}$ mencionada líneas arriba. Para calcular el valor de la resistencia de la membrana dendrítica contamos con la expresión $\lambda = (r_m / r_i)^{1/2}$, para lo cual era necesario primeramente obtener el valor de lambda, y como es un parámetro que no se puede

determinar fácilmente, fue necesario obtenerlo de manera indirecta por medio del modelado matemático.

Además pudimos determinar la tasa de acoplamiento estacionaria al dividir directamente V_2/V_1 a partir de los mismos trazos. Las tasas de acoplamiento en el rango de 0.41-0.64 (Figura 8) obtenidos de respuestas estacionarias correlacionaron linealmente ($R= 0.96$) con las obtenidas a partir de análisis de ruido pero no correlacionaron con el diámetro del soma. Por ejemplo, las neuronas más pequeñas, cuyos diámetros somáticos de 21 y 22 μm , tuvieron tasas de acoplamiento de 0.42 y 0.64 respectivamente. Más aún, las neuronas con diámetros de 36 μm tuvieron la tasa de acoplamiento mayor de 0.64, y las neuronas mayores, con un diámetro de 58 μm tuvieron una tasa de acoplamiento intermedio de 0.53, como puede apreciarse en la (Figura 8)

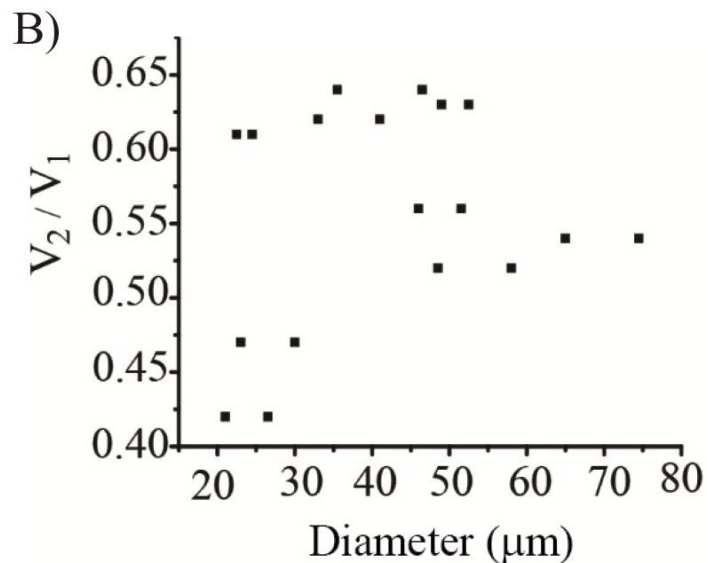


Figura8. La tasa de acoplamiento varió independientemente del diámetro neuronal. Respuestas de estado estable producidas por escalones hiperpolarizantes de corriente inyectados en la neurona seguidora(A). El voltaje se registró simultáneamente a partir de la neurona manejadora (V_1) y de la seguidora (V_2). (B) la tasa de acoplamiento fue independiente del diámetro del soma. Note que el rango de tasas de acoplamiento en las neuronas pequeñas es mayor que en las adultas.

Ahora bien, para obtener la tasa de los parámetros biofísicos τ_c , tau, L y lambda fue necesario efectuar la superposición de las respuestas neuronales junto con las curvas resultantes del modelado matemático (Figura 9C,D) variando un solo parámetro a la vez y obteniendo los mejores ajustes de los puntos experimentales a las curvas de modelado obtenidas con el programa matlab.

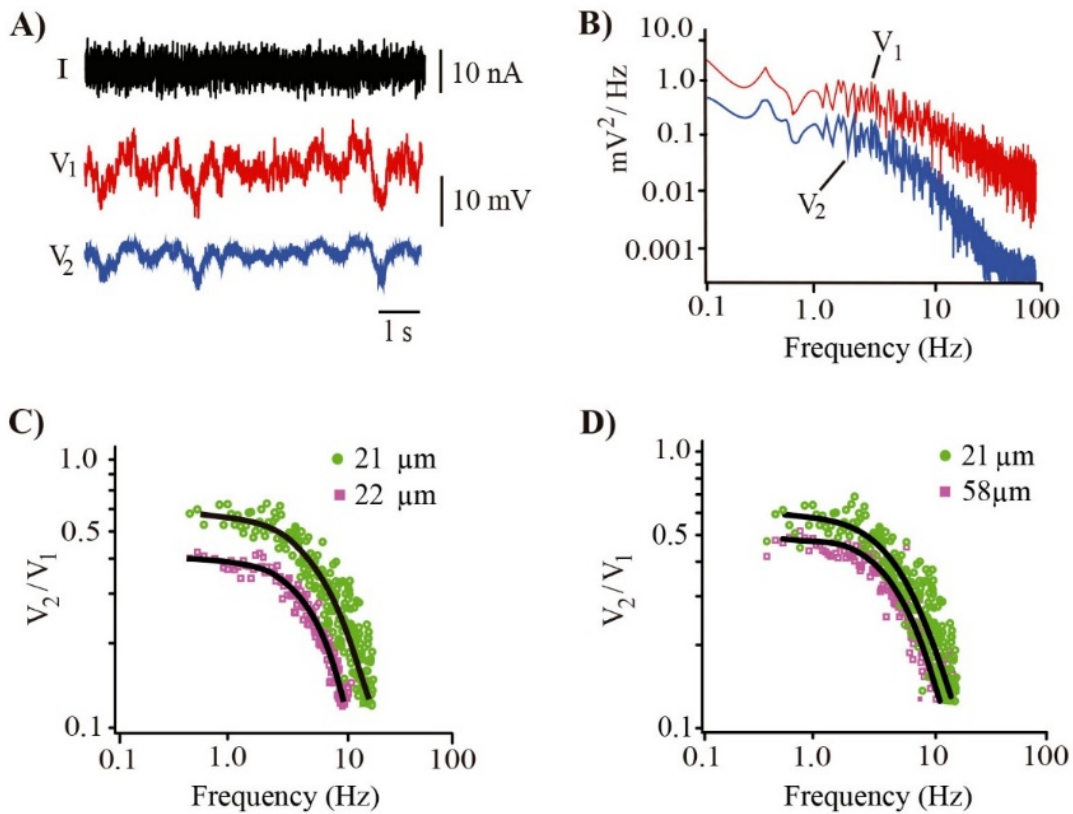


Figura9. Estimaciones de los parámetros biofísicos contribuyendo a la integración .En A) se muestra el protocolo electrofisiológico de ruido aplicado a nueve pares neuronales V_1 (rojo) y V_2 (negro) (B) Espectros en potencia de las señales V_1 (rojo) y V_2 (azul) . En (C) se muestran los espectros en potencia de dos pares neuronales con diámetros celulares de 21 y 22 micras morado (0.42) y verde (0.6) y los resultados del modelado como curvas negras y continuas superpuestas a dichos puntos. En (D) se muestran neuronas de diferentes tamaños (21 y 58 micras).

Una vez que obtuve los valores de λ por medio del modelado, recurrí a la expresión matemática: $\lambda = (r_m / r_i)^{1/2}$, donde $r_i = 85 \text{ [k}\Omega / \text{cm]}$ para determinar los valores de la resistencia de la membrana dendrítica ($r_{m \text{ dend}}$). Y por último, emplee la expresión $L = l / \lambda$ para determinar el valor de la longitud electrotonica.

Por último, ya que obtuve todos los parámetros biofísicos que involucran al sistema biológico de las neuronas de Retzius, procedí a dibujarlos mediante el programa Origin. A continuación se muestran los resultados obtenidos en la **Figura 10**.

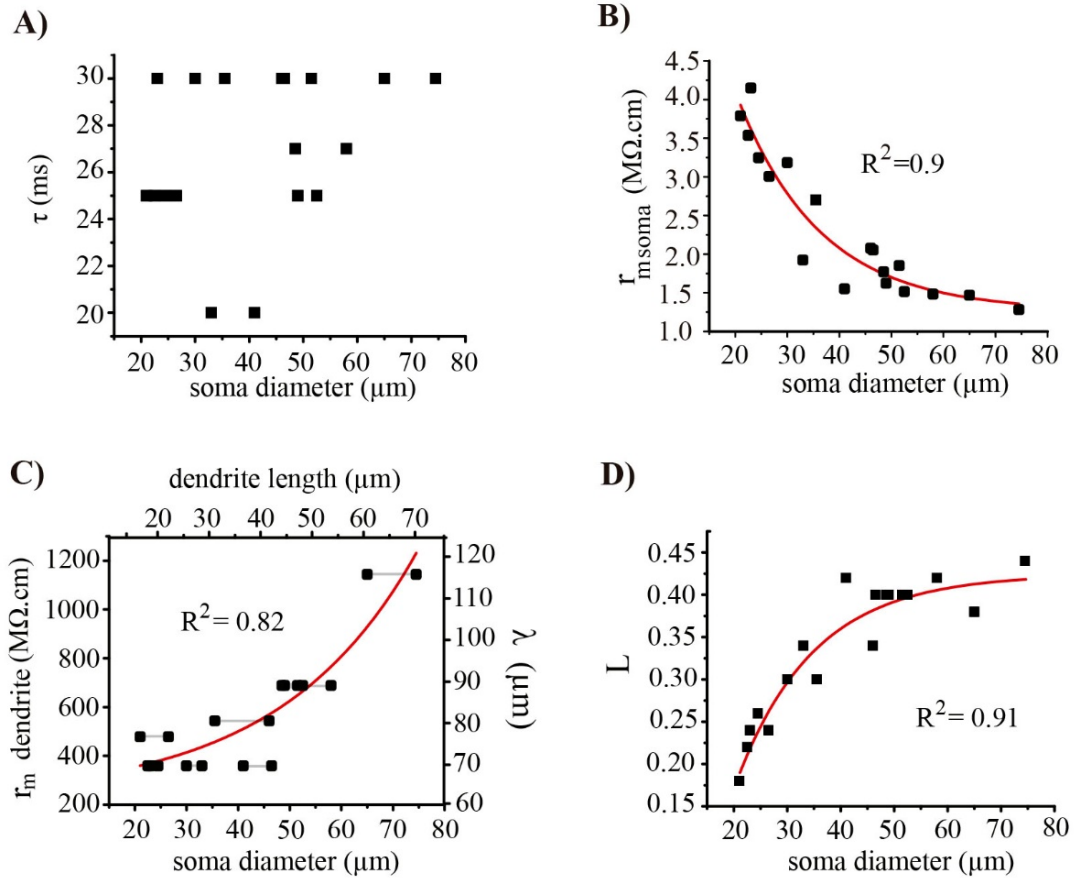


Figura10 Parámetros eléctricos del soma y las dendritas que contribuyen a la integración sináptica. A) La constante de tiempo somática de las neuronas con diferentes diámetros somáticos se restringió al rango 20-30ms. (B) La resistencia de la membrana del soma decreció exponencialmente al incrementarse el diámetro somático. (C) La resistencia de la membrana de las dendritas (r_m) y sus valores de λ se incrementaron al aumentar el diámetro somático y al incrementarse la longitud dendrítica. La longitud dendrítica se calculó considerando crecimiento isométrico de la dendrita y el soma. Las líneas negras horizontales indican neuronas formando un par. (D) El valor L (l/λ) incrementó exponencialmente al incrementarse el diámetro. Los valores de correlación (R^2) de los ajustes a las curvas se indican para cada caso.

Encontramos que los valores de las constantes de tiempo medidas a partir de caídas de voltaje exponencial oscilaron entre 20 y 30 ms para el rango completo de diámetros somáticos (Figura 10A). Este rango correlacionó con el de 18-40 ms reportado con anterioridad en el trabajo del laboratorio en neuronas adultas (García-Pérez et al., 2004). Como era de esperarse, los valores de la capacitancia de la membrana (c_m) del compartimiento soma-axón, se incrementaron linealmente ($R=0.99$) con el diámetro somático, de 6.6 pF cuando el diámetro era de 21 μm hasta 23.4 pF cuando el diámetro somático era de 75 μm . En contraste, la resistencia de la membrana somática (r_m) decreció exponencialmente ($R^2 = 0.9$) de 3.4 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 1.4 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ cuando el diámetro somático fue 74 μm (Figura 10 B).

El parámetro que compensó la propagación de los EPSPs fue la resistencia de la membrana de las dendritas, que se comportó de manera opuesta a la del soma, mostrando un incremento exponencial ($R^2 = 0.82$) al incrementarse el diámetro somático (Figura 10C). Suponiendo un valor constante de $85 \text{ K}\Omega / \text{cm}$ para la resistencia interna (García-Pérez et al., 2004), el incremento exponencial en la resistencia de la membrana dendrítica incrementó la constante de espacio dendrítica (λ) de manera proporcional (figura 7D). Por esta razón, la longitud dendrítica efectiva $L = l / \lambda$ de las dendritas se incrementó exponencialmente ($R^2 = 0.91$) al incrementarse el diámetro somático (Figura 7E) para alcanzar una meseta cuando el diámetro somático se aproximó a $50 \mu\text{m}$.

IX.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SINÁPTICA ESPONTÁNEA

IX.3.1 MECANISMOS PRESINÁPTICOS SUBYASCENTES A LA INTEGRACIÓN SINÁPTICA DURANTE EL CRECIMIENTO

Una cuestión que nos interesaba conocer era la actividad sináptica espontánea de las neuronas durante el crecimiento, entre otras cosas, para saber si existía algún mecanismo sináptico que tuviera que ver con la probabilidad de liberación de neurotransmisor en la neurona manejadora y estudiar sus efectos en la neurona seguidora en caso de que la amplitud de los EPSPs sinápticos fuera diferente a la ya estudiada en el laboratorio en neuronas de Retzius en estado adulto, y por otro lado, para saber comparar la fuerza sináptica de las neuronas durante el crecimiento con respecto de la adultas. Para contestar ambas preguntas, Prashant Kumar Mishra llevó a cabo mediciones de amplitudes y tiempos al pico de los sinápticos y yo me dí a la tarea de llevar a cabo un análisis poblacional de ambos parámetros, obteniendo ajustes gaussianos con valores de correlación ($R^2=0.9$). Ver Figura 11, obteniendo sorpresivamente, una tendencia similar a la obtenida en el estado adulto por García et al., 2004, lo cual arrojó como resultado que existían dos tipos de poblaciones: valores de amplitudes y tiempos al pico cortos debidos presumiblemente a la sinapsis química que dispara espontáneamente en ambas células, y otra población con tiempos al pico más largos y que correspondían a los EPSPs provenientes de la neurona propagada.

A continuación me permito mencionar dos ejemplos obtenidos de los 9 pares estudiados:

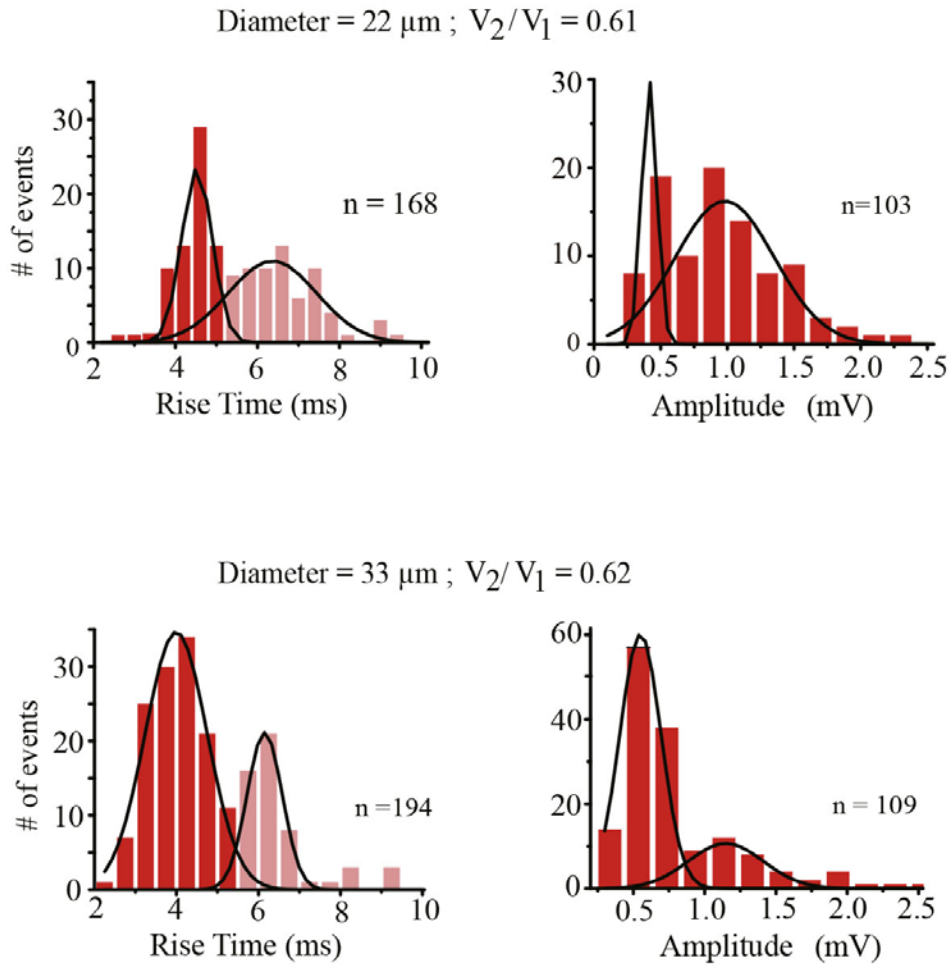


Figura 11 Características de los EPSPs. (A) Distribuciones del tiempo al pico (Izquierda) y Amplitudes de EPSPs registrados en la misma neurona con un diámetro de 22 μm y una tasa de acoplamiento de 0.61 mostrado en (A). El tiempo al pico de EPSPs indica su distancia de propagación del origen al soma. Los EPSPs con tiempos al pico más rápidos se produjeron en las dendritas acopladas de la neurona manejadora mientras que EPSPs con tiempos al pico más lentos (rojo pálido) se produjeron en las dendritas acopladas de la neurona seguidora después de propagarse a través de la sinapsis eléctrica (De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al., 2004). Los valores de “n” indican el número de eventos en las gráficas de distribución. Las distribuciones de amplitud se produjeron utilizando únicamente los EPSPs con tiempos al pico rápidos generados en las dendritas de la neurona manejadora. La distribución desplegó dos picos de amplitud, el segundo duplicando la amplitud del primero. (B) Tiempos al pico similares y distribuciones de amplitud se obtuvieron de un par neuronal con diámetro neuronal de 33 μm y una tasa de acoplamiento similar de 0.62. A pesar de las diferencias de tamaño de los pares neuronales. Los EPSPs llegando al soma de los pares neuronales con tasas de acoplamiento similares tuvieron amplitudes parecidas.

Retomando los resultados acerca del análisis de EPSP’s mencionado en la pag 31, en los nueve pares neuronales estudiados en el rango de tamaños de 21-70 micras, obtuvimos las siguientes clases de resultados:

Una población de amplitudes grandes y tiempos al pico cortos y otra segunda de menor amplitudes y con tiempos al pico mayores, por lo que al analizar los tiempos al pico, pudimos inferir que la primera población era de potenciales sincrónicos originados presumiblemente por la sinapsis química común a ambas neuronas, y la segunda más larga con origen en la neurona propagada.

De manera interesante pudimos observar que los valores de amplitudes no guardaron relación alguna con el tamaño sino con la tasa de acoplamiento de las neuronas y de manera particular con la resistencia de acoplamiento: A mayor tasa de acoplamiento, menor resistencia de acoplamiento y en consecuencia la amplitud de los EPSPs era más grande que cuando la tasa de acoplamiento entre las dos neuronas de Retzius era menor, su resistencia de acoplamiento mayor, y las amplitudes de los EPSPs eran mucho menores.

Analizamos los siguientes casos:

Caso 1: Una neurona pequeña cuyo diámetro somático fue de 22 μm y su tasa de acoplamiento de 0.61 tuvo un EPSPs con un tiempo al pico de 5.32 ± 0.01 ms y una distribución bimodal de amplitudes con un pico mayor de 0.45 ± 0.01 mV y un segundo pico a 1.1 ± 0.1 mV (Fig 11 A).

Otro par con diámetro mayor de 33 μm y una tasa de acoplamiento también de 0.62 tuvo EPSPs con un tiempo al pico de 4.53 ± 0.13 ms y una distribución bimodal de amplitudes con un pico mayor de 0.43 ± 0.13 mV y un segundo pico de 0.98 ± 0.09 mV.

Caso 2: En otro par celular proveniente de un mismo ganglio, una célula de 23 μm y otra de 58 μm y tasa de acoplamiento de 0.47, los EPSPs tuvieron tiempos al pico similares, de 4.92 ± 0.09 y de 4.6 ± 0.06 ms, respectivamente. De manera interesante, la distribución de amplitudes de ambas poblaciones de EPSPs tuvieron picos de amplitudes similares, siendo de 0.52 ± 0.03 mV en el par neuronal de 23 μm y de 0.54 ± 0.01 mV en la neurona de 58 μm . Ambos picos fueron menores que en las neuronas con las tasas de acoplamiento más grandes(ver el caso 1). Esos datos también confirman que a coeficientes de acoplamiento similares, las propiedades membranales de las neuronas compensan su crecimiento para producir propiedades integrativas constantes, por lo que continuamos analizando cual de las propiedades biofísicas era la responsable de mantener la integración sináptica constante.

IX.3.2.FRECUENCIA DE LOS AP'S y EPSPs

La suma de los EPSPs producidos en ambas neuronas acopladas generó potenciales de acción a frecuencias de 0.04 a 0.17 s^{-1} cuando el potencial de reposo se mantuvo a -60 mV (Figura 12). Esas frecuencias se incrementaron dramáticamente a potenciales de reposo menos negativos. Sin embargo, el análisis de esos datos no se presenta en el presente reporte.

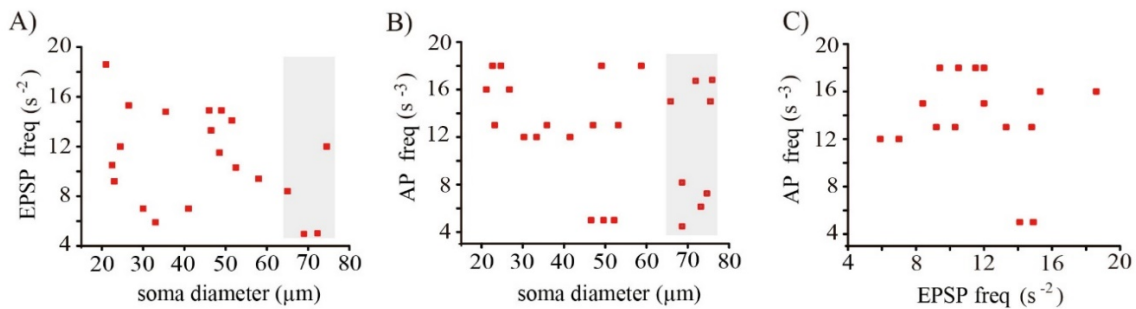


FIGURA 12. Frecuencias promedio de los EPSPs y los potenciales de acción registrados en 18 neuronas (9 pares) con diferentes tamaños somáticos. La frecuencia de los EPSPs (A) y los potenciales de acción (B) no tienen correlación con el diámetro neuronal. Los datos en las áreas grises corresponden a neuronas adultas. (C) Los potenciales de acción y las frecuencias de los EPSPs tampoco están correlacionados.

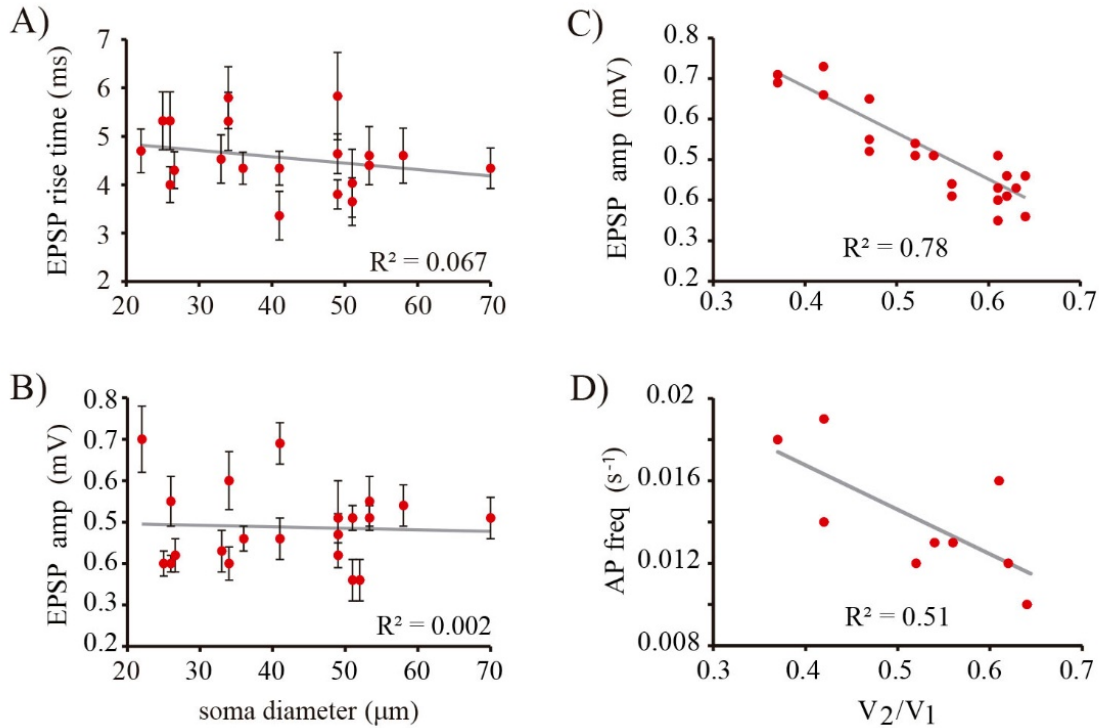


Figura 13 La amplitud de los EPSPs y la frecuencia de los potenciales de acción dependió de la tasa de acoplamiento. (A) El tiempo al pico no tuvo correlación con el diámetro somático. (B) La amplitud del pico unitario del EPSP no tuvo correlación con el diámetro somático. (C) La amplitud del EPSPs local es inversamente dependiente de la tasa de acoplamiento del par neuronal presumiblemente debido a la suma de EPSPs. Las líneas grises son los ajustes lineales de las predicciones a los datos. El coeficiente de correlación se indica en cada gráfica. El bajo coeficiente de correlación de la frecuencia del potencial de acción puede deberse a una suma multivariable que es afectada por las fluctuaciones de amplitud entre EPSPs individuales, la suma con los EPSPs de la neurona acoplada y las variaciones de frecuencia entre neurona y neurona. Todas esas variables son independientes del tamaño neuronal.

En pares neuronales con diferentes tamaños pero con una tasa de acoplamiento similar, la amplitud de los EPSPs fue directamente proporcional a la tasa de acoplamiento, debido a que como se muestra en las Figuras 11 A y B, las distribuciones de amplitudes de los EPSPs producidos en las dendritas de las neuronas comando se obtuvieron de las poblaciones rápidas. Esas distribuciones tuvieron uno ($n=18$ neuronas), usualmente dos ($n=14$ neuronas) y eventualmente tres ($n=2$ neuronas) picos de amplitud bien resueltos, estimados con ajustes gaussianos a los datos.

X.DISCUSIÓN

El microcircuito establecido por las neuronas Retzius acopladas eléctricamente y su entrada química mantiene sus propiedades integrativas durante el crecimiento hasta que el soma neuronal triplica su diámetro. Nuestro procedimiento experimental nos permitió medir distintas variables con relativa independencia entre sí en el mismo par neuronal. La tasa de acoplamiento de los pares de neuronas Retzius varía en un amplio rango de valores independientemente del tamaño. La frecuencia y las características de los EPSPs que producen la frecuencia basal de disparo de las neuronas Retzius queda definida en las etapas posnatales tempranas y permanecieron sin cambio durante el crecimiento. El incremento en la resistencia de las membranas de las dendritas fue suficiente para compensar el crecimiento morfológico del circuito, permitiendo la propagación de EPSPs en el rango completo de tamaños neuronales. Este efecto produce capacidades integrativas constantes mientras el circuito crece.

El incremento en la resistencia de la membrana dendrítica durante el crecimiento neuronal es contra toda intuición, debido a que un incremento en el área membranal conduce a un decremento en la resistencia específica de la membrana. Este incremento en la resistencia implica una reducción del número de canales activos por unidad de membrana dendrítica. Existen varias posibilidades para tal efecto.

Uno es mediante la reducción de la probabilidad del estado abierto de los canales de la membrana dendrítica. Tal modulación existe en canales de potasio con doble dominio de poros, los cuales contribuyen mayormente al potencial de reposo y a la resistencia de la membrana de las neuronas y de células musculares (Goldstein et al., 2001).

Otra posibilidad es la reducción selectiva en la tasa de incorporación de los canales a las dendritas. Las dendritas sintetizan proteínas que son incorporadas en sus membranas (Kiss, 1977; Slomniki et al., 2016).

En cualquier caso, esta reducción en la resistencia debería ser local, debido a que las membranas del soma y el axón conservan su constante de tiempo mientras que las neuronas crecen, lo cual es consistente con una reducción en la resistencia proporcional al incremento en el área de la superficie.

Propiedades integrativas de las neuronas durante el crecimiento

La persistencia de la constante de tiempo axo-somática mientras las neuronas crecen impone un decaimiento en los EPSPs que llegan al axón-soma independientemente del tamaño neuronal. Debido a que el rango de frecuencia al cual aparecen los EPSPs se mantiene durante el crecimiento, la suma temporal que determina la frecuencia de disparo basal también debe permanecer constante.

Por lo tanto, la variable que determina la frecuencia de disparo independientemente del tamaño es la tasa de acoplamiento.

Un segundo factor que contribuye a la integración sináptica es el pequeño coeficiente de la conductancia dentro-somática, que reduce significativamente la amplitud de los EPSPs al llegar al axón (Vázquez- et al., 2009).

Este coeficiente reduce la amplitud de los EPSPs sin alterar su forma. Nuestros datos indican un coeficiente dentro-somático constante para todos los tamaños, debido a que las neuronas de diferentes tamaños con tasas de acoplamientos similares tienen amplitudes de EPSPs y frecuencias de disparo similares.

El hecho de que los valores del acoplamiento eléctrico en neuronas pequeñas se extienda sobre un rango tan amplio como el de las adultas indica que desde etapas tempranas de la vida post embrionaria, el acoplamiento eléctrico ya es modulado.

Implicaciones funcionales para las neuronas serotoninérgicas

Las neuronas serotoninérgicas de vertebrados e invertebrados disparan espontáneamente a bajas frecuencias (Mosko and Jacobs, 1974; Veasey et al., 1997; Wang and Aghajanian 1977; Cunningham and Lakoski, 1988).

Aún las neuronas de Retzius más pequeñas estudiadas aquí habían establecido el patrón de generación de EPSPs que caracteriza a las adultas. La suma de los EPSPs produce este disparo, lo que refleja un establecimiento temprano de un mecanismo presináptico. Esta constancia contrasta con el incremento gradual en el número de entradas sinápticas en grillo o de rata durante el crecimiento (Chiba et al., 1992; Liu et al., 2003). En nuestro caso implica que desde etapas postnatales, el circuito serotoninérgico ha adquirido su frecuencia basal.

El disparo basal puede producir liberación de serotonina de terminales sinápticas (Henderson, 1983, Liu and Nicholls, 1989). Sin embargo, las neuronas serotoninérgicas también liberan serotonina de manera extrasináptica a partir del soma, dendritas y varicosidades cuando la frecuencia de disparo se incrementa (Trueta et al., 2003).

La exocitosis extra-sináptica puede ser evocada por la activación de conexiones polisinápticas excitadoras formadas por neuronas mecanosensoriales nociceptivas en el ganglio. (Szczipack and Kristan, 1982; Velázquez-Ulloa et al., 2003). En particular, el disparo de las neuronas sensibles a la presión bajo estimulación de la piel incrementa el disparo de las neuronas de Retzius (Velázquez-Ulloa et al., 2003).

La liberación masiva de serotonina del soma puede en turno incrementar los niveles de serotonina circulante en el ganglio (Willard, 1981) y evocar el nado ficticio (Nusbaum et al., 1986) o la locomoción terrestre (De Miguel et al., 2015).

La modulación de las sinapsis eléctricas en neuronas serotoninérgicas puede producirse por liberación de serotonina (Colombaioni and Brunelli, 1988; Rorig and Suttor, 1996; Szabo et al, 2010) actuando sobre la actividad de los canales de la unión eléctrica (Phelan et al., 1998; Kandarian et al., 2012). Sin embargo, las neuronas de Retzius de animales pequeños animales son insensibles a la modelación serotoninérgica (Groom et al., 1995), lo cual sugiere que posiblemente la comunicación extrasináptica aún no sea funcional y que la modulación de la sinapsis eléctrica obedezca a otro transmisor o mecanismo.

BIBLIOGRAFÍA

Atkinson S.E., and Williams SR. (2009). Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical neurons. *J Neurophysiol* 102,735-51. doi:10.1152/jn.00083.2009

Baker, M.W., and Macagno, E.R. (2014). Control of neuronal morphology and connectivity: emerging developmental roles for gap junctional proteins. *FEBS Lett.* 588, 1470-1479. doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.010

Blackshaw, SE., Nicholls JG. 1995. Neurobiology and development of the leech. *J Neurobiol* 27, 267-76. 362 363 . doi: 10.1002/neu.480270302

Burrell, B.D., Sahley, C.L. and Muller., K.J. 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.

Chiba, A., Kamper G., Murphey R.K. 1992. Response properties of interneurons of the cricket cercal sensory system are conserved in spite of changes in peripheral receptors during maturation. *J Exp Biol* 164,205-226.

Colombaioni, L., and Brunelli M. (1988). Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the CNS of *Hirudo medicinalis*. *J Exp Biol* 47:139-144.

Cooke I, Lipkin M. 1972. *Cellular Neurophysiology A source book*. Holt,Rinehart & Winston. P 1039

Cunningham KA, Lakoski J M. 1988. Electrophysiological effects of cocaine and procaine on dorsal raphe serotonin neurons. *Eur J Pharmacol* 148:457-462.

De-Miguel,F.F., Leon-Pinzon,C., Noguez, P., and Mendez, B. (2015). Serotonin release from the neuronal cell body and its long-lasting effects on the nervous system. *Philos. Trans.R.,Soc.Lond. B.Bipñ. Sci.* 370:20140196. doi:10.1098/rstb.2014.0196

De-Miguel F.F., M. Vargas-Caballero, and E. Garcia-Perez. (2001). Spread of synaptic potentials through electrical synapses in RZ neurons of the Leech. *J Exp Biol* 204(19), 3241-3250.

Di Caprio, R.A., French, A.S., and Sanders, E.J. (1974). Dynamic properties of electrotonic coupling between cells of early xenopus embryos. *Biophys. J.* 14, 387-411. doi:10.1016 / s0006-3495(74)85923-0

Eckert, R. 1963. Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J Gen Physiol* 46, 573-587. doi:10.1085/jpg.46.3.573

Edwards, D.E., Fricke, R.A., Barnett L., Yeh S., Leise, M. (1994a). Neuronal growth and response habituation. *J Neurophysiol* 72,890-898

- Edwards D.H., Yeh, S., Barnett L.D., and Nagappan, P.R. (1994b). Changes in the synaptic integration during the growth of the lateral giant neuron of crayfish. *J Neurophysiol* 72, 899-908.
- Fernández de Miguel F., Drapeau P. (1995). Synapse formation and function: Insights from identified leech neurons in culture. *J Neurobiol* 3,367-379
- Friesen W.O., Kristan W.B. (2007). Leech locomotion: swimming, crawling, and decisions. *Curr Opin Neurobiol* 17,704-711. doi:10.1016/j.conb.2008.01.006
- Furshpan E.J., Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol.* 145, 289-325. doi: 10.1113/jphysiol.1959.sp006143
- Galarreta, M., and Hestrin S. (1999). A network of fast spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402, 72-75. doi: 10.1038/47029
- García- Pérez E., Vargas-Caballero, M., Velázquez-Ulloa N., Minzoni A., and De-Miguel FF. (2004). Synaptic integration in electrically coupled neurons. *Biophys J* 86, 645-655. doi: 10.1038/35058574
- Goldstein, S.A., Bockenhauer, D.K., O'Kelly, I., Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2,175–184. doi:10.1038/35058574
- Groome J.R., Vaughan, D.K. and Lent, C.M. (1995). Ingestive sensory inputs excite serotonin effector neurons and promote serotonin depletion from the leech central nervous system and periphery. *J Exp Biol* 198, 1233-1242.
- Hagiwara, S., and Morita, H. (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* 339:309-324. doi:10.1113/jphysiol.1983.sp01478
- Hermann, L. (1905). *Pflugers Arch.* 109:95
- Hochner, B., Spira, M.E. (1987). Preservation of motoneuron electrotonic characteristics during postembryonic growth. *J Neurophysiol* 7(1):261-270
- Hodgkin, A.L., Rushton W.A.H. (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc R Soc B* 133, 444-479.
- Jellies, J., Loer C.M., Kristan W.B Jr. (1987). Morphological changes in leech Retzius neurons after target contact during embryogenesis. *J Neurosci* 7(9), 2618-2629.
- Kandarian, B., Sethi, J., Wu A., Baker M., Yazdani N., Kim E., Sanchez A, Edsall L, Gaasterland T, Macagno E. (2012). The medicinal leech genome encodes 21 innexin genes: different combinations are expressed by identified central neurons. *Dev Genes Evol* 222, 29-44. doi:10. 1007/s00427-011-0387-z

- Kepler, T.B., Marder, E., and Abbott, L.F. (1990). The effect of electrical coupling on the frequency of model neuronal oscillators. *Science* 249, 83-85. doi: 10.1126/science.2321028
- Kiss, J. (1977). Synthesis and transport of newly formed proteins in dendrites of rat hippocampal pyramid cells. An electron microscope autoradiographic study. *Brain Res* 124, 237-250. doi: 10.1016/0006-8993(77), 90882-4
- Kleinhaus, A.L., Angstadt, J.D. (1995). Diversity and modulation of ionic conductances in leech neurons. *J Neurobiol* 27,419-433.
- Korn, H., Faber, D.S. (1976). Vertebrate central nervous system: same neurons mediate both electrical and chemical inhibitions. *Science* 194, 1166-1169. doi: 10.1126/science.186868
- Kristan, Jr W.W. (1982). Sensory motorneurons responsible for the local bending response in leeches. *J Exp Biol* 96:161-180.
- Lent, C.M., and Frazer, B.M. (1977). Connectivity of the monoamine containing neurons in the central nervous system of the leech. *Nature* 28, 844-877. doi: 10.10138/266844a0
- Lent, C.M., Dickinson M.H. (1984). Serotonin integrates the feeding behavior of the medicinal Leech. *J 436 Comp Physiol A* 154, 457-471.
- Lent, C.M. (1973). Retzius cells from segmental ganglia of four species of leeches: comparative neuronal geometry. *Comp Biochem Physiol A* 44:35-40. 434 435
- Leon-Pinzon, C., Cercós, M.G., Noguez, P., Trueta, C., and De-Miguel, F.F. (2014). Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Front. Cell. Neurosci.* 8:169. doi:10.3389/fncel.2014.00169
- Liu, Y., Lio, P.A., Pasternak, J., and Tromer, B.L. (1996). Developmental Changes in membrane properties and post synaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 76,1074-1088.
- Liu, Y., and Nicholls, J. (1989). Steps in the development of chemical and electrical synapses by pairs of identified leech neurons in culture. *Proc. R. Soc. Lond, B Biol. Sci.* 236, 253-268. doi: 10.10198/rspb.1989.0023
- Llinás, R., Baker, R and Sotelo, C (1974). Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J. Neurophysiol.* 37, 560-571.
- Lockery, S.R and Kristan, W.B. Jr. (1990). Distributed processing of sensory information in the leech II 443 identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J Neurosci* 10:1816-1829.

- Loer, C.M., Jellies J., and Kristan, W.B. Jr (1987). Segment-specific morphogenesis of leech retxius neurons requires peripheral targets. *J. Neurosci.* 7, 2630-2638.
- Mason, P. (1997). Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. *J Neurophysiol* 77, 1087–1098.
- Mosko, S.S., and Jacobs, B.L. (1974). Midbrain raphe neurons: spontaneous activity and response to light. *Physiol. Behav* 13,589-593. doi:10.1016/0031-9384(74)90292-3
- Nicholls, J.G., Liu, B.W., Payton W., Kuffler, D.P. (1990) The specificity of synapse formation by identified leech neurons in culture. *J Exp Biol* 153,141-154.
- Nusbaum, M.P., Kristan W.B. Jr. (1986). Swim initiation in the leech by serotonin containing interneurons cells 21 and 61. *J Exp Biol* 122: 277-302.
- Peng, Y.R., He S., Marie H., Zeng S.Y., Ma J., Tan Z.J., et al. (2009). Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron* 61, 71-84. doi: 10.106/j.neuron.2008.11.015
- Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A., Stebbings L.A., Toodmand, M.G., Avery, L., et al. (1998). Innexins: a family of invertebrate gap-junctions proteins. *Trends Gen* 14,348-349. doi:10.106/s0168-9525(98)01547-9
- Picones, A., Chung, S.C. and Korenbrot J. (2003). Developmental maturation of passive electrical properties in retinal ganglion cells of rainbow trout. *J Physiol* 548, 71-83. doi: 10.1113/jphysiol.2002.034637
- Rall, W. (1959). Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp Neurol* 1,491- 527. doi: 10.1016/0014-4886(59)90046-9
- Rall, W. (1969). Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophys J* 9,1483-1508. doi: 10.1016/s0006-3495(69),86467-2
- Rapp, M., Segev, I., Yarom, Y. (1994). Physiology, morphology and detailed passive models of guinea-pig cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 474,101-118
- Reese, D., Drapeau., P. (1988). Neurite growth patterns leading to functional synapses in an identified embryonic neuron. *J Neurosci* 18,5652-5662.
- Rorig, B., and Sutor B. (1996). Serotonin regulates gap junction coupling in the developing rat somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 8,1685-1695. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb.01312.x
- Shruti S, Schulz DJ, M Lett K, Marder E. 2014. Electrical coupling and innexin expression in the stomatogastric ganglion of the crab cancer borealis. *J Neurophysiol* 112:2946-2958

Slomnicki, L., Pietrzak, M., Vashishta, a., Jones, J., Lynch, N., Elliot, S., et al. (2016). Requirement of neuronal ribosomes synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree. *J. Biol. Chem.* 291, 5721-5739. doi: 10.1074/jbc.M115.682161

Stewart, W.W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14,741-759.

Stuart, D.K., Blair, S.S., Weisblat D.A. (1987). Cell lineage, cell death, and the developmental origin of identified serotonin- and dopamine- containing neurons in the leech. *J Neurosci* 7, 1107-1122

Szabo, T.M., Caplan J., and Zoran, M.K. (2010). Serotonin regulates electrical coupling via modulation of extrajunctional conductance: H current. *Brain Res* 19, 21-31. doi: 10.1016/j.brainres.2010.06.025

Szczupak, L., Kristan, W.B. Jr. (1995). Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *J Neurophysiol* 74, 2614-2624

Thomas, D., Plant, L.D., Wilkens, C.M., McCrossan, Z.A, Goldstein, S.A. (2008). Alternative translation initiation in rat brain yields K(2P)2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* 58:859

Todd, K.L., Kristan, W.B. Jr., and French, K.A. (2010). Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation. *J. Neurosci.* 30, 15277-15285. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2331-10.2010

Trueta, C., Mendez, B., and De-Miguel F.F. (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J. Physiol* 547:405-416. doi:10.1113/jphysiol.2002.030684

Vazquez, Y., Méndez, B., Trueta, C., and De-Miguel, F.F. (2009). Summation of excitatory postsynaptic potentials in electrically-coupled neurons. *Neuroscience* 163, 202-212. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.003

Veasey, S.C., Fornal C.A., Metzler, C.W, and Jacobs, B.L. (1997). Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. *Neuroscience* 79,161–169. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00673-2

Velázquez-Ulloa, N., Blackshaw, S.E., Szczupak, L., Trueta, C., García, E and De-Miguel, F.F. 2003. Convergence of Mechanosensory Inputs onto Neuromodulatory Serotonergic Neurons in the Leech. *J. Neurobiol.* 54, 604-617. doi:10.1002/neu.10184

Wang, R.Y., and Aghajanian, G.K. (1977). Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res* 132,186–193. doi: 10.1016/000-8993(77)90719-3

Weisblat, D.A. (1981). "Development of the Nervous System". In: Neurobiology of the Leech. Eds K.J. Muller J.G. Nicholls and G Stent. (New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory), 173-195

Willard, A.L. (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medical leech. *J Neurosci* 1,936-944

Wine, J.J., and Krasne, F.B. (1982). "The cellular organization of crayfish escape behavior", in: *The biology of Crustacea Vol (IV)*, eds E.D. Bliss H.L Atwood and D Sanderman (New York, NY: Academic Press), 241-292.

Wright, W.N., Bardakjian, B.L., Valiante, T.A., Pérez J.L. (1996) White noise approach for estimating the passive electrical properties of neurons. *J of Neurophysiology*. 76, 5

Yang, J., Chapman, K.M. (1983). Frequency domain analysis of electrotonic coupling between leech Retzius cells. *Biophys J*. 44, 91-99. doi: 10.1016/s0006-3495(83)84280-5