

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

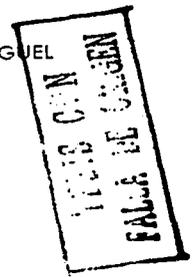
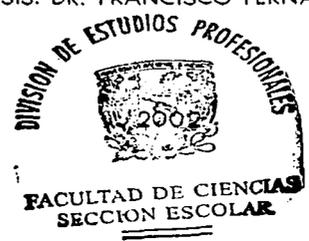


FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LAS CONEXIONES ENTRE NEURONAS MECANOSENSORIALES Y NEUROMODULADORAS EN LA SANGUIJUELA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
QUE PRESENTA:
NORMA ANDREA VELÁZQUEZ ULLOA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE MIGUEL





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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Norma Andrea Velázquez Villca

FECHA: 09/11/2002

FIRMA: Norma Andrea Velázquez Villca

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA





ACADEMIA DE CIENCIAS Y LETRAS  
 AZULEMA  
 AZULEMA  
 AZULEMA

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de las conexiones entre neuronas mecanosensoriales y neuromoduladoras en la sanguijuela"

realizado por Norma Andrea Velázquez Ulloa

con número de cuenta 9650413-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dr. Francisco Fernández de Miguel

Propietario

Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Propietario

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Suplente

Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Consejo Departamental de Biología

M. en C. JOAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

## **AGRADECIMIENTOS**

Hacer ciencia no es labor de una sola persona, implica la colaboración de muchas personas sin las cuales sería imposible realizar una investigación. El presente trabajo requirió de la ayuda e intervención de innumerables personas, algunas involucradas directamente con el proyecto y otras de forma indirecta. Todas estas personas contribuyeron a mi formación con algún consejo, comentario, apoyo moral o simplemente llevando a cabo su labor.

En el primer rubro quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio: Nuri y Yu (por las pláticas de grupo); Bruno, Elizabeth, Hugo, Citlali, Jacobo, Hortensia, Verónica y recientemente Javier y Adriana. Incluyo a Paco, quien más que un tutor, muchas veces fue más como cualquier otro miembro del laboratorio, participando directamente en los experimentos. Lino está incluido también, al igual que en su momento la Sra. Eloisa y Laura.

En el rubro de apoyo indirecto incluyo a mis maestros de la Facultad de Ciencias cuyas enseñanzas han sido determinantes en el rumbo que tomé mi formación: Memo Salgado, Miguel A. Palomino, la Dra. Fanjul, Julio Prieto, Rita, Víctor Valdés y Toño Lazcano. Agradezco especialmente a Elsa por corregir rápidamente mi tesis y a Silvestre por sentarse conmigo a revisar y comentar sus correcciones de mi tesis. Agradezco a mis maestros de la Universidad de McGill: Catherine Potvin y Louis Lefèvre. Agradezco también la ayuda sobre computadoras de Daniel Silva, Arturo Becerra, Luis Delaye, Aquiles Bernal, Miguel Angel Hernández, César Sandoval, Jorge Neme, Luis Novoa y al equipo de cómputo del IFC. También agradezco a la Fundación Telmex y finalmente quiero agradecer a toda la gente que me apoyó durante todo éste tiempo: Primero que nada a mi familia: mi papá, mi mamá, les agradezco por su interés y por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y hacerme comentarios al respecto de un tema que sé no pertenece a su área de trabajo. A mi hermana y mi abuelita por su interés y preguntarme continuamente como iba. A mis amigos: Carla, Candela, Xoxo, Aline, Tathali, Rocío, Ana, Paola, Nadia, Ale Medina, Ale del Rosal y Miguel Baltadano por estar al pendiente. A Tanya y Graham por el apoyo moral y por las múltiples pláticas de desahogo. Agradezco a la gente que se me pueda estar olvidando de momento.

**Agradezco a mis sinodales:**

**Dr. Francisco Fernández de Miguel**

**Dra. María Luisa Fanjul Peña**

**Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo**

**Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio**

**Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal**

**Agradezco especialmente a los doctores:**

**Francisco Fernández de Miguel, Susanna Blackshaw, Lidia Szczupak, Esperanza García y Citlali Trueta (unos meses no hacen diferencia)**

**por haber iniciado el proyecto del cual derivó mi tesis.**

**En este mismo rubro agradezco a Mariana Vargas y Verónica González, quienes junto con el Dr. Fernández de Miguel, realizaron las imágenes analizadas en éste trabajo.**

## ÍNDICE

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumen</b>                                                              | <b>1</b>  |
| <b>Introducción</b>                                                         | <b>3</b>  |
| <b>Sinapsis Eléctricas</b>                                                  | <b>4</b>  |
| <b>Sinapsis Químicas</b>                                                    | <b>8</b>  |
| <b>Integración en Neuronas</b>                                              | <b>10</b> |
| <b>La Sanguijuela como Modelo de Estudio</b>                                | <b>13</b> |
| <b>Sistema Nervioso de las Sanguijuelas</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>Morfología de las Neuronas de Retzius</b>                                | <b>14</b> |
| <b>Modos de Liberación de Neurotransmisor en las Neuronas de Retzius</b>    | <b>19</b> |
| <b>Integración en las Neuronas de Retzius</b>                               | <b>19</b> |
| <b>Neuronas Mecanosensoriales en la Sanguijuela</b>                         | <b>24</b> |
| <b>Integración en Neuronas Mecanosensoriales</b>                            | <b>27</b> |
| <b>Estimulación Mecánica, Integración y Neuromodulación</b>                 | <b>29</b> |
| <b>Planteamiento del Problema</b>                                           | <b>30</b> |
| <b>Hipótesis</b>                                                            | <b>31</b> |
| <b>Objetivos</b>                                                            | <b>32</b> |
| <b>Objetivos Generales</b>                                                  |           |
| <b>Objetivos Particulares de la Parte I</b>                                 |           |
| <b>Objetivos Particulares de la Parte II</b>                                |           |
| <b>Métodos</b>                                                              |           |
| <b>Disección</b>                                                            | <b>33</b> |
| <b>Identificación de las Neuronas de Interés</b>                            | <b>33</b> |
| <b>Obtención de las Imágenes de Dobles Tinciones de Neuronas de Retzius</b> | <b>33</b> |
| <b>Adquisición de Imágenes por Microscopía Confocal</b>                     | <b>35</b> |
| <b>Procesamiento Digital de Imágenes</b>                                    | <b>35</b> |
| <b>Cuantificaciones Anatómicas</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>Registro Intracelular</b>                                                | <b>38</b> |

|                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Análisis de Conexiones Polisinápticas</b>                                                                                                   | <b>38</b> |
| <b>Caracterización de la Respuesta Sináptica de las Neuronas de Retzius a la Estimulación de las Neuronas Mecanosensoriales</b>                | <b>39</b> |
| <b>Estadística</b>                                                                                                                             | <b>40</b> |
| <b>Resultados: Parte I</b>                                                                                                                     |           |
| <b>Cuantificación del Número de Sitios de Contacto entre Neuronas de Retzius</b>                                                               | <b>41</b> |
| <b>Sitios de Contacto entre Neuronas de Retzius</b>                                                                                            | <b>43</b> |
| <b>Resultados: Parte II</b>                                                                                                                    |           |
| <b>Características de las Respuestas Sinápticas Producidas por la Estimulación de las Neuronas T, P y N</b>                                    | <b>49</b> |
| <b>Probabilidad de Respuesta Sináptica por Estímulo de la Neurona de Retzius en Diferentes Neuronas Mecanosensoriales</b>                      | <b>52</b> |
| <b>Conexiones Polisinápticas entre las Neuronas Mecanosensoriales y las Neuronas de Retzius</b>                                                | <b>54</b> |
| <b>Distribución de Amplitudes y Tiempos al Pico de PPEs Espontáneos y Evocados por Estimulación Mecanosensorial en las Neuronas de Retzius</b> | <b>54</b> |
| <b>Rangos de Distribuciones de Amplitud y Tiempos al Pico</b>                                                                                  | <b>58</b> |
| <b>Discusión</b>                                                                                                                               | <b>62</b> |
| <b>Conclusiones</b>                                                                                                                            | <b>68</b> |
| <b>Literatura citada</b>                                                                                                                       | <b>70</b> |
| <b>Apéndice</b>                                                                                                                                | <b>79</b> |

## RESUMEN

Existen dos neuronas de Retzius en cada ganglio de la sanguijuela que se encuentran acopladas eléctricamente. Al ser estimuladas con trenes de impulsos de baja y alta frecuencias, liberan serotonina en la terminal sináptica o en el soma respectivamente. La liberación somática está relacionada con el papel neuromodulador de estas neuronas. El cambio de función de la neurona de Retzius de neurotransmisión a neuromodulación podría depender de la integración de las entradas que se activen por estimulación a altas frecuencias.

El presente trabajo está dividido en dos secciones. La Parte I analiza los sitios de contacto entre las dendritas acopladas eléctricamente para estimar su papel en la integración de éstas neuronas. La Parte II es el estudio de las características cinéticas de los potenciales sinápticos en respuesta a las entradas de las neuronas mecanosensoriales a las neuronas de Retzius, las cuales ocasionan disparos de alta frecuencia.

Para la Parte I se cuantificó el número de contactos eléctricos entre las neuronas de Retzius usando reconstrucciones digitales en tercera dimensión. Después de un proceso de deconvolución, se encontraron  $45.6 \pm 1.2$  sitios de contacto entre ellas. Esto aunado a la proporción de potenciales sinápticos (PPEs) unitarios, sugirió que cada dendrita acoplada produce únicamente eventos unitarios y que eventos dobles o triples resultan de la integración en el axón primario de eventos unitarios de diferentes dendritas, los cuales se suman linealmente.

Para la Parte II se registraron las respuestas de las neuronas de Retzius a estimulación de neuronas mecanosensoriales. Estas neuronas respondieron en su mayoría al primer impulso de mecanoneuronas sensibles a tacto (neuronas T) y gradualmente la probabilidad de producir un sináptico se redujo. Las respuestas a estimulación de neuronas sensibles a presión (P) y a estímulos nocivos (N), aparecieron después del segundo o tercer impulsos y su probabilidad bajó al quinto impulso. Experimentos realizados con alto  $Mg^{++}/Ca^{++}$  para reducir la probabilidad de liberación, mostraron que los tres tipos de mecanoneuronas establecen contactos polisinápticos con las neuronas de Retzius. Las distribuciones de

amplitudes y tiempos al pico de PPEs producidos por las neuronas mecanosensoriales fueron diferentes a las de los PPEs espontáneos, sugiriendo que se trata de distintas entradas sinápticas. Los tiempos al pico de los potenciales sinápticos se tomaron como indicadores de la distancia electrotonica a la cual fueron producidos y sugieren que los contactos se encuentran sobre las dendritas no acopladas. Las interneuronas activadas por las mecanoneuronas establecen contactos con ambas neuronas de Retzius en sitios distales al soma. Las distribuciones de amplitudes de los PPEs variaron entre neuronas, sugiriendo que cada tipo neuronal tiene su propia vía polisináptica. Además, la fuerza de las sinapsis varió de neurona a neurona y de ganglio a ganglio. En conclusión, éstos datos sugieren que las entradas que producen PPEs espontáneos a bajas frecuencias y que están situadas en dendritas acopladas eléctricamente, producirían la liberación sináptica. Las entradas sinápticas provenientes de mecanoneuronas producen actividad de alta frecuencia y están en su mayoría en dendritas no acopladas. Estas podrían desencadenar liberación somática de serotonina y activar la función moduladora de las neuronas de Retzius.

## INTRODUCCIÓN

Existen cuatro tipos de comunicación intercelular: la endocrina, la paracrina, la neuroendocrina y la sináptica. La primera se da entre células que se encuentran lejos unas de otras y el mensajero entra al torrente sanguíneo y es así como llega a las células blanco u órgano diana. La comunicación paracrina ocurre entre células de distintos tipos que están muy cerca por lo que el mensajero puede difundirse en el espacio extracelular y actuar en las células vecinas. En la comunicación neuroendocrina una neurona libera una neurohormona al torrente sanguíneo y ésta actúa sobre sus células blanco. La comunicación sináptica se lleva a cabo entre neuronas que se comunican entre sí por medio de sinapsis químicas. Hay neurotransmisores que pueden servir tanto de neurotransmisores como de hormonas (Hiriart, 1998).

Se han identificado neurotransmisores que actúan como neuromoduladores ya que generan variaciones en las respuestas sinápticas. Entre éstos neurotransmisores están la serotonina y la dopamina, además de muchos péptidos. Las sustancias moduladoras pueden alterar la excitabilidad de neuronas individuales y la amplitud de los potenciales sinápticos (Marder y Calabrese, 1996). La frecuencia de disparo de las neuronas del circuito y el ambiente modulador determinan las propiedades intrínsecas y sinápticas que producen un comportamiento (Jorge-Rivera et al., 1998). En cada momento la dinámica de la red depende de las propiedades sinápticas y de las propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas que la constituyen. Cabe mencionar que la participación de sustancias químicas es la única forma de neuromodulación existente. Se ha demostrado que el acople eléctrico puede constituir otra fuente de modulación capaz de regular la generación de respuestas sincrónicas y tanto la frecuencia y como la forma éstas (Marder, 1998).

La neuromodulación de circuitos motores por entradas que forman parte del circuito provee flexibilidad al comportamiento. Por ejemplo, neuronas que contribuyen al centro generador del patrón de nado de *Tritonia* pueden evocar efectos neuromoduladores además de sus acciones neurotransmisoras (Katz et al.,

1994). Las neuronas moduladoras suelen producir efectos múltiples dando lugar a diferentes comportamientos. La neuromodulación puede ser extrínseca o intrínseca al circuito que se estudie dependiendo de si la neurona moduladora forma parte o no del circuito responsable de ese comportamiento (Katz, 1995). Estos estudios prueban que existen neuronas que pueden tener función tanto de neurotransmisor como de neuromodulación.

Uno de los neurotransmisores que se ha asociado con la neuromodulación de sistemas motores es la serotonina. Se ha demostrado su papel en la regulación de la postura de la langosta (Harris-Warrick y Kravitz, 1984), en patrones motores de nado de *Tritonia* (McClellan et al., 1994) y de sanguijuela (Willard, 1981) o en la fase apetitiva de la alimentación en sanguijuela (Wilson et al., 1996). También se ha estudiado su efecto en la modulación de los reflejos espinales y en la generación de patrones locomotores en el sistema nervioso de vertebrados (Grillner, 1975; Schmidt y Jordan, 2000). Otro papel que se ha adjudicado a la serotonina es en la agresión, tanto en humanos (Young y Leyton, 2002) como en otros animales, por ejemplo en la langosta (Kravitz, 2000) y en ratones (Nelson y Chiavegatto, 2001). Se ha demostrado que la serotonina participa en la neurotransmisión y en la neuromodulación en *Tritonia*, al actuar en receptores diferentes (Katz y Frost, 1995).

El interés es saber como una neurona puede pasar de la función de neurotransmisión típica de una neurona a la de célula neuromoduladora dependiendo de la integración de las respuestas generadas por distinto nivel de actividad en sus entradas sinápticas.

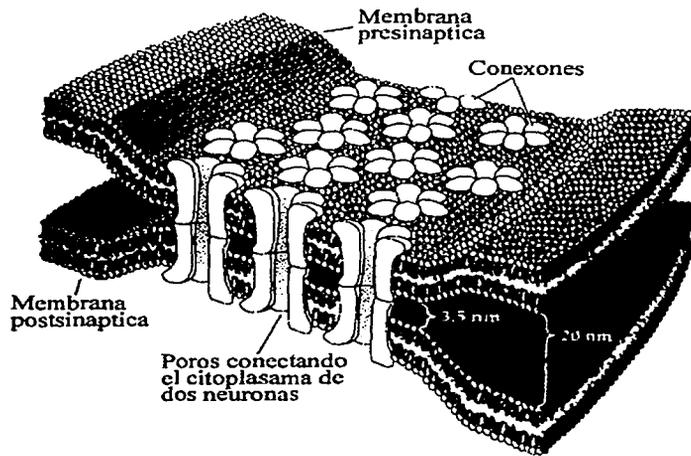
### **Sinapsis Eléctricas**

Una manera en la que el sistema nervioso transmite información de una neurona a otra es por medio de las sinapsis. Existe un tipo de sinapsis que implica contacto entre las neuronas por medio de uniones comunicantes, conocida como sinapsis eléctrica. Las uniones comunicantes representan una forma de comunicación intercelular en varios tejidos, incluyendo el corazón, el hígado, los

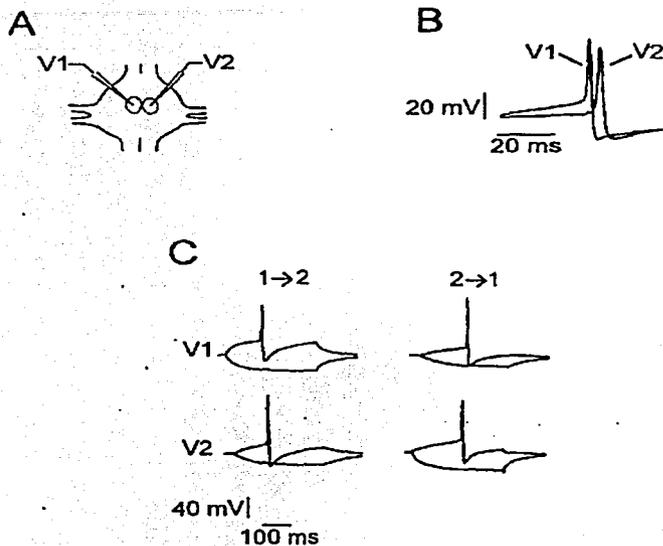
pulmones, riñones y cerebro, entre otros. Estas uniones (Fig. 1) están compuestas por 12 subunidades (conexinas) que forman dos hexámeros, cada uno de los cuales constituyen un hemicanal o conexón, que deja pasar moléculas hasta de 1 kDa (Dermietzel y Spray, 1993). Se han encontrado uniones comunicantes en poblaciones de neuronas (Furshpan y Potter, 1959; Galarreta y Hestrin, 1999).

Entre las funciones que se han descrito para las sinapsis eléctricas está el sincronizar la actividad de conjuntos neuronales, un ejemplo de este fenómeno en la corteza de rata es el trabajo de Galarreta y Hestrin (1999). Los conexones permiten el movimiento de iones, que transportan la corriente de una neurona a la otra y la corriente se propaga sin retardo de una neurona a otra, lo que favorece respuestas sincrónicas de grupos de neuronas acopladas (Fernández de Miguel, 1998). En el desarrollo generan patrones motores durante las etapas embrionaria y postnatal temprana, tanto en invertebrados (Saint-Amant y Drapeau, 2001), como en vertebrados (Kiehn y Tresch, 2002).

Las sinapsis eléctricas también desempeñan un papel importante en la integración de las entradas sinápticas ya que en células acopladas por sinapsis eléctricas los potenciales sinápticos fluyen de una neurona a otra (Marder y Eisen, 1984; De-Miguel et al., 2001). Parte de esta corriente se escapa por la membrana y otra fluye por los conexones a la neurona contigua. Los conexones ejercen cierta resistencia al paso de corriente, lo que se denomina resistencia de acople ( $r_a$ ). Debido a la resistencia de acople al pasar la corriente de una célula a otra el cambio de voltaje producido en la célula acoplada es menor. El acople entre dos células se expresa como el cociente de los voltajes en ambas células y representa la tasa de acople:  $V_2/V_1$ , donde  $V_1$  es la célula en la cual se produjo la corriente y  $V_2$  es la célula acoplada (Fernández de Miguel, 1998 ; Fig. 2). El grado de acople entre las uniones comunicantes no es estático y puede ser regulado por factores funcionales o por factores secretados durante el desarrollo, incluyendo neurotransmisores (Laseter y Dowling, 1985).



**Figura 1. Estructura de la sinapsis eléctrica.** Las uniones comunicantes consisten de complejos hexaméricos formados subunidades llamadas conexones, que están presentes en las membranas pre y postsinápticas formando un canal. Los poros de los canales se conectan entre sí, creando continuidad entre las dos células (Tomado de: Purves, et al., 1997).



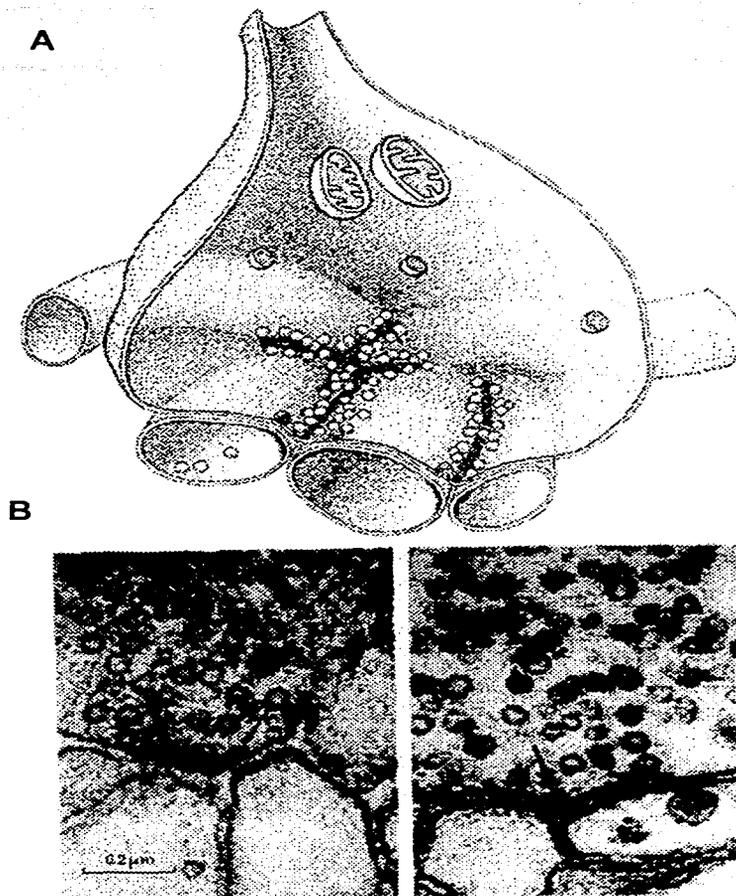
**Figura 2. Acoplamiento eléctrico en neuronas de Retzius de la sanguijuela. A)** Diagrama del ganglio y los dos somas en los que se inyecta corriente y registra el voltaje. **B)** Impulso de la célula V1 propagado a la célula V2. El potencial en V2 tiene un retardo debido a la conducción del árbol dendrítico. **C)** Corriente despolarizante e hiperpolarizante se propaga de una célula a la otra en ambos sentidos (Tomado de: Fernández de Miguel, 1998).

## **Sinapsis Químicas**

La transmisión sináptica química se produce cuando el flujo de calcio durante un impulso presináptico dispara la exocitosis de neurotransmisor de las vesículas sinápticas. El neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica y ocupa receptores de la membrana postsináptica. Esta interacción regula la apertura o cierre de canales iónicos y produce cambios en la permeabilidad a determinados iones. Dependiendo de los iones la respuesta será excitadora o inhibitoria. La acción del neurotransmisor termina por la acción de enzimas que lo degradan o por su recaptura por la neurona presináptica (Pitman, 1984).

La morfología de las sinapsis químicas es diferente a la de las eléctricas (Fig. 3). En el sitio donde se forma la sinapsis hay un ensanchamiento conocido como hendidura sináptica, donde se vacía el neurotransmisor. Éste está contenido en vesículas de entre 30-50 nm en la terminal presináptica. Se les denomina vesículas claras porque su contenido es traslúcido al verlas en microscopio electrónico. Estas se acumulan cerca de la membrana presináptica y se fusionan para liberar su contenido. En algunas terminales también hay vesículas con contenido electrodenso al microscopio electrónico, por lo que se denominan vesículas de núcleo denso y su tamaño es de 70 a 120 nm. Por lo general contienen péptidos que actúan como cotransmisores que modulan la actividad sináptica, pero también pueden contener mezclas de péptidos y transmisores clásicos. Las vesículas de núcleo denso rodean a las vesículas claras y su liberación se asocia a altas frecuencias de disparo en la célula presináptica (Fernández de Miguel, 1998).

La teoría cuántica propone que el neurotransmisor es almacenado en la terminal presináptica en la forma de paquetes o cuantos, de cantidad constante, que son liberados con una cierta probabilidad en respuesta a un impulso nervioso. Cada evento de liberación es independiente de los eventos previos. La probabilidad puede expresarse como una distribución binomial o para casos de baja probabilidad de liberación como una distribución de Poisson (Del Castillo y Katz, 1954; Redman, 1990). Kuffler y Yoshikami (1975) determinaron que el número de



**Figura 3. Sinapsis química de la sanguijuela.** A) Representación de una sinapsis típica basada en cortes seriados. La estructura presináptica contiene vesículas de cerca de 50 nm de diámetro y está separada del proceso postsináptico por un espacio de 30 nm. En la superficie interna de la membrana presináptica hay una estrecha banda de material denso. B) A la izquierda, sección longitudinal que pasa por la banda de material denso, con procesos presinápticos llenos de vesículas, opuestos a procesos postsinápticos. A la derecha, sección transversal sobre la banda de material denso. (Tomado de Müller, K.J. y McMahan, U.J., 1976)

moléculas de acetilcolina por cuanto para la placa neuromuscular de la serpiente es de alrededor de 10,000 moléculas. En la sanguijuela, cada vesícula clara de una neurona de Retzius contiene alrededor de 4,700 moléculas de serotonina (Bruns y Jahn, 1995).

La cantidad de neurotransmisor liberada por la terminal presináptica depende de manera no-lineal de la concentración externa de  $Ca^{++}$  por lo que se propone una acción cooperativa de cuatro iones de  $Ca^{++}$  para la liberación de un paquete cuántico de transmisor por impulso nervioso (Dodge y Rahamimoff, 1967; Agustine y Charlton, 1986). Entre la llegada del impulso a la terminal presináptica y la liberación de transmisor hay una latencia conocida como retardo sináptico que se debe mayormente al tiempo que lleva a abrir los canales de  $Ca^{++}$  (Llinás et al., 1981). Este retardo varía según la terminal. Los potenciales sinápticos tienen cursos temporales variables. Los más rápidos corresponden a la activación por neurotransmisor de canales activados por la unión de un ligando. Estos potenciales duran de algunos a decenas de milisegundos. Otros potenciales sinápticos son mucho más lentos, incluso en un orden de magnitud (Marder, 1998).

La forma y la duración de los potenciales sinápticos en el sitio de origen dependen de las propiedades cinéticas de apertura y cierre de los receptores - canales y del tiempo que el transmisor permanece en el espacio intersináptico (Fernández de Miguel, 1998). Las características de las respuestas sinápticas son un reflejo de la identidad de las neuronas que las produjeron y por esto la forma y duración (medidas como amplitud y tiempo al pico) del potencial sináptico se utilizan como parámetros para distinguir entradas sinápticas producidas por neuronas diferentes.

### **Integración en Neuronas**

Para entender la forma en que las neuronas integran la información es necesario realizar un análisis cuantitativo de sus propiedades de cable junto con la morfología de las neuronas (Surkis, et al., 1998).

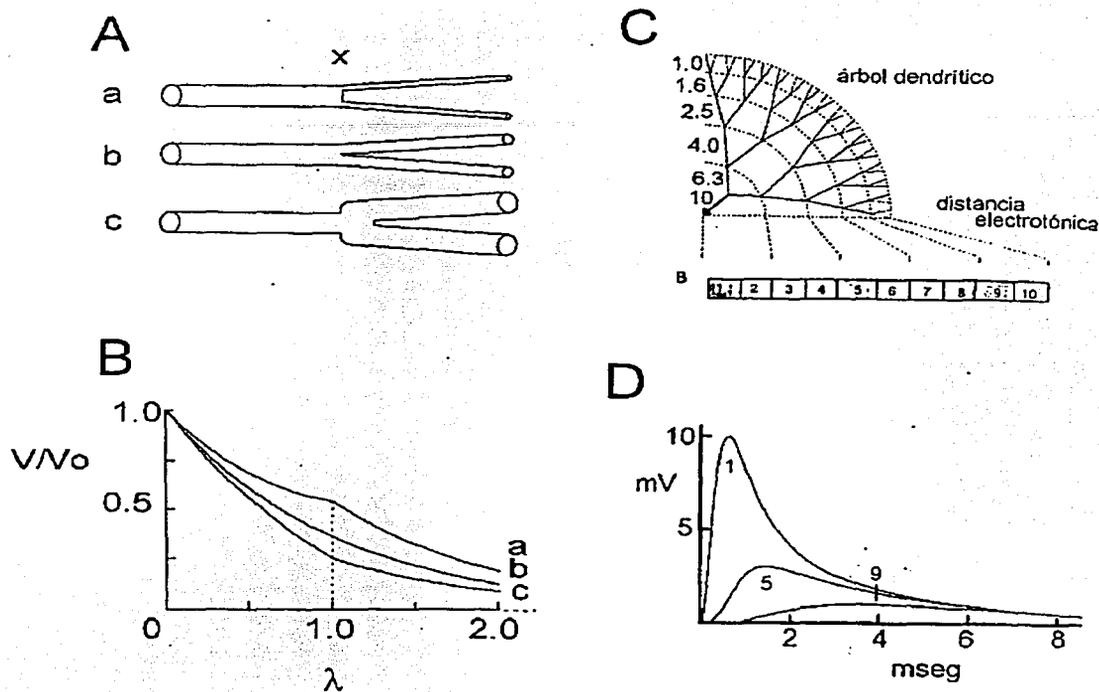
Las propiedades pasivas de las dendritas, junto con la localización de las entradas sinápticas determinan en gran parte la amplitud y duración de los potenciales postsinápticos excitadores (PPEs) registrados en el soma (Rall, 1959). Los estudios de Bloomfield y cols. (1987) sobre neuronas del núcleo geniculado del gato y el estudio de Bras y cols. (1987) de las motoneuronas del tallo cerebral del gato, son ejemplos de la importancia de combinar el análisis de las propiedades de cable con la geometría de las dendritas para entender diferentes modos de integración.

Fatt y Katz (1951) demostraron que la amplitud y el tiempo de subida de un potencial decaen a lo largo de la distancia a partir del sitio de iniciación. Las constantes de espacio y tiempo definen la caída electrotonica de los potenciales sinápticos. Dado que la membrana filtra señales de alta frecuencia, la forma y duración de los potenciales son críticas para su propagación a lo largo de fibras nerviosas. Los potenciales lentos se propagan más que los rápidos. Las señales lentas y los voltajes estacionarios se propagan con una pérdida debida fundamentalmente a la constante de espacio. La forma del potencial sináptico así como la resistencia de la membrana modulan la eficiencia de propagación.

La geometría del árbol dendrítico, en especial las ramificaciones, también desempeña un papel fundamental en la propagación pasiva de impulsos. Si la dendrita tiene un diámetro constante el potencial caerá uniformemente. Sin embargo, en los sitios de ramificación la relación entre el diámetro del cilindro madre y los de las hijas alteran la caída del potencial. Para que la caída de potencial sea homogénea, los diámetros de los cilindros madre e hijos deberán cumplir la función de potencia:

$$d_m^{3/2} = \sum d_h^{3/2}$$

Donde  $d_m$  es el diámetro del cilindro madre y  $d_h$  es el diámetro de los cilindros hijos. Si  $\sum d_h^{3/2}$  es menor que  $d_m^{3/2}$  la caída de potencial es menor que la esperada; si la relación de igualdad se cumple, la fibra se comporta como una sola de diámetro constante; si  $\sum d_h^{3/2}$  es mayor que  $d_m^{3/2}$  la caída de voltaje sobrepasa la esperada (Fig. 4).



**Figura 4. Influencia de la geometría del árbol dendrítico en la propagación del potencial sináptico.** **A)** La geometría de los sitios de ramificación influye en la propagación de los potenciales sinápticos. La caída de potencial estacionario es exponencial a lo largo de cilindros de diámetro homogéneo. En caso de ramificaciones, si la suma de los diámetros de las dendritas hijas a la  $3/2$  es igual al diámetro de la dendrita madre a los  $3/2$  entonces es como si fuera una dendrita sin ramificaciones de diámetro homogéneo. **B)** Tres casos de ramificaciones con diferentes relaciones de potencia de  $3/2$  entre los diámetros de la neurita madre y las hijas. En **a** la relación de potencia  $3/2$  es menor, en **b** se cumple la relación de potencia y en **c** la relación es mayor. **C)** Representación de una dendrita con ramificaciones en las que se cumple la relación de potencia  $3/2$  y el cilindro equivalente, en la parte inferior. Cada número representa el segmento correspondiente. **D)** Potenciales simulados que se registrarían en los segmentos 1, 5, y 9 (Tomado de Fernández de Miguel, 1998).

La mayoría de los potenciales sinápticos no llegan al umbral para producir un potencial de acción por lo que muchas de estas entradas deben actuar juntas para lograr producir un impulso. La forma de integrar la información de diferentes botones sinápticos es por medio de la suma espacial o temporal (Fernández de Miguel, 1998). En caso de que en una neurona coexistan entradas sinápticas químicas y eléctricas, los potenciales sinápticos pueden cruzar por la sinapsis eléctrica a la célula contigua, de modo que cada neurona integra los potenciales propios y los de su homóloga para producir impulsos (De-Miguel et al., 2001).

### **La Sanguijuela como Modelo de Estudio**

La sanguijuela fue popularizada por Stephen Kuffler y David Potter en los años 1960s y ha sido utilizada por varios más en diferentes líneas de investigación: exocitosis (Bruns y Jahn, 1995; Bruns et al., 2000); aprendizaje (Sahley, 1995); formación de sinapsis (De-Miguel y Vargas, 2000), desarrollo (Revisión por Kristan et al., 2000); interacción entre células sensoriales y motoras (Nicholls y Purves, 1970; Kristan, 1982; Lockery y Kristan, I., 1990a; Zoccolan y Torre, 2002), integración (De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al., enviado) y el estudio de los circuitos que subyacen a diversos comportamientos en la sanguijuela (Willard, 1981; Kristan et al., 1982; Lockery y Kristan, II.b, 1990; Wilson et al., 1996).

El interés en el estudio de su sistema nervioso se debe a varias características comunes a sus ganglios segmentales. Cada ganglio contiene un número pequeño de neuronas (*Hirudo medicinalis* 400 y *Haementeria officinalis* 320; Izquierdo y Fernández de Miguel, 1996); las células de los ganglios son grandes y muchas de ellas pueden identificarse por su tamaño, posición y electrofisiología; es posible realizar registros múltiples e identificar las conexiones entre células determinadas. Esto permite estudiar aspectos celulares, electrofisiológicos, de conectividad, y hasta conductuales. Por todo lo anterior la sanguijuela ha sido y sigue siendo un excelente modelo para estudios integrales del sistema nervioso ya que pueden abarcarse con un mismo modelo, aspectos a todos los niveles.

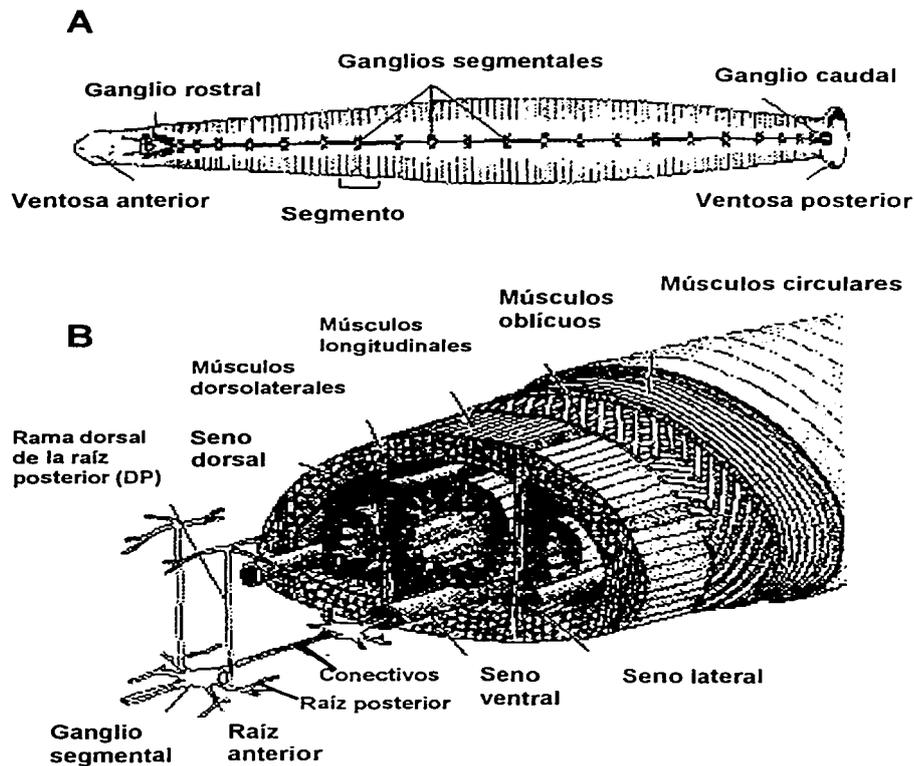
## **Sistema Nervioso de las Sanguijuelas**

El sistema nervioso central (SNC) de las sanguijuelas está compuesto por ganglios que se encuentran en un cordón ventral, y cada uno de éstos innerva un segmento específico (Fig. 5). Hay 34 ganglios. La fusión de 6 de ellos constituye el ganglio rostral, formado por el ganglio supraesofágico (2 ganglios) y el ganglio subesofágico (4 ganglios). Siete ganglios forman el ganglio caudal y hay una cadena de 21 ganglios segmentales (Brodfuehrer y Thorogood, 2001).

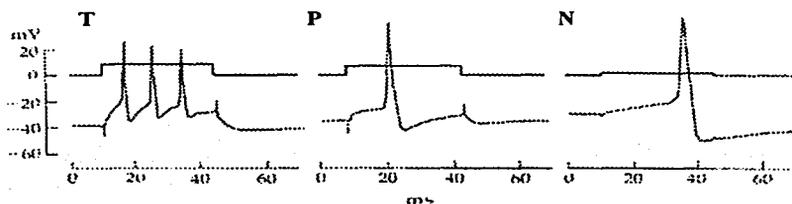
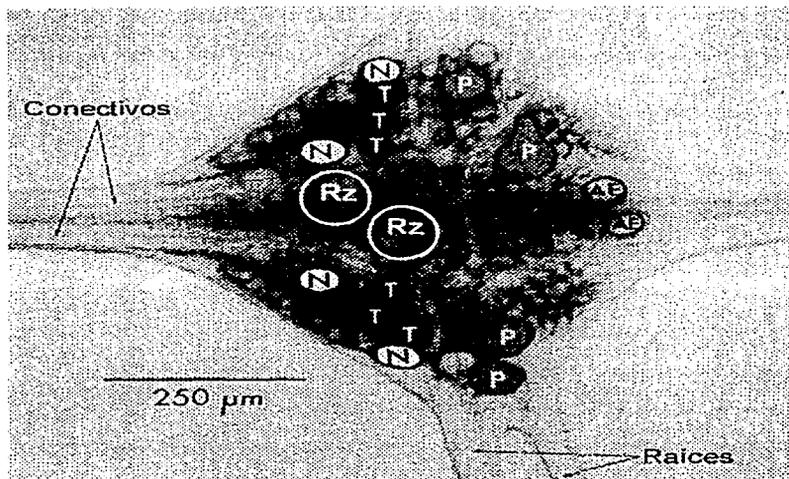
Cada ganglio tiene conectivos que consisten de dos haces de axones que corren adyacentes a los ganglios. Los conectivos contienen varios miles de axones no mielinizados de menos de 4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cada ganglio tiene una raíz anterior y una posterior de cada lado. Los axones de la raíz innervan la pared y las vísceras circundantes. Los ganglios 5 y 6 mandan otro nervio a los genitales. El SNC, en *Hirudo medicinalis*, está dentro de un seno sanguíneo. No hay capilares en el SNC, pero el intercambio con la sangre se da por difusión. Las células están segregadas en seis paquetes, cada uno de los cuales está asociado a una gran célula glial. La posición de las células es más o menos constante y pueden ser reconocidas. Del lado ventral destacan: dos neuronas de Retzius y las neuronas mecanosensoriales T, P y N (Nicholls y Baylor, 1968; Fig. 6).

### **Morfología de las Neuronas de Retzius**

Las neuronas de Retzius son las células de mayor tamaño en el ganglio y fueron descritas por el anatomista Retzius, en honor al cual llevan el nombre. Su soma está orientado hacia la parte anterior. De su base parte un proceso primario que se dirige a la parte posterior ipsilateral (del mismo lado que el soma) y se bifurca cerca del centro del ganglio. Cada neurona de Retzius manda ramas por las raíces ipsilaterales y antes de salir se bifurcan para dar origen a ramas más delgadas que salen por los nervios conectivos ipsilaterales anterior y posterior hacia los ganglios adyacentes (Mason y Leake, 1978; Smith et al., 1975).



**Figura 5. Organización del sistema nervioso de la sanguijuela. A)** Lado ventral de la sanguijuela, donde se aprecia la cadena de ganglios. Hay 34 ganglios, seis se fusionan en el ganglio rostral, siete se fusionan en el ganglio caudal y hay 21 ganglios segmentales. Cada segmento está compuesto por 5 anillos. **B)** Corte transversal de una sanguijuela. El cordón nervioso está dentro del seno venoso ventral y cada ganglio de la cadena se une por conectivos e innerva la pared del cuerpo vía las raíces nerviosas (Tomado de: Nicholls, et al., 1992).



**Figura 6. Arreglo citoarquitectónico de un ganglio de sanguijuela.** Potenciales de acción en neuronas mecanosensoriales. En el panel superior se ve la fotografía del ganglio de la sanguijuela con las neuronas mecanosensoriales marcadas: T, P y N , que responden a tacto, presión y estímulos nocivos, respectivamente. También marcadas están las neuronas motoras AE, responsables de la contracción de los anillos de la piel. En el panel inferior vemos registros intracelulares que muestran potenciales de acción producidos en diferentes neuronas mecanosensoriales. Las neuronas T disparan repetidamente durante una despolarización sostenida. Las neuronas N se caracterizan por su gran hiperpolarización al final del potencial de acción (Tomado de Nicholls, et al., 1992).

REVIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Lent (1973) demostró que la morfología y fisiología de las neuronas de Retzius de cuatro especies distintas de sanguijuela son similares. Vargas (1999) mostró que del proceso primario emerge un árbol dendrítico que se expande en el plano horizontal. Las neuritas que surgen del proceso primario se dirigen hacia el neuropilo en donde tienen sus puntos terminales. Las dendritas más largas se dirigen hacia las regiones anterior o posterior del ganglio sin cruzar hacia la región contralateral (del lado opuesto a donde está el soma). La zona de contactos entre las dos células es la neuropila, en la región medial del ganglio (Fig. 7).

La longitud de las dendritas varía entre 14 y 115  $\mu\text{m}$ , con una media similar de una célula a otra (45 - 50  $\mu\text{m}$ ). Las dendritas cortas (14 a 20  $\mu\text{m}$ ) se dirigen hacia la parte medial o lateral del ganglio y no forman contactos con la neurona homóloga. Las dendritas medias (35-55  $\mu\text{m}$ ) se dirigen hacia la parte medial del ganglio sin cruzar la línea media y hacen contacto con sus equivalentes de la célula contralateral. El 70 % de las dendritas no están ramificadas y su diámetro es constante desde la base hasta la punta. El 30 % restante tiene de una a cinco ramificaciones. Los diámetros de las dendritas hijas y los de la rama madre no cumplen la relación de potencia de  $3/2$  ya que el diámetro de las ramificaciones es similar al de la madre en todos los casos (Vargas, 1999).

Estudios morfoanatómicos mediante doble tinción en las neuronas de Retzius de *Heamenteria officinalis* permitieron cuantificar los posibles sitios de contactos entre las neuronas de Retzius. Se determinaron entre 90 y 120 posibles sitios de contacto, 80 % de los cuales serían entre dendritas mediales no ramificadas con longitudes de 50  $\mu\text{m}$  promedio y cuyo diámetro fue homogéneo a todo lo largo. La mayoría (70 %) de los contactos estaban en las dendritas no ramificadas, por lo que se postuló que podían ser equiparadas a un cable equivalente (Vargas, 1999). Estos conteos se realizaron a partir de imágenes confocales. Sin embargo, a pesar de que la microscopía confocal es una técnica de alta precisión óptica, para estructuras finas como las dendritas el ruido de fondo puede impedir una cuantificación fiable por lo que el papel de las entradas eléctricas podría estar sobrestimado.



**Figura 7. Reconstrucción tridimensional de neuronas de Retzius en el ganglio.**

Se tomaron series X/Y/Z de dobles tinciones de neuronas de Retzius y se realizó la reconstrucción tridimensional. Las ramas en las que se establecen contactos están dirigidas hacia la parte medial del ganglio. Se aprecian otras ramas que se dirigen hacia otras zonas.

## **Modos de Liberación de Neurotransmisor en las Neuronas de Retzius**

Las células de Retzius son monoaminérgicas, producen y liberan serotonina (Stuart et al., 1974; Henderson, 1983) que se encuentra en las vesículas de núcleo denso (Kuffler et al., 1987) y en vesículas claras a concentraciones similares (Bruns et al., 2000). El axón primario presenta vesículas claras y de núcleo denso, mientras que el soma sólo tiene vesículas de núcleo denso cuyo diámetro es ligeramente mayor al de las vesículas de núcleo denso del axón. Las vesículas claras liberan aproximadamente 4,700 moléculas de serotonina y las vesículas de núcleo denso liberan cerca de 80,000 moléculas. La exocitosis de las vesículas claras ocurre más rápidamente y con mayor frecuencia que la de las vesículas de núcleo denso a un solo potencial de acción (Bruns et al., 2000; Bruns y Jahn, 1995).

La pregunta que surge con respecto a la secreción de estas células es cuál es el estímulo que provoca esta liberación, y de qué depende cuanto neurotransmisor se libera. Estudios previos estimulando a las neuronas de Retzius directamente y midiendo la liberación de serotonina del soma y de sinapsis, muestran que la liberación de neurotransmisor guarda una relación con la frecuencia de estimulación, siendo mayor la secreción a mayor la frecuencia de estimulación. Un solo impulso y trenes con frecuencias a partir de 0.5 Hz, se asocian mayormente a liberación sináptica, mientras que la liberación somática ocurre a partir de 5 Hz y hasta 50Hz (Trueta et al., 2002). Otros estudios han mostrado el papel del calcio en la secreción en éstas neuronas, siendo una liberación de calcio inducida por calcio (Trueta y De-Miguel, 2000).

## **Integración en Neuronas de Retzius**

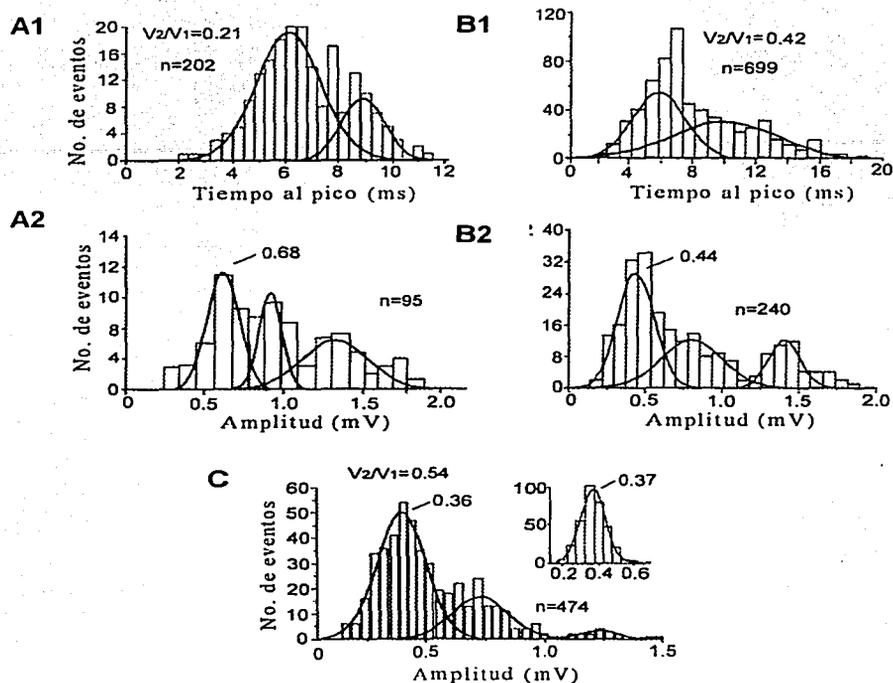
Se han identificado entradas a las neuronas de Retzius que parecen correlacionarse con los diferentes modos de liberación. Hay entradas de baja frecuencia que generan actividad espontánea y están en las dendritas acopladas (De-Miguel, 2001) y hay entradas que producen actividad de alta frecuencia que

proviene de células mecanosensoriales (Blackshaw, Trueta, Szczupak, de-Miguel, comunicación personal).

Las neuronas de Retzius están conectadas eléctricamente (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963). La actividad espontánea de las neuronas de Retzius tiene potenciales sinápticos sincrónicos que tienen fases de subida rápidas, sugiriendo que las sinapsis son cercanas al soma y que existe una entrada común para cada neurona de Retzius. En caso de fallas sobre alguna de las células, los potenciales son asincrónicos, permitiendo ver la propagación del potencial de la célula donde no hubo falla hacia la contralateral. Las distribuciones de tiempos al pico de los potenciales sinápticos, sugieren que hay un dominio principal de entradas sobre las dendritas acopladas de cada neurona, equidistante de la sinapsis eléctrica (García-Pérez et al., enviado). El cruce de PPEs a través de la sinapsis eléctrica y la procedencia contralateral de los PPEs con tiempos largos fueron corroborados por De-Miguel y cols. (2001).

Las distribuciones de amplitudes de PPEs espontáneos se ajustaron con curvas gaussianas, donde los segundos y terceros picos fueron múltiplos del primer pico, indicando que la liberación fue cuántica con picos que coincidían con eventos unitarios, dobles y triples. La integración de los potenciales sinápticos para obtener eventos múltiples depende del número de dendritas acopladas, ya que la probabilidad de tener eventos simultáneos sobre la misma dendrita o la liberación de más de un cuanto en una misma terminal será menor entre más dendritas acopladas haya (García-Pérez, et al., enviado). Por lo tanto, para entender la integración en estas neuronas es necesario obtener un estimado preciso del número de contactos entre ellas.

Las distribuciones de tiempos al pico de PPEs espontáneos presentaron dos picos, uno en 6 ms y otro en 10 ms (Fig. 8). Por medio de un modelo matemático que tomó en cuenta las propiedades de cable y la anatomía de las dendritas acopladas de las neuronas de Retzius se determinó la localización de las entradas con respecto al soma (García-Pérez et al., enviado). A partir de los tiempos al pico, variando el factor  $L$ , que es el cociente de la longitud de la dendrita entre la constante de tiempo, los valores de tiempo fueron traducidos en distancia sobre las

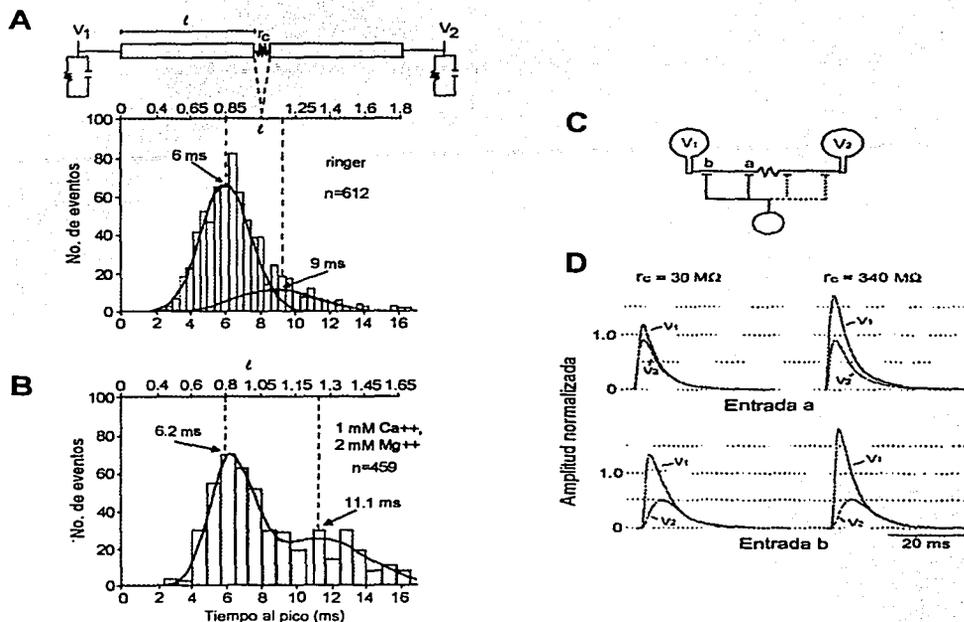


**Figura 8. Efecto del acople eléctrico en las distribuciones de amplitudes de PPEs espontáneos de neuronas de Retzius. A1)** Distribución de tiempos al pico de PPEs espontáneos registrados en una neurona con tasa de acople de 0.21, la cual se ajusta a dos gaussianas. **A2)** Distribución de amplitudes de la subpoblación con tiempos entre 4.5 y 6.5 ms, la cual se ajusta a tres gaussianas con el pico menor en 0.68 mV. **B1)** Distribución de tiempos al pico de una neurona con tasa de acople de 0.42. **B2)** Distribución de amplitudes de la subpoblación con tiempos entre 4.5 y 6.5 ms, que se ajusta a tres gaussianas con pico menor en 0.44 mV. **C)** Distribución de amplitudes de una neurona con tasa de acople de 0.54. El pico menor es de 0.36 mV. El inserto muestra la distribución de amplitudes de PPEs espontáneos registrados de una neurona con tasa de acople de 0.5 mV en solución con 100nM de TTX para bloquear actividad evocada. El pico es de 0.37 mV (Tomado de: García-Pérez et al., enviado).

dendritas (Fig. 9). Se estableció que los PPEs con tiempos cortos correspondían a un dominio de entradas ipsilaterales, mientras que los PPEs con tiempos largos eran entradas del dominio de la neurona contralateral que habían cruzado la sinapsis eléctrica. A partir de simulaciones en las que se varió el valor de la resistencia de acople ( $r_a$ ) y la constante de espacio se concluyó que el valor de  $r_n$  es el que determina la amplitud de los PPEs. Se encontró una relación directa entre  $r_n$  y la impedancia de las dendritas, por lo que se dió una compensación de la amplitud de los PPEs. La neurona contralateral siempre recibe un PPE propagado de la misma amplitud de manera que ambas neuronas de Retzius integran la información de las entradas en las dendritas acopladas como una unidad. Esto se logra por un balance de la cantidad de corriente que se propaga dependiendo del valor de la resistencia de acople: a valores chicos la corriente puede propagarse a la neurona contralateral y a valores grandes, aunque se propague menos corriente, la atenuación se compensa por el incremento proporcional de la impedancia de la dendrita (debida al aumento de resistencia de acople) de manera que casi no se fuga corriente de la dendrita contralateral (García-Pérez et al., enviado).

Por otro lado, las neuronas de Retzius responden indirectamente a estimulación mecánica. Como se mencionó anteriormente, se ha reportado la participación de las neuronas de Retzius en el nado (Willard, 1981), que se desencadena al excitarse las neuronas mecanosensoriales de tipo P y N de los ganglios anteriores (Brodfehrer y Thorogood, 2001). Estudios de Wittemberg y cols. (1990) demostraron que las neuronas P hacen contactos polisinápticos con las neuronas de Retzius.

Szczupak y Kristan (1995) postularon que las neuronas P excitan a ambas neuronas de Retzius en sitios cercanos al sitio de acople entre ellas. Demostraron también que cada una de las cuatro neuronas P tiene efectos similares en las neuronas de Retzius y que las neuronas P homólogas contralaterales comparten vías de interneuronas, por lo que proveen información bilateral casi idéntica a ambas neuronas de Retzius. Mostraron que cada neurona P excita las neuronas de Retzius de los ganglios anterior y posterior al sitio de estimulación y que la señal es llevada a lo largo de todo el cordón nervioso por vías interneuronales.



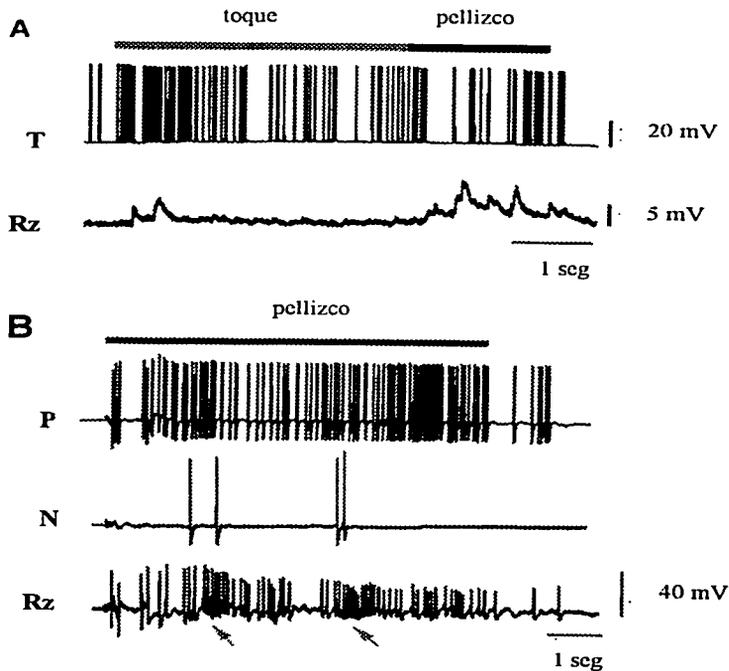
**Figura 9. Localización de las entradas sinápticas.** **A)** Representación del circuito formado por las neuronas de Retzius en términos de componentes eléctricos. Distribuciones con dos picos para los tiempos al pico de los PPEs espontáneos registrados en V1, sugiriendo dos principales dominios de entradas sinápticas. Variando el coeficiente  $L$ , el modelo traduce los tiempos al pico a las distancias electrotonicas equivalentes en ambos lados de la unión comunicante. **B)** Distribución de tiempos al pico en presencia de bajo  $\text{Ca}^{++}$  y alto  $\text{Mg}^{++}$ . En estas condiciones el segundo pico se hace más evidente. **C)** Representación diagramática de las neuronas de Retzius acopladas y de una neurona presináptica. Las letras a y b representan dos sitios de entrada. **D)** Amplitud normalizada de PPEs simulados vistos en V1 y V2 para entradas localizadas en a (panel superior) o b (panel inferior) del modelo de acople de las neuronas de Retzius. A la izquierda se presentan las amplitudes para una resistencia de acople ( $r_c$ ) de  $30 \text{ M}\Omega$  y a la derecha con una resistencia de  $340 \text{ M}\Omega$  (Tomado de: García-Perez, et al., enviado).

Experimentos realizados por Blackshaw, Trueta, Szczupak y De-Miguel (comunicación personal) sugieren que las neuronas de Retzius responden a estimulación mecánica en la piel y que su actividad se correlaciona con la actividad de las células mecanosensoriales, respondiendo con trenes de alta frecuencia. La respuesta de las neuronas Retzius sigue la de las neuronas P a la estimulación en la piel y la respuesta de la neurona de Retzius es máxima al activarse las neuronas P y N (Ver Fig. 10). Estos experimentos indican que las neuronas de Retzius responden a estimulación mecánica y que no sólo las neuronas P tienen contacto con las neuronas de Retzius sino también las neuronas T y N.

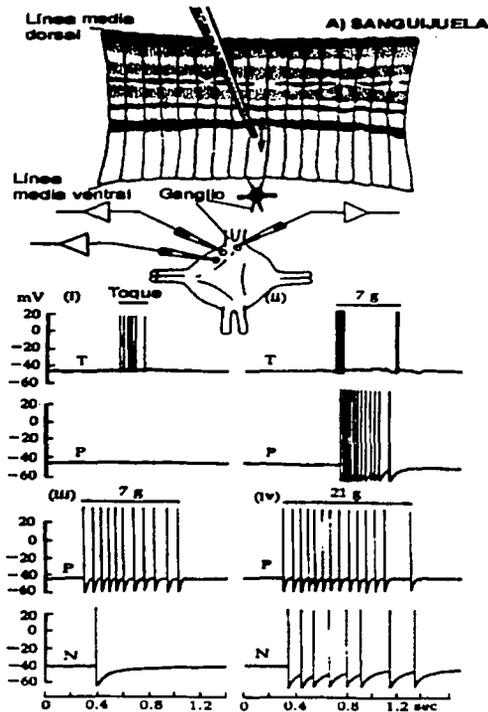
### **Neuronas Mecanosensoriales en la Sanguijuela**

Nicholls y Baylor (1968) identificaron 14 neuronas sensoriales centrales por su tamaño, forma, posición, propiedades eléctricas y curso temporal de adaptación. Al estimular la piel con distinta fuerza se activan diferencialmente las neuronas mecanosensoriales dependiendo de la intensidad del estímulo. Hay 3 neuronas sensibles a tacto (T) de cada lado del ganglio. Al estimular la piel con un toque breve de 2 mN las neuronas T del ganglio central y de los adyacentes dispararan 1 o 2 potenciales de acción; la respuesta es de adaptación rápida. Hay dos neuronas sensibles a presión (P) de cada lado del ganglio y su respuesta es de adaptación lenta. Con una fuerza de 20 mN las neuronas P de los ganglios centrales y vecinos disparan potenciales de acción. Los potenciales de acción en las neuronas P siguen a los de las neuronas T. Las neuronas que responden a estímulos nociceptivos (N) requieren estímulos de más de 50 mN para disparar potenciales de acción y son dos de cada lado del ganglio. Su respuesta es de adaptación lenta y siguen disparando después del estímulo. A esta fuerza de estímulo la mayoría de las células en los tres ganglios disparan también (Nicholls y Baylor, 1968; Pinato y Torre, 2000; Fig. 11).

Los axones de las neuronas mecanosensoriales van a la periferia por las raíces nerviosas ipsilaterales y conducen impulsos aferentes. Los campos receptivos de las 14 neuronas sensoriales son discretos y de tamaño, forma y



**Figura 10. Estímulos en la piel generan respuesta en la Retzius. A)** Respuesta de las neuronas T y Retzius al estimular la piel con un toque y con un pellizco. **B)** Respuesta de las neuronas P, N y Retzius a un pellizco en la piel. La mayor respuesta en la neuronas de Retzius se da cuando la N responde (flechas) (Tomado de Velázquez-Ulloa, et al., enviado).



**Figura 11. Respuestas de las neuronas mecanosensoriales a estímulos en la piel.** Se realizaron registros intracelulares de las neuronas mecanosensoriales T, P, y N. La preparación consistió en un pedazo de piel unida al ganglio segmental correspondiente. En (i), vemos la respuesta de la neurona T a un toque ligero que sólo activa ésta célula. (ii) presenta la respuesta de las neuronas T y P a un estímulo más fuerte. Esta vez las neuronas P tienen una respuesta prolongada y las neuronas T tienen respuesta al inicio y final del estímulo. En (iii y iv) vemos la respuesta de la neurona N, que necesita mucha más fuerza de estímulo para activarse (Tomado de Nicholls, et al., 1992).

posición constantes de un segmento a otro y de un animal a otro. Sus límites están relacionados con las marcas naturales en la piel por lo que pueden ser identificados a simple vista. Los campos se sobrelapan en sus márgenes con los campos de neuronas homólogas del mismo ganglio y de los ganglios vecinos (Nicholls y Baylor, 1968).

Los árboles dendríticos de las células mecanosensoriales son ipsilaterales (Nicholls y Purves, 1970), aunque las neuronas P y N extienden ramas secundarias a la zona contralateral del ganglio (Muller y McMahan, 1976; Gu, 1991; Fig. 12).

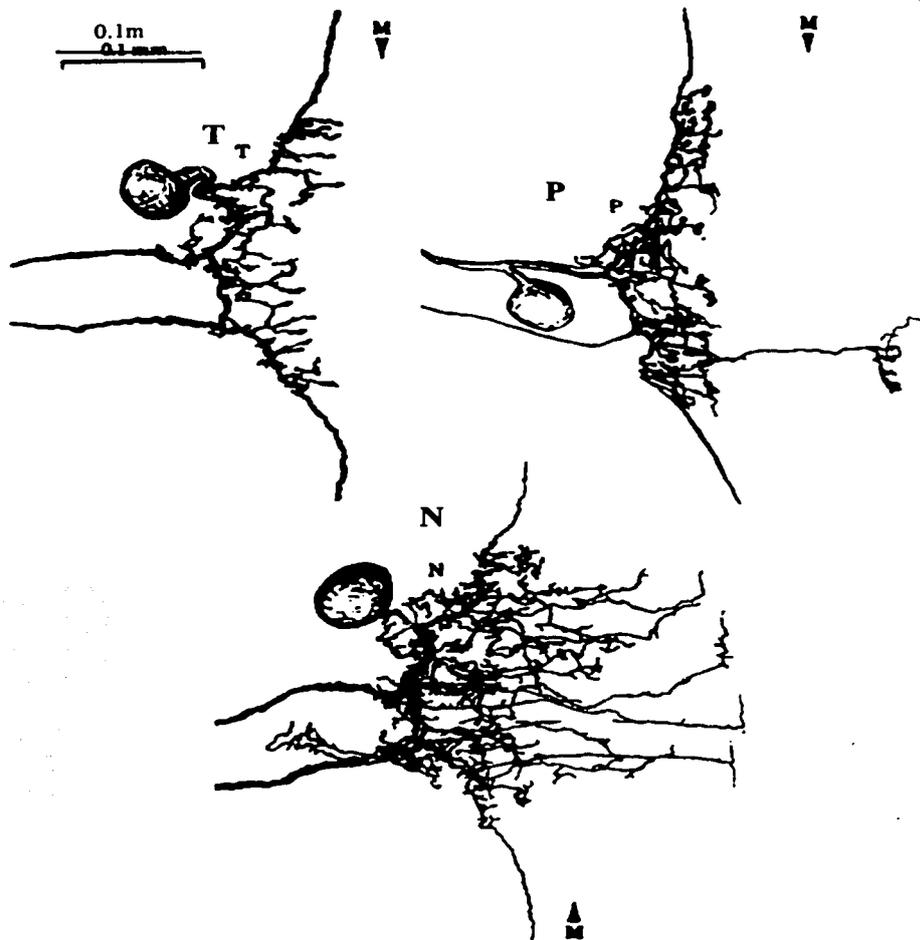
Los potenciales de acción de éstas células también son distintivos. En la neurona T son más pequeños y cortos que los de las N y P; las neuronas N se caracterizan por tener una larga repolarización (Nicholls y Baylor, 1968).

### **Integración en Neuronas Mecanosensoriales**

Se ha mostrado que las neuronas T interactúan entre sí a través de sinapsis químicas y eléctricas. Las sinapsis eléctricas de las neuronas T son rectificantes. Además, las neuronas T tienen entradas inhibitorias de tipo químico comunes al menos a las tres neuronas T ipsilaterales del mismo ganglio y probablemente con interneuronas que a su vez inhiben las neuronas T contralaterales y de las ipsilaterales de los ganglios adyacentes. Las neuronas P producen inhibición en las neuronas T por un contacto químico que también actúa en las tres neuronas T ipsilaterales. Las neuronas P también hace sinapsis en la neurona N, provocando potenciales excitadores (Baylor y Nicholls, 1969).

Hay dos poblaciones de neuronas mecanosensoriales que codifican la información del tacto, las P y las T, pero las neuronas P son las relevantes para el comportamiento. Las neuronas T y N tienen una contribución menor como potenciadoras de la respuesta (Lewis y Kristan, 1998; Zoccolan y Torre, 2002).

Carlton y McVean (1995) aplicaron estímulos mecánicos en la piel de magnitudes que imitaran el tipo de estímulos que una sanguijuela podría experimentar en condiciones naturales. Sus experimentos sugieren que las neuronas T interpretan el ambiente mecánico ya que responden a cambios en la



**Figura 12. Morfología de las neuronas mecanosensoriales.** Los procesos secundarios de las neuronas sensibles al tacto (T), a la presión (P) y a los estímulos nociceptivos (N) emergen del proceso principal y de sus ramas primarias; la mayoría están dirigidas medialmente. La distribución de los procesos y su patrón de ramificación son característicos de cada neurona. Las neuronas T tienen ramas en la región ipsilateral. Las neuronas P y N extienden ramas a la región contralateral también. (Tomado de Müller, K.J. y McMahan, U.J., 1976)

deformación de la piel producida por roce con objetos externos. Al responder a incrementos y decrementos de la deformación de la piel, las neuronas T no darían una clara imagen del entorno. Las neuronas T codifican la velocidad de la indentación y no la presión. Las neuronas P, que disparan tónicamente, darían una imagen más integrada de como se va deformando la piel y podrían desencadenar comportamiento. Concluyeron que cuando las sanguijuelas exploran su entorno e inician contacto con otros objetos el umbral de la neuronas N es raramente alcanzado. De las tres mecanoneuronas, las neuronas T dan la mayor información al animal sobre el contacto, aunque las neuronas P son también ocasionalmente reclutadas.

### **Estimulación Mecánica, Integración y Neuromodulación**

En la sanguijuela, se han realizado muchos trabajos sobre la codificación de los estímulos mecánicos en la piel por los receptores mecanosensoriales y como éstos a su vez interactúan con una serie de interneuronas y motoneuronas para llevar a cabo un patrón motor o comportamiento específico. Ejemplo de esto son los trabajos sobre la flexión local, el nado, la alimentación y el acortamiento en la sanguijuela (Nicholls y Baylor, 1968 ; Baylor y Nicholls, 1969 ; Nicholls y Purves, 1972 ; Kristan et al., 1982; Kristan, 1982; Lockery y Kristan, 1990, a y b; Lewis y Kristan, 1998 ; Pinato y Torre, 2000 ; Zoccolan y Torre, 2002).

En otra línea de investigación, otros trabajos se han enfocado en el papel de la serotonina como modulador de los comportamientos de la sanguijuela. Willard (1981) reportó que la estimulación de neuronas que contienen serotonina logra activar el programa de nado. También mostró que las neuronas de Retzius incrementan su frecuencia de disparo durante el nado y generan los altos niveles de serotonina en sangre que siguen a episodios de nado múltiples. La serotonina secretada por las neuronas de Retzius también desempeña un papel en la fase apetitiva de la alimentación y se propone que éstas células y la serotonina que liberan centralmente y en la pared del cuerpo tiene un papel modulador general de las actividades locomotoras de la sanguijuela (Wilson et al., 1996).

La serotonina en la sanguijuela también modula formas de plasticidad sináptica como el aprendizaje (Sahley, 1995) y el bloqueo de conducción (Gu 1991). El trabajo de Mar y Drapeau (1996) mostró que la serotonina liberada por las neuronas de Retzius modula el bloqueo de conducción de los campos receptivos menores de las neuronas mecanosensoriales. Burrell y cols. (2001 y 2002) mostraron que la serotonina también modula los patrones de actividad de la célula S, responsable de la deshabitación y sensibilización del reflejo de acortamiento de la sanguijuela.

Los trabajos sobre nado habían demostrado que las neuronas de Retzius eran activadas rítmicamente durante el patrón motor de nado y que liberan serotonina masivamente y de manera difusa al SNC de la sanguijuela. Las neuronas mecanosensoriales ya habían sido caracterizadas (Nicholls y Baylor, 1968; Baylor y Nicholls, 1969; Blackshaw, et al., 1982) y eran buenos candidatos para hacer conexión con las neuronas de Retzius; ya que se sabía de su activación en el nado y en otros comportamientos que son modulados por serotonina.

Wittemberg y cols. (1990) estudiaron las diferencias entre las conexiones de ganglios sexuales con segmentales y concluyeron que las neuronas P tienen contactos polisinápticos con las neuronas de Retzius. Szczupak y Kristan (1995) caracterizaron el tipo de contactos entre las neuronas P y las de Retzius y plantearon que las neuronas P podrían producir la liberación masiva de serotonina de las neuronas de Retzius. Estos estudios apuntaban a que las neuronas mecanosensoriales pudieran provocar liberación masiva de las neuronas de Retzius y desencadenar la modulación de los comportamientos de la sanguijuela.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El presente trabajo pretende estudiar el número de contactos entre las neuronas de Retzius como un índice de la contribución de las entradas eléctricas en la integración y las conexiones entre las neuronas de Retzius y las neuronas mecanosensoriales como representantes de la actividad de alta frecuencia con el fin de elucidar las características de entradas que pudieran permitir que una neurona

pase de tener liberación sináptica a somática dependiendo de la integración de los estímulos que les lleguen.

Suponemos que la activación de las entradas de las neuronas mecanosensoriales pudiera desencadenar liberación somática de serotonina. De ser así, el nivel de actividad de las neuronas mecanosensoriales sería uno de los factores que regularía la cantidad de serotonina liberada por las neuronas de Retzius.

## **HIPÓTESIS**

La actividad eléctrica de baja frecuencia (0.5- 5 Hz) de las células de Retzius es generada por potenciales sinápticos espontáneos que se originan en las dendritas acopladas. Esta actividad desencadenará únicamente liberación sináptica de neurotransmisor. La estimulación sensorial mecánica incrementa la actividad sináptica en las neuronas de Retzius hasta producir en ellas trenes de disparo de frecuencias hasta de 10-50 Hz, que correlacionan con la liberación somática.

La pregunta a estudiar fue si los potenciales espontáneos y los evocados por neuronas mecanosensoriales en las neuronas de Retzius son producidos por la misma vía.

a) De ser así, los potenciales producidos por las neuronas T, P y N se originarían en las dendritas acopladas. Al aumentar la probabilidad de producir potenciales sinápticos en ellas, la integración se iniciaría en estas dendritas y no en el axón primario. Los cambios presinápticos en la probabilidad de liberación, el número de dendritas acopladas y la fuerza de la estimulación determinarían el efecto del acople eléctrico en la integración, de manera que la suma de PPEs dependería de las diferencias en el tiempo y en las amplitudes (asincronías y asimetrías).

b) De tratarse de vías distintas, la localización de las entradas sinápticas determinaría la forma de la integración.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

Parte I) Cuantificar los contactos entre pares de neuronas de Retzius a partir del procesamiento y análisis de imágenes confocales con doble tinción para poder predecir a partir del número de dendritas acopladas y de la probabilidad de aparición de eventos unitarios, el tipo de integración que se lleva a cabo.

Parte II) Analizar las características de las respuestas de las neuronas de Retzius a la estimulación de las neuronas T, P y N para probar a) si comparten vías comunes y b) si son las mismas o similares a aquellas que producen los potenciales sinápticos espontáneos.

### **Objetivos Particulares de la Parte I**

- a) Cuantificar el número de sitios de contacto mediante imágenes confocales en X, Y, Z de dobles tinciones de pares de neuronas de Retzius por medio del proceso de deconvolución. Lo anterior permitirá eliminar el ruido de fondo y obtener imágenes de mayor contraste y definición, diferenciando las dendritas de las neuronas de manera que sitios que parecieran adyacentes debido a superposición de luz fuera de foco serán eliminados.
- b) Analizar estas imágenes cuantificando el número de contactos.

### **Objetivos Particulares de la Parte II**

- a) Analizar las respuestas de las neuronas de Retzius a la estimulación de neuronas mecanosensoriales. Se medirán la amplitud, tiempo al pico, latencia y la probabilidad de respuesta por estímulo para cada célula. Estos parámetros darán información sobre si las conexiones entre las neuronas mecanosensoriales y las neuronas de Retzius son las mismas o diferentes para cada mecanoneurona.
- b) Mediante la utilización de ringer con alto  $Mg^{++}$  y alto  $Ca^{++}$ , analizar la naturaleza mono o polisináptica de la interacción neurona de Retzius-neurona mecanosensorial.

## **MÉTODOS**

### **Disección**

Se aislaron los ganglios de acuerdo a Nicholls y Baylor (1968) colocándolos en una caja de Petri con Sylgard y solución Ringer. La cadena de ganglios se clavó al Sylgard con la parte ventral hacia arriba. La caja de Petri se colocó en el sistema de registro bajo un microscopio estereoscópico para su manipulación y observación.

### **Identificación de las Neuronas de Interés**

Las neuronas de Retzius se identificaron por su ubicación y por su tamaño, al ser las neuronas más grandes con un diámetro promedio de 53 micras (Lent, 1973). El registro intracelular confirmó la identidad de las neuronas (potencial de reposo y de acción similares a los reportados por Lent (1973). Las neuronas mecanosensoriales en el ganglio (T, P y N) fueron identificadas por su tamaño (las T entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ ; las P entre 30 y 40  $\mu\text{m}$  y las N entre 35 y 45  $\mu\text{m}$ ) y por su posición en el ganglio, encontrándose en los paquetes laterales anterior (T y N) y posterior (P). Se corroboró su correcta identificación registrando intracelularmente y estimulándolas, de manera que produjeron un potencial de acción, que pudo ser reconocido por sus características y relacionado a cada tipo de neurona mecanosensorial (Muller, 1981).

### **Obtención de las Imágenes de Dobles Tinciones de Neuronas de Retzius**

Las imágenes utilizadas en el presente estudio fueron realizadas por Mariana Vargas, Verónica González Arce y el Dr. Francisco Fernández de Miguel, quienes realizaron las tinciones de las neuronas, el montaje de las preparaciones y la toma de imágenes por microscopía confocal como parte de un proyecto de tesis de licenciatura. El presente estudio utilizó éstas imágenes y las procesó mediante

deconvolución para lograr una caracterización más detallada de los contactos entre las neuronas de Retzius. Para determinar el número de sitios de contacto entre las neuronas de Retzius se analizaron imágenes confocales de tinciones dobles de 7 pares de neuronas de *Haementeria officinalis*. Una neurona de Retzius de cada par fue teñida con Amarillo Lucifer y la otra con Rojo Texas. Estos colorantes fueron elegidos porque no cruzan la sinapsis eléctrica y debido a que sus espectros de emisión casi no se sobrelapan (picos de emisión: 522 y 680nm, respectivamente).

Para inyectar el colorante se utilizó un puller de micropipetas Flaming-Brown modelo P-97, que permite estirar capilares (capilares 30-30-0 de la compañía FHC) controlando la presión, fuerza de estiramiento, temperatura y velocidad del proceso para obtener resistencias y formas de punta con las características necesarias para diferentes tipos de experimentos. Se creó un programa para registro intracelular para obtener electrodos con resistencias entre 15 y 30 M $\Omega$  (con KCl 3M). Los electrodos se llenaron con una solución con LiCl 0.1 M para inyección de Amarillo Lucifer 3% en agua destilada; con esta solución las resistencias de los electrodos fueron de 80 a 100 M $\Omega$ . El colorante Rojo Texas se diluyó en agua destilada, se agregó verde rápido al 4% y el electrodo se llenó con KCl. Los colorantes se cargaron en el electrodo por capilaridad; dejando que se llenara la punta y luego llenando el electrodo con la solución conductora correspondiente.

Una vez llenos los electrodos con la solución requerida se acercaron a la célula requerida mediante manipuladores especiales, hasta acercarlos a la célula requerida. Se ajustó la iluminación y se empalaron las células.

### **Amarillo Lucifer**

Este colorante está cargado negativamente y se inyectó por iontoforesis. Se hizo pasar una corriente negativa de 7 nA, en pulsos de 500 ms, con una frecuencia de 1 Hz, durante 25-30 minutos.

### **Rojo Texas**

Este colorante se inyectó mediante una bomba de presión, monitoreando visualmente al microscopio que entrara suficiente colorante a la célula. De ésta

forma, se verificó que la célula correspondiente se tiñera de verde, indicador de que el Rojo Texas también había entrado a la célula.

Para todos los colorantes, se dejó el ganglio con las células inyectadas en solución ringer por 30 minutos para dar tiempo de que difundiera hacia las ramificaciones. Luego se fijó con paraformaldehído al 4 % en PBS por dos horas. Se lavó con PBS, se deshidrató en alcoholes al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y dos veces en 100 %, por 10 minutos cada uno. Finalmente se aclaró y montó en metilsalicilato.

### **Adquisición de Imágenes por Microscopía Confocal**

Se adquirieron imágenes confocales en series X, Y, Z de manera que se abarcaran el árbol dendrítico y una parte del soma de la neurona en el campo de visión al moverse sobre el eje Z en pasos de 1 $\mu$ m. Las coordenadas de X, Y se mantuvieron fijas. Se utilizó un objetivo Nikon de inmersión en aceite, 40X de aumento y 1.0 de apertura numérica.

Cada preparación constó de dos neuronas teñidas con colorantes que fluorescen en distinta longitud de onda, las imágenes se tomaron seleccionando los parámetros de espectro de excitación y de emisión para cada colorante (480 nm excitación, 522 nm emisión para el Amarillo de Lucifer), de manera que sólo la neurona teñida con ese colorante apareciera en el campo de visión. Una vez tomados todos los planos de una neurona, se cambiaron los parámetros de excitación y emisión (588 nm excitación, 680 nm emisión para el Rojo de Texas) por los del otro colorante y se procedió a adquirir las imágenes de esta otra célula.

### **Procesamiento Digital de Imágenes**

Los diámetros de las dendritas de las neuronas de Retzius varían entre 1 y 1.8  $\mu$ m (Vargas, 1999). Para calibrar el equipo y determinar si era posible resolver los puntos de contacto entre las dendritas, se obtuvieron imágenes de microesferas

fluorescentes de diámetro conocido (0.5  $\mu\text{m}$  con fluorescencia verde y 2  $\mu\text{m}$  con fluorescencia roja). Estos diámetros están en el intervalo de diámetros esperados para los puntos de contacto. La capacidad de resolver correctamente el diámetro de estas esferas es el control para determinar que los puntos de contacto entre las neuronas pueden ser analizados.

Se adquirieron series de imágenes en X, Y, Z con pasos en Z de 0.2  $\mu\text{m}$ . Las series de imágenes de las microesferas de 0.5 y de 2  $\mu\text{m}$  se procesaron por separado mediante el algoritmo de deconvolución del programa XCOSM 2.3 (Conchello y Lichtman, 1994; Conchello, et al., 1994; Conchello, 1998; Conchello, 1995) utilizando diferente número de repeticiones para ver como afectaba este factor el procesamiento de las imágenes. Posteriormente se realizaron reconstrucciones tridimensionales de las series de imágenes resultantes de los diferentes números de repeticiones. Se cuantificó el diámetro de las microesferas y se comparó con los diámetros obtenidos para las reconstrucciones tridimensionales de las series originales, teniendo como referencia el valor de diámetro conocido.

El algoritmo de deconvolución del programa XCOSM permite restar la luz fuera de foco de la imagen calculando la función de desvío puntual (FDP) del conjunto de imágenes. La FDP calcula como es desviada la luz para cada punto de la imagen en cada plano al momento de adquirir las imágenes. Incluso utilizando microscopía confocal que es una técnica de bajo ruido, dependiendo de las características del microscopio, fluoróforos y de los parámetros utilizados al tomar las imágenes, éstas pueden tener fluorescencia de fondo que no permite distinguir claramente estructuras finas. La técnica de deconvolución es un proceso repetitivo que resta la FDP de cada punto para cada plano de la imagen, por lo que se obtienen imágenes de mejor calidad y con menos luz fuera de foco. En el caso del conteo de contactos sinápticos, es vital que las imágenes que se vayan a utilizar tengan muy poco ruido para poder distinguir las neuritas y los lugares donde se establecen los contactos.

Los conjuntos de imágenes originales de pares de neuronas de Retzius, una vez probada la eficacia del proceso, también se procesaron por medio del algoritmo de deconvolución del programa XCOSM.

### **Cuantificaciones Anatómicas**

Las cuantificaciones anatómicas se llevaron a cabo con los programas Metamorph 4.01 y Confocal Assistant 4.02. Para determinar los contactos entre las neuronas de Retzius se realizaron reconstrucciones tridimensionales a partir de las series X, Y, Z de cada neurona con el Confocal Assistant 4.02. Posteriormente se sumaron digitalmente las imágenes tridimensionales de la neurona con Rojo Texas y la de Amarillo Lucifer de un mismo ganglio y se obtuvieron imágenes de una de las neuronas en color rojo, y otra en color verde (las tonalidades escogidas para las neuronas son arbitrarias y pueden cambiarse a voluntad). Se alcanzaron a distinguir puntos amarillos en la zona del árbol dendrítico de las células. Estos puntos representan los sitios donde las células coincidieron, es decir, donde hubo contacto.

La suma de imágenes no resuelve el que alguno de los puntos amarillos en la imagen corresponda a contactos o a sitios donde una rama de la neurona verde pase por abajo o arriba de una rama de la neurona roja, sin que éstas se toquen. Aun sin haber contacto, por la combinación de colores en el caso de imágenes sumadas, se vería un punto amarillo, que en realidad no corresponde a un contacto.

Para salvar este problema se utilizó una operación digital del programa Metamorph que permite obtener la intersección de dos imágenes a partir de planos X, Y de las reconstrucciones tridimensionales de cada neurona. Los contactos entre dos neuronas corresponderían a los puntos donde se intersectaran las imágenes, esto es, donde las dendritas establecieran contactos y hubiera superposición de estructuras, es decir, intersección. En esta modalidad, no existe la posibilidad de tener puntos que correspondan a ramas que se cruzan sin tocarse porque solo quedan los puntos donde los píxeles con luz coinciden.

Los conteos de los puntos de contacto se realizaron comparando las imágenes de los contactos obtenidas por intersección con las imágenes de superposición de los contactos con la reconstrucción tridimensional de una de las neuronas del par correspondiente para asegurar que los puntos de las imágenes de intersección efectivamente fueran sitios sobre los árboles dendríticos y no artificios.

### **Registro Intracelular**

Se prepararon microelectrodos para registro intracelular de la manera descrita. Los electrodos se llenaron con KCl 3 M y se introdujeron en un sujetador, que sostiene al electrodo y lo conecta al cabezal, el cual es controlado por el manipulador.

El cabezal traduce la señal eléctrica de la célula a un impulso digital que puede desplegarse en el osciloscopio y/o adquirirse en la computadora. Se introdujeron los electrodos al baño de la caja con el ganglio y se midió y compensó su resistencia. Con ayuda de los manipuladores, los electrodos se movieron para empalar las células. Se midió su potencial de reposo para estimar su estado; si estaban muy despolarizadas con respecto a su potencial de reposo normal se desechaban.

Los microelectrodos se conectaron a preamplificadores (Almost Perfect Electronics, Basilea, Suiza) y los registros fueron filtrados por un filtro Bessel con una frecuencia de corte de 400 Hz. Los datos fueron adquiridos utilizando una tarjeta analógica-digital de modelo Digidata 1200 (Axon Instruments, Foster City, California, E.U.) y los programas Pclamp 5.0 y Pclamp 8.0. Los datos fueron almacenados en una computadora para su análisis.

### **Análisis de Conexiones Polisinápticas.**

Para determinar si las conexiones entre neuronas mecanosensoriales y de Retzius eran mono o polisinápticas nos basamos en el trabajo de Nicholls y Purves

(1970) y utilizamos una solución de  $Mg^{++}$  18 mM y  $Ca^{++}$  15 mM. La razón de usar alto  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  es que altas concentraciones de cationes divalentes incrementan la resistencia de la membrana y suben el umbral. En estas condiciones baja la probabilidad de disparo por lo que si la vía es polisináptica tal vez se logre obtener respuesta en una interneurona pero ya no se vería respuesta en la neurona siguiente. Si la conexión es monosináptica se sigue viendo respuesta, aunque de menor amplitud. Para mantener la osmolaridad se redujo proporcionalmente la cantidad de  $Na^+$  (Nicholls y Purves, 1970).

Se hicieron experimentos registrando simultáneamente una neurona mecanosensorial y una neurona de Retzius inicialmente en ringer estimulando las neuronas mecanosensoriales con 5 impulsos a 10 Hz, adquiriendo cada minuto. Siguiendo el mismo protocolo de estimulación y adquisición, se cambió la solución a la de  $Mg^{++}/Ca^{++}$  y finalmente se volvió a lavar con ringer normal.

### **Caracterización de la Respuesta Sináptica de las Neuronas de Retzius a la Estimulación de las Neuronas Mecanosensoriales.**

Las neuronas mecanosensoriales fueron estimuladas con trenes de 5 potenciales de acción a 10 Hz. La respuesta sináptica se grabó de las neuronas de Retzius en ventanas de tiempo de 2 y 3 segundos tomadas cada minuto. Mediante inyección de corriente el potencial de reposo se mantuvo a  $-60$  mV, para evitar que se produjeran potenciales de acción.

Para caracterizar la forma del potencial sináptico producido en respuesta a las diferentes neuronas mecanosensoriales se analizaron los siguientes parámetros de las respuestas: latencia, probabilidad, amplitud y tiempo al pico. Estos parámetros son indicadores de diferentes aspectos de la transmisión sináptica: la amplitud de la fuerza de la sinapsis, los tiempos al pico de la distancia a la que están los contactos sobre las dendritas y la latencia y probabilidad de la eficiencia de la sinapsis (Fernández de Miguel, 1998).

La probabilidad de la respuesta sináptica se obtuvo dividiendo el número de respuestas entre el total de trazos adquiridos. Este cociente se determinó para cada

impulso de un tren de cinco impulsos. La latencia, amplitud y tiempo al pico se determinaron por medio del programa Clampfit 8.0. Este programa despliega los registros adquiridos en un sistema de coordenadas X, Y donde la ordenada se calibró en mV y la abscisa en ms, representando la amplitud y el tiempo, respectivamente. La latencia se midió como el tiempo entre el inicio del primer potencial de acción en la neurona mecanosensorial y el inicio del primer potencial postsináptico excitador (PPE) producido por la neurona de Retzius. La amplitud se midió como la diferencia entre la amplitud mínima y máxima del potencial sináptico y el tiempo al pico como la diferencia de tiempo entre el inicio y la cima del potencial sináptico.

Todos éstos parámetros permiten distinguir distintos tipos celulares que pudieran estar involucrados en las respuestas de las neuronas de Retzius a estímulos en diferentes células mecanosensoriales.

### **Estadística**

Los valores medios de los PPEs espontáneos se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DS). Todos los demás valores, se reportan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM).

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y t de student. El nivel de significancia se fijó en un valor de  $\alpha=0.05$ . En el caso del estudio de la probabilidad de respuesta sináptica de las neuronas de Retzius a estímulos en las neuronas T, P y N, las pruebas estadísticas antes mencionadas se realizaron para determinar si había diferencias significativas entre el valor de probabilidad al primer impulso y los valores de probabilidad a los subsecuentes impulsos.

## RESULTADOS: Parte I

### Cuantificación del Número de Sitios de Contacto entre Células de Retzius

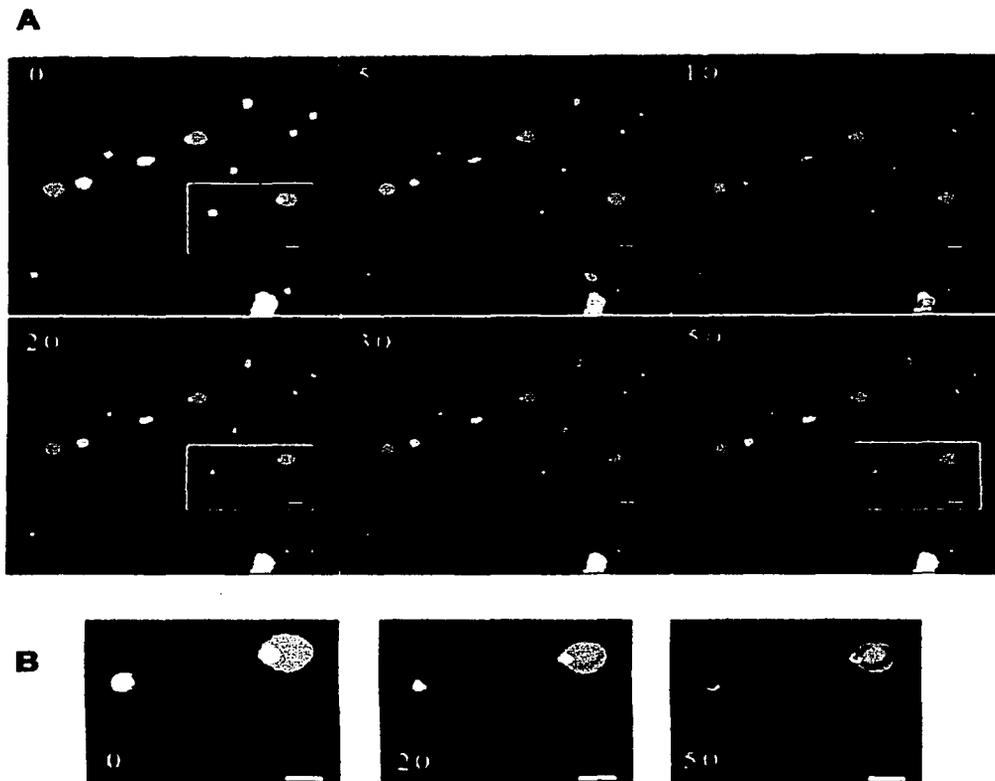
Con el objeto de calibrar el sistema se analizaron imágenes de microesferas con fluorescencia verde de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y con fluorescencia roja de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. La figura 13 muestra el mismo plano en reconstrucciones tridimensionales formadas con las imágenes procesadas con el número de iteraciones que se indica en la esquina superior izquierda de cada recuadro. Conforme se hacen mas repeticiones, los diámetros de las microesferas van disminuyendo. Esto se ve al comparar la imagen original, de cero iteraciones, con la de 50 iteraciones y contrastar el diámetro de las microesferas grandes con la barra de escala, que es de 2  $\mu\text{m}$ . (Ver recuadros ampliados)

Las Tablas 1 y 2 muestran los promedios de los diámetros de las microesferas de 0.5 y 2  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Se midieron los diámetros a 0° (frente) y a 180° (espalda) y se obtuvo un promedio de ambas mediciones para verificar si el procesamiento por deconvolución y la reconstrucción tridimensional no modificaban la forma circular de la microesfera. Los diámetros promedio van disminuyendo de forma inversamente proporcional al número de repeticiones, llegando al valor de diámetro real en las 50 iteraciones.

**Tabla 1. Diámetros de microesferas de 0.5  $\mu\text{m}$  medidos en reconstrucciones tridimensionales de series de imágenes X, Y, Z procesadas con diferente número de iteraciones en el programa XCOSM.**

| No. | 0°      | $\pm$ DS | 180°    | $\pm$ DS | Promedio | $\pm$ DS |
|-----|---------|----------|---------|----------|----------|----------|
| 0   |         | 0.326    | 1.481+  | 0.345    | 1.458 +  | 0.329    |
| 5   | 1.158 + | 0.375    | 1.161 + | 0.339    | 1.16 +   | 0.349    |
| 10  | 1.052+  | 0.316    | 0.986 + | 0.365    | 1.01 +   | 0.336    |
| 20  | 0.869 + | 0.311    | 0.909 + | 0.317    | 0.889 +  | 0.308    |
| 30  | 0.773 + | 0.362    | 0.782 + | 0.375    | 0.777 +  | 0.361    |
| 50  | 0.647+  | 0.215    | 0.567 + | 0.052    | 0.609 +  | 0.161    |

Los promedios de los diámetros de las microesferas de la Tablas 1 se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DS).



**Figura 13. Procesamiento digital de imágenes por deconvolución. A)** Resultado del procesamiento por deconvolución de imágenes de microsferas fluorescentes de diámetro conocido variando el número de repeticiones. Se utilizaron microsferas con fluorescencia verde de  $0.5 \mu\text{m}$  y con fluorescencia roja de  $2 \mu\text{m}$  de diámetro. Los números indican el número de repeticiones. El número 0, indica la imagen original. Conforme más repeticiones se utilizan va disminuyendo el diámetro de las esferas hasta corresponder al diámetro real. Este ensayo indica que la resolución del microscopio permite distinguir puntos de incluso  $0.5 \mu\text{m}$  de diámetro. La barra de escala corresponde a  $2 \mu\text{m}$ . **B)** Acercamientos de las zonas en recuadro para 0, 20 y 50 repeticiones. El diámetro de las esferas con respecto a la barra de escala ( $2 \mu\text{m}$ ) disminuye al aumentar las repeticiones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 2. Diámetros de microesferas de 2  $\mu\text{m}$  medidos de reconstrucciones tridimensionales de series X, Y, Z procesadas con diferente número de iteraciones en el programa XCOSM.**

| No.iteracion | 0° $\pm$ DS   | 180° $\pm$ DS   | Promedio $\pm$ DS |
|--------------|---------------|-----------------|-------------------|
| 0            | 3.009 + 0.085 | 3.009 + 0.085   | 3.009 + 0.076     |
| 5            | 2.614 + 0.085 | 2.7133 + 0.085  | 2.664 + 0.093     |
| 10           | 2.565 + 0.085 | 2.516 + 0       | 2.54 + 0.06       |
| 20           | 2.516 + 0     | 2.417 + 0.17    | 2.466 + 0.12      |
| 30           | 2.368 + 0     | 2.318 + 0.085   | 2.343 + 0.06      |
| 50           | 2.22 $\pm$ 0  | 2.12 $\pm$ 0.17 | 2.17 $\pm$ 0.12   |

Los promedios de los diámetros de las microesferas de la Tabla 2 se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DS).

Las microesferas de diferente diámetro y con fluorescencia de diferentes longitud de onda pudieron ser definidas. Estas imágenes comprobaron la eficacia del procesamiento por deconvolución para quitar luz fuera de foco y nos permitió saber que era posible resolver puntos de hasta 0.5 micras, que es menor al diámetro de las dendritas acopladas de las neuronas de Retzius y de los diámetros esperados de los puntos de contacto. Por lo tanto, es posible utilizar esta técnica para resolver y cuantificar los contactos entre las dendritas de las neuronas de Retzius.

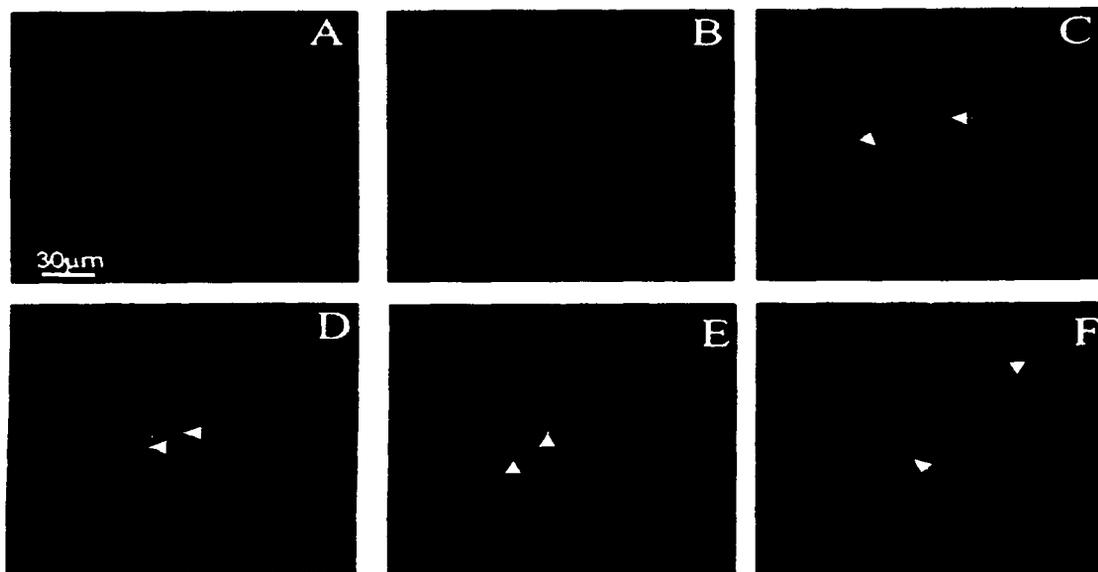
### **Sitios de contacto entre neuronas de Retzius**

La actividad espontánea en las neuronas de Retzius es producto de entradas que están en las dendritas acopladas. La forma en que esta información es integrada depende de las propiedades pasivas de las dendritas y del número de dendritas que estén acopladas. Estudios previos mostraron que las dendritas acopladas tienen un diámetro homogéneo de la raíz a la punta y que el 71 % de las dendritas candidato a estar acopladas no se ramifican y que por lo tanto podían ser consideradas como un cable equivalente, es decir, como si no hubiera ramificaciones (Vargas, 1999; De-Miguel et al., 2001; García-Pérez et al, enviado).

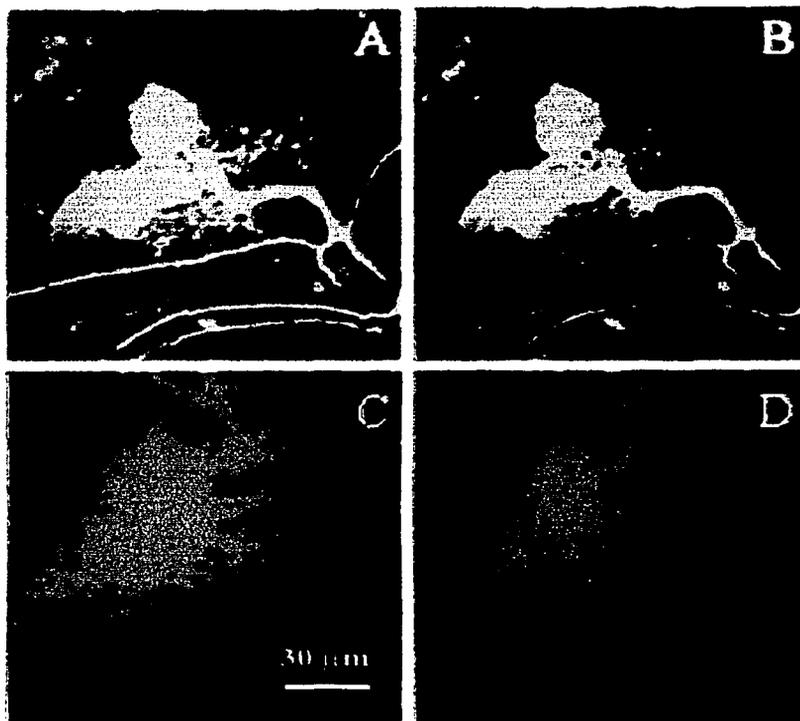
El conteo previo de sitios de contacto fue de entre 90 y 120 sitios de contacto (DeMiguel et al., 2001). Consideramos que éste rango podría estar sobrestimado dado el ruido de las imágenes utilizadas para el conteo.

La figura 14 muestra una serie de cortes ópticos ascendentes de la unión de las imágenes de neuronas teñidas con Amarillo Lucifer y Rojo de Texas con una separación de 2 micras entre ellos. En amarillo se ven algunos puntos de contacto y como se aprecia, los planos inferiores no presentan contactos. Estas imágenes al ser tomas de diferentes planos no permiten saber si algunos de los puntos amarillos corresponden a ramas que sin tocarse, al estar una por abajo o encima de otra, produzcan un punto amarillo por combinación de colores viendo las neuronas desde arriba, que es la perspectiva del objetivo. Además, de estos cortes ópticos podría haber el error de contar puntos de más, que aparezcan repetidos en varios planos.

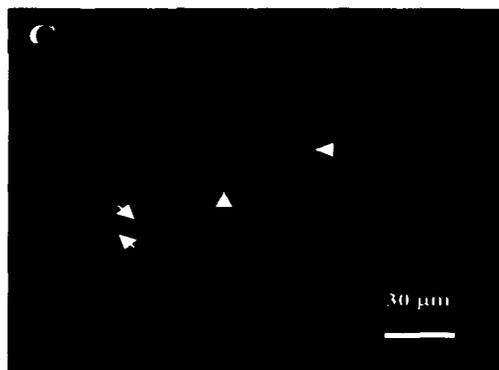
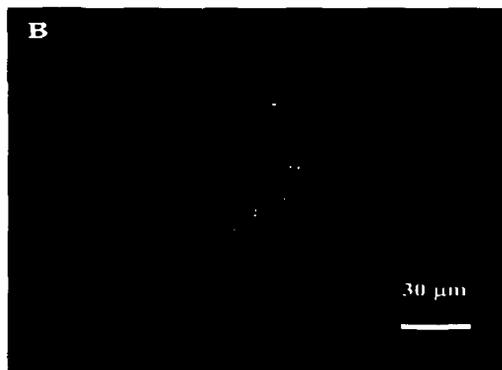
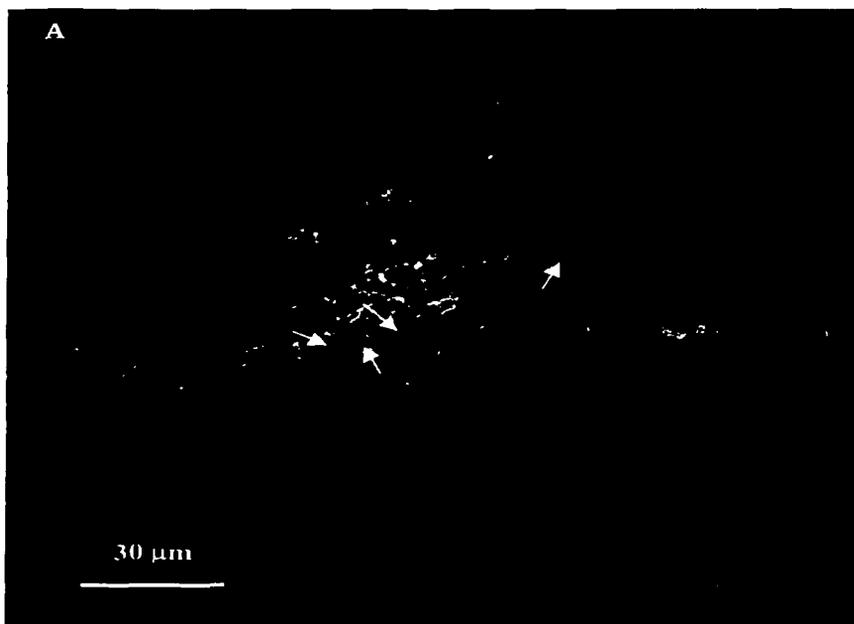
Por esta razón se decidió trabajar con las reconstrucciones tridimensionales de las series Z de las neuronas, porque de esta manera todos los planos son reorganizados de manera que queden ordenados en el espacio como estaban en el ganglio. La figura 15 muestra reconstrucciones tridimensionales de las imágenes originales (A y C) y las imágenes deconvolucionadas (B y D). En verde vemos la neurona teñida con Amarillo Lucifer (A y B) y en rojo las imágenes (C y D) de la neurona teñida con Rojo Texas del mismo par (el par 27). De esta manera al unir las imágenes los contactos corresponderán a los puntos donde haya colocación en el espacio de las dendritas. La figura 16A es un ejemplo de la superposición de dos imágenes de tinción doble. En el centro, en los árboles dendríticos se aprecian puntos de color amarillo, que presumiblemente son los puntos de contacto. Sin embargo, aún así, simplemente guiándonos por la combinación de colores, algunos puntos amarillos pudieran ser resultado de combinación óptica de dendritas que se cruzan sin tocarse desde la perspectiva del observador. Buscando eliminar éste factor se utilizó la función de "intersección" del programa Metamorph, donde se intersectan las reconstrucciones tridimensionales de las neuronas y el resultado es una imagen donde sólo hay pixeles que corresponden a sitios donde las dos imágenes coincidían, es decir, en sitios de superposición. La figura 16B es la



**Figura 14. Superposición de dos neuronas a distintos planos focales.** Una célula fue inyectada con Rojo de Texas y la otra con Amarillo de Lucifer. La distancia en Z entre cada uno de los planos focales es de dos micras en orden ascendente. Los planos inferiores (**A** y **B**) no mostraron superposición de las arborizaciones. Esta aparece como puntos amarillos en los últimos planos (**C** a **F**). La barra de escala es igual para todos los planos (Ver cabezas de flecha).



**Figura 15. Comparación de reconstrucciones tridimensionales de neuronas deconvolucionadas y sin deconvolucionar.** En los paneles **A** y **C** vemos las reconstrucciones tridimensionales de la imágenes antes de ser procesadas. En ambas hay ruido de fondo. En los paneles **B** y **D** vemos las mismas reconstrucciones una vez que las imágenes han sido procesadas. En estas imágenes hay menos ruido de fondo y las neuritas se ven más delimitadas. La escala es la misma en todas las imágenes.



**Figura 16. Puntos de contacto entre neuronas de Retzius. A)** Superposición de reconstrucciones tridimensionales sin soma de neuronas procesadas, con posibles sitios de contacto en amarillo (Ver flechas) **B)** Puntos de contacto resultado de la intersección de las reconstrucciones tridimensionales. **C)** Superposición de puntos de contacto en la reconstrucción tridimensional de la célula teñida con rojo Texas. La barra de escala corresponde en todos los casos a 30  $\mu\text{m}$  (Ver cabezas de flecha).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

imagen resultante de la intersección de las imágenes tridimensionales. De ésta, y teniendo como referencia la imagen de superposición de los contactos en una de las dos células, se realizaron los conteos. Un ejemplo es la imagen de la figura 16C, que es una superposición de los contactos en la célula teñida con Rojo Texas del par correspondiente.

La Tabla 3 muestra los resultados de los conteos de los contactos entre los pares de células analizadas.

**Tabla 3. Conteo de contactos entre las neuronas de Retzius**

| <b>Número del par de imágenes</b> | <b>No. de contactos en las imágenes sin procesar (Vargas, 1999).</b> | <b>Número de contactos de las imágenes procesadas.</b> |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| D4                                | 103                                                                  | 45                                                     |
| D5                                | 85                                                                   | 48                                                     |
| D8                                | 134                                                                  | 47                                                     |
| D13                               | 60                                                                   | 41                                                     |
| D16                               | 106                                                                  | 50                                                     |
| D25                               | 152                                                                  | 45                                                     |
| D27                               | 107                                                                  | 43                                                     |
| <b>Promedio ± ESM</b>             | <b>106.7 ± 11.4</b>                                                  | <b>45.6 ± 1.2</b>                                      |

El promedio del número de contactos de la Tabla 3 se reportan como media ± el error estándar de la media (ESM).

Vargas (1999) contó entre 60 y 152 contactos, con una media de  $106.7 \pm 11.4$  (ESM). Este nuevo conteo arrojó una media de  $45.6 \pm 1.2$  (ESM). El que existan alrededor de 45 contactos entre las neuronas de Retzius en lugar de 106, como se había cuantificado antes, supone que la proporción de dendritas acopladas y no acopladas es menor. La integración en las dendritas acopladas, sería fundamentalmente actividad de baja frecuencia que genere los disparos simultáneos espontáneos.

Suponiendo una sola terminal presináptica por dendrita habría una probabilidad de  $1/45 = 0.022$  para cada evento unitario. La probabilidad de

eventos dobles o simultáneos es muy baja,  $1/2025 = 0.0005$ . Esto sugiere que la mayoría de los potenciales sinápticos serán unitarios producidos en dendritas diferentes. Nuestros datos sobre el número de contactos y la baja probabilidad de eventos simultáneos y/o dobles, indican que PPEs de dos o más cuantos resultarán de la suma de eventos unitarios en diferentes dendritas acopladas. Por lo tanto, la suma de potenciales sinápticos en el axón primario será lineal, al no haber interferencia entre diferentes sinápticos (Fig. 17). En caso de que llegaran a producirse eventos simultáneos a ambos lados de una sinapsis eléctrica, ambas dendritas permanecerían isopotenciales y por lo tanto no habría flujo de corriente entre las neuronas.

## **RESULTADOS: Parte II**

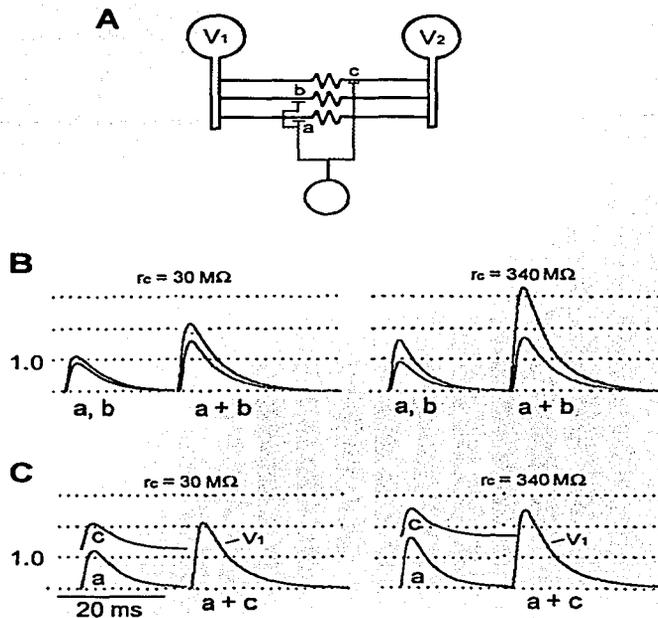
### **Características de las Respuestas Sinápticas Producidas por la Estimulación de las Neuronas T, P y N.**

Para determinar si las entradas en las neuronas de Retzius que producen PPEs espontáneos y las entradas de las neuronas mecanosensoriales eran las mismas, se caracterizaron las respuestas sinápticas de las células de Retzius en respuesta a la estimulación de las neuronas T, P y N.

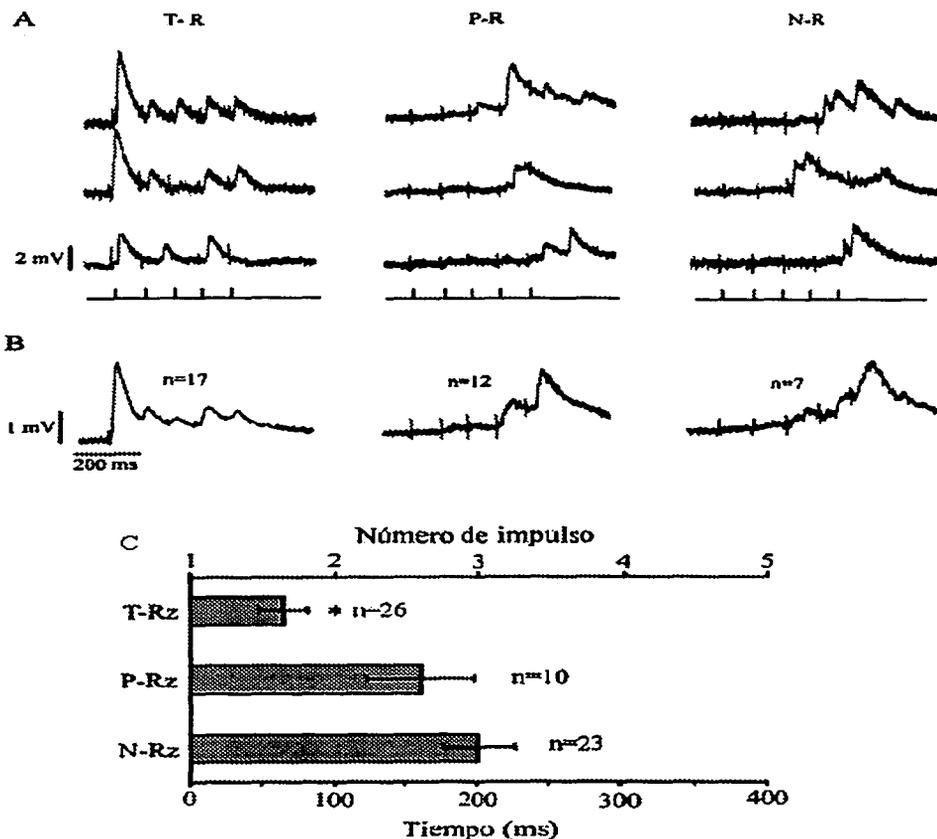
Todas las células mecanosensoriales ipsilaterales y contralaterales probadas produjeron respuestas sinápticas en las neuronas de Retzius, como se aprecia en la figura 18A, en la que se muestran trazos con las respuestas sinápticas de neuronas de Retzius a trenes de 5 estímulos en diferentes neuronas mecanosensoriales. En la figura 18B están los promedios de las respuestas de varias neuronas de Retzius.

Un primer factor para caracterizar las respuestas sinápticas fue la latencia, es decir, el tiempo que tardaba la neurona de Retzius en responder a la estimulación en diferentes neuronas mecanosensoriales. Se determinó si esta latencia era similar o no en respuesta a distintas mecanoneuronas.

La figura 18C presenta los valores de latencia obtenidos de la neurona de Retzius en respuesta a la estimulación de las neuronas T, P y N: 63, 161 y 203 ms, respectivamente. El eje superior de la gráfica nos indica que la neurona de Retzius



**Figura 17. Integración de entradas en diferentes dendritas acopladas. A)** Representación diagramática de entradas en diferentes dendritas acopladas. **B)** A la izquierda de cada panel vemos la amplitud de PPEs para neuronas con resistencia de acople de  $30 \text{ M}\Omega$  (izquierda) y con resistencia de acople de  $340 \text{ M}\Omega$  (derecha) como se verían en el soma  $V_1$  provenientes de  $a$  y  $b$ . A la derecha vemos la suma de los PPEs en  $a$  y en  $b$ , donde el trazo superior corresponde a  $V_1$  y el trazo inferior a  $V_2$ . Nótese que la amplitud en  $V_2$  es constante, mientras que la amplitud en  $V_1$  depende del valor de la resistencia de acople. **C)** A la izquierda están los PPEs producidos en  $a$  y en  $c$  vistos en  $V_1$ . A la derecha está la suma de  $a$  y  $c$  (García-Pérez, E. y F.F. De Miguel, en preparación).



Se utilizó un valor de  $\alpha=0.05$ , marcado como un asterisco

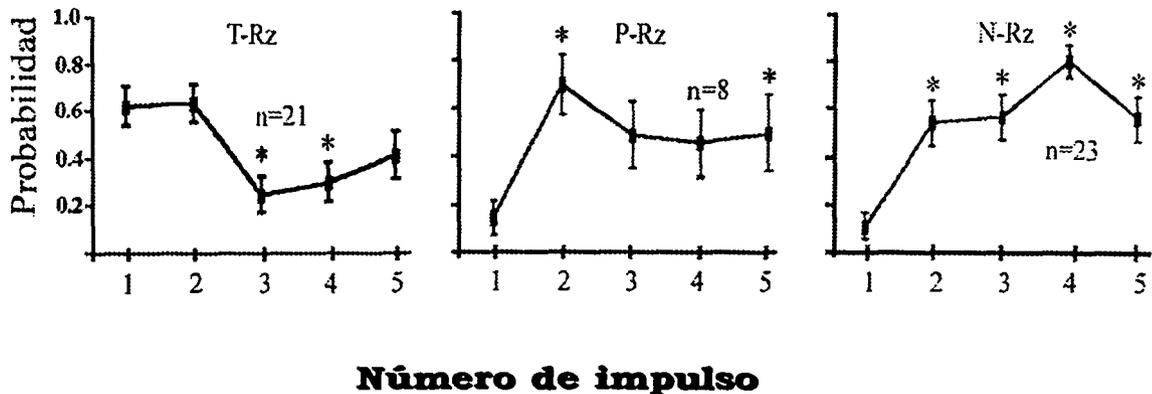
**Figura 18. Latencia al primer sináptico para estimulación de diferentes neuronas mecanosensoriales.** **A)** Respuestas sinápticas de diferentes neuronas de Retzius a estímulos es neuronas T, P y N. **B)** Trazos promediados de respuestas sinápticas de neuronas de Retzius a estímulos en neuronas T, P y N. **C)** La latencia al primer sináptico de la neurona de Retzius es diferente para estimulación en la neurona T. Para esta neurona la respuesta se da al primer impulso, mientras que para las neuronas N y P ocurre hasta el segundo e incluso tercer impulsos del tren.

respondió al primer potencial de acción en la neurona T, mientras que se necesitaron dos potenciales de las neuronas P y N e incluso tres de la neurona N para producir respuesta. No hubo diferencias significativas entre las latencias de las neuronas P y N; en cambio, ambos valores de latencias fueron significativamente diferentes al valor de la neurona T. La diferencia en los valores de latencia apunta a que las vías de comunicación de la neurona T con las neuronas de Retzius son distintas a las vías de las neuronas P y N.

### **Probabilidad de Respuesta Sináptica de la Neurona de Retzius para cada Estímulo en Diferentes Neuronas Mecanosensoriales.**

La dinámica de la respuesta de las células de Retzius a las neuronas T, P y N a lo largo del tren de impulsos fue distinta. Para cuantificar como variaba ésta respuesta se calculó la probabilidad de respuesta sináptica (Ver Métodos).

La figura 19 muestra que la respuesta a estimulación en la neurona T (panel A) fue alta para el primer y segundo impulsos ( $0.609 \pm 0.08$  y  $0.62 \pm 0.08$ , respectivamente), se redujo rápidamente al tercer y cuarto impulsos ( $0.243 \pm 0.07$  y  $0.29 \pm 0.08$ , respectivamente), siendo significativamente diferentes a la probabilidad al primer impulso, y aumentó hacia el final del tren. En contraste, la respuesta sináptica a estimulación en las neuronas P (panel B) y N (panel C) fue baja al primer impulso ( $0.143 \pm 0.07$  y  $0.11 \pm 0.05$ , respectivamente) y aumentó al segundo impulso ( $0.7 \pm 0.12$  y  $0.545 \pm 0.09$ , respectivamente). La probabilidad de respuesta al tercer y cuarto impulsos en la P bajó ( $0.487 \pm 0.13$  y  $0.456 \pm 0.13$ , respectivamente) y aumentó ligeramente al quinto impulso ( $0.5 \pm 0.15$ ). Los valores de probabilidad del segundo y quinto impulsos de la neurona P fueron significativamente diferentes al valor del primer impulso. La probabilidad de respuesta a impulsos en la neurona N siguió aumentando en el tercer impulso, con un máximo en el cuarto impulso ( $0.573 \pm 0.09$  y  $0.81 \pm 0.06$ , respectivamente) y disminuyó al quinto impulso ( $0.565 \pm 0.09$ ). Las probabilidades de respuesta del segundo al quinto estímulos de la neurona N fueron significativamente diferentes a la del primer impulso. Los valores de probabilidad concordaron con los de latencia.



**Figura 19. Probabilidad de disparo por impulso con trenes de 5 impulsos en respuesta a estímulos en diferentes neuronas mecanosensoriales.** La probabilidad de respuesta de la Retzius a lo largo del tren es diferente para cada tipo de neurona mecanosensorial. La probabilidad al inicio del tren es alta para estímulos en la neurona T y luego baja significativamente. En el caso de las neuronas P y N la probabilidad es baja al primer impulso y aumenta significativamente al segundo impulso. La probabilidad de disparo en respuesta al neurona P se mantiene a partir del segundo impulso y para la neurona N va aumentando y disminuye al final del tren. Los asteriscos marcan una diferencia significativa con  $\alpha=0.05$  con respecto a la probabilidad al primer impulso.

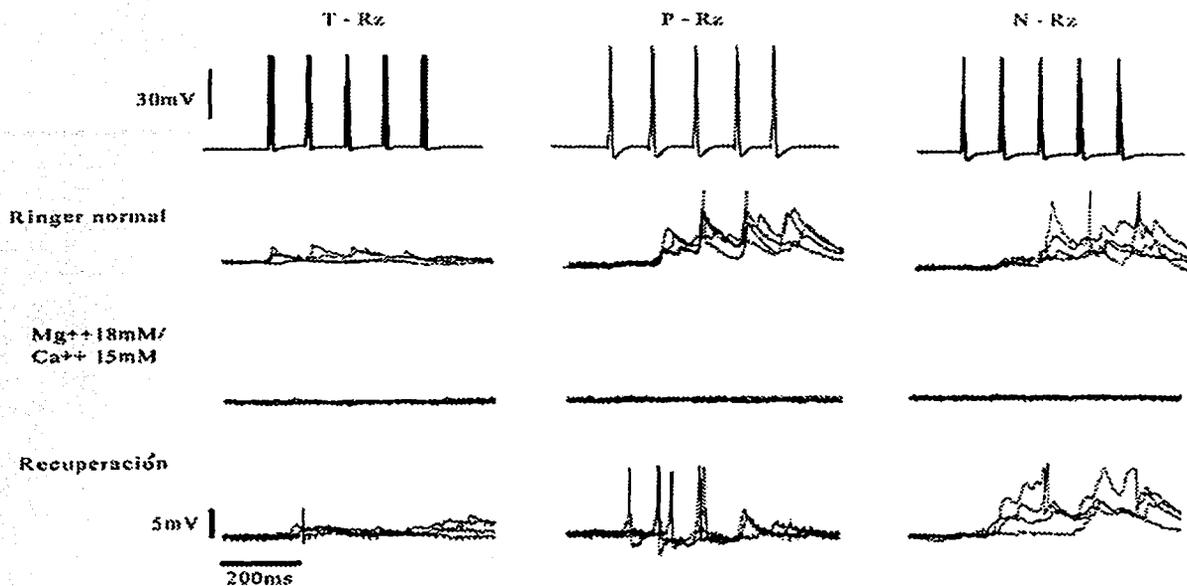
## **Conexiones Polisinápticas entre las Neuronas Mecanosensoriales y las Neuronas de Retzius**

La similitud de los valores de latencia y probabilidad de respuesta a estimulación de las neuronas P y N hicieron suponer que las neuronas N tendrían una vía polisináptica, como en el caso de las neuronas P. Las respuestas a estímulos en las neuronas T, al tener un valor de latencia menor y alta probabilidad de disparo al primer impulso sugerían que esta vía podría ser monosináptica. Para corroborar ésta idea se realizaron experimentos con alto  $Mg^{++}/Ca^{++}$ , que bajan la probabilidad de liberación (Ver Métodos). La figura 20 presenta un resumen de los experimentos. En cada panel están de arriba hacia abajo un tren de potenciales tipo de cada neurona mecanosensorial. En la segunda fila de la figura están los trazos de la respuesta obtenida en esta solución. En la siguiente fila está la respuesta con solución  $Mg^{++}18\text{ mM}/Ca^{++}15\text{ mM}$  y en la última fila se ve la recuperación. La escala temporal es la misma para todos los trazos.

Al estimular las neuronas mecanosensoriales ninguna produjo respuesta en las neuronas de Retzius en presencia de la solución  $Mg^{++}/Ca^{++}$ . Los trazos presentados en la figura corresponden a neuronas del mismo ganglio y son representativos de la respuesta obtenida en todos los experimentos que se hicieron (tres neuronas T, tres N y dos P). Estos experimentos muestran que la vía entre la neuronas de Retzius y las tres neuronas mecanosensoriales es polisináptica.

## **Distribución de Amplitudes y Tiempos al Pico de PPEs Espontáneos y Evocados por Estimulación Mecanosensorial en las Neuronas de Retzius.**

La cinética de los PPEs puede ser utilizada para estimar la localización de las entradas y para saber si las respuestas a estímulos en diferentes células mecanosensoriales son producidas por la misma interneurona. De las distribuciones al pico de PPEs espontáneos se ha demostrado que las entradas que



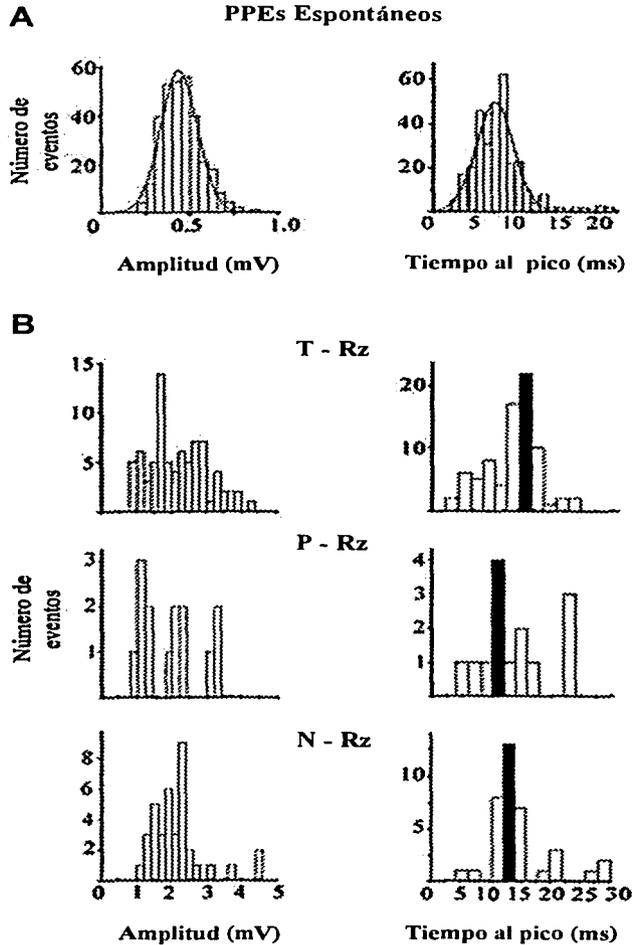
**Figura 20. Conexiones polisinápticas entre las neuronas mecanosensoriales y las neuronas de Retzius.** La figura muestra la respuesta de la neurona de Retzius a trenes de 5 impulsos a 10 Hz en distintas neuronas mecanosensoriales. En la fila con ringer normal vemos respuesta. En la fila con solución de alto  $Mg^{++}/Ca^{++}$  no hay respuesta y en la fila de recuperación vuelve a haber respuesta. Esto indica que las conexiones entre las neuronas de Retzius y las neuronas mecanosensoriales son polisinápticas. La escala en amplitud es de 30 mV por barra para los tres páneces de la primera fila. Para todos los demás trazos, la escala es de 5 mV por barra. En cada caso se presentan 4 trazos superpuestos.

los producen están en las dendritas acopladas eléctricamente de las neuronas de Retzius (De-Miguel et al., 2001).

A manera de control, para poder comparar la actividad sináptica espontánea con la evocada como indicador de si las entradas eran las mismas o no, se registró la actividad sináptica espontánea de las neuronas de Retzius con el fin de conocer la distribución de amplitudes y tiempos al pico de sus PPE espontáneos. El panel izquierdo de la figura 21A presenta una distribución representativa de las amplitudes de los PPE espontáneos. Las amplitudes de estos PPEs van de 0.23 mV hasta 0.87 mV, y se ajustan a una distribución gaussiana con una media de  $0.44 \pm 0.1$  mV ( $n=315$ ). Este valor concuerda con estudios previos de la distribución de amplitudes para PPE monotónicos realizados por De-Miguel y cols. (2001), quienes reportan un rango de 0.3 mV a 2.5 mV y con el valor de amplitud media de los potenciales excitatorios unitarios en *H. officinalis*, que es de 0.44 mV para neuronas de Retzius con una tasa de acople de 0.42 (García-Pérez et al., enviado).

El panel derecho de la figura 21A muestra la distribución de los tiempos al pico de los PPE espontáneos. El rango de valores va de 2.5 ms a 15.5 ms, llegando a encontrarse algunos valores superiores; su distribución también se ajustó a una gaussiana. La media de los tiempos al pico fue de  $7.43 \pm 2.37$  ms ( $n=315$ ). De-Miguel y cols.(2001), reportan un rango de 2 a 14 ms con dos picos en sus distribuciones de tiempos al pico, y García-Pérez y cols. (enviado) encuentran valores de 5.6 ms y otro de 9.6 ms para éstos picos. Dado el error en mis datos y un menor número de datos, la media que se obtuvo más y menos el error estándar, incluye los valores de los picos reportados, por lo que siendo las muestras normales, los presentes datos de tiempos al pico, al igual que los de amplitud, coinciden con los datos previos sobre PPEs espontáneos en sanguijuela.

Los datos de las latencias y probabilidades apuntan a que existen diferentes entradas mecanosensoriales. Por otro lado, se sabe ya que las neuronas P homólogas contralaterales comparten interneuronas y se suponía que las entradas estaban en las dendritas acopladas con base en que las amplitudes de los PPEs de las Retzius ipsi y contralaterales fueron similares al hiperpolarizar sólo una de las neuronas de Retzius (Szczipak y Kristan, 1995). Las distribuciones de PPEs



**Figura 21. Distribuciones de amplitud y tiempo al pico de PPEs espontáneos y evocados.** **A)** Distribuciones de amplitudes (izquierda) y tiempos al pico (derecha) de PPEs espontáneos de neuronas de Retzius se ajustaron a gaussianas. Las medias de las distribuciones concuerdan con datos previos. **B)** Distribuciones de amplitudes y tiempos al pico de PPEs evocados en la misma neurona de Retzius por estimulación de diferentes neuronas mecanosensoriales. Las respuestas tienen mucha variación, lo que apunta a que cada neurona tiene una vía polisináptica distinta.

espontáneos, se compararon con las distribuciones de los PPEs evocados por estimulación mecanosensorial.

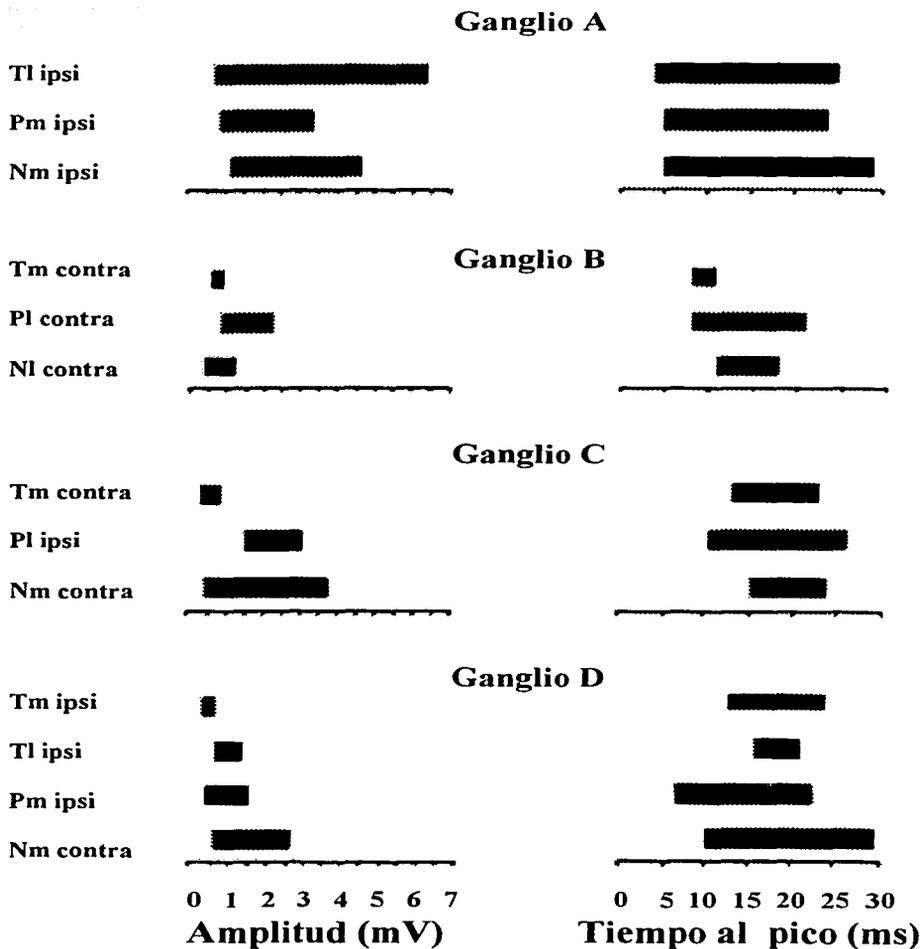
La figura 21B muestra las distribuciones de amplitud y tiempo al pico de los PPEs evocados en la misma neurona de Retzius ipsilateral ante la estimulación de una neurona mecanosensorial de cada tipo. Como se aprecia, hay una gran variación en las distribuciones de diferentes neuronas. Las amplitudes variaron dentro de un rango de 0.74 mV a 6.36 mV en respuesta a la neurona T, de 0.86 a 3.3 mV en respuesta a la neurona P y de 1.17 mV a 4.6 mV en respuesta a la neurona N. Las distribuciones de tiempos al pico, a la derecha en la figura, fueron igualmente variables; abarcaron de 3.9 a 24.9 ms, de 5.1 a 23.7 ms y de 5.1 a 28.8 ms en respuesta a las neuronas T, P y N, respectivamente. El que haya tiempos cortos y largos sugiere que hay más de un pico en las distribuciones de tiempos.

Al comparar con las distribuciones de los PPEs espontáneos los datos sólo coinciden en el rango de valores más pequeños de las distribuciones de potenciales evocados. Por lo tanto, concluimos que la mayoría de los PPEs producidos por estimulación mecanosensorial son producidos por entradas diferentes a las responsables de la actividad espontánea.

### **Rangos de Distribuciones de Amplitud y Tiempos al pico**

Debido a la gran variabilidad entre las distribuciones de amplitudes y tiempos al pico de diferentes células decidimos hacer las comparaciones entre los rangos de valores de amplitudes y tiempos de las diferentes células en lugar de comparar las medias.

Al analizar los rangos de amplitudes y tiempos al pico de las respuestas de neuronas de Retzius en ganglios diferentes se encontró una gran variabilidad. La figura 22 muestra los rangos de amplitudes y tiempos al pico de 4 neuronas de Retzius en cuatro ganglios diferentes en respuesta a distintas combinaciones de neuronas y mecanorreceptores. En el ganglio A todas las mecanoneuronas son ipsilaterales a la neurona de Retzius, en el ganglio B todas son contralaterales y en los ganglios C y D hay una combinación de neuronas mecanosensoriales



**Figura 22. Rangos de amplitudes y tiempos al pico de respuestas en neuronas de Retzius de cuatro ganglios distintos.** Los rangos tanto de amplitudes como de tiempos al pico varían mucho de una neurona de Retzius a otra y para la misma neurona a estimulación en diferentes neuronas mecanosensoriales.

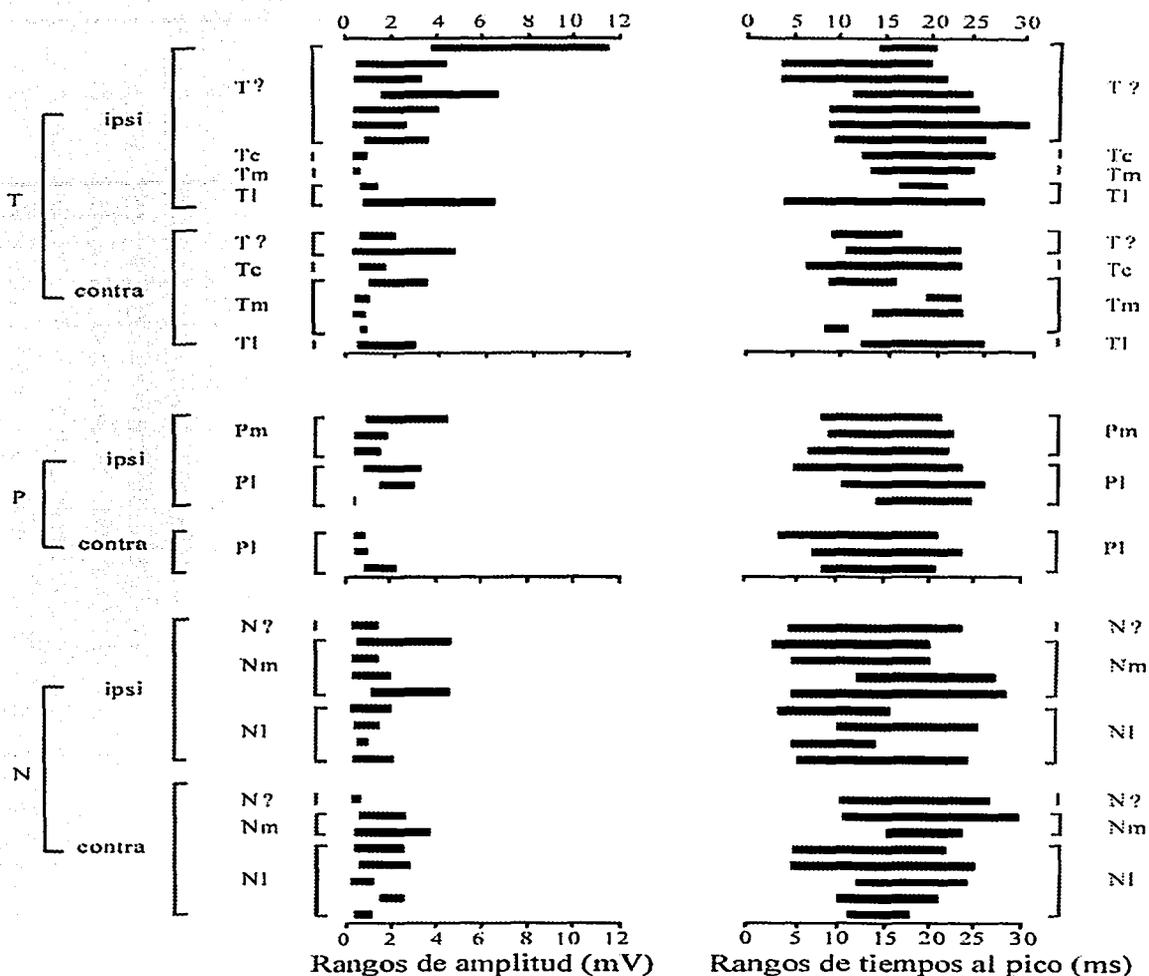
ipsilaterales y contralaterales. Existió variabilidad en las respuestas de la misma neurona de Retzius, sin importar si las neuronas mecanosensoriales fueron ipsilaterales o contralaterales a la neurona de Retzius y hay también variabilidad entre neuronas de Retzius de diferentes ganglios.

La figura 23 muestra los rangos que abarcan las distribuciones de las respuestas de todas las neuronas de Retzius analizadas en respuesta a diferentes neuronas mecanosensoriales de diferentes ganglios. Hay una gran variabilidad en las respuestas entre neuronas ipsilaterales y contralaterales, y entre las respuestas de neuronas mecanosensoriales de diferente y del mismo tipo.

Debido a que la mayoría de las respuestas están por arriba de 10 ms, que es el tiempo al pico correspondiente a respuestas propagadas de la neurona de Retzius contralateral, concluimos que la mayoría de las entradas de las neuronas mecanosensoriales están en dendritas no acopladas eléctricamente.

No hubo correlación entre los rangos de amplitudes y los rangos de tiempos correspondientes, con valores de 0.21, 0.1 y 0.42 para las neuronas T, P y N, respectivamente. Buscando correlaciones entre diferentes tipos de mecanoneuronas comparamos entre sí sus rangos de amplitudes y tiempos y tampoco obtuvimos correlación. Los valores obtenidos para las amplitudes fueron de 0.2 entre las neuronas T y N, de  $-0.03$  para las neuronas T y P y de 0.62 para las neuronas P y N. En el caso de los tiempos al pico los valores de correlación fueron 0.38, 0.53 y 0.60 para los pares de neuronas T y P, T y N y P y N, respectivamente. En todos los casos probados los valores de correlación fueron bajos, indicando y apoyando la idea de que cada tipo de mecanoneurona hace sinapsis en interneuronas diferentes.

Nuevamente, la gran variabilidad de las amplitudes apunta a varias vías interneuronales, posiblemente distintas para cada tipo de mecanoneurona y sugiere que las entradas tienen una fuerza sináptica que varía de ganglio a ganglio. Las distribuciones de los tiempos al pico en una misma neurona de Retzius indican que muchas de las entradas de distintas neuronas mecanosensoriales son establecidas a distancias electrotónicas similares, aunque cada mecanoneurona parece tener una vía interneuronal distinta.



**Figura 23. Rangos de amplitudes y tiempos al pico de potenciales evocados en diferentes combinaciones de neuronas.** Los rangos de amplitudes y tiempos al pico de las respuestas de la neuronas de Retzius varian mucho entre diferentes subtipos de neuronas mecánosensoriales sin importar si ésta fue ipsilateral o contralateral a la neurona de Retzius.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra que las entradas sinápticas en las neuronas de Retzius que producen la actividad espontánea -de baja frecuencia- y las de las neuronas mecanosensoriales -que producen actividad de altas frecuencias- son distintas, con base en las diferentes distribuciones de amplitudes y tiempos al pico obtenidas. A partir de los experimentos con alto  $Mg^{++}/Ca^{++}$ , se determinó que las entradas de neuronas mecanosensoriales son polisinápticas. Probablemente estén involucradas diferentes interneuronas para cada célula mecanosensorial, reflejadas en rangos de valores de amplitudes y tiempos al pico que no se sobrelapan y que pudieran corresponder a diferentes interneuronas. Los valores de tiempos al pico indican que la mayoría de las entradas están situadas en dendritas no acopladas.

Conociendo el número de contactos entre las neuronas de Retzius se tiene un estimado del peso de las sinapsis eléctricas en la integración. Estudios anteriores habían reportado entre 90 y 120 contactos entre las neuronas de Retzius. El análisis de imágenes deconvolucionadas mostró que ésta cantidad estaba sobrestimada presumiblemente debido al factor ruido de las imágenes originales. El estimado a partir de los conteos realizados fue de entre  $45.6 \pm 1.2$  puntos de contacto entre las neuronas de Retzius.

Este nuevo estimado indica que las neuronas de Retzius tienen al menos dos modos de integración distintos. Por un lado estarían las entradas que se localizan en las dendritas acopladas. En ellas, los valores de resistencia de acople y de impedancia dendrítica modulan la amplitud cuántica. El balance entre estos valores dadas las constantes de tiempo y espacio para neuronas de Retzius, hace que las entradas sean integradas por ambas neuronas como si fueran una unidad, por lo que aumenta el número de entradas que contribuyen a la integración. Además, una consecuencia muy importante para la integración es que por la baja probabilidad de eventos dobles o simultáneos en una misma terminal, fundamentalmente se producirán eventos unitarios en dendritas diferentes que se

propagarán a ambas neuronas y se sumarán linealmente en el axón primario para producir potenciales sinápticos dobles, triples y potenciales de acción, al no haber interferencia de otros PPEs cercanos.

Por otro lado, las entradas de las neuronas mecanosensoriales, en su mayoría en las dendritas no acopladas, serán integradas independientemente en cada neurona de Retzius con una contribución menor de las dendritas acopladas. En el presente trabajo se caracterizaron las conexiones entre las neuronas mecanosensoriales y las neuronas de Retzius y se demostró que son polisinápticas. Las latencias, probabilidad de respuesta sináptica, y cinética de los PPEs apuntan a que cada tipo de neurona mecanosensorial tiene vías interneuronales distintas.

La probabilidad de respuesta en las neuronas de Retzius ante estímulos en las neuronas T fue alta para los primeros dos impulsos y luego disminuyó drásticamente y siguió disminuyendo a lo largo del tren, con recuperación parcial a la mitad del tren. Se ha visto que las neuronas T tienen respuestas "on" y "off", dependiendo de la estimulación (Nicholls y Baylor, 1968). Por otro lado, los estudios de Baylor y Nicholls (1969) demostraron que las neuronas T de un ganglio y las ipsilaterales de los ganglios adyacentes están conectadas eléctricamente. Mencionan también una entrada inhibitoria activada por las mismas neuronas T y también por las neuronas P. Esto está relacionado con la reducción de la probabilidad de producir PPEs en respuesta a la estimulación de la neurona T. Esto podría provocar que las neuronas T se autoinhibieran. Por otro lado, la respuesta a estimulación en la neurona P o N aumenta cuando cae la respuesta a la neurona T, esto pudiera ser por la activación de la entrada inhibitoria de las neuronas P en las neuronas T. También reportan una entrada excitadora de las neuronas P a las neuronas N, lo que concuerda con que sus probabilidades de disparo tengan un comportamiento similar. Esto sugiere un papel de reforzador de las neuronas N de la respuesta de la neurona P.

Las diferencias entre las distribuciones de amplitudes y tiempos al pico de PPEs espontáneos y PPEs evocados por estimulación de las neuronas

mecanosensoriales en las neuronas de Retzius indicaron que se trataba de entradas diferentes. La gran variabilidad en las amplitudes y tiempos al pico, así como la falta de correlación entre éstas, apuntan a diferentes vías polisinápticas. Además, las variaciones de las amplitudes de los PPEs sugieren que la fuerza de las sinapsis de las células mecanosensoriales varía de un ganglio a otro y dentro del mismo ganglio. Esto puede depender de las condiciones fisiológicas previas a la estimulación mecánica. En especial en el caso de las neuronas T cabe la posibilidad de que al estar conectadas eléctricamente y suponiendo una resistencia de acople baja, al activarse una de las neuronas T se produzcan impulsos en las otras neuronas T que en conjunto lograrían una entrada más fuerte sobre la o las interneuronas que finalmente contactan las Retzius. Esto podría producir una respuesta con menor retraso y mayor probabilidad que en el caso de las otras células. La caída posterior de la probabilidad podría explicarse como una depresión de la sinapsis en los primeros impulsos debido a la activación masiva de las neuronas T en caso de que todas las T compartan la misma interneurona.

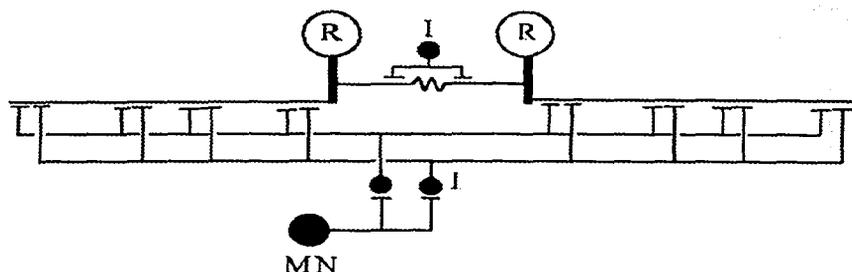
Los tiempos al pico, como indicadores de la distancia a la que fueron producidas las respuestas sinápticas indicaron que los contactos se encontraban en su mayoría en dendritas no acopladas, en sitios distales al soma. Por otra parte, la gran variabilidad de los valores sugieren que se establecen contactos múltiples. Los tiempos al pico con valores menores a 10 ms corresponderían a sitios localizados a una distancia equivalente a la de entradas ipsilaterales e incluso contralaterales sobre dendritas acopladas; sin embargo, las entradas pudieran estar sobre dendritas no acopladas. La información del presente trabajo no permite distinguir si algunos de los tiempos al pico de menos de 10 ms corresponden a contactos en las dendritas acopladas eléctricamente. Una forma de corroborar si algunos de los contactos están en las dendritas acopladas sería medir la tasa de acople entre las neuronas de Retzius produciendo un potencial artificial en una de ellas y midiendo la tasa de acople del potencial artificial y el propagado a manera de control. Después registrando simultáneamente ambas neuronas de Retzius se podrían estimular diferentes neuronas mecanosensoriales mientras se va

umentando progresivamente la concentración de  $Mg^{++}$  en la solución para provocar fallas. El análisis de los experimentos sería comparar la tasa de acople de los potenciales donde hubo fallas con la tasa de acople control. Si la tasa de acople fuera similar eso indicaría que los contactos están en las entradas acopladas. Si la tasa de acople control fuera mayor a la de los potenciales de fallas de estimulación mecanosensorial, esto indicaría que el potencial en V2 se habría propagado de distancias mayores a las de las dendritas acopladas y por lo tanto indicaría que las entradas estarían afuera de las dendritas acopladas. Si se encontraran contactos en las dendritas acopladas, podríamos suponer que contribuyan a la actividad espontánea de las neuronas de Retzius y a la liberación sináptica de serotonina.

La falta de diferencias significativas entre los datos de los sinápticos ipsilaterales y contralaterales coincide con lo reportado por Szczupak y Kristan (1995), quienes mostraron que las entradas de las neuronas P a las neuronas de Retzius son bilaterales y hacen contacto con ambas neuronas en paralelo. Especulando sobre posibles convergencias, Szczupak y Kristan (1995) reportaron convergencia sobre la o las mismas interneuronas para las neuronas P homólogas contralaterales. Dado que la organización de las demás neuronas mecanosensoriales es similar podríamos pensar que existe una convergencia similar para las neuronas N y T homólogas contralaterales e incluso, dadas algunas similitudes en los parámetros de los PPEs en respuesta a neuronas P y N podríamos pensar que las neuronas N pudieran establecer algunos contactos en las vías interneuronales de las neuronas P. Sin embargo, los datos del presente estudio no permiten afirmar nada al respecto, sería necesario una aproximación experimental distinta para probar éstas hipótesis, incluyendo estimulación simultánea de pares de mecanoneuronas junto con el registro de alguna de las neuronas de Retzius.

Estudios previos estimulando la piel han mostrado que las Retzius responden con trenes de alta frecuencia a estimulación mecánica (Blackshaw, Trueta, Szczupak, De-Miguel, comunicación personal). El presente estudio apunta

a que las conexiones de las neuronas mecanosensoriales con las neuronas de Retzius transmiten y producen su actividad de alta frecuencia. Las ramas de las neuronas mecanosensoriales de tipo T son ipsilaterales (Nicholls y Purves, 1970), mientras que las neuronas P y N extienden ramas a la región contralateral (Muller y McMahan, 1976; Gu, 1991). Estas características anatómicas hacen pensar que las neuronas mecanosensoriales ipsilaterales hacen sinapsis en interneuronas cuyas dendritas contactan a ambas neuronas de Retzius. La figura 24 muestra un esquema simplificado de cómo podrían ser las conexiones entre las neuronas mecanosensoriales y las neuronas de Retzius.



**Figura 24. Representación de las conexiones entre neuronas mecanoneuronas (MN) y neuronas de Retzius (R).** Cada mecanoneurona podría contactar varias interneuronas que hacen contacto con ambas neuronas de Retzius a diferentes distancias electrotonicas. Los contactos están en las dendritas no acopladas.

Las neuronas de Retzius liberan serotonina de manera sináptica y somática y el modo de liberación depende de la frecuencia de la actividad en la neurona de Retzius (Trueta et al., 2002). La estimulación mecánica excita a las neuronas mecanosensoriales, que a su vez pueden provocar actividad de alta frecuencia en las neuronas de Retzius, y presumiblemente activarían la liberación somática de serotonina. Es posible que las neuronas mecanosensoriales, especialmente las neuronas T y P, al registrar estímulos de baja intensidad (que en el medio ambiente podrían corresponder al roce del agua en la piel, estando el entorno en calma),

generen potenciales de acción de baja frecuencia, que se traducen en potenciales sinápticos en las neuronas de Retzius, también a baja frecuencia. Esto, junto con la actividad espontánea resultado de las entradas en dendritas acopladas eléctricamente, mantendría un nivel de liberación de serotonina basal.

Al haber alguna perturbación en el medio ambiente, que generara un estímulo mecánico de mayor intensidad, se producirían trenes de potenciales de acción de mayor frecuencia en las neuronas mecanosensoriales. Las neuronas de Retzius traducirían información de la estimulación con base en las entradas que se activen y del curso temporal de su activación. Si se trata de un estímulo relativamente débil, se activarían preferentemente las neuronas T, éstas tienen respuesta al principio y al final del estímulo y se cree que su papel es dar una señal de alerta al sistema (Carlton y MacVean, 1995). Tomando en cuenta que para lograr trenes de alta frecuencia en las neuronas mecanosensoriales se necesitarían estímulos relativamente fuertes, requeriríamos la activación de las neuronas T y P.

Las neuronas P tienen una actividad sostenida a un estímulo y se sabe codifican la posición del estímulo y la respuesta resultante, con las neuronas T sirviendo mayormente como reforzadoras de la respuesta (Lewis y Kristan, 1998; Zoccolan y Torre, 2002). Las neuronas T podrían activarse mientras el animal explora o descansa en condiciones estables y en caso de alguna perturbación en el ambiente, al tener la menor latencia de respuesta, serían las responsables de dar una señal de alerta a las neuronas de Retzius, al dar una entrada masiva que las despolarizaría. Las neuronas P, que se activarían después, podrían desencadenar algún comportamiento y mantendrían sus entradas activadas hacia las neuronas de Retzius de manera sostenida; estimulando a todas las neuronas de este tipo de la cadena ganglionar a través de la red de interneuronas que están conectadas a todo lo largo del cordón nervioso (Szcupak y Kristan, 1995). Las neuronas N, de activarse, reforzarían la actividad de la neurona P. La actividad en las neuronas de Retzius a su vez podría activar a las otras neuronas monoaminérgicas, que según Lent y Frazer (1977) y Nusbaum y Kristan (1986) están conectadas eléctricamente. Esto podría provocar que se produjera liberación somática además de sináptica de serotonina de las neuronas de Retzius y que junto con las otras neuronas

serotoninérgicas, al aumentar la concentración de este neurotransmisor en el animal fueran modulados los comportamientos resultantes de la integración de los estímulos mecánicos por el sistema motor: acortamiento, nado o alimentación, por ejemplo.

La actividad neuromoduladora de la serotonina se ha relacionado con la actividad motora en la sanguijuela como un factor que incrementa la probabilidad de que se produzcan un comportamiento motor al alterar las propiedades de membrana y sinápticas de las neuronas motoras para que actúen como miembros de los circuitos generadores de patrones motores (Mangan, et al. 1994, a y b). El nivel de activación de las neuronas de Retzius dependerá en gran parte de las entradas de las neuronas mecanosensoriales, las cuales según el estímulo que las haya excitado generarán respuestas más y menos fuertes que al ser integradas por las neuronas de Retzius se traducirán en una mayor o menor secreción masiva de serotonina, a su vez produciendo una regulación más o menos fuerte de acuerdo a la cantidad de neuromodulador liberada. Así, las neuronas mecanosensoriales al provocar actividad de alta frecuencia en las neuronas de Retzius, lo que a su vez puede desencadenar liberación masiva de serotonina, activarán un mecanismo de neuromodulación extrínseco de los comportamientos que desencadenen.

## **CONCLUSIONES**

En conclusión, los datos de este estudio sugieren que existen al menos dos tipos de entradas sobre las neuronas de Retzius. Por un lado, las entradas situadas sobre las dendritas acopladas, que producen la actividad espontánea de baja frecuencia, asociada a liberación sináptica de serotonina y cuya integración depende del acople eléctrico entre las neuronas de Retzius. Por otro lado, las entradas de las neuronas mecanosensoriales, situadas en su mayoría en dendritas no acopladas, cuya integración es independiente del acople eléctrico y que producen la actividad de alta frecuencia que desencadena liberación somática de serotonina.

Este mecanismo permite a una misma célula nerviosa funcionar como neurona o como célula neuromoduladora según las entradas que se activen en un momento dado. En el caso de las neuronas de Retzius, el estado ambiental, registrado por las neuronas mecanosensoriales parece ser uno de los factores que pudieran desencadenar el paso de un modo de secreción basal, regulado por la actividad espontánea de baja frecuencia, a un modo de liberación masiva de neurotransmisor causado por la actividad de alta frecuencia que module él o los comportamientos resultantes de la excitación de las neuronas mecanosensoriales.

## LITERATURA CITADA

- Agustine, G.J. y Charlton, M.P. (1986) Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid synapse. *Journal of Physiology* 381: 619-640.
- Baylor, D.A. y Nicholls, J.G. (1969) Chemical and electrical synaptic connections between cutaneous mechanoreceptor neurons in the central nervous system of the leech. *Journal of Physiology* 203: 591-609.
- Blackshaw, S.E., Nicholls, J.G. y Parnas, I. (1982) Physiological responses, receptive fields and terminal arborizations of nociceptive cells in the leech. *Journal of Physiology* 326: 251-260.
- Bloomfiel, S.A., Hamos, J.E. y Sherman, S.M. (1987) Passive cable properties and morphological correlates of neurons in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Journal of Physiology* 383: 653-692.
- Bras, H., Gogan, P., y Tyc-Dumont, S. (1987) The dendrites of single brain-stem motoneurons intracellularly labeled with horseradish peroxidase in the cat. Morphological and electrical differences. *Neuroscience* 22(3): 947-970.
- Brodfuehrer, P.D. y Thorogood, M.S.E. (2001) Identified neurons and leech swimming behavior. *Progress in Neurobiology* 63: 371-381.
- Bruns, D. y Jahn, R. (1995) Real-time measurements of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377: 62-65.
- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J. y Jahn, R. (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron* 28: 205-220.
- Burrell, B.D., Sahley, C.L. y Muller, K.J. (2001) Non-associative learning and serotonin induce similar bi-directional changes in excitability of a neuron critical for learning in the medicinal leech. *Journal of Neuroscience* 21(4): 1401-12.
- Burrell, B.D., Sahley, C.L. y Muller, K.J. (2002) Differential effects of serotonin enhance activity of an electrically coupled neural network. *Journal of Neurophysiology* 87(6): 2889-95.

- Carlton, T. y McVean, A. (1995) The role of touch, pressure and nociceptive mechanoreceptors of the leech in unrestrained behavior. *Journal of Comparative Physiology A* 177: 781-791.
- Conchello, J.A. y Lichtman, J.W. (1994) Theoretical analysis of a rotating-disk partially confocal scanning microscope. *Applied Optics* 33 (4): 585-596.
- Conchello, J.A., Kim, J.J. y Hansen, E.W. (1994) Enhanced three-dimensional reconstruction from confocal scanning microscope images. II. Depth discrimination versus signal-to-noise ratio in partially confocal images. *Applied Optics* 33(17): 3740-3750.
- Conchello, J.A. (1998) Super-resolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images. *Journal of the Optics Society of America A* 15(10): 2609-2620.
- Conchello, J.A., (1995) Fluorescence photobleaching correction for expectation maximization algorithm. En Three-Dimensional microscopy: image acquisition and processing T. Wilson and C. J. Cogswell editors, SPIE 2412-21, pp138-146.
- Del Castillo, J. y Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potential. *Journal of Physiology* 124: 560-573.
- Dodge, F.A.Jr. y Rahamimoff, R. (1967) Cooperative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *Journal of Physiology* 193: 419-432.
- De-Miguel, F.F., Vargas-Caballero, M., y García-Pérez, E. (2001) Spread of synaptic potentials through electrical synapses in Retzius neurons of the leech. *The Journal of Experimental Biology* 204: 3241-3250.
- De-Miguel, F.F. y Vargas, J. (2000) Native extracellular matrix induces a well-organized bipolar outgrowth pattern with neurite extension and retraction in cultured neurons. *Journal of Comparative Neurology* 417(4): 387-98.
- Dermietzel, R. Y Spray, D.C. (1993) Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?. *Trends in Neuroscience* 16(5): 186-192.

- Eckert, R. (1963) Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *Journal of General Physiology* 46: 573-587.
- Fernández de Miguel, F. (1998) Transmisión Sináptica. En: Biología funcional de los animales. Fanjul M.L., Fernández de Miguel F. e Hiriart M. Eds. Siglo XXI-UNAM. México. pp. 113-167.
- Fatt, P. y Katz, B. (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *Journal of Physiology* 115: 320-370.
- Furshpan, E.J. y Potter, D.D. (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *Journal of Physiology* 145: 289-325.
- Galarreta, M. y Hestrin, S. (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402: 72-79.
- García-Pérez, E., Vargas-Caballero, M., Velázquez-Ulloa, N., Minzoni, A., De-Miguel, F.F., 2002. Enviado a *Nature Neuroscience*.
- Grillner, S. (1975) Locomotion in vertebrates-Central mechanisms on reflex interaction. *Physiological Reviews* 55: 247-304.
- Gu, X. (1991) Effect of conduction block at axon bifurcations on synaptic transmission to different postsynaptic neurons in the leech. *Journal of Physiology* 441: 755-778.
- Hagiwara, S. y Morita, H. (1962) Electrotonic transmission between two nerve cells in leech ganglion. *Journal of Neurophysiology* 25: 721-731.
- Harris-Warrick, R.M. y Kravitz, E.A. (1984) Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *Journal of Neuroscience* 4(8): 1976-1993.
- Henderson, L.P. (1983) The role of 5-hydroxytryptamina as a transmitter between identified leech neurons in culture. *Journal of Physiology* 339: 309-324.
- Hiriart, M. (1998) Mensajeros químicos y regulación neuroendócrina. En: Biología funcional de los animales. Fanjul M.L., Fernández de Miguel F., Hiriart M. Eds. Siglo XXI-UNAM. México. pp. 209-277.

- Izquierdo, G.E. y Fernández de Miguel, F. (1996) El sistema nervioso central de la sanguijuela *Haementeria officinalis*. C92, Memorias, XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Puebla, México.
- Jorge-Rivera, J.C., Sen, K., Birmingham, J.T., Abbott, L.F. y Marder, E. (1998) Temporal dynamics of convergent modulation at a crustacean neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology* 80: 2559-2570.
- Katz, P.S. (1995) Intrinsic and extrinsic neuromodulation of motor circuits. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 799-808.
- Katz, P.S., y Frost, W.N. (1995) Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CGP: serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons. *Journal of Neurophysiology* 74(6): 2281-2294.
- Katz, P.S., Getting, P.A. y Frost, W.N. (1994) Dynamic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *Nature* 367: 729-731.
- Kiehn, O. y Tresch, M.C. (2002) Gap junctions and motor behavior. *Trends in Neuroscience* 25(2): 108-115.
- Kravitz, E.A. (2000) Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *Journal of Comparative Physiology A* 186: 221-238.
- Kristan, W.B. Jr. (1982) Sensory and motor neurons responsible for the local bending response in leeches. *Journal of Experimental Biology* 96: 161-180.
- Kristan, W.B. Jr., McGirr, S.J., y Simpson, G.V. (1982) Behavioral and mechanosensory neuron responses to skin stimulation in leeches. *Journal of Experimental Biology* 96: 143-160.
- Kristan W.B.Jr., Eisenhart, F.J., Johnson, L.A., y French, K.A. (2000) Development of neuronal circuits and behaviors in the medicinal leech. *Brain Research Bulletin* 53(5): 561-570.

- Kuffler, D.P., Nicholls, J.G. y Drapeau, P. (1987) Transmitter localization and vesicle turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *Journal of Comparative Neurology* 256: 516-526.
- Kuffler, S.W. y Yoshikami, D. (1975) The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *Journal of Physiology* 251(2): 465-482.
- Laseter, E.M. y Dowling, J.E. (1985) Dopamine decreases conductances of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 82: 3025-3029.
- Lent, C.M. (1973) Retzius cells from segmental ganglia of four species of leeches: comparative neuronal geometry. *Comparative Biochemical Physiology* 44A:35-40.
- Lent, C.M. y Frazer, B.M. (1977) Connectivity of the monoamine-containing neurons in central nervous system of leech. *Nature* 266: 844-847.
- Lewis, J.E. y Kristan W.B.Jr. (1998) Representation of touch location by a population of leech sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* 80: 2584-2592.
- Llinás R, Steinberg IZ y Walton K. (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophysical Journal*. 33(3): 323-51.
- Lockery, S.R. y Kristan, W.B. Jr. (1990)a Distributed processing of sensory information in the leech. I. Input-output relations of the local bending reflex. *Journal of Neuroscience* 10 (6): 1811-1815.
- Lockery, S.R. y Kristan, W.B. Jr. (1990)b Distributed processing in the leech. II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *Journal of Neuroscience* 10 (6): 1816-1829.
- Mangan P.S., Curran, G.A., Hurney, C.A. y Friesen, W.O. (1994) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. III. Control of cellular properties in motor neurons by serotonin. *Journal of Comparative Physiology A* 175: 709-722.

- Mangan P.S., Cometa, A.K. y Friesen, W.O. (1994) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. IV. Serotonin-induced alteration of synaptic interactions between neurons of the swim circuit. *Journal of Comparative Physiology A* 175: 723-736.
- Mar A. y Drapeau, P. (1996) Modulation of conduction block in leech mechanosensory neurons. *Journal of Neuroscience* 16 (14): 4335-4343.
- Marder, E. y Eisen, J.S. (1984) Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to same physiological inputs and neurotransmitters. *Journal of Neurophysiology* 51(6): 1362-74.
- Marder, E. (1998) From biophysics to models of network function. *Annual Review of Neuroscience* 21: 25-45.
- Marder, E. y Calabrese, R.L. (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological Reviews* 76(3): 687-717.
- Mason, A. y Leake, L.D. (1978) Morphology of Retzius cells demonstrated by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Comparative Biochemical Physiology* 61A: 213-216.
- McClellan, A.D., Brown, G.D. y Getting, P.A. (1994) Modulation of swimming in *Tritonia*: excitatory and inhibitory effects of serotonin. *Journal of Comparative Physiology A* 174: 257-266.
- Muller, K.J. y McMahan, U.J. (1976) The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase. *Proceedings of the Royal Society of London B* 194: 481-499.
- Muller, K.J., Nicholls, J.G., Stent, G.S. (1981) Neurobiology of the leech. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 320p.
- Nelson, R.J. y Chiavegatto, S. (2001) Molecular basis of aggression. *Trends in Neuroscience* 24(12): 713-719.
- Nicholls, J.G. y Baylor, D.A. (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology* 31:740-756.

- Nicholls, J.G., Martin A.R. y Wallace, B.G. (1992) From neuron to brain. Sunderland, Sinauer Associates. 807p.
- Nicholls, J.G. y Purves, D. (1970) Monosynaptic chemical and electrical connections between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech. *Journal of Physiology* 209: 647-667.
- Nicholls, J.G. y 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. *Journal of Physiology* 225: 637-656.
- Nusbaum, M.P., Kristan, W.B.Jr. (1986) Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61. *Journal of Experimental Biology* 122: 277-302.
- Pinato, G y Torre, V. (2000) Coding and adaptation during mechanical stimulation in the leech nervous system. *Journal of Physiology* 529.3: 747-762.
- Pitman, R.M. (1984) The versatile synapse. *Journal of Experimental Biology* 112: 199-224.
- Rall W. (1959) Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Experimental Neurology* 1: 491-527.
- Redman S. (1990) Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiological Reviews* 70(1):165-98.
- Sahley, C. (1995) What we have learned from the study of learning in the leech. *Journal of Neurobiology* 27 (3):434-445.
- Saint-Amant, L., y Drapeau, P. (2001) Synchronization of an embryonic network of identified spinal interneurons solely by electrical coupling. *Neuron* 31: 1035-1046.
- Schmidt, B.J. y Jordan, L.M. (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Research Bulletin* 43(5): 689-710.

- Smith, P.A., Sunderland, A.J., Leake, L.D. y Walker, R.J. (1975) Cobalt staining and electrophysiological studies of Retzius cells in the leech, *Hirudo medicinalis*. *Comparative Biochemical Physiology* 51A: 655-661.
- Stuart, A.E., Hudspeth, A.J. y Hall, Z.W. (1974) Vital staining of specific monoamine-containing cells in the leech nervous system. *Cell Tissue Research* 153: 55-61.
- Surkis, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., y Leonard, C.S. (1998) Recovery of cable properties through active and passive modeling of subthreshold membrane responses from laterodorsal tegmental neurons. *Journal of Neurophysiology* 80: 2593-2607.
- Szczupak, L. y Kristan, W.B.Jr. (1995) Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *Journal of Neurophysiology* 74(6): 2614-2624.
- Trueta, C. y De-Miguel, F.F. (2000) Abstract 35.2. Society for Neuroscience.
- Trueta, C., Méndez, B. y De-Miguel, F.F. (2002) Somatic excitation mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurons. *Journal of Physiology* (en prensa)
- Vargas Caballero, M., (1999) Integración sináptica en neuronas acopladas eléctricamente. Tesis profesional. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Velázquez-Ulloa, N., Blackshaw, S.E., Szczupak, L., Trueta C., García, E., De-Miguel, F.F., 2002. Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. Enviado a *Journal of Neurobiology*.
- Willard, A.L. (1981) Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *Journal of Neuroscience* 1(9): 936-944.
- Wilson, R.J.A., Kristan, W.B. Jr. y Kleinhaus, A.L. (1996) An increase in activity of serotonergic Retzius neurons may not be necessary for the consummatory phase of feeding in the leech *Hirudo medicinalis*. *Journal of Experimental Biology* 199: 1405-1414.

- Wittenberg, G., Loer, C.M., Adamo, S.A., Kristan, W.B.Jr. (1990) Segmental specialization of neuronal connectivity in the leech. *Journal of Comparative Physiology A* 167: 453-459.
- Young, S.N. y Leyton, M. (2002) The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71: 857-865.
- Zoccolan, D. y Torre, V. (2002) Using optical flow to characterize sensory motor interactions in a segment of the medicinal leech. *Journal of Neuroscience* 22(6):2283-2298.

## APÉNDICE

Las técnicas de microscopía tradicionales, como son el campo claro y la microscopía de fluorescencia o el contraste de fase permiten la entrada al objetivo de una gran cantidad de luz que el objeto de estudio ha reflejado. Dado que la luz es desviada por cada punto del objeto el resultado final es una imagen que incluye mucha luz fuera de foco, donde cada cono de luz reflejada por un punto dado en el objeto está contaminado por los conos de luz reflejada de los puntos adyacentes.

La técnica de microscopía confocal permite la entrada de luz al microscopio por una apertura cuyo diámetro puede ser regulado por el usuario, de manera que la cantidad de luz fuera de foco puede reducirse y así lograr cortes ópticos de objetos sólidos. Sin embargo, aun la microscopía confocal tiene sus limitaciones en cuanto a la cantidad de luz fuera de foco que deja pasar debido a otros parámetros que deben tomarse en cuenta al adquirir una imagen, como son la fuerza del láser, y la apertura del iris. Todo el tiempo existe un compromiso entre la brillantez, el contraste y la cantidad de luz fuera de foco en la imagen. Si se utiliza una apertura muy pequeña, entrará poca luz fuera de foco, pero también poca luz del objeto, por lo que se corre el riesgo de perder detalle; si por el contrario se abre el iris entrará más luz del objeto, pero también más luz fuera de foco. En el caso de la fuerza del láser, entre más potencia se logran imágenes más brillantes y puede tenerse mayor información del objeto utilizando aperturas más cerradas, pero ésta vez se corre el peligro de blanquear los colorantes fluorescentes y dañar la preparación. Además de la desviación de la luz por el objeto, el tipo de microscopio, características del objetivo (apertura numérica, distancia de trabajo), longitud de onda adquirida y el medio de inmersión son factores que también contribuyen a la desviación de la luz, todos éstos factores de desviación de la luz constituyen ruido en una imagen. El factor ruido puede o no ser importante dependiendo de lo que nos interese de la imagen y del tipo de objeto de estudio. En el caso de estructuras grandes las imágenes confocales son de excelente calidad; es cuando se lidia con estructuras pequeñas que el ruido puede ser un factor que impida distinguir estructuras o que aparezcan más gruesas de lo que son. En el caso de dendritas y especialmente si lo

que nos interesa son los contactos entre estas, el ruido es de especial importancia, ya que se trata con diámetros de entre 1 y 1.8 micras(García, et al., enviado). El ruido en la imagen puede hacer que se pierdan estructuras, o que la resolución no permita distinguir una estructura de otra, de manera que se vean superposiciones de estructuras que en realidad no se tocan, siendo simplemente intersecciones de luz fuera de foco.

Este problema ha sido abordado por varios grupos y han surgido distintos algoritmos que tratan de resolver este problema. La mayoría de ellos son soluciones de procesamiento digital en las que el investigador utiliza filtros, ya sea que decida un valor de escala de gris por debajo del cual se eliminará la información de la imagen o una frecuencia de corte a partir de la descomposición de los patrones lumínicos de la imagen en componentes de frecuencia. Esto efectivamente quita parte del ruido de fondo y mejora el contraste de las imágenes, pero no garantiza que se quite la luz fuera de foco que está incluida en la representación del objeto. Otras aproximaciones simplemente promedian valores de escala de gris para obtener una imagen más homogénea. Finalmente están los algoritmos que van a la raíz del problema, un ejemplo es el algoritmo de deconvolución del programa XCOSM 2.3 (Conchello y Lichtman, 1994; Conchello, et al., 1994; Conchello, 1998; Conchello, 1995). Este se basa en que la formación de la imagen microscópica puede describirse matemáticamente como una convolución. La convolución es un algoritmo que define procesos en los que la suma de una serie de eventos dan un resultado. El proceso de formación de la imagen microscópica puede ser definido como un proceso convolutivo donde cada punto del campo iluminado proporciona información, que al conjuntarse forma una imagen del objeto. Cada punto en la imagen refleja luz en forma de un cono doble. Estos conos de luz son la desviación de la luz a partir del punto que la reflejó y se intersectan con otros conos de luz provenientes de puntos adyacentes de la imagen (arriba, abajo, y a los lados). En este proceso se incluye la luz reflejada por el objeto y la luz fuera de foco y desviada por todas las otras fuentes de ruido.

La deconvolución es el proceso inverso a la convolución. Para el caso de la imagen microscópica lo que significa es que la deconvolución permite reconstruir la

forma y los pasos que dieron lugar a una imagen determinada. La PSF (Point Spread Function) es una operación con este mismo principio que calcula el desvío de la luz para cada punto, con base en las condiciones en que fue tomada la imagen. Si ahora "mezclamos" esta desviación de luz para cada punto con la imagen original y de alguna manera la luz desviada la "incorporamos" al punto del que provino originalmente obtendremos una imagen en la que idealmente, no habrá luz fuera de foco (ruido) por lo que la resolución de la imagen será mucho mejor y será posible distinguir regiones que en la imagen original hubieran parecido estar unidas.

La deconvolución es un proceso iterativo, por lo tanto el número de iteraciones es otro factor que el investigador debe controlar. Puede darse el caso de que si se dan menos iteraciones de las que se necesitan, la imagen resultante siga teniendo luz fuera de foco y si se dan más iteraciones que las que la imagen necesita se pierdan estructuras de interés. Esto no es un factor trivial, estructuras grandes pueden necesitar más iteraciones que estructuras pequeñas y viceversa. En el caso de objetos con estructuras heterogéneas, como es el caso de una neurona con un soma, masivo en comparación con las dendritas y axón, el número de iteraciones debe regularse según el interés del investigador en una u otras estructuras. En este caso nos interesaban las dendritas de manera que el número de iteraciones fue regulado para que al restar la luz fuera de foco hubiera mayor resolución y definición de éstas estructuras. Debido a esto, muchas veces el soma no fue suficientemente procesado. La forma de regular el número de iteraciones fue probando diferentes valores y comparando con la imagen original, monitoreando que no se estuviera perdiendo información. Este proceso se realizó con cada una de las imágenes.

Los pasos para procesar una imagen con este programa son:

Windows

1. Ajustar el contraste de la imagen original.

2. Convertir imagen \*.pic en varias \*.tiff con Batch Conversion del Confocal Assistant (CAS). Puede elegirse cuantos planos se quieren convertir.
3. Escoger planos que se vayan a procesar (deben ser potencias de dos). Si sobran imágenes ver si se pueden quitar planos que tengan información repetida.
4. Cambiar los planos \*.tiff elegidos a formato \*.raw en el Photoshop. Este proceso se puede automatizar utilizando la opción de “Actions”, grabando los pasos para salvar la imagen de un formato al otro. Ya grabada con “play” se pueden ir convirtiendo las demás en un sólo paso.
5. Organizar las imágenes en folders según su formato.
6. Crear desde Windows todos los folders que se vayan a usar después para guardar las imágenes resultantes ya procesadas.

## Linux

7. Reiniciar la máquina y elegir “linux” con la flechas y dar Enter.
8. Dar el login y password de la cuenta de usuario donde se va a trabajar. (linux es sensible a mayúsculas y minúsculas, tener cuidado con esto)
9. Para iniciar el ambiente de ventanas usar el comando “\$startx (Enter)”.
10. Crear los folders donde se pondrán las imágenes a procesar ya sea desde terminal con el comando “\$mkdir nombredirectorio (Enter)”, donde mkdir=make directory=hacer directorio. Otra opción es desde el ambiente de ventanas en el “home directory” de la cuenta de usuario.
11. Copiar las imágenes \*.raw a procesar de W98 al directorio donde vayamos a trabajar ; puede ser desde “Home directory”, en ambiente de ventanas. (de preferencia sólo deben estar las imágenes \*.raw que correspondan a una imagen dada por cada directorio!! Para poder unirlos y que conformen nuevamente una sola imagen con muchos planos).

Desde terminal:

12. Abrir una terminal o shell.

13. La terminal abre el prompt en el directorio de la cuenta de usuario. Para moverse a otro subdirectorio se usa el comando "\$cd nombredirectorio (Enter)"; para salir del subdirectorio y moverse al directorio padre, se usa "\$cd .. (Enter)". El comando cd=change directory=cambio de directorio

14. Una vez que estamos en el directorio con las imágenes \*.raw que acabamos de copiar de W98, crear una imagen de múltiples planos:

"\$cat \*> nombre\_del\_archivo (Enter)"

Ej: \$cat \*> retzius1 (Enter). El comando cat=concatenate=concatenar.

15. Para verificar que la imagen haya quedado bien usar el comando:

"\$ls -al (Enter)". El comando ls=list=lista; la opción -al=all/longformat=todos los archivos en formato largo. Ver si el archivo resultante es del tamaño de la suma de todos los planos que se unieron.

Ej: cada plano 262144b , si juntamos 10 planos: 2621440b para archivo resultante.

16. Ponerle la secuencia de reconocimiento de la Universidad de Washigton=WASHU, de 1024 bytes a la imagen con el comando:

"\$addh nombrearchivo <nx> <ny> <nz> <tipo de dato> (Enter)"

Ej: \$addh retzius1 512 512 10 0 (Enter)

Donde nx: tamaño de la imagen en x; ny: tamaño de la imagen en y; nz: número de planos en z; tipo de dato: byte=0, una unidad de memoria por pixel; float=2, cuatro unidades de memoria por pixel.

Por lo tanto "retzius1" es una imagen de 512\*512 pixeles, con 10 planos en z, tipo byte.

## XCOSM

17. En la terminal y desde el directorio donde estamos trabajando abrir XCOSM:

"\$xcosm (Enter)" y cargar la imagen con el botón "Load Image". Mover las barras para cambiar de plano y checar que la imagen haya quedado bien.

18. Apretar el botón "Generate PSF" del menú de la izquierda y llenar toda la información que se pide: nombre que se quiere dar a la PSF ("retzius1psf", por ejemplo, pero que la distinga de la original y que permita saber que es una PSF); número de píxeles en x/y; número de planos en z; distancia entre cada plano z en micras; equivalencia pixel/micra. Dar click en "OK". Seleccionar lente de la lista o si no corresponde seleccionar "other" y dar información sobre el objetivo usado: aumento; distancia de trabajo; apertura numérica, índice de refracción teórica del medio que usa el objetivo; índice de refracción del medio usado; grueso del cubreobjetos. Dar click en "OK". Seleccionar filtro de la longitud de onda correspondiente o seleccionar "other" y dar la longitud de onda en nanómetros que se utilizó. Dar click en "OK". Seleccionar el tipo de microscopio: Confocal circular. Dar click en "OK". Dar valores de scanning optics magnification: 53.0 para microscopios Biorad. Physical aperture size: dejar como está a menos que se consiga otra información. Physical aperture size: es la apertura del iris con que se tomó la imagen. Dar click en "OK". Dar click en "OK" en los avisos de que el proceso ha comenzado.

Nota: Tener cuidado al llenar los campos con la información. Es necesario dar click en el renglón y mantener el cursor del mouse sobre el renglón!!

19. Minimizar el XCOSM y la terminal que lo controla.

Desde terminal:

20. El proceso de PSF genera cuatro archivos: la imagen de la PSF, que no tienen extensión; un archivo \*.info y otro \*.template con la información que se llenó para generar la PSF. El otro archivo generado es \*.log y es este el que nos permite monitorear el proceso.

21. Abrir otra terminal y para seguir el proceso de generación de la PSF moverse la directorio correspondiente y ya en ese directorio usar el comando:

```
"$tail -f nombreadchivo.log"
```

```
ej.- $tail -f retzius1psf.log (Enter)
```

El comando significa: tail -f = sigue hasta el final el proceso del archivo.

## XCOSM

22. Una vez que ha terminado el proceso de generar la PSF, regresar a la pantalla del XCOSM y para la deconvolución, apretar el botón de EM. Llenar la información correspondiente: nombre de la imagen original; nombre de la PSF; nombre de la imagen resultante ("retzius1em10", por ejemplo, de preferencia debe ser algo que distinga que es la imagen procesada y el número de iteraciones que se van a usar) y número de iteraciones. Dejar los demás campos como están a menos que se sepa como modificarlos. Dar click en "OK".

23. La EM genera dos tres archivos: la imagen resultante de la deconvolución, que no tienen extensión; un archivo \*.template con la información que se llenó para realizar la deconvolución y un archivo \*.log donde se puede ver como va el proceso. Nuevamente se puede monitorear el progreso del proceso con el comando: "\$tail -f nombreakivo.log"

24. Una vez que termine el proceso comparar la imagen original con la procesada abriéndolas en xcosc con "Load image". Si se considera que la imagen necesita ser procesada con un mayor número de iteraciones volver a usar el botón de EM y cambiar el número de iteraciones y volver a procesar la imagen. Probar con diferente número de iteraciones hasta encontrar el número adecuado de acuerdo a que tanto se quiera quitar luz de acuerdo a las estructuras que se quiera resaltar; siempre comparar con la original.

Desde terminal:

25. La imagen resultante será una imagen multiplano en tipo de dato float. Para poderla ver en otros programas hay que convertirla a tipo byte:

"\$tobyte nombreakivo (Enter)". El comando tobyte=pasar a tipo de dato byte. y luego hay que quitarle el WASHU: "\$removeh nombreakivo (Enter)". El comando removeh=removeheader=quitar encabezado, que es la secuencia de reconocimiento.

26. Para pasarla a windows hay que dividir la imagen multiplano en una serie de planos:

“\$split --bytes=numerodebytesporplano nombreadarchivo nombreadarchivosresultante (Enter)”

Ej: Para una imagen de 512\*512 pixeles en x/y, el tamaño de la imagen en bytes cuando el tipo de dato es byte es de 1pixel=1byte: 512\*512= 262144bytes. Por lo tanto cada plano será de 262144 bytes.

“\$split --bytes=262144 retzius1em10 r1em10.raw

(Todos los archivos resultantes deberán ser del mismo tamaño y el número de archivos debe corresponder al número original de imágenes \*.raw que se procesaron.

Ambiente de ventanas en Linux:

27.Los archivos resultantes tendrán nombres como: r1em10.rawaa, r1em10.rawab, etc o xaa, xab, ..., xzz si no se especifico como se quería que se llamaran los archivos resultantes. Para que puedan ser leídos en Windows hay que cambiarles el nombre a: "nombreadarchivo.raw". Esto se puede hacer desde Home Directory, en las Propiedades de la imagen, se le puede cambiar el nombre o desde terminal usar el comando: “\$mv r1em10.rawaa r1em1001.raw(Enter)”

e ir cambiando cada letra por el número de plano correspondiente:

r1em10.rawab> r1em1002.raw; r1em10.rawac>r1em1003.raw, etc con el comando mv=move=mover, que en linux es como cortar un archivo.

28.Para pasar las imágenes resultantes a Windows, tienen que hacerse desde la cuenta de root. Para pasar a esta cuenta hay que cerrar todo y en Menu de Inicio elegir “Logout” . Nuevamente llegaremos a la pantalla de inicio.

Si no aparecen las líneas de login y password, buscar el prompt de nuestra cuenta de usuarios y dar “\$logout (Enter)”. Si maca errores y no aparece el prompt, dar “Control +C” para que aparezca el prompt y ahora sí usar el comando “logout”. En la pantalla deberán aparecer las líneas de login y password. Escribir los datos de la cuenta de root y dar (Enter). Para iniciar el ambiente de ventanas usar “startx (Enter)”. Desde el ambiente de ventanas en el Home Directory se pueden cortar o copiar las imágenes procesadas a windows.

Recordar que en el directorio de Root están los directorios de W98=Windows98 y el directorio de home=cuentas de usuario. En este directorio buscar el directorio de la cuenta de usuario donde se hicieron las imágenes y de ahí copiarlas a W98.

Nota: Es peligroso trabajar en root si no se conoce bien el sistema porque se corre el riesgo de dañar el sistema. Trabajar lo menos posible desde esta cuenta y sólo utilizarla para pasar las imágenes resultantes a windows.

29. Para salir de linux, desde el Menu de Inicio elegir "shutdown" y luego la opción "restart". Si hay problemas, desde la pantalla terminal, ya fuera del ambiente de ventanas llamar el prompt con Control +C, en caso de que no esté y usar el comando "shutdown -r now (Enter)" para reiniciar la máquina. Si se quisiera apagarla desde linux usar "shutdown -h now".

Nota: si se quiere regresar a windows desde la cuenta de usuario y hubiera problemas, salir de la cuenta de usuario con "logout" y entrar a la de root y desde la pantalla terminal (SIN entrar al ambiente de ventanas) desde el prompt de root usar el comando "shutdown".

## Windows

30. En Photoshop, convertir las imágenes procesadas \*.raw en \*.tiff.

31. Formar una serie de imágenes en Metamorph, con la opción

File: Build Stack: User defined

Seleccionar el directorio del que se van a tomar los planos e ir seleccionándolos. Hay que indicar la distancia en Z entre cada plano.

La imagen resultante será un conjunto multiplano que puede salvarse como \*.pic si se va a utilizar el CAS después, o como \*.stack si se quiere usar el Metamorph para otros procesos.

32. Una vez con el conjunto de imágenes reconstituido, las reconstrucciones tridimensionales pueden hacerse en CAS con la opción: Movie, especificando los ángulos que se quiere abarque la reconstrucción. En Z el rango que puede utilizarse es de  $1 > x < 10$  micras. Si los planos se tomaron a menos de una micra la reconstrucción saldrá alargada en Z o si se trata de poner un valor menor marcará error. También puede hacerse en Metamorph, desde Stack: 3d reconstruction, este

programa sí permite valores de Z menores de 1 micra pero esto debe especificarse desde que se construye el stack y luego utilizar esta calibración al realizar la reconstrucción tridimensional.

33. Si se quieren combinar imágenes se puede hacer desde CAS con la opción Merge. Se asigna cada imagen a un color diferente (azul, rojo o verde) y se especifica el número de planos que se quieren combinar y el incremento que se quiere. Estas imágenes se salvan como \*.avi por de fault pero es mejor salvarlas como \*.pic por si se quiere verlas en Metamorph después.

En Metamorph la opción equivalente es en Graphics: Color Encode. También se asigna un color a cada imagen y se indica si se quieren combinar todos los planos o sólo el plano en pantalla.

34. Si se quieren intersectar imágenes para ver donde hay contactos, esto se hace desde Metamorph, con Stack: Arithmetics:Logical AND. Hay que seleccionar los stacks=imagenes que se van a intersectar y dar un nombre a la imagen resultante. Hay que elegir si se quieren intersectar sólo los planos en pantalla y todos los planos en las imágenes (Current o All Planes).