



03021
17
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**DISTINTOS MODOS DE INTEGRACIÓN EN
NEURONAS CENTRALES DE SANGUIJUELA
ACOPLADAS ELÉCTRICAMENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A :

YURIRIA VÁZQUEZ ZÚÑIGA

DIRECTOR DE TESIS:
**DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ
DE MIGUEL**

MÉXICO, D. F.

JUN, 2003



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.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Ella estaba en el horizonte — dice Fernando. Birri. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré ¿ Para qué sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar"

Eduardo Galeano/ Las palabras andantes

"Vi la circulación de mi oscura sangre, vi el engranaje del amor y la modificación de la muerte, vi el Aleph, desde todos los puntos, vi en el Aleph la tierra, y en la tierra otra vez el Aleph y en el Aleph la tierra, vi mi cara y mis vísceras, vi tu cara y sentí vértigo y lloré, porque mis ojos habían visto ese objeto secreto y conjetural, cuyo nombre usurpan los hombres, pero que ningún hombre ha mirado: el inconcebible universo.

J.L. Borges/ El Aleph

"Se había ahondado ahora en el fondo de su cerebro (que es un lugar prohibido a nuestra mirada) en un estanque donde habitan las cosas, en una oscuridad tan profunda que casi no sabemos lo que son. Miró ese estanque o ese mar que refleja todo y lo cierto es que algunos dicen que nuestras pasiones más fuertes, y el arte, y la religión, son reflejos que vemos en el hueco negro del fondo de la cabeza, cuando efímeramente se oscurece el mundo visible."

Virginia Woolf/ Orlando

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A mis padres, por haberme dado vida
y mostrarme el mundo con tantas cosas bellas.*

A mi abuela, gracias por todo tu cariño.

A mi hermano, por haber recorrido este camino juntos.

A mis amigos, gracias por estar así siempre.

*A todas las personas que de alguna u otra manera han hecho
posible este trabajo tanto en el ámbito
emocional como en el laboral, gracias.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
1) Comunicación neuronal: sinapsis eléctricas y químicas	2
1.1 Sinapsis eléctricas	2
1.2 Sinapsis químicas	3
1.3 Teoría cuántica	4
1.4 Importancia de la liberación cuántica	6
2) Integración sináptica y factores que la modifican	7
2.1 Geometría dendrítica y propiedades pasivas	7
2.2 Cinética de la respuesta postsináptica	12
2.3 Propiedades activas y mecanismos sinápticos	13
2.3 Relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas	15
2.4 Acople eléctrico	16
3) Generalidades sobre el Sistema Nervioso de la Sanguijuela	19
4) Neuronas de Sanguijuela Acopladas eléctricamente	19
4.1 Morfología de las Neuronas de Retzius	19
4.2 Fisiología de las Neuronas de Retzius	23
II. HIPÓTESIS	27
III. OBJETIVOS	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
V. RESULTADOS	
1) Análisis cuántico.	35
2) Relación entre la frecuencia de disparo, la amplitud de los EPSPs y la tasa de acople.	37
3) Experimentos de Colisión de potenciales sinápticos artificiales y su análisis.	40
VI. DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFIA	55

RESUMEN

Los patrones de actividad eléctrica en neuronas son producidos a partir de la integración de sus entradas sinápticas. El objetivo del presente trabajo fue investigar cómo la relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas con amplitudes variables afecta la integración, en neuronas acopladas eléctricamente.

Utilizamos pares de neuronas de Retzius de sanguijuela, que están acopladas eléctricamente. Estas neuronas reciben entradas sinápticas, localizadas en distintas regiones de su árbol dendrítico. Una entrada sináptica común está localizada en las dendritas acopladas y genera potenciales postsinápticos excitadores espontáneos (EPSPs). Estos pueden ser sincrónicos (al mismo tiempo) en ambas neuronas o asincrónicos (a distintos tiempos). Los sincrónicos pueden ser simétricos o asimétricos. La suma de estos EPSPs genera potenciales de acción a bajas frecuencias.

Además de la entrada común presente en las dendritas acopladas, la estimulación mecanosensorial de la piel produce EPSPs en neuritas no acopladas. Estos dan lugar a potenciales de acción a frecuencias de disparo proporcionales a la intensidad del estímulo. Estas entradas activadas por estimulación mecanosensorial son capaces de generar patrones de disparo a altas frecuencias y se asocian a liberación somática de serotonina.

Se realizó un análisis para conocer si la liberación del neurotransmisor responsable del disparo a bajas frecuencias es cuántica. Combinando métodos electrofisiológicos y de modelaje matemático se encontró que la distribución de los EPSPs es cuántica, es decir el neurotransmisor responsable de los EPSPs se libera en vesículas que contienen una cantidad fija de neurotransmisor. Siendo que las amplitudes de los EPSPs están formadas por múltiplos de la amplitud de los EPSPs unitarios. Además, la amplitud del cuanto se encuentra regulada postsinápticamente por el grado de acople.

El papel de la sinapsis eléctrica en la integración de EPSPs se analizó generando potenciales sinápticos artificiales por inyección de corriente en el soma de ambas neuronas de Retzius. Se produjeron potenciales sinápticos excitadores artificiales sincrónicos, asincrónicos, simétricos y asimétricos. Cuando los potenciales sinápticos fueron simétricos y sincrónicos, su amplitud en el soma de ambas neuronas no se afectó, aunque sus tiempos de caída se incrementaron. Cuando los potenciales sinápticos fueron asincrónicos (simétricos o asimétricos), el tiempo de caída se incrementó en todos los casos (excepto cuando el sináptico de menor amplitud precedió por 10 ms al de mayor amplitud). Cuando el potencial sináptico en la neurona contralateral se produjo antes, la suma ocasionó un aumento en la amplitud del potencial sináptico local.

Nuestros resultados muestran que el acople eléctrico puede producir cambios en la amplitud y en el tiempo de caída de los potenciales sinápticos, dependiendo de la relación que exista entre ellos. Los incrementos en la amplitud favorecen la llegada al umbral de disparo y por lo tanto el aumentó de su frecuencia de disparo. Los aumentos en la fase de caída favorecen la suma temporal y reducen el filtrado de la membrana mejorando así la propagación del potencial sináptico.

I INTRODUCCIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Comunicación neuronal: sinapsis eléctricas y químicas

Las neuronas se comunican entre sí transmitiendo señales eléctricas, que son cambios de voltaje en las neuronas. La frecuencia, amplitud y duración de estos cambios de voltaje dan lugar a patrones eléctricos que le permiten al sistema comunicarse entre sí, con otros órganos y con el exterior. Estas señales eléctricas fluyen de una a otra célula a través de las sinapsis, que es donde los flujos eléctricos se traducen y se transmiten. Las sinapsis pueden ser entre las neuronas o de estas con sus células efectoras. En las sinapsis la información se traduce y se transmite a otras neuronas. Existen dos tipos de sinapsis: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas. En todas las sinapsis existe una célula presináptica y una postsináptica.

En la sinapsis química, un cambio de voltaje depolarizante en la célula presináptica produce una respuesta excitadora o inhibitoria en la célula postsináptica, dependiendo de los receptores postsinápticos. En la sinapsis eléctrica, el cambio de voltaje de la neurona presináptica produce una respuesta de la misma polaridad en la célula postsináptica.

1.1 Sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas permiten el flujo directo de información de una célula a otra. Éste se realiza a través de uniones comunicantes que son sitios donde se agrupan canales intercelulares. Es a través de la sinapsis eléctrica que fluyen los impulsos eléctricos, ya que permiten el paso de iones, metabolitos y segundos mensajeros (Ca^{2+} , cAMP, IP_3) (revisado por Bruzzone et.al., 1997).

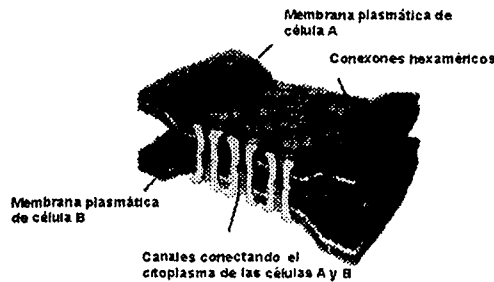
En los vertebrados, estos canales intercelulares resultan de la asociación de 2 hemiconexones; cada uno aportado por una célula (**Fig.1**). Los hemiconexones, a su vez, son un ensamble hexamérico de proteínas llamadas conexinas. Se han identificado aproximadamente 20 tipos de conexinas, lo cual permite una gran variedad de combinaciones entre ellas. Existen canales homotípicos (cuando los 2 conexones son iguales) o heterotípicos (cuando los conexones son distintos) (revisado por Dermietzel, 1993). En invertebrados hay una especie de proteínas homólogas a las conexinas, denominadas inexinas y aunque no son similares en secuencia a las conexinas, su función fisiológica sí lo es (Phelan, 1998).

Los conexones, al igual que otros canales pueden tener distintos estados de apertura, que son modulados por dopamina, Ca^{2+} , pH, y la fosforilación de algunas cinasas (revisado por Dermietzel, 1993).

Los primeros en demostrar la existencia de una sinapsis eléctrica fueron Furshpan y Potter en el año de 1959, registrando fibras nerviosas del axón gigante del acocil. Esta sinapsis eléctrica es rectificante, es decir, permite el paso de la corriente despolarizante en una dirección, de la célula presináptica a la célula postsináptica y de la hiperpolarizante en

sentido contrario. Hoy en día se conocen sinapsis eléctricas tanto rectificantes como no rectificantes.

A pesar de que anteriormente se pensaba que la comunicación neuronal era mediada principalmente por sinapsis químicas, se han demostrado uniones comunicantes en muchos órganos, en los que su expresión varía durante el desarrollo del individuo. Se han encontrado conexinas en: corazón, hígado, testículos, piel,



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Representación esquemática de una sinápsis eléctrica. La representación está basada en análisis de difracción por rayos X y microscopía electrónica. El flujo de iones y segundos mensajeros se realiza a través del poro de los conexones o canales hexaméricos. (modificado de Oviedo-Orta et al, 2002).

hígado, cerebro (neuronas, oligodendrocitos, astrocitos), riñones y pulmones (revisado por Dermietzel y Spray, 1993). El hecho de que las conexinas tengan una distribución tan amplia, ha hecho revalorar su importancia en la comunicación intercelular y por lo tanto en el papel que desempeñan en procesos fisiológicos. Debido a que las sinapsis eléctricas tienen efectos muy rápidos, favorecen reflejos de escape (Giaume, 1987) y la sincronización de redes neuronales en la corteza (Tamás et. al, 2000) y otras áreas del cerebro.

1.2 Sinapsis químicas

Las sinapsis químicas fueron demostradas mucho tiempo antes de las sinapsis eléctricas y como su nombre lo indica, utilizan un intermediario de naturaleza química para traducir el mensaje de la neurona presináptica a la célula postsináptica. La despolarización de la terminal presináptica y la entrada de Ca^{2+} extracelular inducen la liberación de neurotransmisor de la presinapsis. El neurotransmisor se libera al espacio intercelular o hendidura sináptica, para posteriormente unirse a su receptor en la célula postsináptica (Fig. 2), para finalmente abrir canales catiónicos o aniónicos que modifican el potencial al cual

se encuentra la célula. Debido a los múltiples pasos involucrados, el proceso de transmisión química es más lento que las sinapsis eléctricas, con un retardo de 0.2 a 1.5 ms. entre la llegada del impulso presináptico y la respuesta postsináptica.

Dependiendo del neurotransmisor liberado, de los receptores y del voltaje postsináptico, se pueden producir potenciales sinápticos subumbrales excitadores (EPSPs) o inhibidores (IPSPs). La suma de EPSPs en algún momento ocasiona que la célula llegue a su umbral de disparo y se genere un potencial de acción.

1.3 Teoría cuántica

Trabajando con la unión neuromuscular de la rana, en 1952 Fatt y Katz demostraron que la acetilcolina se libera en cuantos o paquetes multimoleculares. Hoy en día, un cuanto presináptico se define como la cantidad neurotransmisor secretado por una vesícula.

En 1954 Del Castillo y Katz, realizaron registros tanto de potenciales espontáneos como de potenciales evocados en condiciones de bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} , disminuyendo la probabilidad de liberación. A partir de los histogramas de las amplitudes de los potenciales registrados, observaron que las amplitudes de los potenciales evocados eran múltiplos de la amplitud promedio de los potenciales espontáneos. Su interpretación fue que la amplitud media de los potenciales espontáneos miniatura equivale al valor de un cuanto, y las amplitudes de las respuestas de sinápticos evocados están formadas por varios de ellos. Es decir, los potenciales de la placa neuromuscular (e.p.p.) están formados estadísticamente por múltiplos de las unidades que conforman los potenciales espontáneos miniatura.

Otra aportación sumamente importante de este trabajo, fue la demostración de que en condiciones de baja probabilidad de liberación, es posible calcular una distribución teórica para las amplitudes de potenciales evocados utilizando la amplitud media de los potenciales sinápticos espontáneos. Del Castillo y Katz supusieron que una terminal presináptica tiene n número de cuantos para liberar durante un impulso sináptico, con una probabilidad promedio de liberación x . De manera que uno puede calcular la amplitud media (m) con base en el número de cuantos liberados (n) y su probabilidad de liberación (p), tal como lo predice una distribución Binomial. Sin embargo, para calcular m de esta manera, es necesario conocer el número de cuantos liberados y la probabilidad de liberación, lo cual era prácticamente imposible. Ante tal dificultad, Del Castillo y Katz replantearon dos formas alternativas para calcular m . Suponiendo que al haber alto Mg^{2+} y bajo Ca^{2+} la probabilidad de liberación es muy baja, por lo que ocasionalmente habrá respuestas con uno ó dos cuantos, y la mayoría de las respuestas serán fallas. Debido a que la probabilidad de liberación es muy baja, el valor de m a partir de larga serie de observaciones tenderá a distribuirse como una distribución de Poisson. Esta distribución se utiliza generalmente para eventos discretos sobre un continuo; por ejemplo, cuantas veces al año llueve sobre un desierto ($Frecuencia = \exp(-m)/m^x/x!$)).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

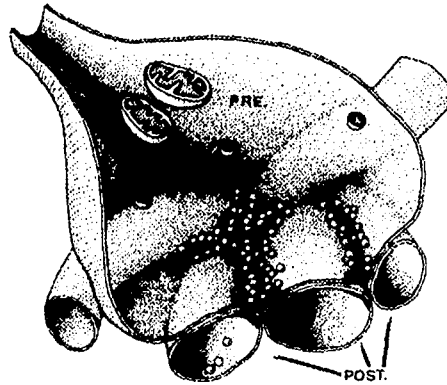
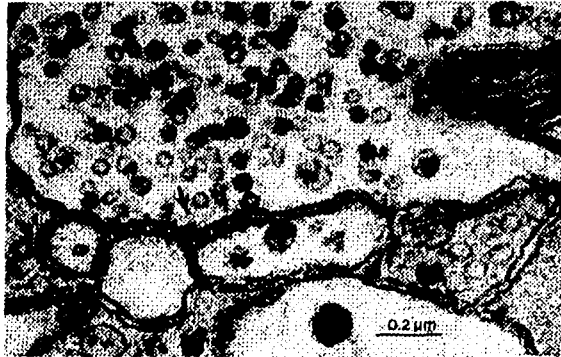
A**B**

Figura 2 . Estructura de una sinapsis química. A. Esquema general para una sinapsis química. La estructura presináptica contiene (Pre.) numerosas vesículas granulares y se encuentra separada del proceso postsináptico por un espacio extracelular de aproximadamente 30 nm. En la hendidura sináptica, los procesos postsinápticos se encuentran muy cerca de la presinapsis. Corte transversal visto al microscopio de proceso presináptico en conjunto con varias membranas postsinápticas. La flecha indica material sináptico denso. En la presinapsis podemos observar varias vesículas con neurotransmisor (modificado de Muller y McMahan, 1976 en *Neurobiology of the Leech*, capítulo 6).

Entonces, suponiendo las condiciones anteriores de baja probabilidad de liberación y que n es grande, m se puede distribuir como una distribución de Poisson, y por lo tanto puede ser calculada de dos maneras:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

calculada de dos maneras:

- a) $m = \frac{\text{Amplitud media de los e.p.p.}}{\text{Amplitud media de los potenciales sinápticos espontáneos}}$
- b) $m = \frac{\ln \text{Número total de impulsos evocados}}{\text{Número de fallas}}$

Del Castillo y Katz midieron la amplitud de los e.p.p. evocados, las fallas, y la amplitud media de los potenciales sinápticos espontáneos. Calculando m de ambas maneras los resultados fueron muy similares. Este valor sirvió para calcular la distribución teórica de las amplitudes dependiendo del número de cuantos liberados. Sobreponiendo la distribución teórica con la distribución obtenida experimentalmente mostraron que son muy similares y dejaron claro que la liberación de la acetilcolina en la placa neuromuscular es de naturaleza cuántica. Además, la distribución de amplitudes por las condiciones experimentales impuestas podía ser predicha por una distribución de Poisson.

En general, el número de cuantos liberados de una terminal presináptica (contenido cuántico) puede variar considerablemente, pero el número de moléculas contenido en cada cuanto de la misma terminal (tamaño cuántico) es relativamente fijo con una varianza del 10% aproximadamente (Boyd y Martin, 1956). Entonces, un cuanto presináptico es la cantidad de neurotransmisor liberado en una vesícula. Sin embargo, un cuanto también puede definirse postsinápticamente. En este caso la amplitud del potencial producido por un cuanto depende del número de receptores activados.

1.4 Importancia de la liberación cuántica

Los cuantos proveen las unidades de neurotransmisor que constituyen las señales químicas que son convertidas en potenciales sinápticos. La amplitud de los potenciales sinápticos dependerá de la cantidad de cuantos liberados por la célula presináptica.

Dependiendo de la sinapsis existe un balance entre el contenido cuántico y la probabilidad de liberación, por ejemplo en el sistema nervioso de vertebrados hay una reducción en el contenido cuántico conforme uno se va acercando hacia sinapsis más centrales. En la placa neuromuscular, donde la transmisión debe ser muy segura el contenido cuántico medio es grande ($m=100-300$ cuantos), sin embargo en sinapsis centrales como la de motoneuronas espinales, que integran muchas entradas sinápticas, el contenido cuántico es mucho menor. El hecho de que el contenido cuántico sea menor, no significa que esa sinapsis falle todo el tiempo, ya que la probabilidad de liberación es mucho más alta (revisado en Nicholls, 2001). Dependiendo del tipo de sinapsis el contenido cuántico varía y el tamaño cuántico dependerá de la probabilidad de liberación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Integración sináptica y factores que la modifican

Las neuronas generan sus patrones de disparo integrando la información proveniente de sus entradas sinápticas. La célula postsináptica integra una combinación de variaciones de voltaje producidos por múltiples entradas sinápticas para convertirlas en un solo cambio de voltaje final. Diferentes elementos determinan la integración sináptica: la cinética de la respuesta postsináptica, la geometría dendrítica, las propiedades eléctricas pasivas de la membrana, la existencia de propiedades activas (canales activados por voltaje), la relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas y el acople eléctrico entre las células.

Las propiedades pasivas y la geometría dendrítica son elementos que influyen de manera directa la integración, porque independientemente de la cinética de la respuesta postsináptica, cualquier potencial tendrá que propagarse hacia el sitio de integración para ser procesado. Generalmente las entradas sinápticas están en las dendritas y el sitio de integración en el axón. Entonces, dependiendo de la forma de la neurona y de sus propiedades pasivas, los potenciales se propagaran de manera distinta.

2.1 Propiedades Pasivas y Geometría Dendrítica

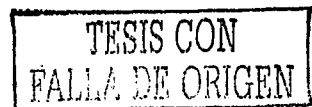
En 1957, Rall propuso un modelo de la neurona como un circuito eléctrico RC, y tomando en cuenta parámetros como capacitancia, resistencia, corriente, cambios de voltaje, y la geometría de la célula; predijo la propagación pasiva de potenciales electrotónicos en dendritas. Rall consideró la longitud del compartimiento neuronal - dendrita o axón- como una serie de segmentos formados por componentes eléctricos. Imaginó las dendritas como *cables conductores* (Fig 3). Según el modelo, si se aplica un pulso de voltaje despolarizante estacionario V_{io} en uno de los extremos, la propagación del potencial va a depender del cambio de voltaje interno V_i a lo largo del cable.

La corriente dentro de la dendrita se propagará de segmento en segmento. Una parte de la corriente fluye para cargar el capacitor (Cm), otra parte de la corriente fluye a través de la resistencia interna (ri) de la dendrita (citoplasma), y el resto de la corriente se fuga a través de la resistencia de membrana (rm). El potencial de reposo de la célula está representado por E_r . El cambio final en el voltaje (V_f) es posible calcularlo restando el cambio de voltaje instantáneo (V_m) menos el potencial de reposo (E_r) (Hodgkin y Rushton, 1946).

$$V_f = V_m - E_r$$

A partir de esta sencilla ecuación, Rall calculó la fórmula que nos permite conocer como es que un potencial va decreciendo conforme se aleja del lugar donde fue generado, es decir el decaimiento exponencial electrotónico:

$$V_f = V_0 e^{-x/\lambda}$$



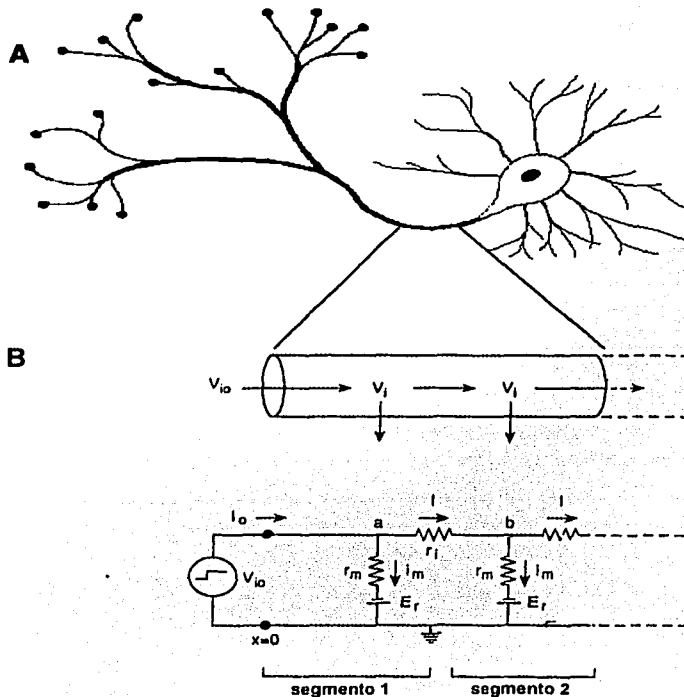
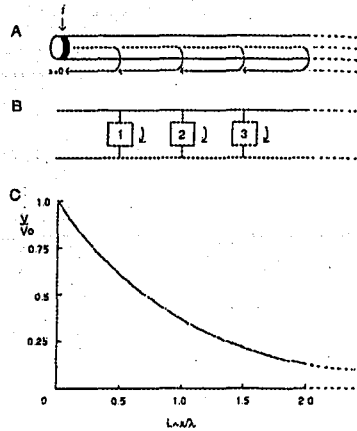


Figura 3. Representación esquemática y eléctrica de una neurona. A. Representación esquemática de una neurona. **B.** Representación esquemática de un compartimiento nervioso (axón o dendrita). En un extremo se aplica una pulso despolarizante (V_{io}), que se propaga a lo largo del proceso generando un cambio en el potencial interno (V_i). **C.** Representación de la dendrita como circuito eléctrico. El pulso de corriente estacionario (I_0) generado en V_{io} donde la distancia es $x=0$, se propaga de segmento en segmento. Una fracción de la corriente se propaga a través de la resistencia interna (r_i) y otra se fuga a través de la resistencia de membrana (r_m). El potencial de membrana está representado como E_r (modificado de Shepherd, 1990).

Donde el voltaje final (V_f) es igual al voltaje inicial (V_0) multiplicado por el número e elevado a la longitud característica (distancia (x)/ constante de espacio (λ)). Lo anterior, siempre y cuando el potencial sea estacionario. Imaginemos que queremos conocer la magnitud del potencial en el lugar en que es producido, es decir, el punto donde $x=0$ entonces e^0 será igual a 1, por lo que el V_f será igual al V_0 . En el caso en el cual $x=\lambda$, e estará elevado a la -1 , lo que significa multiplicar V_0 por .37. Lo anterior en términos prácticos significa que cuando $x=\lambda$, el voltaje habrá decaído en un 63% (Fig. 4). Una distancia electrotonica de 2λ está considerada como el límite para interacciones específicas entre potenciales sinápticos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Descripción del potencial electrotonico en un cable de extensión semiinfinita.

A. Representación esquemática del cable y del flujo de corriente durante la inyección de un pulso de corriente i en $x=0$. **B.** Representación del cable como una serie de segmentos. **C.** Distribución del potencial electrotonico estacionario de acuerdo con la ecuación $V_r = V_0 e^{-x/\lambda}$. Ordenadas: amplitud del potencial tomando como referencia V_0 . Abcisas: L , definida como la longitud real (x) relativa a la longitud característica (λ) (Shepherd, 1990).

Matemáticamente, la constante λ se define como

$$\lambda = \sqrt{rm/ri} = \sqrt{Rm/Ri * d/4}$$

donde rm es la resistencia de membrana (Ω/cm) y ri es la resistencia interna (Ω/cm).

La resistencia de membrana esta dada por los canales iónicos en la membrana y ri por el citoplasma celular. Normalmente ri se mantiene constante, pero rm varía con la apertura y cierre de los canales que generan los potenciales sinápticos.

Entonces lo que define el valor de λ es el coeficiente entre rm/ri .

La resistencia de membrana (rm) depende de la resistencia específica de la membrana (Rm) y del tamaño de la circunferencia del cable. La resistencia interna depende a su vez de la resistencia interna específica (Ri) y del área de la dendrita. Es por estas razones que el valor de λ depende del diámetro de la dendrita o del axón, entre más grande sea el diámetro, λ será mayor y la propagación a lo largo del cable será mejor.

Hay varios parámetros que influyen en la propagación del potencial: la resistencia interna o axial (ri), la resistencia de membrana (rm), la capacitancia (Cm) y λ .

Debido a que λ es afectada por el diámetro, la propagación de un potencial sináptico en las dendritas es diferente a la propagación en el soma.

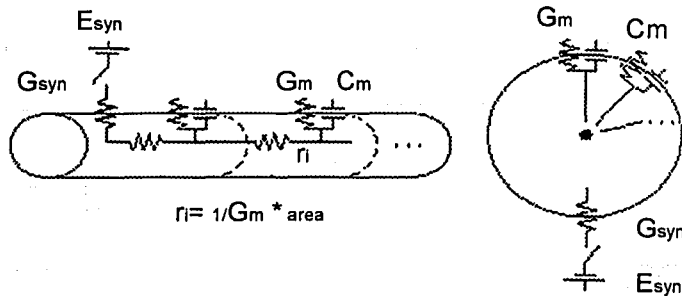


Figura 5. Diferencias eléctricas entre una dendrita y el soma de una neurona. A. Circuito equivalente para una dendrita. **B.** Circuito equivalente para un soma esférico. Donde G_m y C_m representan la conductancia de la membrana en reposo y la capacitancia de una unidad de membrana; r_i es la resistencia interna del cable. La conductancia sináptica esta representada por G_{syn} . (tomado de Magee, 2000)

En dendritas, la corriente sináptica fluye a lo largo de la membrana a través de G_m y C_m ; y se propaga al siguiente compartimento por medio de r_i . El valor de r_i es inversamente proporcional a la G_m y al área, por lo que las dendritas presentan una r_i mucho mayor comparada con la del soma. En el soma, la corriente fluye solamente por dos vías C_m y G_m , debido a que r_i es muy pequeña (Fig. 5).

Como resultado de lo anterior, la amplitud local de un ESPS generado por la misma conductancia sináptica será mucho más grande en una dendrita con poco diámetro y mucha resistencia interna, que en el soma. Al mismo tiempo, la posibilidad de que la corriente fluya por otras vías, además de C_m y G_m provoca una fuga de corriente mayor. Debido a estas razones la cinética de los potenciales sinápticos producidos en dendritas lejanas al sitio de integración será mucho más lenta al llegar a él, ya que la señal se va filtrando mientras recorre los diversos compartimentos del cable.

El valor de la conductancia de membrana (G_m) varía de las dendritas al soma. Rall describió un factor llamado rho (ρ) para definir la relación conductancia dendrítica y la somática. Se ha demostrado que en la mayor parte de las neuronas, las dendritas presentan una conductancia de entrada de 5 a 10 veces mayor que el soma. Sin embargo, esto es opuesto a lo que ocurre en invertebrados, donde el diámetro somático es enorme (García et.al., en prensa)

Otro factor influyente en la propagación del potencial en las dendritas, es la manera en la cual la que estas se bifurcan formando árboles dendríticos. Si la dendrita madre se bifurca dando lugar a ramas electrotonicamente equivalentes a ella, la propagación será similar a la de un cilindro con diámetro constante. Esto se cumple siempre y cuando el diámetro de la dendrita madre (d_m) elevado a la 3/2 sea igual a la suma de los diámetros de las dendritas hijas (d_h) elevados a la potencias 3/2.

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Supongamos que tenemos una dendrita con un diámetro de $4 \mu\text{m}$ ($4^{3/2} = 8$), entonces para que las dendritas hijas constituyan un cilindro equivalente, estas deberán medir $2.5 \mu\text{m}$ aproximadamente.

La figura 6 muestra el efecto de forma de bifurcación de las dendritas en la propagación del potencial sináptico. Cuando los diámetros de las dendritas hijas forman un cable equivalente la propagación del potencial o la relación V/V_0 , decae exponencialmente. Hay un aumento en la relación V/V_0 cuando el diámetro de las dendritas hijas es más pequeño, y un decaimiento más rápido cuando el diámetro de las dendritas hijas es más grande que el de la madre.

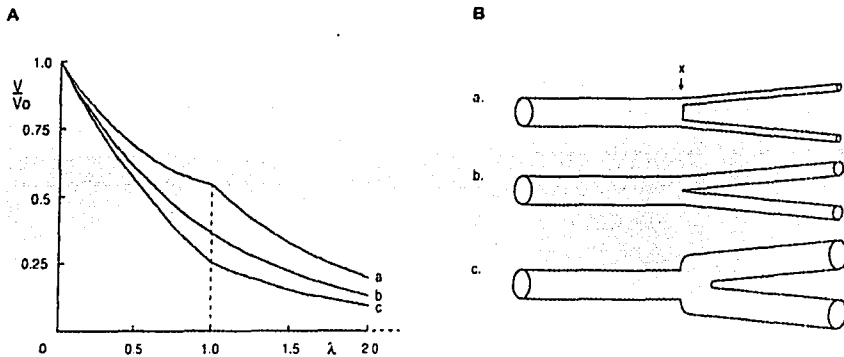


Figura 6. Efectos de la propagación electrotonica en distintos tipos de ramificaciones. A. Gráfica de la propagación del potencial electrotonico, a través de dendritas con tipos de ramificaciones distintas (mostradas en B). B. Tres modelos de ramificación básicos, cuando el diámetro de la madre es de $8 \mu\text{m}$: (a) cada rama hija es de $1 \mu\text{m}$ de diámetro; (b) cada rama hija es aproximadamente de $2.5 \mu\text{m}$, de manera que la suma $dh^{3/2}$ es igual a $dm^{3/2}$; (c) cada rama hija tiene el mismo diámetro que la rama madre (tomado de Shepherd, 1990).

Como hemos visto, diversas variables influyen la propagación de un potencial sináptico hacia el sitio de integración. Entonces, dependiendo de en que lugar se encuentre la entrada sináptica y los compartimientos eléctricos que el potencial sináptico recorra, su amplitud y cinética serán alteradas. Rall demostró que el tiempo al pico y la amplitud del potencial en una neurona donde la propagación depende exclusivamente de propiedades pasivas son un indicador de la distancia a la cual esta localizada la entrada sináptica (Fig. 7). Cuando las entradas están localizadas cerca del soma, las respuestas son amplias y rápidas, mientras que cuando las entradas están distantes, las respuestas son más lentas y de menor amplitud. Esto se debe al filtrado que sufren los potenciales sinápticos al propagarse a través de la membrana.

El filtrado de potenciales sinápticos provenientes de entradas distales tendrá esencialmente dos consecuencias en sus propiedades de integración. La primera, es que los potenciales sinápticos serán de menor amplitud y su curso temporal será más largo. Al prolongarse la duración temporal se extiende el período en cual los potenciales sinápticos se suman. La actividad más lenta, proveniente de las entradas distales, puede superponerse con

potenciales rápidos causados por sinapsis cercanas. (Magee J., 2001)

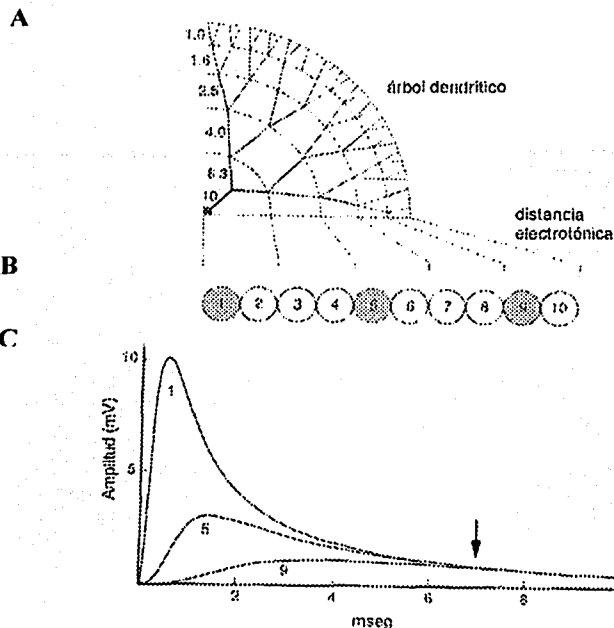


Figura 7. Propagación del potencial electrotonico en un árbol dendrítico. A. Árbol dendrítico, donde la regla de los 3/2 se cumple en cada bifurcación. **B.** Simulación de dendritas como cilindros equivalentes. El cilindro 1 equivale al punto más cercano al soma. **C.** Grafica de amplitud vs tiempo a distintas distancias del soma en el árbol dendrítico. (Shepherd, 1990)

Sin embargo en las dendritas existen mecanismos capaces de compensar el filtrado dendrítico; entre los que se encuentran:

- 1) La alta resistencia específica (Rm) de la membrana.
- 2) La alta resistencia interna (ri)
- 3) La geometría y las bifurcaciones dendríticas.
- 4) Algunas dendritas presentan propiedades activas (canales iónicos activados por voltaje).

2.2 Cinética de la Respuesta Postsináptica

Hasta ahora hemos revisado los factores influyentes en la propagación pasiva de los potenciales sinápticos hacia el sitio de integración, sin embargo algo sumamente importante es la naturaleza del potencial sináptico, o sea la cinética de la respuesta postsináptica (amplitud, duración y polaridad).

En general, las respuestas pueden ser: excitadoras e inhibitoras. Las respuestas excitadoras despolarizan la célula, permitiendo la entrada iones con cargas positivas. La suma de varias respuestas excitadoras eventualmente genera un potencial de acción. Por el contrario, las respuestas inhibitoras hiperpolarizan la membrana celular, ya sea dejando pasar iones con cargas negativas o sacando K^+ ; con lo que disminuye la probabilidad de llegar al umbral de disparo.

Las respuestas postsinápticas pueden tener amplitudes y duraciones muy distintas, dependiendo de los canales y/o receptores que los producen. El potencial de reposo de la célula y los iones participantes también desempeñan un papel fundamental en la polaridad, la amplitud y la duración de la respuesta. Todos estos factores, influyen cuantitativamente en la respuesta y por lo tanto su integración.

Los potenciales de acción generalmente actúan como una variable que renueva la actividad eléctrica en la neurona, provocando que la integración de las entradas posteriores a él comience desde cero (Koch, 1999).

2.3 Propiedades Activas y mecanismos sinápticos

La mayoría de las neuronas tienen árboles dendríticos sumamente complejos que reciben miles de entradas sinápticas. En caso de que la eficiencia de las entradas sinápticas fuese dependiente de su localización, estaría dominada por las constantes electrotónicas de membrana. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que en muchas neuronas la integración es independiente de la localización de las entradas sinápticas (Stuart y Sakmann, 1995; Gilllesen y Azlheimer 1997; Magee y Cook, 2000.).

Pero entonces cómo es que los potenciales de las entradas más lejanas logran llegar al sitio de integración, o dicho de otra manera ¿cómo es que las dendritas distales se hacen escuchar por el axon? Una solución podría ser que las dendritas distales “hablarán” mucho más fuerte que las proximales. Spruston ha hecho una analogía útil para comprender lo importante que es en algunos casos, compensar el filtrado dendrítico. La analogía es la siguiente: cuando hablamos por teléfono con un amigo que se encuentra en otro país, lo escuchamos de la misma manera que si estuviéramos hablando con él aquí. Sin embargo, nuestra voz es transmitida por una serie de cables a través de distancias muy largas, casi sin atenuación. Para lograr esto los científicos han diseñado estrategias que evitan la atenuación de las señales conforme se propagan. Algunas neuronas tienen que hacer lo mismo. Para lo cual se valen de mecanismos tales como amplificar la señal usando canales dependientes de voltaje (propiedades activas) o bien que la fuerza de las sinapsis distales sea mayor.

La forma en que las sinapsis distantes pueden ser más fuertes es utilizando mecanismos sinápticos encargados de modificar el tamaño y las propiedades cinéticas de la conductancia sináptica. Estos mecanismos pueden ser presinápticos (el contenido del transmisor vesicular, el número de sitios de liberación por terminal) o postsinápticos (número de receptores, densidad, afinidad o conductancia del receptor/canal, y su cinética). Por ejemplo Pettit y Augustine (2000), demostraron que tanto en neuronas neocorticales como en neuronas piramidales de hipocampo las dendritas distales son mucho más sensibles al glutamato que las dendritas proximales. Además, en muchas dendritas existen canales activados por voltaje, distintos a los canales activados por neurotransmisores

cuando ocurre una sinapsis. Las corrientes producidas por los canales influyen en la cinética de los potenciales sinápticos y por lo tanto en su integración. En las dendritas de muchas neuronas se han encontrado canales de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y una corriente catiónica no específica (I_h).

Canales de Na^+

La corriente de Na^+ es la más importante en la generación del potencial de acción en el axón. Esta corriente se produce en el axón y en algunos casos en las dendritas; y su distribución varía dependiendo del tipo celular. Se ha visto que en neuronas piramidales de la neocorteza, en interneuronas y neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo, y en células mitrales, la distribución de los canales de Na^+ es relativamente constante a lo largo del árbol dendrítico. Sin embargo en dendritas de células de Purkinje y de neuronas piramidales de la capa CA3 del hipocampo, la densidad de canales decrece conforme aumenta la distancia del soma (revisado por Migliore y Shepherd; 2002). Esta distribución diferencial permite que en algunas neuronas el filtrado dendrítico pasivo que sufren los potenciales sinápticos pueda ser compensado. Por ejemplo, en las neuronas piramidales de la capa V de la neocorteza, Stuart y Sakmann demostraron que los EPSPs de las entradas distantes al soma, son amplificados por canales de Na^+ dependientes de voltaje localizados principalmente en la región axosomática. De manera similar Adreassen y Lambert (1999), han observado en neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo una amplificación de los potenciales sinápticos generados en sitios distantes. Esta amplificación es debida a una corriente de Na^+ no inactivable ($I_{\text{Na+np}}$). Con ello, la integración se vuelve independiente del lugar en el cual se encuentra la entrada sináptica.

Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} también participan en la propagación sináptica activa, por ejemplo en neuronas piramidales (Gillesen y Alzheizer, 1997) Sin embargo, la información a cerca de la distribución y densidad de canales de Ca^{2+} , en general es mucho más limitada.

El mecanismo mediante el cual tanto los canales de Na^+ como los de Ca^{2+} dependientes de voltaje contribuyen a minimizar el efecto de la pérdida de corriente sináptica a través de la resistencia de membrana, es proveyendo un flujo extra de iones.

Canales de K^+

Distintos tipos de canales de K^+ dependientes de voltaje son responsables de la fase de repolarización del potencial de acción y contribuyen al control de la frecuencia de disparo en el axón. En algunas dendritas este tipo de canales se distribuyen a una densidad relativamente constante (ej. neuronas talamocorticales). Aunque en otros tipos celulares la densidad de los canales se incrementa conforme la distancia al soma aumenta (ej. neuronas mitrales, neuronas piramidales de CA1) (revisado por Migliore y Shepherd, 2002). Fricker y Miles (2000), han descrito una corriente de K^+ en interneuronas de la capa CA1 del hipocampo. Estos participan en la reducción de la fase de caída de los EPSPs y por lo tanto modulan la frecuencia de disparo. Lo mismo ocurre en células granulares del bulbo olfatorio (Shoppa y Westbrook, 1999) En estas células la conductancia de K^+ favorece la integración de entradas a frecuencias muy altas y el modo de detección coincidente se sobrepone al de suma temporal.

Canales catiónicos activados a potenciales hiperpolarizantes (I_h)

La corriente I_h catiónica no específica, activada por hiperpolarización, y desactivada por despolarización de la membrana. Esta corriente incrementa la conductancia de la membrana durante el reposo, reduciendo así el curso temporal de los ESPSs subumbrales. En algunas neuronas esta corriente aumenta con la distancia al soma. En neuronas piramidales de la capa CA1 en el hipocampo, la presencia de la corriente I_h aumenta 6 veces en las dendritas distales. Esta corriente a potenciales despolarizantes se desactiva aumentando la resistencia de entrada. Sin embargo, esta corriente casi no afecta las amplitudes de los ESPSs si no las fases de caída, haciéndolas más rápidas, y por tanto reduciendo la sumación temporal de los EPSPs. (revisado Magee, 2000).

En general los mecanismos activos, se encuentran en una gran cantidad de neuronas y su principal ventaja es que al disminuir el filtrado dendrítico hacen que la integración sea independiente del sitio de la entrada sináptica. Además en algunas neuronas permiten modos de integración muy específicos.

2.4 Relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas

Las neuronas tienen que integrar potenciales sinápticos de cinéticas variables, originados en distintos lugares y a diferentes tiempos. La neurona entonces debe sumar tanto espacial como temporalmente, para finalmente computar la interacción entre las distintas entradas, y así obtener una respuesta final.

Suma espacial

La suma espacial se refiere a la integración de dos o más entradas originadas en distintos lugares. El resultado de la suma depende de la localización de las entradas sinápticas sobre el árbol dendrítico. Cuando la propagación es exclusivamente pasiva, la suma espacial, esta influida principalmente por la constante de membrana (λ), ya que de ésta depende la eficiencia de la propagación de los potenciales sinápticos hacia el sitio de integración. Entre más grande sea λ , las entradas más lejanas serán más efectivas.

Cuando se activan dos entradas sinápticas en sitios relativamente cercanos entre sí, la interacción entre las conductancias de ambas respuestas determina la magnitud de la respuesta final. Supongamos que tenemos dos entradas similares, situadas sobre la misma rama dendrítica muy cerca una de la otra. Si activamos ambas entradas al mismo tiempo, la magnitud de la respuesta será de mayor amplitud a la obtenida cuando solo activamos una de las entradas. Sin embargo, será menor a la suma lineal calculada teóricamente, aunque las conductancias en ambos casos sean iguales. A este tipo de suma se le conoce como *suma sublineal* y se debe a que la resistencia de la membrana disminuye, y se reduce el potencial electroquímico, por lo que al final el cambio de voltaje es menor. Estas interacciones serán mayores, entre más cercanas estén entre sí las sinapsis. Para evitar, las interacciones sublineales, es suficiente con que las entradas sinápticas se localicen a distancias sinápticas equivalentes. La ramificación dendrítica tiende a minimizar las

interacciones sublineales, ya que entre más separación exista entre las sinapsis, la interacción entre sus conductancias se minimizará.

Suma Temporal

Es la suma de secuencias de potenciales sinápticos a lo largo del tiempo. La constante de tiempo (τ) es determinante en este tipo de suma, ya que entre más larga sea, le tomará más tiempo al potencial sináptico decaer, y la probabilidad de que se sume con otros sinápticos será mayor. A últimas fechas se ha propuesto que las neuronas son capaces de integrar en dos modos distintos, dependiendo de la duración del intervalo en cual sumen sus entradas sinápticas (revisado por König, Engel y Singer; 1996). Si el intervalo de integración está en la media del intervalo existente entre un espiga y otra, las neuronas actúan como integradores temporales. Sin embargo, si el intervalo de integración es más corto comparado con el intervalo entre la generación de una espiga y otra, las neuronas actúan como detectores de coincidencia, retransmitiendo de preferencia entradas sincronizadas. Este tipo de integración ha sido propuesta para neuronas corticales.

2.5 Acople Eléctrico

El acople eléctrico puede influir considerablemente en la integración sináptica. Las sinapsis eléctricas pueden coexistir con las sinapsis químicas, por lo que es de esperarse que una neurona acoplada eléctricamente sume tanto las entradas provenientes de las sinapsis químicas, como las entradas provenientes de las sinapsis eléctricas. Ello provoca que la integración se torne más compleja, ya que el número de entradas es mayor y las relaciones espacio-temporales pueden ser más complejas. Por lo tanto, en neuronas acopladas eléctricamente la integración dependerá tanto de los parámetros antes mencionados como del número de neuronas acopladas eléctricamente, del grado de acople entre ellas y de la relación temporal entre todas las entradas. El grado de acople es un factor sumamente importante ya que de él depende el peso que tenga la sinapsis eléctrica. En diversos tipos neuronales, las sinapsis eléctricas coexisten con las sinapsis químicas, por ejemplo en neuronas de Retzius de sanguijuela, en interneuronas de disparo rápido (células FS) en la neocorteza, en interneuronas de canasta en la corteza y en neuronas ganglionares (Hagiwara et al., 1962; Eckert, 1936; Galarreta et al., 1999; Tamás, et al., 2000; Mastrorarde, D.N.; 1983).

Se han estudiado diversos casos en donde las sinapsis eléctricas tienen consecuencias específicas sobre el flujo de información de una célula a otra, ocasionando patrones de disparo característicos. Algunas de estas consecuencias son:

Sinapsis eléctricas como filtros pasobajas.

En algunos casos las sinapsis eléctricas funcionan como un filtro pasobajas. En las neuronas del *Locus Coeruleus* de ratas recién nacidas, las sinapsis eléctricas sincronizan la actividad subumbral de la red, fungiendo como un filtro pasabajas (Christie, et al.; 1989). El acople eléctrico restringe la entrada de corriente proveniente de los potenciales de acción generados en la neurona acoplada. Discriminando así, las entradas sinápticas dependiendo de su frecuencia.

Participación en procesos sinápticos rápidos

El flujo de información a través de una sinapsis eléctrica es mucho más rápido que a través de una sinapsis química, debido a que no existe retardo sináptico. Lo anterior, ha llevado a postular que las sinapsis eléctricas podrían ser útiles en procesos sinápticos donde son necesarias respuestas sinápticas rápidas y las ventanas temporales son muy cortas. Por ejemplo, en respuestas de escape (Giaume, et al., 1987).

Generación de sincronía en redes neuronales

En el cerebro humano, la actividad de grupos neuronales disparando de manera repetida y sincrónica, es importante en la generación de funciones complejas. Por ejemplo: en el hipocampo la actividad gamma (4-10 Hz), la actividad theta (20-80Hz) y la de alta frecuencia (200 Hz), se relacionan con procesos de atención y cognición. La generación de sincronía en redes neuronales se ha asociado a neuronas acopladas eléctricamente. En neuronas de la capa CA3 de hipocampo, y Draguhn y colaboradores (1998) demostraron que las oscilaciones de alta frecuencia son el resultado del acople eléctrico entre numerosas neuronas. En neuronas del Locus Coeruleus, el acople eléctrico sincroniza la actividad subumbral presente en los primeros días de nacimiento de la rata. Otro caso, en el cual el acople eléctrico participa en la sincronización de una red, es en las neuronas de embriones de pez cebra, donde las despolarizaciones periódicas subumbrales son dependientes del acople eléctrico (Saint-Amant y Drapeau, 2001).

Interacciones entre sinapsis eléctricas y químicas

En la mayor parte de las neuronas las sinapsis eléctricas coexisten con las químicas. El balance entre ambos tipos de comunicación neuronal genera patrones específicos de disparo y algunas veces, ambos tipos de sinapsis participan en la sincronización de la red neuronal. En el desarrollo de la rata, las motoneuronas de la médula espinal poseen una sincronía con dos ritmos: uno lento dependiente del acople eléctrico, y uno rápido dependiente de las sinapsis químicas. (revisado por Kiehn O y Tresch M., 2002). Quizá un claro ejemplo de la interacción entre sinapsis químicas y eléctricas sea el del trabajo de Galarreta y Hestrin (2001) en interneuronas GABAérgicas de la neocorteza. Estas interneuronas de disparo rápido (FS) además de estar acopladas eléctricamente, presentan conexiones inhibitorias entre ellas. Este hecho permite obtener distintas respuestas dependiendo de la ventana temporal entre las entradas (Figura 8).

Cuando la ventana es muy corta entre ambas entradas, la respuesta es excitadora en las dos células. Sin embargo, si el intervalo entre una entrada y otra se amplía a 5ms, la respuesta es completamente distinta ya que en una de las células es excitadora; mientras la otra es inhibitoria, con una pequeña despolarización al inicio. Esta despolarización es ocasionada por la corriente que fluye de la neurona acoplada eléctricamente. La respuesta excitadora de la segunda neurona se ve opacada por la entrada inhibitoria. Lo anterior resalta que una neurona al estar acoplada eléctricamente con otra, aumenta de manera considerablemente sus modos de integración sináptica.

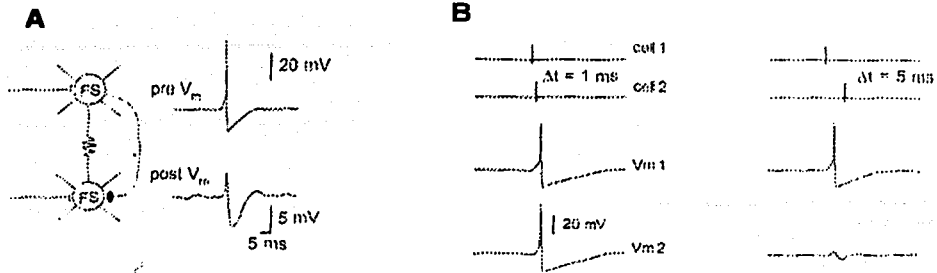


Figura 8, Influencia del acople eléctrico en interneuronas de la corteza. A. Lado izquierdo: representación de 2 neuronas FS acopladas eléctricamente, con una sinapsis inhibitoria entre ellas. Lado derecho: respuestas obtenidas al estimular la neurona presináptica. En la neurona postsináptica hay dos componentes, una pequeña despolarización, correspondiente a la entrada de la sinapsis eléctrica y un potencial inhibitorio correspondiente a la sinapsis química. **B.** Respuestas cuando se estimulan ambas neuronas con distintas ventanas temporales (modificado de Galarreta y Hestrin, 2001).

Un modelo muy sencillo para estudiar el papel del acople eléctrico en la integración son el par de neuronas de Retzius de sanguijuela. Estas neuronas, además del acople eléctrico, presentan otras entradas sinápticas localizadas en diferentes regiones de sus árboles dendríticos. Por lo que integran información proveniente tanto de entradas sinápticas provenientes de sinapsis eléctricas como de entradas provenientes de la otra neurona. Con ello permiten analizar la influencia del acople eléctrico en la integración de entradas sinápticas con distintas relaciones espacio-temporales.

3. Generalidades sobre el Sistema Nervioso de la Sanguijuela

El sistema nervioso central de la sanguijuela esta constituido por una cadena ganglionar que corre a todo lo largo del animal, de manera tal que los 32 segmentos metaméricos y el prostomio se encuentran enervados por un ganglio-cerebroide, 21 ganglios enervando el cuerpo y 7 ganglios fusionados el ganglio caudal. Los 21 ganglios pertenecientes al cuerpo son muy similares entre si, conteniendo aproximadamente la misma distribución y número de células, con excepción de los ganglios que enervan los órganos sexuales (revisado Nicholls, 2001).

Los ganglios están unidos por medio de nervios conectivos. De cada ganglio, emergen raíces nerviosas, que se ramifican para enervar las estructuras de ese segmento (Fig. 9). En cada ganglio hay distintos tipos neuronas sensoriales, motoneuronas e interneuronas. Por otra parte, los nervios periféricos forman complejas redes que consisten en anillos de nervios y en tractos longitudinales.

Cada ganglio contiene aproximadamente el mismo número de neuronas, sin embargo este número varia ligeramente de una especie a otra. Para la especie *Haementeria officinalis* cada ganglio contiene aproximadamente 325 neuronas (Izquierdo E. Y De Miguel F., no publicado). Sin embargo, para la sanguijuela *Hirudo medicinalis* el número de neuronas por ganglio aumenta a 400 aproximadamente (revisado Nicholls, 2001). Todos los ganglios son muy similares con excepción de los ganglios que enervan los órganos sexuales en los segmentos 5 y 6, donde el número de células es alrededor de 700. En la figura 10 se muestra un ganglio, con sus nervios conectivos, raíces y varias neuronas identificadas. Como podemos observar es fácil identificar a las células por su forma, tamaño y posición. Además de esto, cada neurona presenta un patrón de disparo distinto al ser estimuladas fisiológica o experimentalmente, lo cual facilita identificación.

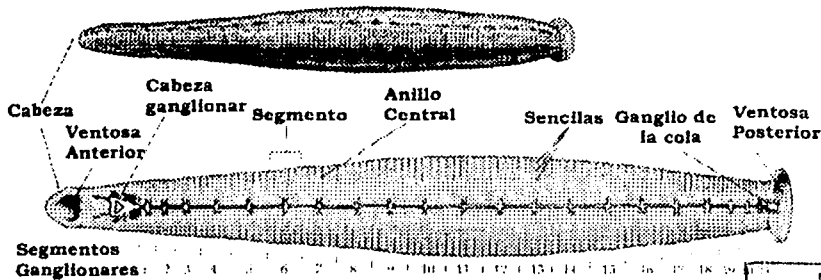
4. Neuronas de Sanguijuela Acopladas eléctricamente

En cada ganglio existen varios tipos de neuronas acopladas eléctricamente: las células S, las NS y las Retzius (Muller K., et. al, 1983; Rela L. et.al. 2003, Retzius, 1891). Las neuronas de Retzius se encuentran en la parte antero-medial del ganglio y son las más grandes (Fig. 10). Ambas neuronas se encuentran acopladas por una sinapsis eléctrica no rectificante (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963).

4.1 Morfología de las Neuronas de Retzius

Las neuronas de Retzius son las más grandes del ganglio, poseen un soma de 60-80 μm de diámetro (García et.al., en presa). Su morfología muy similar a las de la especie *Hirudo medicinalis*, donde del soma emerge una proyección primaria, que se divide en 4 ramas secundarias. Dos de estas ramas se dirigen hacia ganglios adyacentes y las otras dos ramas viajan hacia la periferia a través de las raíces nerviosas. La proyección primario o axón posee arborizaciones neuríticas que entran al neuropilo. En estas neuritas subyace el acople eléctrico entre las dos células (Fig. 11)(Lent, 1973; Smith et al,1975; Mason y Leake, 1977; García et.al., en prensa).

A



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

B

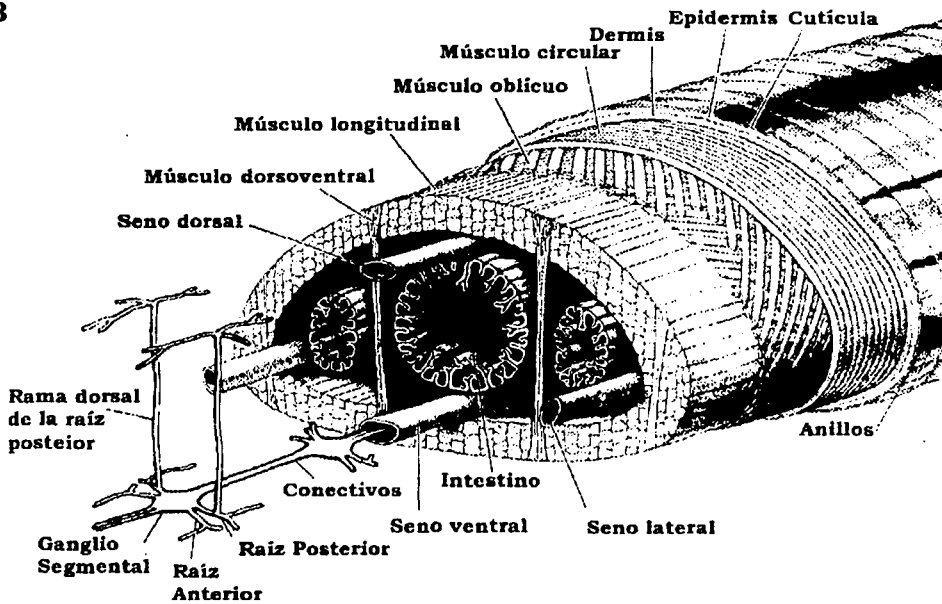
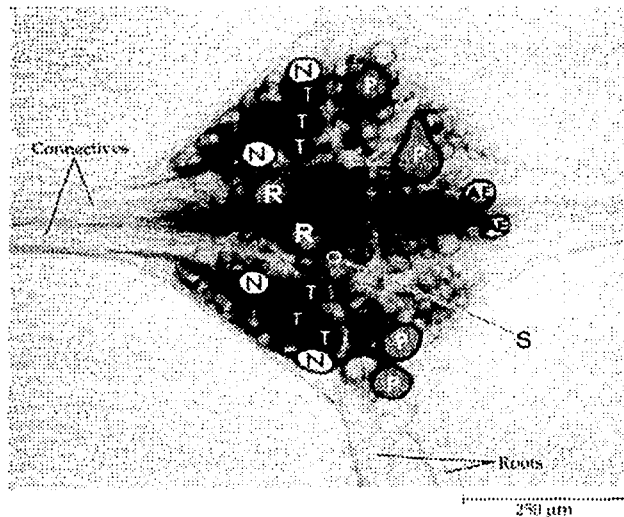


Figura 9. Sistema nervioso central (SNC) de la Sanguijuela. A. SNC de la sanguijuela formado por 21 ganglios corporales, un ganglio conformando al cerebro, y un ganglio conformando la cola. Cada segmento metamérico esta formado por 5 anillos. B. Corte transversal de una sanguijuela donde se observa el sistema nervioso central conformado por una cadena de ganglios que inervan cada uno un segmento metamérico del animal, por medio de las raíces. La cadena ganglionar se encuentra unida por los conectivos, y dentro del seno ventral del animal (tomado de Payton en Neurobiology of the leech, 1981).

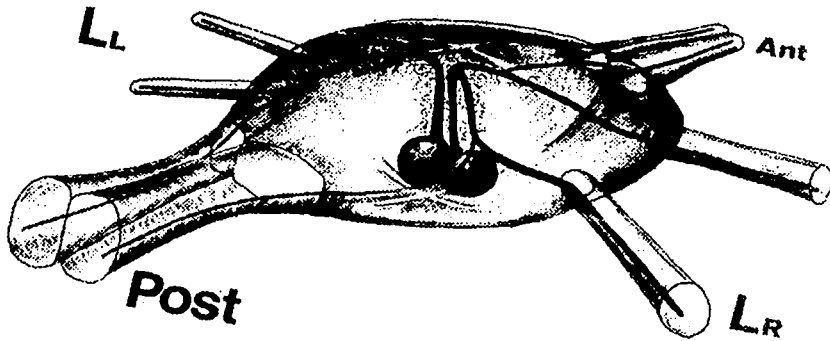
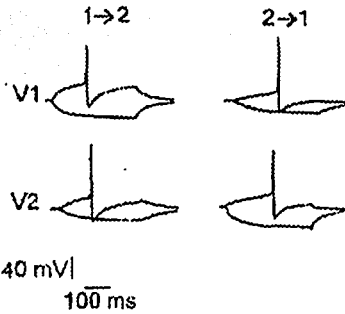
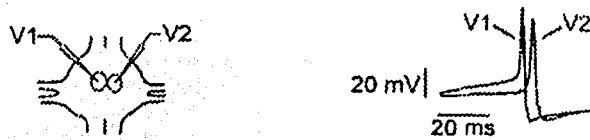


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Ganglio del SNC de una sanguijuela. Vista ventral de un ganglio de sanguijuela con sus conectivos y raíces. En la parte antero-medial se muestran las neuronas de Retzius (R). También se observan neuronas mecanosensoriales que responden al tacto (T), presión (P) y a estímulos de nocicepción (N), así como motoneuronas erectoras anulares (AE). Cada tipo neuronal presenta distintos patrones de disparo (tomado de Nicholls et. al 2001).

Estudios realizando dobles tinciones en las neuronas de Retzius de *Haementeria officinalis* (De Miguel, et al, 2001; García- Pérez, et al., en prensa) han mostrado que los sitios de contacto entre las dos células se encuentran exclusivamente en las neuritas (Fig. 12A). Descartando posibles contactos entre los somas o axones. El número de contactos se ha estimado entre 45.42 ± 2.63 e.e.(García-Pérez, en prensa). Los diámetros de estas neuritas o dendritas van desde 1 a $1.8 \mu\text{m}$ y su largo varía de 35-55 μm . Aproximadamente un 71% de estas dendritas carecen de bifurcaciones y se encuentran conectadas directamente con el axón primario. El resto de las dendritas tienen una (91%) o más ramas (9%), las cuales poseen diámetros iguales a las neuritas madre, no siguiendo la regla de los 3/2 para un cable electrotonicamente equivalente. Sin embargo, el 70% de las dendritas que cumplen con la regla de los 3/2 puedan ser modeladas como un cable (E. García, et. al., en prensa).

El coeficiente somatodendrítico (ρ) en estas células varía de 0.005 a .15. Es importante señalar que en estas células a diferencia de las neuronas de vertebrados el factor ρ se encuentra invertido, debido al área tan grande del soma en comparación con la de las dendritas. Contrariamente a lo que sucede con la mayoría de las neuronas en los vertebrados. El bajo valor de ρ predice una atenuación de los EPSPs al llegar al soma, por lo que es de esperarse que los EPSPs sean mucho más grandes en las dendritas.

A**B**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 11. Morfología y acople eléctrico de neuronas de Retzius. A. Reconstrucción de un par de neuronas de Retzius en el ganglio. Se muestran las fibras mayores en los conectivos posterior (post) y anterior (ant), y los nervios segmentales ipsilaterales (Ll y Lr). El árbol dendrítico también está representado (tomado de Smith et al., 1975) **B.** Representación de neuronas de Retzius en un ganglio con dos microelectrodos de registro (V1 y V2). **C.** Registro simultáneo de potenciales de acción, donde V2 sigue a V1. **D.** Demostración de que la sinapsis no es rectificante (tomado de De Miguel F., 1998).

4.2 Fisiología de las Neuronas de Retzius

El sistema serotoninérgico de la sanguijuela está formado por un pequeño número de neuronas, de las cuales las neuronas de Retzius liberan la mayor cantidad. En la sanguijuela la serotonina es un neurotransmisor implicado en varias funciones fisiológicas como la activación del programa motor para el nado (Willard, 1981), liberación de moco (Lent, 1973; Mann 1961), disminución en la tensión del músculo longitudinal y relajación posterior a la contracción muscular (Mason et. al., 1979).

En las neuronas de Retzius la serotonina en la región presináptica se almacena en vesículas sinápticas pequeñas y en vesículas sinápticas densas (Henderson, 1983; Kuffler, 1987). Sin embargo, en el soma también existen vesículas densas con serotonina (Bruns et al, 2000).

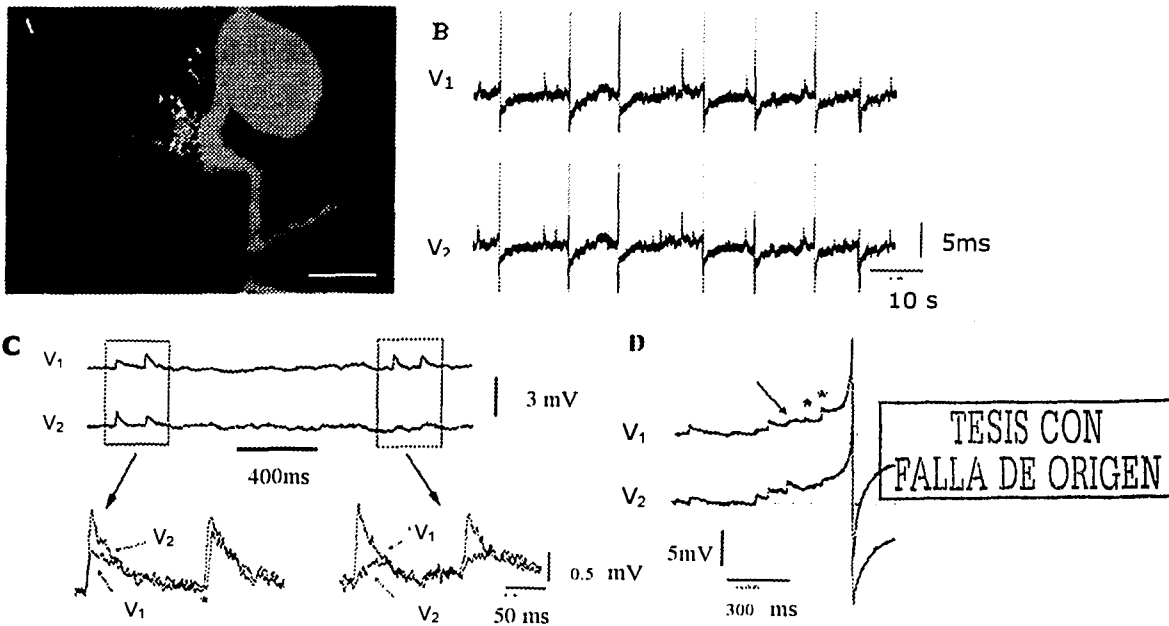


Figura 12. Morfología y actividad eléctrica espontánea en neuronas de Retzius acopladas eléctricamente. A. Neuronas de Retzius, en imagen confocal, teñidas con distintos colorantes c/u. Los puntos donde hay colocalización de los colorantes, se encuentran exclusivamente en las dendritas. B. Actividad espontánea de baja frecuencia en las neuronas de Retzius. C. Escala ampliada del registro en B donde se observan EPSPs. C₁. Ampliación del recuadro en C, se muestran EPSPs sincrónicos tanto simétricos como asimétricos. El asterisco denota que es posible la existencia de sinápticos simétricos-asincrónicos. C₂. Potenciales donde se observa un EPSP en una de las células (V1), mientras que en la otra célula al haber existido un falla en la transmisión presináptica, solamente se observa la propagación del sináptico originado en V1. D. Potenciales de acción (P.A.) en neuronas de Retzius, producidos por la suma de EPSPs. Los potenciales marcados con un asterisco producen un P.A. en una de las neuronas (V1), el cual es seguido por otro P.A. en la neurona acoplada eléctricamente. En todos los casos, el potencial de acción producido en una neurona es seguido por otro en la neurona contralateral (De Miguel et. al., en preparación).

Dependiendo de la frecuencia de estimulación la liberación del neurotransmisor puede ser sináptica o somática. La liberación somática se da a frecuencias altas entre 1-20Hz; esta liberación parece ser similar a la realizada por células secretoras (Trueta, et al., 2003).

Las neuronas de Retzius producen potenciales postsinápticos excitadores espontáneos (EPSPs), que al sumarse originan potenciales de acción a bajas frecuencias (Fig. 12B y D). Estos EPSPs son generados por una posible entrada sináptica común a las dos neuronas, localizada sobre las dendritas acopladas eléctricamente. Es por esta razón que cuando se realizan registros simultáneos en ambas Retzius aparecen EPSPs sincrónicos. Estos sinápticos sincrónicos pueden ser de la misma amplitud (simétricos) o tener distintas amplitudes (asimétricos) (Fig. 12C₁). Potenciales sinápticos con distintas amplitudes reflejan variaciones en los contenidos cuánticos liberados por la terminal presináptica. Además de los potenciales sinápticos sincrónicos, también hay asincronías. Cuando existe una falla en una de las entradas, observamos un EPSPs en una de las neuronas, y su propagación hacia la neurona acoplada. En ella el potencial propagado se observa con una amplitud menor y con una fase de subida mucho más lenta (Fig. 12C₂) (modificado de García, et. al., enviado).

García y colaboradores utilizando técnicas electrofisiológicas y de modelaje matemático han propuesto que la entrada común responsable del disparo a bajas frecuencias esta a 7.5 μm de la sinapsis eléctrica. Esto predice que la sinapsis eléctrica modula al cantidad de corriente que fluye de una neurona a la otra. Si la resistencia de acople es muy grande, la cantidad de corriente propagada hacia la neurona acoplada será menor que si la resistencia es pequeña. En este trabajo los autores proponen un modelo donde los somas de las neuronas acopladas eléctricamente están representadas por un dos circuitos RC en paralelo, las dendritas acopladas por un cable finito, y el acople eléctrico por una resistencia.

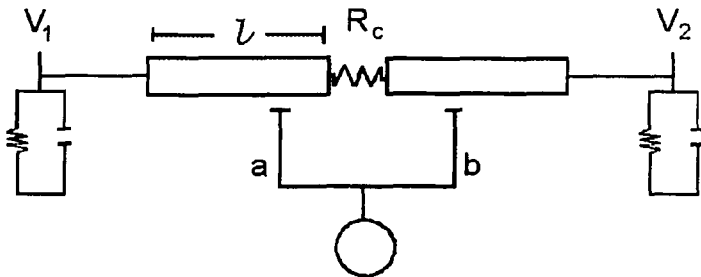


Figura 13. Modelo para neuronas de Retzius acopladas eléctricamente, propuesto por García y colaboradores. Los somas de las neuronas de Retzius están representados por 2 circuitos RC en paralelo, unidos por un cable finito (dendritas acopladas) de cierta longitud (l) y una resistencia con valores variables (acople eléctrico). Las entradas sinápticas comunes (a y b) se encuentran muy cerca de la resistencia de acople (tomado de García, et. al., enviado).

Este modelo predice que la resistencia de acople modula la amplitud unitaria de los EPSPs en la neurona de origen (V1). Siendo que a resistencias de acople grandes la cantidad de corriente fugándose a la neurona acoplada es poca, la amplitud del sináptico en V1 será mayor que si la resistencia es baja. La amplitud del sináptico propagado a la neurona acoplada (V2) siempre sería la misma, debido a que las variaciones en la cantidad de corriente propagada estarían compensadas por la impedancia dendrítica. De tal manera que si fluye poca corriente a través de una alta resistencia de acople, la impedancia aumentará manteniendo el voltaje y viceversa en la situación contraria. Por lo que el voltaje en V2 siempre será constante, a pesar de que la corriente propagada varíe.

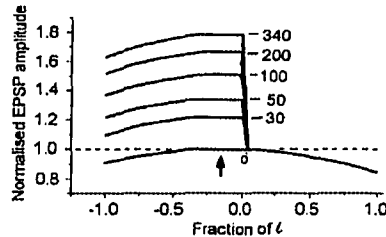
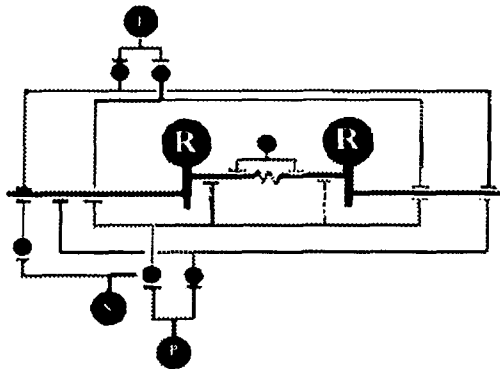


Fig. 14. Amplitud normalizada para los EPSPs en función de la fracción de l con distintas resistencias de acople (l es la longitud del cable, $l=0$ corresponde al lugar donde se encuentra la sinapsis eléctrica). Lado izquierdo amplitudes en V1. Lado derecho, amplitud del sináptico propagado a V2. La amplitud en V1 del potencial sináptico cambia en función del valor de la resistencia de acople, sin embargo en V2 la amplitud del sináptico propagado es constante.

Por otro lado, Velázquez-Ulloa y colaboradores (2002) demostraron que la estimulación mecanosensorial produce respuestas postsinápticas en las neuronas de Retzius. Esto se añade a la entrada común generadora de actividad espontánea.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 15. Esquema representando el posible circuito de entradas sinápticas sobre las neuronas de Retzius. Sobre las dendritas acopladas eléctricamente se encuentra la entrada responsable de la actividad espontánea de baja frecuencia. Las neuronas mecanosensoriales P, N y T tienen sinapsis con más de una interneurona. Esta interneurona a su vez forma contactos en diferentes puntos sobre las dendritas no acopladas de cada neurona de Retzius. Algunos contactos también pueden ser establecidos sobre las dendritas acopladas eléctricamente (tomado de Velázquez-Ulloa, et. al., 2002).

La intensidad de la respuesta sináptica en las neuronas de Retzius es directamente proporcional a la intensidad del estímulo mecánico aplicado en la piel. La respuesta en las neuronas de Retzius puede ir desde ESPSs hasta potenciales de acción de altas frecuencias capaces de inducir liberación somática de serotonina

Las entradas mediadas por la estimulación de neuronas mecanosensoriales (células P, T y N) se encuentran localizadas en las dendritas no acopladas, sin embargo hay una pequeña población que pudiera encontrarse sobre las dendritas acopladas (Fig. 15) (Velázquez-Ulloa, et. al., 2002). El sitio de integración sináptica en estas neuronas se encuentra en el axón primario (García et.al., en prensa).

Las variaciones en las amplitudes de los EPSPs y la distribución de las entradas sinápticas, sugieren que la resistencia de acople participa activamente en la integración. La amplitud y la cinética de estos potenciales sinápticos al llegar al sitio de integración dependerán de la localización de la entrada y de la suma con otros potenciales sinápticos, por ejemplo con los provenientes de las entradas activadas por las células mecanosensoriales. De manera que la relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas y el acople eléctrico determinarán la forma en que estos potenciales se integren.

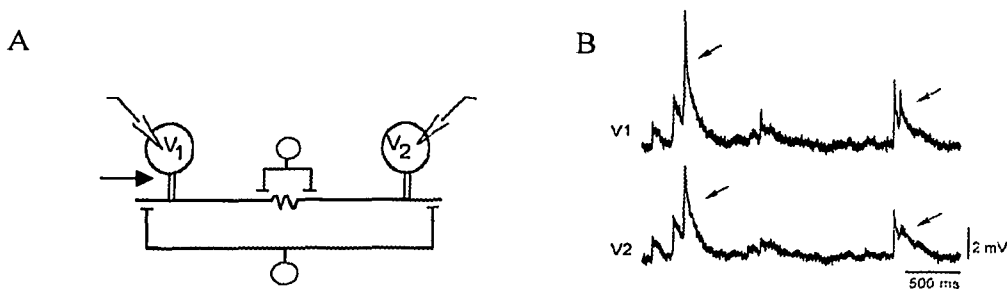


Figura 16. A. Simplificación del circuito de entradas sinápticas sobre las neuronas de Retzius. La flecha indica el sitio de integración (axón primario) donde se suma la información proveniente tanto de entradas en las neuritas acopladas como en las no acopladas. Los potenciales sinápticos producidos cerca de la sinapsis eléctrica o propagados a través de ella se verán influenciados por el valor de la resistencia de acople. Para las entradas cercanas al sitio de integración, los efectos del filtrado dendrítico serán menores que para las entradas lejanas. **B. Registro de un par de neuronas de Retzius,** donde se muestra como potenciales sinápticos (simétricos, asimétricos) se suman (flechas lado izquierdo). También podemos observar una falla en la transmisión sináptica (V_2 flecha lado derecho).

Las variaciones en la amplitud de los EPSPs en estas neuronas pueden ser tanto por mecanismos presinápticos (distintos contenidos cuánticos) como por mecanismos postsinápticos (el grado de acople eléctrico). Estas dos posibilidades se exploraron probando que a pesar de que la liberación es cuántica, la amplitud de los EPSPs varía en función de la tasa de acople.

Produciendo potenciales sinápticos artificiales en el soma de ambas neuronas de Retzius, analizamos el papel del acople eléctrico cuando los potenciales sinápticos poseen distintas amplitudes y relaciones temporales entre ellos.

II. HIPÓTESIS

Las neuronas de Retzius reciben una entrada común en las dendritas acopladas eléctricamente, la cual origina EPSPs de amplitudes variables. Las fluctuaciones en las amplitudes de los EPSPs podrían ser por 2 razones. La primera es por variaciones en el contenido cuántico (efecto presináptico). Si esto es cierto, entonces podríamos calcular el número de eventos y de fallas (potenciales propagados de la otra neurona, donde si hubo un evento) y calcular una distribución teórica, donde la amplitud de los EPSPs este dada por múltiplos de la amplitud promedio de los EPSPs unitarios.

La segunda razón por la que se puede haber variaciones en la amplitud es debido a la resistencia de acople entre estas neuronas (efecto postsináptico). Si la resistencia de acople regula el flujo de corriente entre ambas neuronas y las entradas sinápticas se localizan muy cerca de ella, entonces se espera que el valor de la resistencia modifique la amplitud de los EPSPs unitarios regulando la cantidad de corriente que se queda en la neurona local y la que se fuga a la neurona acoplada. Si lo anterior es cierto, la relación entre la resistencia de acople y la amplitud de los EPSPs, será directamente proporcional. La misma relación es esperada para la frecuencia de potenciales de acción, ya que al ser los EPSPs más amplios será más fácil llegar al umbral.

Las neuronas de Retzius al estar acopladas eléctricamente integrarán de manera diferencial dependiendo de la relación espacio-temporal entre sus entradas y del grado de acople entre ellas. Con base en la teoría de la propagación de corriente pasiva en dendritas suponemos que si los potenciales en ambas neuronas son simétricos y sincrónicos, al no haber diferencia de potencial entre ellas, no habrá flujo de corriente de una neurona a otra y por tanto la sinapsis eléctrica no tendrá un papel relevante. Sin embargo, cuando los potenciales sinápticos sean asimétricos, habrá una diferencia de potencial, la cual permitirá flujo de corriente entre las neuronas. En este caso, la resistencia de acople entre ellas desempeñaría un papel relevante, modificando las amplitudes de los potenciales sinápticos. En cuanto a la relación temporal entre las entradas, esperamos que cuando los sinápticos en la neurona acoplada precedan a los de la neurona registrada, la suma incrementará la amplitud del sináptico local. En cambio, en el caso contrario, cuando el sináptico en la neurona acoplada se produzca después del sináptico local, la suma producirá cambios en la fase de caída haciéndola más larga.

III. OBJETIVOS

- Analizar las variaciones en las amplitudes de los potenciales sinápticos en función de su carácter cuántico y la resistencia de acople.
- Analizar cómo es que la relación espacio-temporal entre entradas sinápticas con amplitudes variables afecta la integración en neuronas acopladas eléctricamente.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación y disección

Los experimentos se llevaron a cabo con neuronas de Retzius de ganglios del sistema nervioso central de sanguijuelas adultas *Haementeria officinalis*. Se utilizaron los ganglios de los segmentos intermedios de la sanguijuela, exceptuando el 5 y 6 por sus características distintas al resto. Los ganglios fueron obtenidos por disección utilizando un microscopio estereoscópico, tijeras y pinzas.

Una vez obtenido, el ganglio fue inmovilizado clavando unos alfileres sobre los nervios conectivos y las raíces, en platos rellenos de Sylgard. Todo el proceso se realizó en presencia de Ringer normal (115 mM NaCl, 4mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 11 mM glucosa, 10 mM Tris-maleato, pH=7.4). Las células de Retzius fueron identificadas por su morfología característica y su posición central en el ganglio.

4.2 Sistema para Registro Intracelular

Utilizando un puller P97 (Sutter Instruments) capilares de vidrio con un diámetro externo de 1 mm y un diámetro interno de 0.75mm., fueron estirados para obtener electrodos. Los electrodos fueron llenados con una solución de 3 M de KCl, obteniendo electrodos con resistencias entre 18 y 25 MΩ. Estos fueron introducidos en un sujetador, el cual fue conectado a un cabezal sostenido por un manipulador. El cabezal conduce los potenciales registrados a un amplificador. Se utilizaron dos amplificadores Almost Perfect Electronics para registrar intracelularmente. Para la inyección de corriente se utilizó un amplificador Getting modelo 5 y un amplificador diseñado por B. Méndez. Los amplificadores para registro intracelular se conectaron a un filtro Bessel pasabajas (frecuencia de corte 400Hz), el cual fue conectado a un osciloscopio. Los cambios de voltaje fueron observados en el osciloscopio y con una tarjeta analógica-digital de modelo Digidata 1200(Axon Instruments) a una frecuencia de muestreo de 20 kHz. fueron adquiridos en una computadora. Para la adquisición y almacenamiento de datos, utilizamos el programa Axoscope (Axon Instruments) o Pclamp5, dependiendo del tipo de registro. Cada uno de los amplificadores utilizados para inyectar corriente fue conectado a un estimulador (Almost Perfect y Grass SD9).

El nivel de ruido durante la mayoría de los registros fue de aproximadamente de 0.2 a 0.3 mV.

Las señales registradas fueron a filtradas y amplificadas entre 100 y 1000 veces dependiendo del tipo de registro.

4.3 Registros Intracelulares

Una vez con los microelectrodos en el baño (Ringer) antes de empalar la célula se compensó: la capacitancia, la resistencia del microelectrodo y el potencial de unión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.1 Registros Simultáneos de la Actividad espontánea de las células de Retzius

Ambas células de Retzius fueron empaladas en el soma con un microelectrodo. Una vez adentro de la célula se balanceó el puente, y se midió la tasa de acople (V_2/V_1) estacionaria entre estas las células. Donde V_1 es la neurona donde se aplica un pulso de corriente lo suficientemente largo para llegar a un voltaje estacionario, y V_2 es la neurona donde se registra este potencial propagado. Para esto, se aplicó un pulso de corriente hiperpolarizante durante 150 ms. a una de las neuronas (V_1), registrando ambas células.

La actividad eléctrica espontánea de las neuronas de Retzius se registró aproximadamente durante 2h. Los registros se realizaron utilizando Ringer normal o Ringer con 1 mM de CaCl_2 y 2 mM de MgCl_2 . El Ringer con Ca^{2+} y Mg^{2+} se utilizó para disminuir la probabilidad de liberación y así aumentar el número de fallas y los EPSPs unitarios. (Del Castillo y Katz, 1954). El potencial de membrana se mantuvo entre -50 y -55 mV.

4.4 Producción de sinápticos artificiales en neuronas de Retzius

Los potenciales sinápticos artificiales en las neuronas de Retzius fueron producidos y registrados empleando 2 microelectrodos en cada neurona. Un microelectrodo fue utilizado para registrar la actividad eléctrica y el otro para inyectar corriente (Fig 17A de materiales). Los registros se hicieron en presencia de Ringer normal.

Para asegurarnos que la relación entre la corriente inyectada y los sinápticos producidos fuese lineal, se realizaron curvas I/V . La cantidad de corriente utilizada varió un poco de neurona a neurona, sin embargo, la relación entre la corriente inyectada y el voltaje registrado fue lineal en todos. Estos experimentos se realizaron también en presencia de Tetrodotoxina (TTX), para comprobar que no había canales de Na^+ dependientes de voltaje involucrados en la generación de estos sinápticos.

Se utilizaron pulsos de corriente de 0.5 ms y de 4-6.5 nA para producir potenciales sinápticos de 1.5 mV o 3 mV respectivamente. Se produjeron sinápticos artificiales tanto simétricos (misma cinética y amplitud en ambas neuronas) como asimétricos (distinta amplitud en cada neurona). También se produjeron sinápticos sincrónicos y asincrónicos variando el intervalo de producción entre un sináptico y otro. Los intervalos entre el sináptico producido en una célula (V_1) y el producido en la otra (V_2) fueron hasta de 10 ms. (Fig. 17B materiales)

4.5 Análisis de los Registros

Los datos fueron analizados con el programa Clampfit. Los parámetros medidos fueron el tiempo al pico y la amplitud de cada sináptico espontáneo. Cabe mencionar que solo los potenciales sinápticos sencillos, aquellos cuya pendiente de subida fuera monotónica, fueron considerados para el análisis estadístico (ver Fig. 12C).

Los registros de 10 sinápticos artificiales fueron promediados. En estos promedios se midieron la amplitud, la fase de subida, la fase de caída y el t25 (tiempo al cual la amplitud máxima decrece al 25%) de los potenciales.

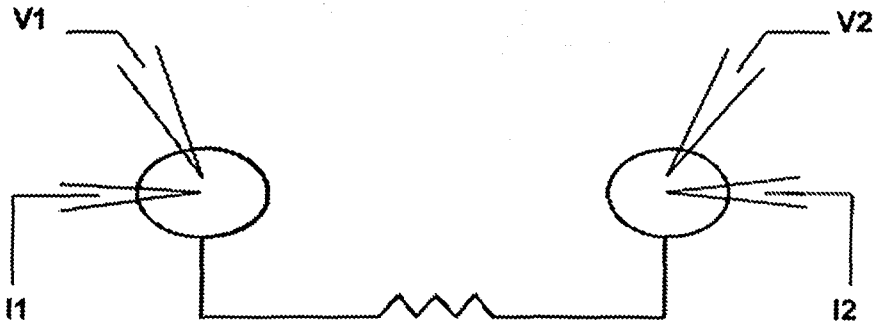
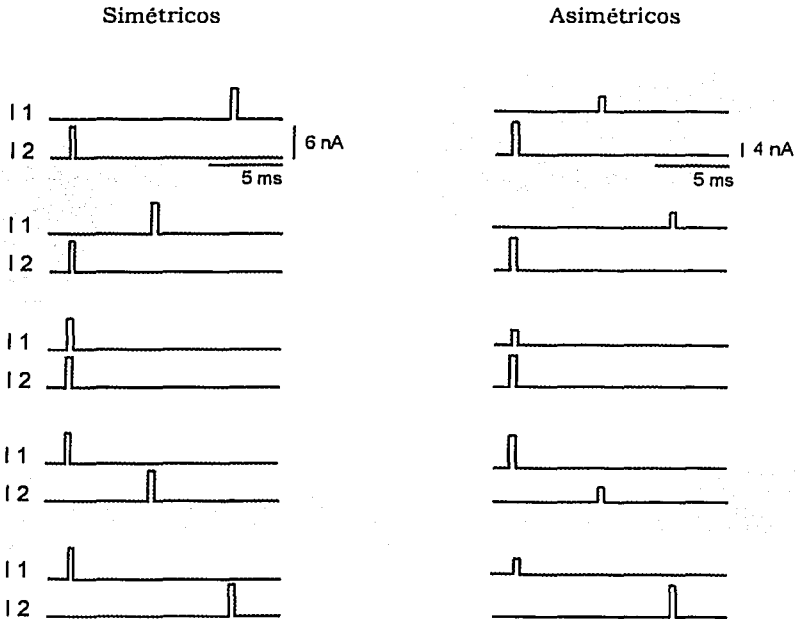
A**B**

Figura 17. A. Representación esquemática del protocolo de estimulación de Retzius acopladas eléctricamente. Cada célula fue impalada por 2 microelectrodos: uno para inyectar corriente (I1 y I2) y otro para medir (V1 y V2). B. Protocolo de corriente utilizado para la producción de potenciales sinápticos artificiales simétricos y asimétricos.

4.6 Análisis Estadístico en potenciales sinápticos artificiales

Para el análisis de las amplitudes de los sinápticos simétricos y asimétricos (V_1 y V_2), se utilizó una prueba de ANOVA para saber si al menos alguno de los promedios para cada uno de los retardos era distinto a otro. Se utilizó un $\alpha=.05$ para todos los casos. Posteriormente, para el caso de los potenciales asimétricos medidos en V_1 asimétricos y los potenciales simétricos, se utilizó la prueba de Bonferroni, para saber dependiendo del retardo en donde hubo aumentos significativos en la amplitud.

Se utilizó un $\alpha=.05$ para todos los casos. Este análisis se realizó utilizando el programa Excel.

Para el análisis de las fases de caída y los t_{25} se utilizó una prueba de Wilcoxon para diferencias pareadas. Se utilizó esta prueba debido a que tanto las τ_1 como los t_{25} en los sinápticos control y en los experimentales variaban mucho de una neurona a otra. Sin embargo, ambos presentaban tendencias similares en función del retraso de una neurona a otra. Se usó el programa proporcionado por el Institute of Phonetic Sciences (IFA) Universiteit van Amsterdam en la página. web:

http://fonsg3.let.uva.nl/Service/Statistics/Signed_Rank_Test.html.

4.7 Análisis Estadístico para los EPSPs

Una vez obtenidos los tiempos al pico y las amplitudes de un mínimo de 500 potenciales sinápticos espontáneos (ESPSs) por registro, se realizaron distribuciones de amplitudes vs tiempos al pico para cada neurona registrada. También se realizaron histogramas de amplitudes y de tiempos al pico. A los histogramas de tiempos al pico se les ajustaron el número de gaussianas más adecuado. Para la mayoría de los histogramas de tiempos al pico, el mejor ajuste fue con dos gaussianas. Lo anterior, permitió separar los potenciales con tiempos cortos de los potenciales con tiempos largos. Los potenciales con tiempos cortos se tomaron como eventos, y los potenciales con tiempos largos como fallas.

Una vez que se obtuvieron los eventos, se realizó un histograma de sus amplitudes.

A este histograma se le ajustaron varias gaussianas. El número de gaussianas dependió de la población y se tomó el número de gaussianas que representara el mejor ajuste. Esto con la finalidad de comprobar que en la distribución de amplitudes hay distintas poblaciones.

Con las distintas poblaciones, fue necesario comprobar que los picos de las gaussianas fuesen múltiplos del valor del pico de la primer gaussianas, tal como lo dicta la Teoría Cuántica.

Las distribuciones, histogramas y ajustes de gaussianas se realizaron utilizando el programa Origin 5.

4.8 Distribuciones teóricas de amplitudes

Basándonos en la teoría cuántica (Del Castillo y Katz, 1952), realizamos distribuciones teóricas de las amplitudes de los EPSs. Suponiendo que la entrada sináptica responsable de la actividad espontánea presenta liberación de carácter cuántico, con baja probabilidad

de liberación por botón, es posible suponer que los eventos pueden ser predichos por una distribución Poisson. Usando programas diseñados y ejecutables en Matlab (García E. et al., en prensa) realizamos distribuciones teóricas de los histogramas de amplitudes. Las distribuciones teóricas de amplitudes se realizaron a partir de una distribución de Poisson que calcula frecuencias de eventos discretos en un continuo:

$$\text{Frecuencias} = \exp(-m) \frac{m^x}{x!}$$

Para ello obtuvimos el promedio de las amplitudes (m). De acuerdo con Del Castillo y Katz (1954) hay dos maneras de calcular m . Una predice que en condiciones de baja probabilidad de liberación, es posible estimar el número de fallas y el número de eventos, y así calcular m conforme a:

$$m = \ln \frac{\text{Eventos totales } (N)}{\text{fallas } (n_0)}$$

Siendo: $N = \text{eventos}(n) + \text{fallas } (n_0)$

Utilizando los histogramas de los tiempos al pico de los EPSPs registrados en Ringer con 1 mM de CaCl_2 y 2 mM de MgCl_2 , estimamos el número de potenciales sinápticos (eventos) y el número de fallas. Inicialmente se graficaron las amplitudes vs tiempos al pico de los potenciales sinápticos (Fig. 18A de materiales). Eliminamos algunos potenciales sinápticos que tenían amplitudes grandes y tiempos al pico muy cortos, por considerar que no provenían de la entrada común localizada en las dendritas acopladas. Sino de una entrada distinta mucho más cercana al soma (Velazquez-Ulloa et al., 2003). Para el caso de la primera célula de la figura 19 (lado izquierdo) se eliminaron las amplitudes mayores a 1.2 mV con tiempos al pico cortos.

Con la población resultante se realizaron histogramas de tiempos al pico, ajustándoles varias gaussianas. A partir del histograma de tiempos al pico, se estimaron el número de eventos y de fallas. Al no conocerse la neurona presináptica, las fallas fueron estimadas de manera indirecta, a partir de los potenciales propagados de la neurona acoplada. Al haber una falla en una de las neuronas, es posible observar el potencial propagado de la otra célula donde sí hubo un evento (De Miguel, et. al. 2001). Los potenciales propagados son distinguibles por sus tiempos al pico largos y amplitudes pequeñas. Para determinar a partir de qué tiempo al pico, el potencial llegaba de la neurona contralateral, se utilizó la intersección entre las 2 gaussianas del histograma de tiempos al pico. Por ejemplo, para el caso de la célula de la figura 18B, la intersección fue en 10 ms. Entonces los eventos fueron definidos por sus tiempos al pico menores a 10 ms. Las fallas fueron potenciales con tiempos al pico mayores a 10 ms.

El número de eventos y de fallas, se introdujeron a los programas de Matlab, que calcularon la amplitud promedio " m " y la frecuencia de los eventos y las fallas predicha por la distribución de Poisson. Las proporciones fueron trasladadas a amplitudes, resultando la distribución teórica de amplitudes.

Estos datos fueron procesados en Excel y normalizados conforme al número total de eventos " N ", para obtener una gráfica final: Probabilidad de fallas y eventos vs amplitud.

Finalmente esta distribución se comparó con la distribución de eventos experimentales (n).

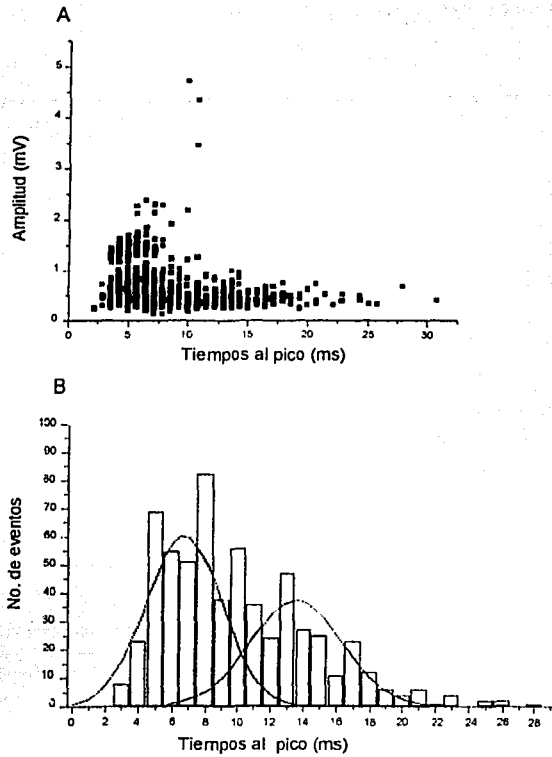


Figura 18. A. Amplitudes vs tiempos al pico para EPSPs de una neurona de Retzius. Para el análisis las amplitudes mayores a 1.2 mV con tiempos cortos se eliminaron, por considerarlas pertenecientes a una entrada distinta mucho más cercana al soma. **B. Histograma de tiempos al pico para los EPSPs.** En barras se observa la distribución de los tiempos al pico de EPSPs obtenidos experimentalmente. Las líneas continuas representan el ajuste de curvas gaussianas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS

Las variaciones en la amplitud se dan de manera presináptica, debido a variaciones en el contenido cuántico y a fallas en la transmisión sináptica. Para esto fue necesario comprobar que la liberación del neurotransmisor responsable de la actividad espontánea en las neuronas de Retzius es cuántica, de manera que existan eventos con amplitudes distintas, y fallas en la liberación del neurotransmisor. A partir de los registros de EPSPs en bajo Ca^{2-} y alto Mg^{2+} analizamos la distribución de tiempos al pico de los EPSPs espontáneos. Utilizamos esta distribución para determinar los eventos exitosos y las fallas cuánticas. Se tomaron como fallas sinápticos propagados de la neurona acoplada.

Como se observa en la figura 19, tanto a los histogramas de tiempos al pico como a los de amplitudes se les ajustaron curvas gaussianas, hasta encontrar el mejor ajuste. En la figura 19A se muestran los histogramas de tiempos al pico para dos neuronas de Retzius, donde los picos de las gaussianas para una célula (lado izquierdo) están en $x_1 = 6.56 \pm 0.63$ ms y $x_2 = 12.29 \pm 3.06$ ms. El punto donde interseccionaron las dos gaussianas fue 10 ms. Potenciales sinápticos con tiempos al pico por debajo de 10 ms se tomaron como eventos exitosos, potenciales sinápticos con tiempos al pico mayores a 10 ms se tomaron como fallas. Para la otra neurona (lado derecho) los picos de las curvas gaussianas se encuentran en $x_1 = 7.6 \pm 0.19$ ms y $x_2 = 13.46 \pm 0.46$ ms. Las curvas gaussianas interseccionaron en 11 ms. Potenciales sinápticos con tiempos al pico por debajo de 11 ms se tomaron como eventos y sinápticos con tiempos al pico mayores a 11 ms se tomaron como fallas.

El panel B muestra los histogramas de amplitudes consideradas como eventos. Para la célula del lado izquierdo, los picos de las gaussianas se encuentran $x_1 = 0.43 \pm 0.016$ mV y $x_2 = 0.78 \pm 0.09$ mV. Para la neurona del lado derecho, los picos de las gaussianas están en $x_1 = 0.30 \pm 0.008$ mV y $x_2 = 0.50 \pm 0.19$ mV. Lo anterior fue un indicador, igual que en la otra neurona, de que el segundo pico podría ser múltiplo del primero.

Una vez, calculado el número de eventos y de fallas, utilizamos la distribución de Poisson para calcular una distribución de las amplitudes (eventos). En el panel C se muestran las fallas calculadas y las distribuciones teóricas (línea continua), sobrepuestas a las distribuciones de amplitudes obtenidas a partir de datos experimentales (gráficas en barras). Todo fue normalizado con respecto al número total de eventos ($N = \text{eventos} + \text{fallas}$). Para la primera célula, el número de eventos fue 356 y las fallas 258, mientras que para la otra neurona fueron 477 y 184 respectivamente.

El número de curvas gaussianas que predijeron las curvas teóricas es el mismo que el que se obtiene al ajustar de manera independiente las gaussianas a los eventos experimentales (compárese Fig. 19B y 19C). El valor de la amplitud de los EPSPs unitarios varió de una neurona a otra, correlacionando con variaciones en la tasa de acople.

El análisis anterior se realizó para 4 pares más de neuronas de Retzius, encontrando resultados similares, y sugiere que la liberación del neurotransmisor responsable de la actividad espontánea en estas células es cuántica. Además es posible predecir el número de

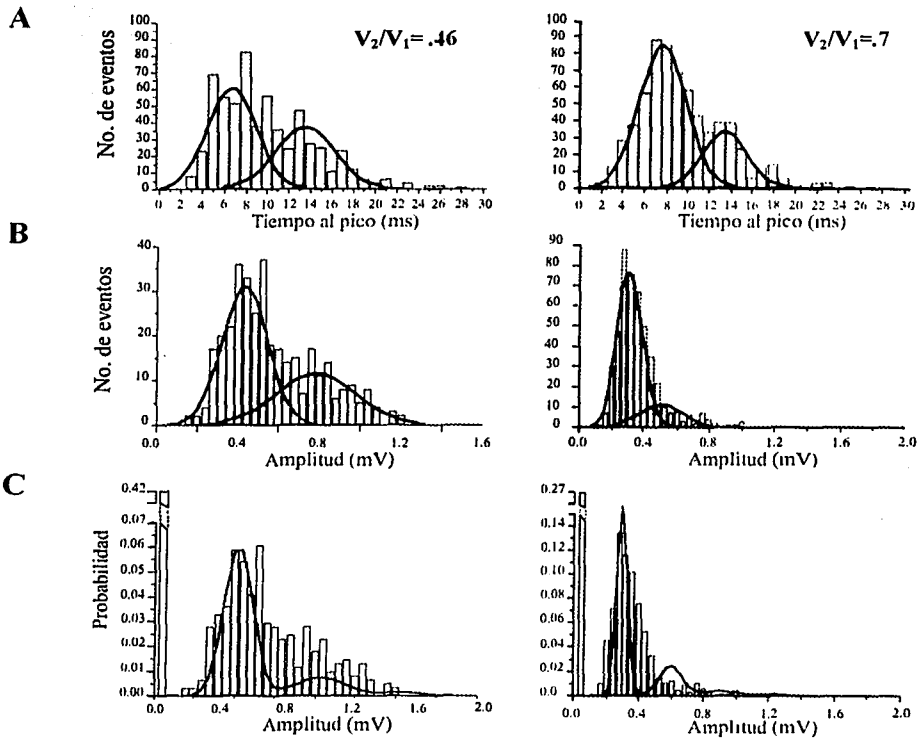


Figura 19. Distribución de tiempos al pico y amplitudes de EPSPs. Los paneles del lado izquierdo corresponden a una neurona y los del lado derecho a otra. **A. Histogramas de tiempos al pico de los EPSPs, ajustando dos gaussianas.** Lado izquierdo: El pico de la primera gaussianas está en 6.56 ± 0.063 ms y el de la segunda en 12.29 ± 3.06 ms. Lado derecho: histograma de otra neurona. El pico de la primera gaussianas está en $7.6 \pm .19$ ms y el pico de la segunda en $13.46 \pm .46$ ms. Los eventos bajo la segunda gaussianas fueron usados como fallas para predecir la distribución de Poisson en C. **B. Histogramas de amplitudes de eventos exitosos con ajuste de 2 gaussianas.** Lado izquierdo: primer pico en $.43 \pm 0.01$ mV y segundo en $.78 \pm .09$ mV. Lado derecho: primer pico en $.3 \pm .008$ mV y segundo en $.50 \pm .19$ mV. **C. Comparación de la distribución de amplitudes obtenidas experimentalmente (barras), con la distribución teórica de amplitudes (línea) y fallas predichas por la distribución de Poisson.** Lado izquierdo: los picos de la distribución teórica (.4 y .8 mV, $\sigma=17$) coinciden con los picos de la distribución de eventos experimentales (panel B, lado izquierdo). Esto significa que podemos calcular una distribución teórica usando las fallas y los eventos calculados a partir de la distribución experimental. Lo anterior, permite considerar que la liberación del neurotransmisor responsable de la actividad espontánea en las neuronas de Retzius es cuántica. Lado derecho: otra célula donde los picos de la distribución teórica están en .3 y .6 mV ($\sigma=11$), lo que correlaciona con los picos del histograma en B (lado derecho).

fallas y eventos exitosos, a partir de los histogramas de tiempos al pico utilizando los eventos lentos como fallas locales.

Existe una estrecha relación entre el valor de la tasa de acople y la frecuencia promedio. Para neuronas de Retzius con una tasa de acople pequeña la frecuencia promedio es alta y viceversa (Fig. 20A). Como era de esperarse, la relación entre la amplitud unitaria vs la tasa de acople resultó similar (Fig. 20B). Con tasas de acople muy bajas la amplitud unitaria (producida por la liberación de un cuanto presináptico) de los EPSPs fue grande, mientras que para tasas de acople muy grandes, la amplitud del unitario fue pequeña. El punto marcado con una flecha, corresponde al experimento en que una neurona fue eliminada por fotoblación. La amplitud unitaria para esta neurona tiene un valor de 0.6, ya que al eliminar a la neurona acoplada las dendritas se comportan como un cable sellado, similar a cuando la resistencia de acople tiene un valor muy alto.

Esto confirma que el grado de acoplamiento entre las neuronas de Retzius es capaz de regular la amplitud unitaria de los ESPSPs de manera postsináptica, y por lo tanto influenciar la frecuencia promedio a la cual disparan estas neuronas potenciales de acción espontáneos.

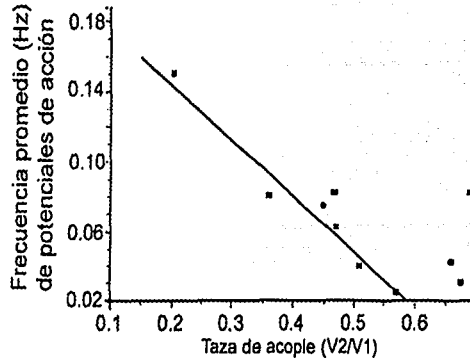
Producción de potenciales sinápticos artificiales

Sabiendo que es posible obtener variaciones en la amplitud de los potenciales sinápticos ya sea por variaciones cuánticas o por la resistencia de acople entre las neuronas de Retzius.

Lo siguiente fue analizar cómo potenciales sinápticos con amplitudes variables y con distintas relaciones espacio-temporales afectan la integración en estas neuronas. Para esto produjimos potenciales sinápticos artificiales mediante inyección de corriente. Utilizando de 4 a 6 nA se produjeron potenciales sinápticos de 1.5 o 3 mV. La relación entre la corriente y la amplitud varió un poco de neurona a neurona. Los registros se muestran en la figura 21A, donde V_1 es el potencial sináptico producido en una de las neuronas de Retzius, y V_2 es su propagación hacia la neurona acoplada. Al reproducir el experimento a distintos potenciales de membrana, encontramos que tanto la amplitud y la cinética de los potenciales en V_1 y V_2 fueron independientes del voltaje de membrana. Esto, sugirió que en la generación y propagación de estos potenciales solamente intervienen propiedades pasivas. Sin embargo, para asegurar que no hubiese canales de Na^+ involucrados en la propagación, agregamos TTX durante los registros. La presencia de TTX no afectó la propagación de los potenciales sinápticos, lo que indica que no participan canales de Na^+ dependientes de voltaje en la propagación (Fig. 21A). Para bloquear los posibles canales de Ca^{+2} involucrados, utilizamos Ringer con Co^{+2} sustituyendo al Ca^{+2} . En presencia de Co^{+2} , la propagación en estas neuronas tampoco se vio afectada, por lo que los canales de Ca^{+2} no están involucrados en la propagación.

Se realizaron curvas voltaje vs corriente para determinar si la relación entre la cantidad de corriente inyectada y los potenciales sinápticos producidos era lineal (Fig. 21B). Esta relación resultó fue lineal aún en presencia de TTX, confirmando la ausencia de componentes activos involucrados en la generación de estos potenciales. Las curvas También fueron similares al realizarse a potenciales de membrana de -60 mV y -70 mV.

A



B

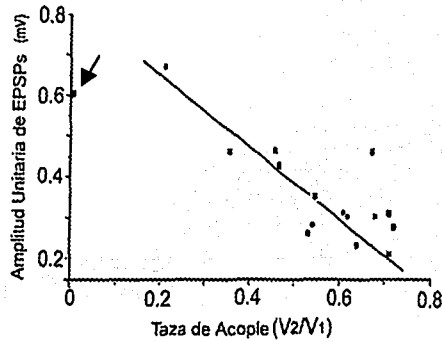


Figura 20. Relación entre la frecuencia de los potenciales de acción, la amplitud de los EPSPs y la tasa de acople. A. La frecuencia promedio de disparo en función de la tasa de acople fue inversamente proporcional a la tasa de acople. B. Amplitud de los EPSPs unitarios en función de la tasa de acople. La amplitud unitaria de los EPSPs es inversamente proporcional a la tasa de acople. El punto marcado con una flecha, indica la amplitud de los potenciales sinápticos unitarios después de eliminar a la neurona acoplada eliminada por fotobloqueo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

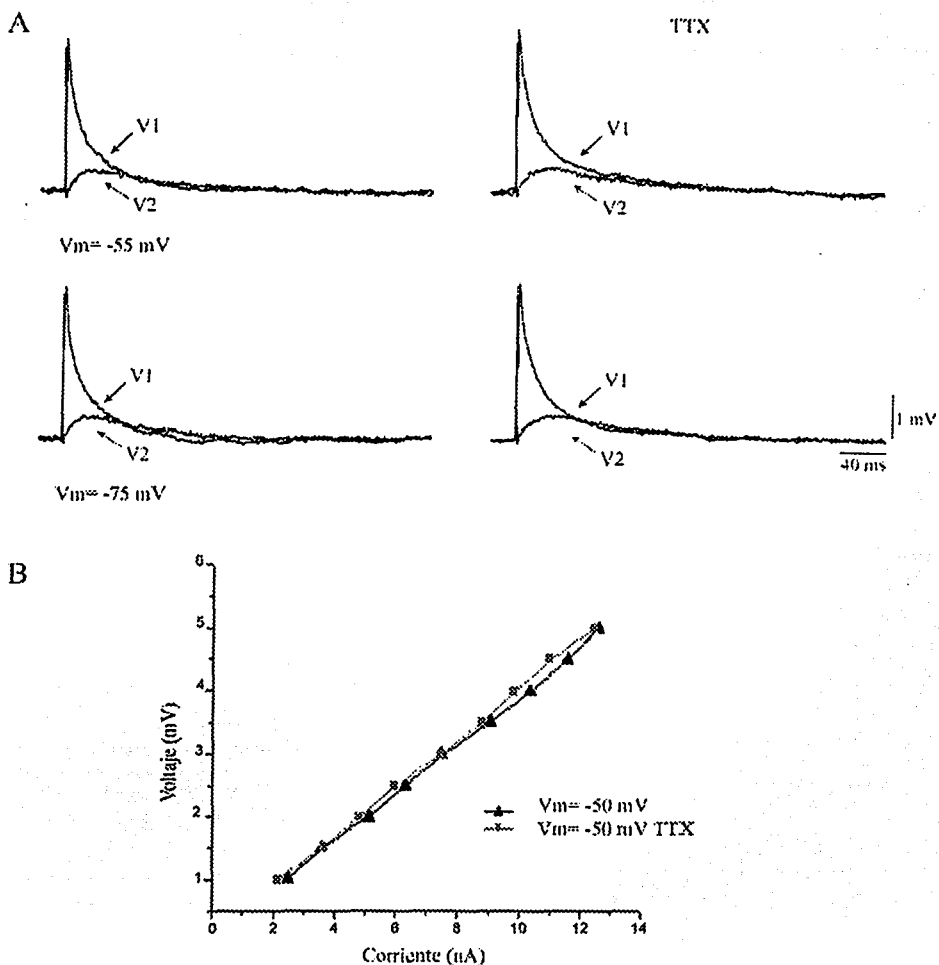


Figura 21. Relación entre la amplitud y la cinética de potenciales sinápticos excitadores artificiales producidos a distintos potenciales de reposo, en ausencia y en presencia de TTX. A. Lado izquierdo: sinápticos artificiales producidos en V1 y propagados hacia V2, a potenciales de reposo de -55 y -75 mV. La amplitud y la cinética de los potenciales artificiales son independientes del potencial de reposo, lo que sugiere que la propagación es independiente del potencial de reposo (V_m). Lado derecho: registros en las mismas condiciones pero en presencia de TTX. La amplitud y la cinética fueron iguales en ambas situaciones, lo cual descarta la participación de canales de Na^+ activados por voltaje. B. Relación entre la corriente y la amplitud de los potenciales sinápticos artificiales fue lineal aún en presencia de TTX, lo cual sugiere que en la generación de los sinápticos no intervienen propiedades activas.

Potenciales sinápticos artificiales sincrónicos

Proseguimos a investigar cómo la relación espacio-temporal entre las entradas sinápticas afecta la integración. El primer caso que analizamos fue cuando ocurren los potenciales sinápticos sincrónicos simétricos.

Se produjeron potenciales sinápticos artificiales en ambas neuronas de Retzius. Los potenciales sinápticos resultantes, se compararon con el control, producido solamente en la neurona registrada (V_1). En este caso (Fig. 22A trazo negro), la suma no produjo cambios en amplitud, sin embargo la fase de caída se alargó significativamente ($p \leq .03125$) al comparar con el control (trazo rojo). Las asimetrías en los potenciales sinápticos artificiales incrementaron los efectos ya descritos. Cuando los sinápticos fueron sincrónicos pero asimétricos, es decir V_1 fue de la mitad de amplitud a V_2 . La suma registrada en V_1 resulta en un potencial sináptico cuya amplitud no fue afectada, pero su fase de caída se alargó considerablemente. En contraste, el sináptico registrado en V_2 , casi no se ve afectó (Fig. 23A).

Potenciales sinápticos artificiales asincrónicos

Cuando los potenciales sinápticos fueron simétricos-asincrónicos y el sináptico en V_1 fue precedido 10 ms por el producido en V_2 , la amplitud del potencial sináptico registrado en V_1 aumentó y en su fase de subida apareció un pie (Fig. 22B), reflejando la propagación del potencial sináptico de la neurona acoplada. Al producirse potenciales asimétricos con estas condiciones, sucedió lo mismo, aunque los aumentos en la amplitud fueron mucho más evidentes. V_2 en el caso de los asimétricos permaneció muy similar al sináptico control (Fig. 23B).

Sin embargo, cuando V_1 precedió 10 ms a V_2 , la amplitud no cambió pero la fase de caída aumentó considerablemente. El artefacto que aparece en la fase de caída, indica la producción del potencial sináptico en V_2 (Fig. 22C). Para el caso de los asimétricos (Fig. 23C) V_1 no cambió su amplitud, pero su fase de caída se incrementó y apareció una joroba. El sináptico en V_2 aumentó su amplitud con respecto al control y apareció el pie característico en la fase de subida. Su fase de caída también fue alargada.

Para el análisis de aumentos en amplitud y tiempos de caída en función de la relación temporal entre los potenciales sinápticos artificiales. Se tomó como referencia la neurona en la cual se estaba realizando la medición (V_1). Por ejemplo, un $\Delta t = -10$ ms indica que el sináptico en V_1 fue precedido 10 ms por el producido en V_2 . En cambio, un $\Delta t = 10$ ms, indica que V_2 ocurrió 10 ms después de V_1 .

Análisis de cambios en la amplitud

Los 6 pares de neuronas estudiadas tuvieron un comportamiento similar. La figura 24A muestra el promedio de las amplitudes de los potenciales sinápticos simétricos en función del Δt . En la gráfica podemos observar que las amplitudes son mayores cuando el valor del

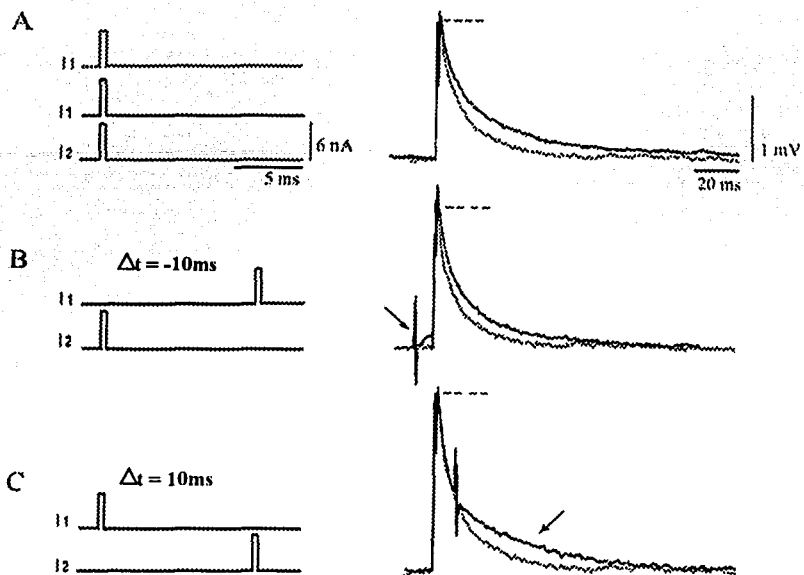


Figura 22. Suma de Potenciales Sinápticos Simétricos Sincrónicos y Asincrónicos. A. Los trazos en el lado izquierdo: El trazo en rojo es el control aplicado solo a V_1 . Trazos en negro, produjeron potenciales sinápticos simétricos-sincrónicos. A la derecha: Registros en V_1 (negro), sobrepuestos al control (rojo). Hubo un alargamiento de la fase de caída sin cambio en la amplitud. B. Lado izquierdo protocolo de corriente para producir potenciales sinápticos simétricos-asincrónicos. Lado derecho: sobreposición de un potencial en V_1 precedido en 10 ms por V_2 . Registro en V_1 (negro). El control esta en rojo y se observa un pie al inicio de la fase de subida (flecha), y un incremento en la amplitud. La línea punteada indica la amplitud del control. C. Lado izquierdo: protocolo de corriente para producir sinápticos simétricos-asincrónicos. Lado derecho: registro en V_1 (negro) cuando los sinápticos son simétricos, pero el sináptico producido en V_2 se produjo 10 ms después de V_1 . En este caso, la amplitud no se afectó sin embargo, la fase de caída se alarga mucho más que en las condiciones anteriores (flecha).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

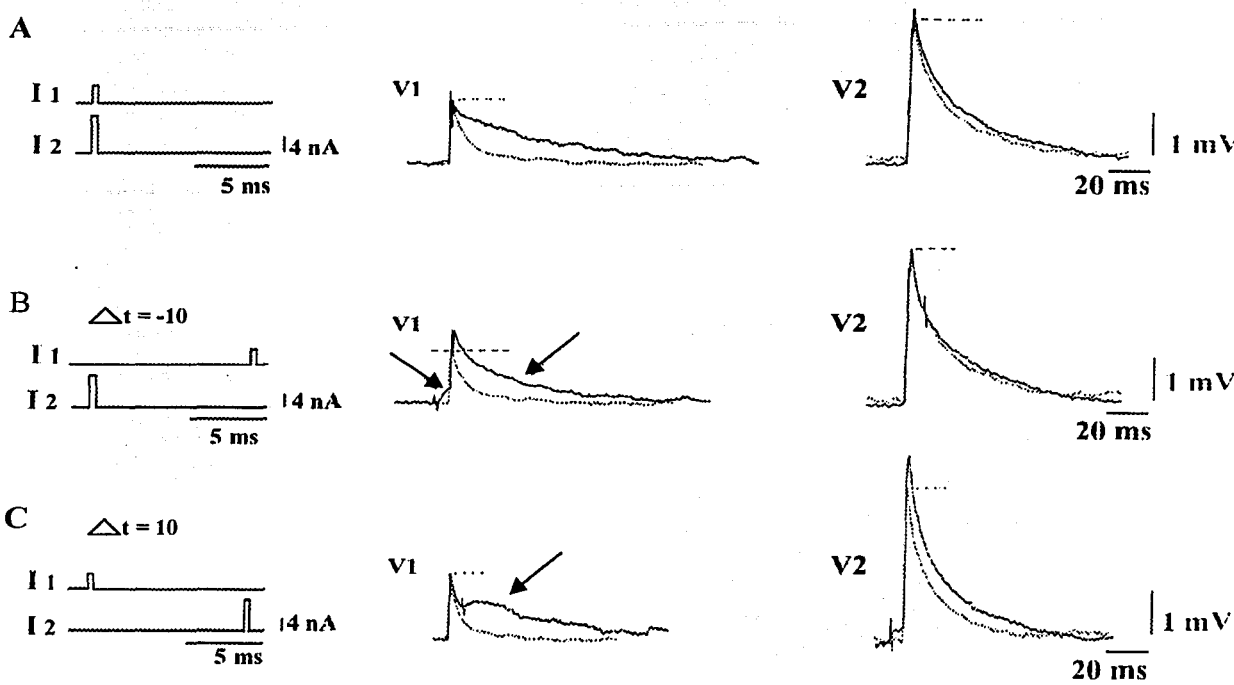


Figura 23. Suma de potenciales sinápticos asimétricos en neuronas de Retzius.

Trazos en el lado izquierdo: protocolos de corriente utilizado para producir potenciales sinápticos asimétricos, donde V_2 es del doble de amplitud a V_1 . En medio: registros en V_1 . Lado izquierdo: registros en V_2 . Los trazos en rojo son los trazos control, cuando solo se produjo un potencial sináptico en la célula registrada. **A. Suma de potenciales sinápticos sincrónicos asimétricos.** Registro en V_1 cuando los potenciales son sincrónicos y asimétricos (trazo en negro). Como puede verse, la amplitud del sináptico no se afectó, pero su fase de caída se alargó en comparación con el control. Registro en V_2 (trazo en negro), comparando con el control, notamos que el sináptico es ligeramente mayor en amplitud y su fase de caída se alarga. La línea punteada indica la amplitud del control. El aumento en la amplitud como veremos más adelante no es significativo. **B. Suma de potenciales sinápticos sinápticos asincrónicos asimétricos.** Cuando el sináptico producido en V_2 precede al producido en V_1 . La suma de V_1 y V_2 produce un sináptico de mayor amplitud, con un pie en la fase de subida y un alargamiento de la fase de caída (flechas). La línea punteada indica la amplitud del sináptico control. En V_2 el efecto es prácticamente nulo, al compararlo con el control. **C. Suma de potenciales sinápticos asincrónicos asimétricos.** Cuando el sináptico en V_1 precede 10 ms al producido en V_2 . El registro en V_1 muestra una joroba en la fase de caída (flecha). La amplitud no se afecta. Para el registro en V_2 , la suma produce un aumento con respecto al del control. En la fase de subida aparece el pic característico.

Δt es negativo. Las amplitudes de los potenciales sinápticos producidos con $\Delta t = -10$ y -5 ms resultaron significativamente mayores a las amplitudes producidas con un $\Delta t = 10$ ms ($\alpha = .05$).

Análisis de cambios en la amplitud

El análisis de las amplitudes para los potenciales sinápticos asimétricos fue similar al de los sinápticos simétricos. En la figura 24B se encuentra el promedio de las amplitudes medidas para V_1 . Cuando Δt fue negativo, hubo aumentos considerables en la amplitud, en comparación con los sinápticos producidos con otros retardos. Las amplitudes de los potenciales sinápticos obtenidos con $\Delta t = -10$ ms y -5 ms fueron significativamente mayores a las obtenidas con 10 ms ($\alpha = .05$). En el panel 24C están los promedios de las amplitudes para V_2 . Para los sinápticos en V_2 , encontramos que no hubo diferencias significativas en las amplitudes a distintos Δt ($\alpha = .05$).

El panel D, resume el comportamiento de las amplitudes medidas en todas las condiciones. Los promedios fueron normalizados con respecto al promedio de las amplitudes obtenidas con $\Delta t = 10$ ms. Se observa que los mayores aumentos en la amplitud, fueron con Δt negativos. Este efecto se acentuó cuando V_2 tuvo el doble de amplitud que V_1 . Sin embargo los mayores cambios en la amplitud se dan en V_1 cuando los sinápticos son asimétricos y cuando los sinápticos son simétricos. Para V_2 cuando los sinápticos son asimétricos no hay cambios en la amplitud con ningún retardo.

Relación entre la amplitud los potenciales sinápticos artificiales y la V_2/V_1

Debido a que los incrementos en las amplitudes y fases de caída se deben al flujo de corriente a través de la resistencia de acople, analizamos la influencia de la resistencia de acople en la cantidad de corriente fluyendo entre ambas neuronas. Graficamos la amplitud de los potenciales en V_1 y V_2 en función de la tasa de acople estacionaria (Fig. 25). La amplitud de los potenciales sinápticos controles (V_1) fue independiente de la tasa de acople, debido a que fue impuesta por la inyección de corriente en el soma. Sin embargo, las amplitudes de los potenciales propagados hacia V_2 , fueron directamente proporcionales a la tasa de acople (V_2/V_1) e inversamente proporcionales al valor de la resistencia de acople (r_c). La r_c fue calculada a partir de simulaciones en el dominio senoidal (García, et al., en prensa).

Análisis de las fases de caída y t_{25}

Debido a que la cantidad de corriente fluyendo entre estas neuronas varía dependiendo de la V_2/V_1 los aumentos en las fases de caída serán distintos de célula a célula. El análisis de las constantes de caída de los sinápticos producidos arrojó resultados ambiguos. El ajuste no fue monoexponencial, sino que fue necesario ajustarle a la fase de caída 2 exponenciales, y en algunos casos hasta 3. La segunda de las constantes fue descartada por considerarle parte de un artefacto, ya que siempre se mantuvo constante a pesar del Δt . La presencia de la tercera constante de tiempo, solo se presentó en V_1 en potenciales sinápticos asimétricos y

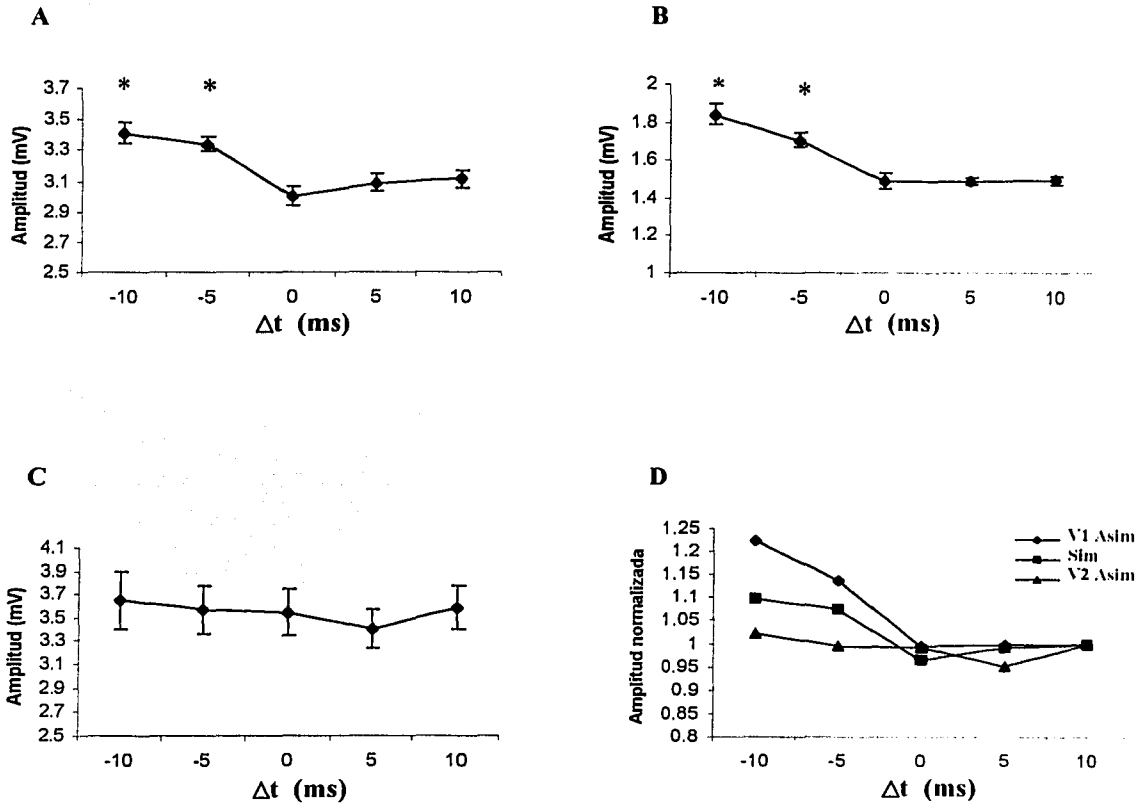


Figura 24. Cambios en la Amplitud en función del retardo en la generación de Potenciales sinápticos artificiales.

A. Amplitud vs Δt * de potenciales sinápticos simétricos. Promedio de amplitudes en función del retardo ($n=6$ células). Las mayores amplitudes se dieron con $\Delta t = -5$ y -10 ms. Comparando las amplitudes de estos Δt con las de 10 ms, hay un aumento significativo en la amplitud ($\alpha=.05$). **B. Amplitud medida en V_1 vs Δt de potenciales sinápticos asimétricos, cuando V_1 tuvo la mitad de amplitud a V_2 ($n=6$).** Las mayores amplitudes fueron para potenciales sinápticos con $\Delta t = -5$ y -10 ms fueron significativamente mayores con respecto a $\Delta t = 10$ ms ($\alpha=.05$). **C. Amplitud medida en V_2 vs Δt en la generación de potenciales sinápticos asimétricos ($n=6$).**

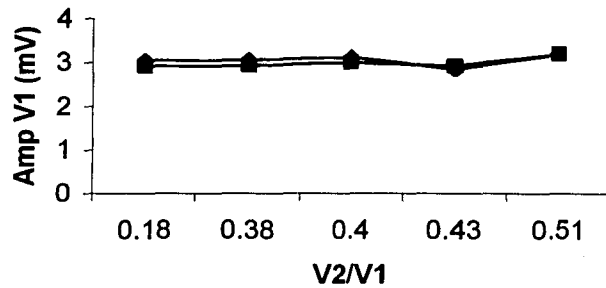
Independientemente del retardo no hay diferencias en la amplitud con ($\alpha=.05$).

D. Amplitudes promedio normalizadas vs Δt ($n=6$) Amplitudes normalizadas con respecto a la amplitud promedio cuando el retardo es de 10 ms.

* Para el retardo, se tomó siempre como referencia V_1 (ver texto).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



B

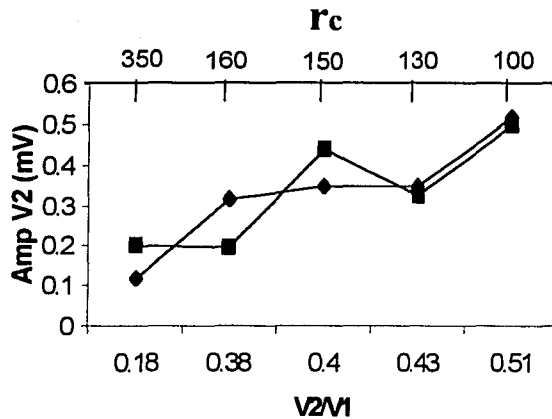


Figura 25. Papel de la tasa de acople en la amplitud de los potenciales sinápticos en ambas neuronas.

A. La amplitud de los potenciales sinápticos controles en V1, vs distintas tasas de acople. Esta relación fue constante. B. La Amplitud del potencial sináptico propagado hacia V2 vs la tasa de acople. Conforme la tasa de acople aumenta y la resistencia de acople (r_c) disminuye, la amplitud del sináptico propagado aumenta. Los valores de r_c , para cada tasa de acople fueron tomados de García. et. al., en prensa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

correlacionó con Δt positivos. Analizando solamente la primera constante de tiempo (τ_1), encontramos que cuando los potenciales fueron simétricos, esta aumentó conforme el Δt se fue haciendo positivo. La τ_1 de los potenciales sináptico producidos con $\Delta t = 10$ ms resultaron significativamente mayores que las τ_1 para $\Delta t = -10$ ms ($p \leq .03125$). Es importante mencionar que las τ_1 de los sinápticos simétricos son mayores a las τ_1 de los sinápticos control ($p \leq .03125$).

En el caso de los potenciales sinápticos asimétricos el análisis de τ_1 arrojó resultados ambiguos, donde no pudimos identificar ningún tipo de tendencia en función de Δt . Aunque al ver los registros era evidente que las fases de caída eran distintas al menos en la forma, a las de los controles. Por lo tanto, para cuantificar el incremento en el tiempo de caída, medimos el tiempo al cual la amplitud máxima del potencial sináptico decrece al 25% (t_{25}). Utilizamos este valor porque a este tiempo, en todos los registros observamos el efecto de la suma en la fase de caída. Los t_{25} controles variaban mucho de una neurona a otra, presumiblemente a la constante de tiempo de la membrana y posiblemente a la penetración de los electrodos. Sin embargo, cuando los potenciales fueron simétricos, el t_{25} fue significativamente más grande que el t_{25} de los controles ($p \leq .03125$) (Fig. 26A). Aunque esperaríamos que hubiese una tendencia del t_{25} a aumentar cuando el Δt es positivo, esto no se observó en todas las células. Comparando con los controles, los aumentos en el t_{25} van desde un 20 hasta un 120% (Fig. 26B).

Cuando los potenciales sinápticos fueron asimétricos, el aumento en el t_{25} fue mayor. La figura 27A muestra los promedios comparados con el único control que tuve como referencia. Sin embargo, no hay una relación entre los t_{25} promedio y el retardo ($\alpha = .05$). Los t_{25} aumentaron entre un 134-250% (Fig. 27B).

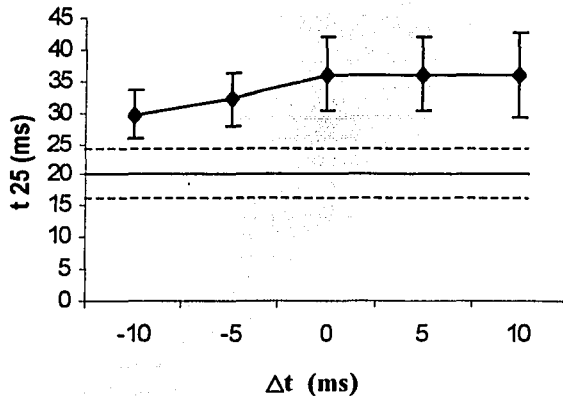
Para V_2 los valores de t_{25} son mayores a los t_{25} control ($p \leq .0625$) (Fig. 27C). Aunque de nuevo, los incrementos no variaron en función de Δt . Comparando con los controles, los aumentos en el t_{25} fueron hasta de un 77%. Menores a los observados para V_1 (Fig. 27D).

Para analizar si los aumentos en la amplitud y en las fases de caída fueron debidos a la suma lineal de la corriente producida de corriente de la neurona acoplada. Realizamos sumas digitales de los sinápticos locales con los sinápticos propagados desde V_2 y las comparamos con los registros de estimulación simultánea.

Sumando los potenciales sinápticos controles con las amplitudes de los sinápticos propagados de la neurona acoplada, resultó que cuando el sináptico en la neurona acoplada precede al sináptico local y hay aumentos en la amplitud, estos aumentos son lineales ($\alpha = .05$). Obtuvimos resultados similares tanto para los potenciales simétricos como para los asimétricos. Para aumentos en la fase de caída, al potencial control le sumamos el potencial propagado de la neurona acoplada a distintos tiempos (5 o 10 ms después). Resultando potenciales muy similares a los registrados para esos retrasos (Fig. 28), de manera que la suma también es lineal. Esto fue tanto para potenciales simétricos como asimétricos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



B

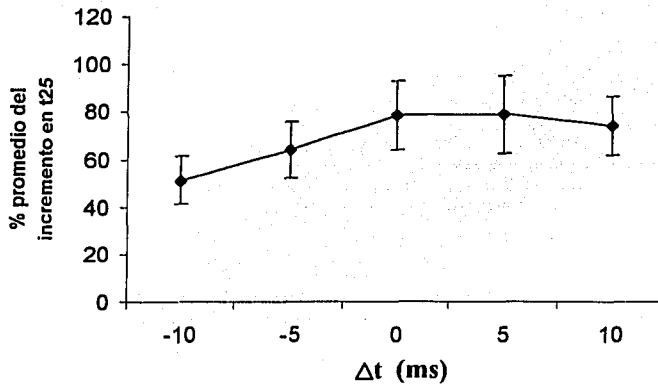


Figura 26. t_{25} vs Δt (ms) para Potenciales Sinápticos Simétricos

A. Efecto del Δt en el t_{25} para potenciales sinápticos simétricos. La línea continua horizontal es el promedio de los sinápticos control y las líneas discontinuas representan el error estándar. Resultando que los t_{25} para todos los retardos resultan significativamente mayores a los controles ($p \leq 0.03125$ en todos los casos).
B. Porcentaje promedio del incremento del t_{25} para cada célula con respecto a su control, en función del Δt . Cuando los sinápticos fueron simétricos sus t_{25} aumentan con respecto a su control, para cualquier retardo.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

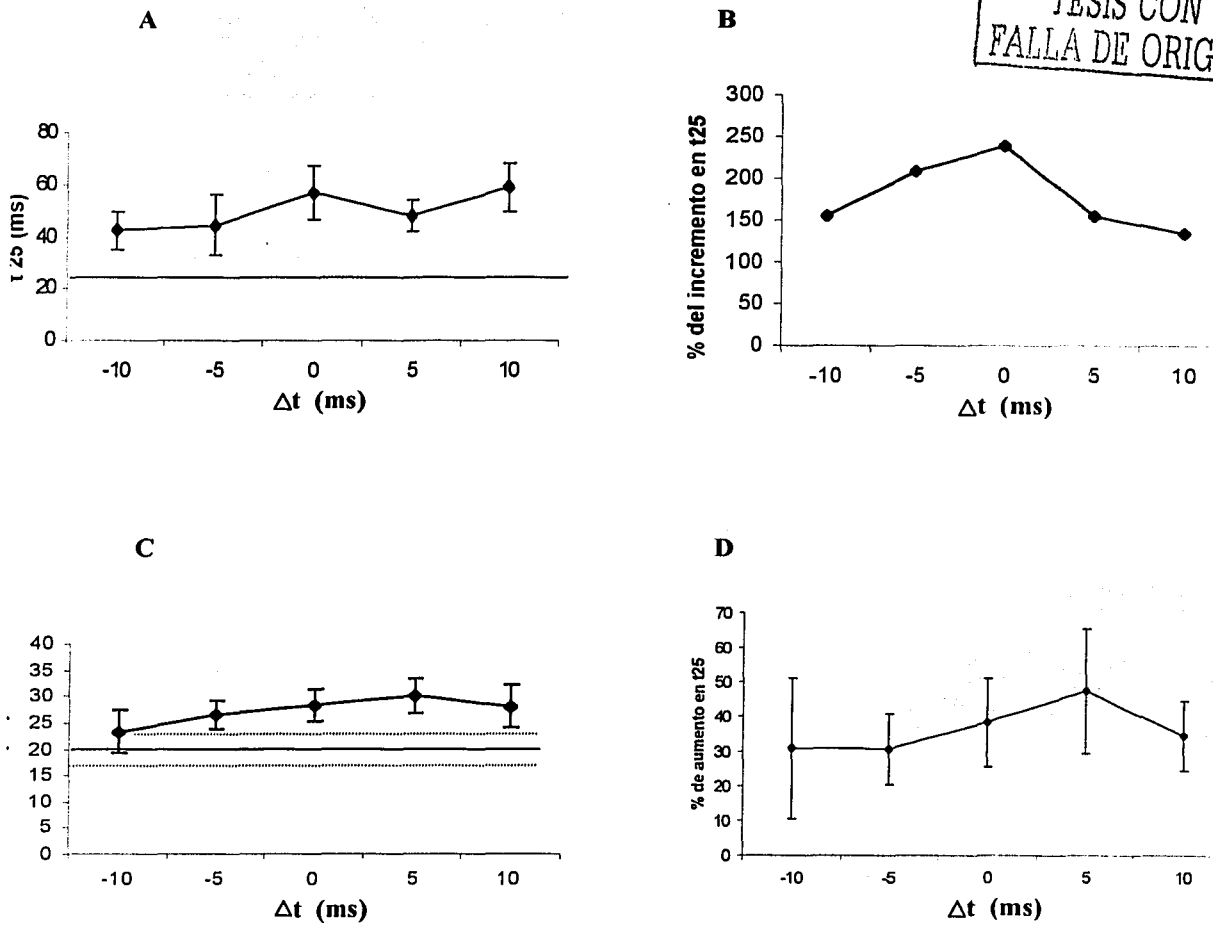


Figura 27. t_{25} vs Δt para Potenciales Sinápticos Asimétricos

A. Efecto del Δt en t_{25} para potenciales en V1. Comparando los t_{25} en función del retardo, resultó que no hay diferencias en el t_{25} en función del retardo ($\alpha=.05$). La línea continua indica el valor del t_{25} para la única neurona que tuvimos control. **B. Incremento porcentual en el valor de t_{25} en función de Δt .** Los t_{25} en V1 cuando los potenciales fueron asimétricos fueron más grandes que el control. **C. Efecto del retardo en t_{25} para potenciales en V2.** Los t_{25} medidos en V2 cuando los sinápticos fueron asimétricos resultaron mayores a sus controles ($p \leq .0625$ para todos los casos); con excepción de los sinápticos producidos con un $\Delta t = -10$ ms. Línea horizontal continua: control. Línea discontinua: error estándar. **D. Promedio del Porcentaje del incremento en t_{25} en función del Δt .**

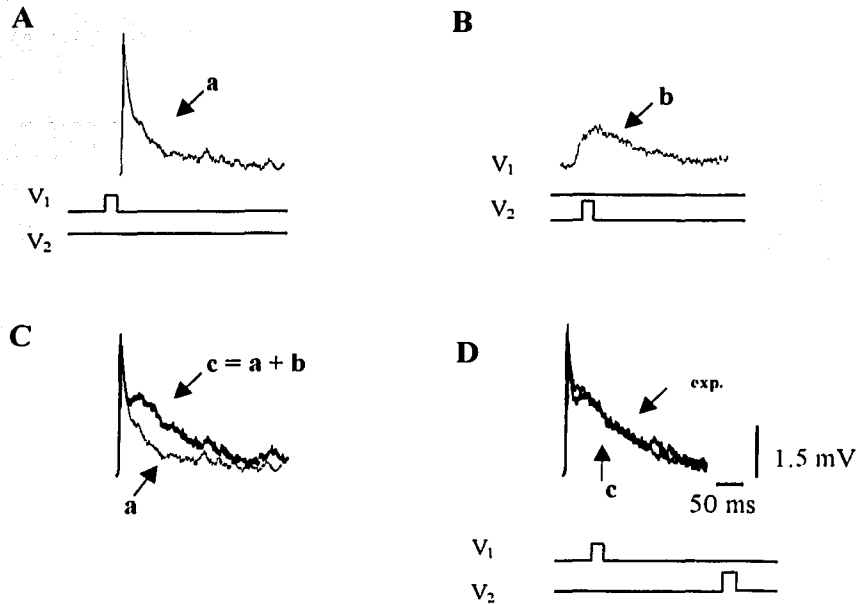


Figura 28. Suma lineal de potenciales sinápticos asimétricos.

A. Potencial sináptico artificial control producido en una neurona de Retzius. El protocolo de corriente está abajo. ($V_1 = a$). **B.** Potencial artificial medido en V_1 , perteneciente a la propagación del sináptico producido en V_2 con amplitud de 3 mV. **C.** El trazo en negro (c) es el resultado de la suma teórica entre a y b cuando $\Delta t = 10$ ms, entre la producción de a y la propagación de b. Trazo en rojo: control. **D.** Comparando con el trazo experimental la suma de a y b resulta muy similar, lo que indica que la suma de los potenciales es lineal.

VI. DISCUSIÓN

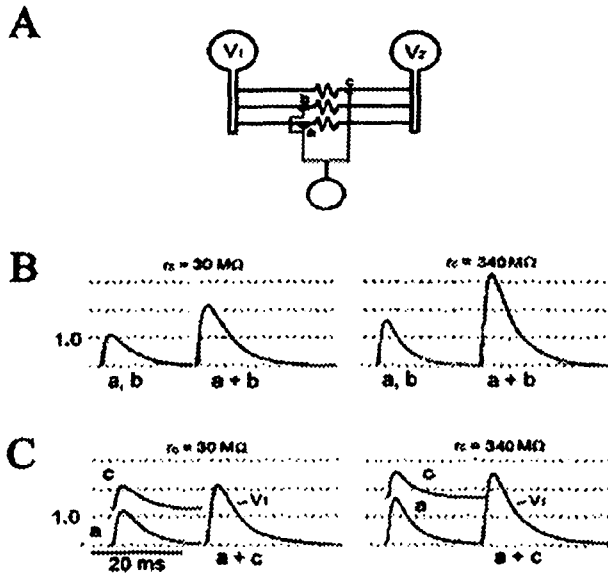
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados de este trabajo, demuestran que el grado de acoplamiento eléctrico entre las neuronas de Retzius modula la amplitud unitaria de los EPSPs. Estos cambios de amplitud correlacionan con la frecuencia de disparo de las neuronas. Así mismo, confirmamos que la liberación del neurotransmisor responsable de los EPSPs es cuántica. El acople eléctrico permite la propagación de potenciales sinápticos de una neurona a otra. Cuando se producen potenciales sinápticos en ambas neuronas, estos se suman linealmente y la relación temporal y de amplitudes entre ellos ocasiona cambios en la amplitud y en los tiempos de caída.

El acople eléctrico, modula la amplitud de los potenciales sinápticos regulando el flujo de corriente entre las neuronas (García et. al., enviado). Al existir poco acople entre las células, poca corriente se fuga hacia la otra neurona, ocasionando que la amplitud del sináptico local se incremente. En este caso las dendritas tienden a comportarse como un cable sellado. En cambio, si la resistencia es baja y hay un gran acople, la cantidad de corriente que se fuga es mayor y la amplitud se reduce (García et. al. enviado). Esta hipótesis fue demostrada de manera directa en el presente trabajo. Además de las variaciones en la amplitud de los EPSPs atribuibles a distintos contenidos cuánticos, la amplitud de los EPSPs sufre modificaciones postsinápticas en función del valor de la resistencia de acople.

En cuanto a las probabilidades de liberación del neurotransmisor responsable del disparo a bajas frecuencias, el análisis utilizado confirma que la liberación es de carácter cuántico. El método usado, es original ya que aprovechando el acople eléctrico, calculamos el número de eventos y fallas a partir de la cinética de los potenciales espontáneos. Sin embargo, a pesar de que los ajustes de la curva teórica son bastante cercanos a la distribución experimental de amplitudes, lo más probable es que el número de fallas haya sido subestimado, debido a que no determinamos el número de fallas simultáneas en ambas neuronas. Es importante mencionar que las distribuciones de amplitudes estuvieron dominadas por eventos unitarios, lo que aunado al número de sitios de contacto (45) y a la suma lineal de los potenciales sinápticos, sugiere que cada neurita acoplada produce solo respuestas unitarias y que la suma ocurre en el axón primario. Entonces, si la integración depende de la amplitud y de la relación espacio- temporal entre las entradas sinápticas, ¿cual sería la probabilidad de que ocurran potenciales sinápticos sincrónicos sobre una misma dendrita? Velázquez-Ulloa y colaboradores en el laboratorio, encontraron que hay 46.6 ± 1.2 e.s. puntos de contacto entre ambas neuronas de Retzius (en preparación). Sugiriendo un número similar de dendritas acopladas. Entonces, si suponemos una entrada sináptica sobre cada dendrita acoplada eléctricamente, la probabilidad de tener un evento o un potencial sináptico unitario es de $1/45 = .022$. Siendo entonces $1/45 * 1/45 = .0005$ la probabilidad de tener un evento doble en una dendrita o de tener sinápticos sincrónicos sobre la misma dendrita. Dado que las distribuciones de amplitudes están dominadas por eventos individuales, la probabilidad es tan baja que los potenciales sinápticos producidos en las dendritas acopladas eléctricamente, son eventos unitarios, y eventos dobles o triples registrados en el soma son la suma en el axón primario de todos los eventos individuales

producidos simultáneamente en varias dendritas. La figura 29 simula el efecto integrativo de esta hipótesis.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 29. Integración de potenciales sinápticos unitarios en diferentes dendritas acopladas eléctricamente. A. Representación esquemática de entradas sinápticas en diferentes dendritas acopladas. **B.** A la izquierda de cada panel se observa la amplitud de los EPSPs en V_1 cuando la resistencia de acople es $30 \text{ M}\Omega$ y a la derecha cuando es $340 \text{ M}\Omega$ (derecha). Nótese que la amplitud en V_1 depende del valor de la resistencia de acople. **C.** A la izquierda están los EPSPs producidos en a y c vistos en V_1 . A la derecha está la suma de a y c (tomado de De Miguel, et. al., en preparación).

En teoría el hecho de tener eventos en distintas dendritas le permitiría a la sinapsis eléctrica participar en la integración sináptica, ya que al existir diferencias de potencial de una dendrita a otra, habría flujo de corriente, y el potencial sináptico se podría propagar a la otra neurona.

El hecho de que la amplitud de los potenciales propagados de sinápticos artificiales varíe con respecto a la tasa de acople, confirma que la resistencia de acople modula el flujo de corriente entre ambas neuronas. Es importante señalar que el modelo teórico propuesto por E. García y colaboradores propone que simulando corrientes constantes en V_1 , la amplitud del sináptico en V_1 será modulada por el valor de la resistencia de acople. Sin embargo la amplitud del potencial propagado en V_2 se mantiene constante, esto para entradas cercanas

a la sinapsis eléctrica. Teóricamente el valor de V_1 puede ser calculado ya que el circuito se comporta según la ley de Ohm. Aunque la cantidad de corriente fluyendo hacia V_2 depende del valor de la resistencia de acople, los cambios en la corriente serán compensados por la impedancia dendrítica que se mueve en paralelo con la resistencia. En nuestros experimentos V_2 varía porque el valor de corriente inyectada no fue constante. Por el contrario la amplitud del potencial en V_1 fue lo que se mantuvo constante. En este caso, hay dos parámetros que varían: la corriente inyectada y la corriente fluyendo hacia V_2 . Es por eso que la impedancia dendrítica no compensa el flujo de corriente a través de la resistencia y la amplitud del sináptico en V_2 cambia dependiendo de la resistencia de acople entre las neuronas de Retzius. In vivo, estas neuronas reciben múltiples entradas con distintas relaciones espacio-temporales, lo que provoca flujos de corriente variables lo cual sugiere fuertemente que la resistencia de acople modula la cantidad de corriente fluyendo entre ambas neuronas, por lo que la amplitud de los sinápticos propagados dependería del grado de acople eléctrico.

La activación de entradas localizadas cerca del soma o sobre las dendritas acopladas eléctricamente (entradas activadas por neuronas mecanosensoriales (Velázquez-Ulloa, 2002)) puede ser equivalente a lo que sucede durante la generación de potenciales sinápticos artificiales. Generando, potenciales sinápticos artificiales en ambas neuronas de Retzius se demostró que no hay conductancias ni de Na^+ ni de Ca^{+2} involucradas en la generación de estos potenciales sinápticos artificiales, ni tampoco en su propagación. Esto está en concordancia con datos previos de García et.al., (2003), donde modelando potenciales postsinápticos teóricos con la función de transferencia en el dominio senoidal sugieren fuertemente que la conducción en las neuritas acopladas es puramente pasiva.

Encontramos que la suma de potenciales artificiales producidos en ambas neuronas afecta la amplitud y la fase de caída, dependiendo de la relación temporal entre los potenciales sinápticos en las neuronas (sincrónicos o asincrónicos) y de sus amplitudes.

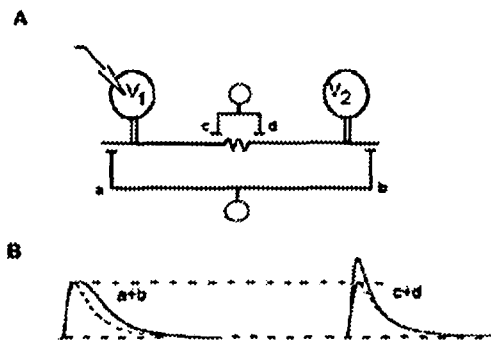
Cuando los potenciales sinápticos artificiales fueron simétricos y sincronizados, su fase de caída aumentó en comparación con la de los controles. Esto se debe a que al producirse con la misma amplitud y al mismo tiempo, las corrientes que fluyen del soma a las dendritas son de la misma magnitud pero con direcciones contrarias. Por ello, las neuronas no generan una diferencia de potencial y por lo tanto no hay flujo de corriente de una a otra. Sin embargo, la carga pasiva y el retraso debido a la velocidad de conducción alarga la fase de caída del potencial. En este caso, cada neurona de Retzius integraría la información que recibe de manera independiente y la sinapsis eléctrica se comportaría como una dendrita sellada. Cuando los potenciales fueron asimétricos y sincronizados, debido a que los sinápticos no son de la misma amplitud, el flujo de corriente no se anula (como es el caso para los simétricos-sincrónicos). Entonces la diferencia de potencial, resulta en el flujo de corriente del voltaje mayor al menor (de V_2 hacia V_1), afectando la fase de caída de este último. V_1 actúa reduciendo el cambio de voltaje y por tanto la fuga de corriente a la neurona acoplada por lo que en V_2 no hay cambios en amplitud, sin embargo su tiempo de caída es mayor al control.

Cuando los sinápticos fueron simétricos asincrónicos, la anticipación del potencial en V_2 permitió la suma de ambos, acercando a V_1 al umbral. Además hubo un alargamiento de la

fase de caída. Los aumentos en la amplitud se deben a la suma de corriente propagada de la otra neurona. La otra posibilidad analizada fue cuando el sináptico en V_1 es seguido por el sináptico en V_2 . En este caso, no hubo cambios en la amplitud del potencial V_1 , pero su fase de caída incrementó con la corriente proveniente de la neurona acoplada. A pesar de que es posible esperar también un aumento significativo en el t_{25} , con respecto a los sinápticos producidos con -10 y -5 ms de retraso, no lo hubo.

Para los potenciales sinápticos asimétricos y asincrónicos, sucede lo mismo que para los simétricos asincrónicos con la diferencia de que por ser asimétricos, la diferencia de voltaje es mayor y por tanto se incrementa el flujo de corriente entre las neuronas. Por lo que para V_1 los cambios en la amplitud serán mayores. La amplitud de V_2 permanece igual.

Los cambios en la fase de caída y en la amplitud producirán efectos distintos en la integración. Aumentos en la amplitud acercan el voltaje al umbral y tenderían a incrementar la frecuencia de disparo. Los aumentos en la fase de caída, favorecerían la suma temporal de otras entradas sinápticas y reducirían el filtrado de la membrana, mejorando la propagación del potencial sináptico. (Magee, 2000; Shepherd, 1990).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 30. Posibles potenciales sinápticos ocasionados por entradas localizadas sobre las dendritas acopladas eléctricamente. A. Esquema representando un par de neuronas de Retzius acopladas eléctricamente (resistencia) con entradas sinápticas (a,b,c,d) a diferentes distancias de la sinapsis eléctrica. Las dendritas están simuladas por un cable y la sinapsis eléctrica por una resistencia. B. Predicciones del efecto de la localización de la entrada sináptica en la localización. Lado izquierdo: sináptico registrado en V_1 cuando entradas son lejanas a la sinapsis eléctrica (a,b). Lado derecho: sináptico en V_1 cuando entradas cercanas a la sinapsis eléctrica (c,d) se activan. (tomado de De Miguel, et.al., en preparación)

En resumen, podemos afirmar que siempre que los potenciales sinápticos producidos en ambas neuronas se sobreponen en curso temporal, la suma favorece aumentos en la fase de caída. Es importante mencionar que si la entrada se encuentra muy cerca de la sinapsis

eléctrica la localización favorecerá que la suma incremente la amplitud del potencial de manera independiente del valor de la resistencia de acople.

Si las entradas están sobre las dendritas acopladas, la corriente fluye exclusivamente a través de ellas, hacía los sitios de integración. Cuando los potenciales sinápticos son sincrónicos y simétricos, y se generan cerca del soma la corriente fluye primeramente del soma a la sinapsis eléctrica y al colisionar, la corriente fluye de regreso al soma.

Esto provoca un aumento en la fase caída del potencial. En cambio, para entradas cercanas a la sinapsis eléctrica, habrá un aumento en la amplitud del sináptico y la fase de caída no se alargará (Fig. 29).

Cabe recalcar que en ambos casos, el valor de la resistencia de acople no tendría ninguna relevancia y las neuronas integrarían de manera independiente. En caso de que los sinápticos fueran asimétricos y sincrónicos, el valor de la resistencia es determinante en la cantidad de corriente que fluye de una neurona a la otra. Para las entradas cerca de la sinapsis los aumentos en la amplitud serían mucho más notorios (Fig. 29B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. CONCLUSIONES

- El acople eléctrico en las neuronas de Retzius de la sanguijuela *Haementeria officinalis* permite distintos modos de integración sináptica.
- La liberación del neurotransmisor sobre las neuritas acopladas es cuántica y probabilística. Fue posible obtener una aproximación relativamente buena del número de fallas contando los potenciales propagados de la neurona acoplada.
- La amplitud unitaria de los potenciales sinápticos espontáneos (ESPSs) esta determinada por el valor de la resistencia de acople. La amplitud unitaria es inversamente proporcional a la tasa de acoplamiento y directamente proporcional a la resistencia de acople.
- La relación temporal y de amplitudes entre las entradas sinápticas de ambas neuronas influyen en la respuesta postsináptica final de dos maneras:
 - a) Cuando los sinápticos son sincrónicos-simétricos hay un aumento en la fase de caída, debido a que la corriente se propaga en un sola dirección. En este caso no hay flujo de corriente hacia la otra neurona y el hecho de que las neuronas estén acopladas eléctricamente es irrelevante.
 - b) Cuando los sinápticos son asincrónicos se alarga la fase de caída en todos los casos.
 - c) Cuando el sináptico en la célula acoplada precede al local, la suma aumenta el cambio de voltaje. La magnitud del cambio depende del retardo, y de la amplitud del sináptico producido en la neurona acoplada. En estos casos, el valor de la resistencia de acople desempeña un papel relevante, al modular la cantidad de corriente fluyendo de una neurona a la otra.
- En todos los casos provocados, la suma de potenciales producidos en ambas neuronas fue lineal.
- La localización de las entradas sinápticas desempeña un papel fundamental en los incrementos de amplitud, en la propagación del potencial a la neurona acoplada y en la suma espacial con otras entradas.
- El acople eléctrico confiere a las neuronas mayor diversidad en sus modos de integración. Incrementos en la amplitud ocasionan que la célula llegue mucho más rápido al umbral y por tanto aumente su frecuencia de disparo. Aumentos en la fase de caída favorecen la suma temporal y reducen los efectos del filtrado de la membrana, contribuyendo a una mejor propagación del potencial sináptico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Andreasen M. y Lambert J., 1999, "Somatic Amplification of distally generated subthreshold EPSPs in rat hippocampal pyramidal neurones", *Journal of Physiol.*, 519(1): 85-100.
- Brizzzone R. Y Ressot C., 1997, "Connexins, Gap Junctions and Cell-Cell Signalling in the Nervous System". *European Journal of Neuroscience*, 9: 1-6.
- Boyd. I.A., y Martin, A. R., 1956, "The end-plate potential in mammalian muscle", *J. Physiol.* 132: 74-91.
- Bruns D. y Jahn R., 1995, "Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles". *Nature*, 377: 62-65.
- Christie M., Williams J.T., y North A., "Electrical Coupling Synchronizes Subthreshold Activity in Locus Coeruleus Neurons *in vitro* from Neonatal rats", 1989, *Journal of Neuroscience*, 9 (10): 3584-3589.
- Del Castillo y Katz, 1954, "Quantal components of the end-plate potential", *Journal of Physiol.* 124:560-573.
- Delcomyn F., 1998, "Foundations of Neurobiology" ed. 1a. USA, Ed. Services of New England. pags. 185-205.
- De Miguel F., 1998, "Biología funcional de los animales", 1ª ed., Ed. Siglo XXI, México, pag. 113-167.
- De Miguel F., Vargas-Caballero M., García-Pérez E., 2001, "Spread of Synaptic potential through electrical synapses in Retzius neurones of the leech", *J. of Exp. Biol.*, 204: 3241-3250.
- Dermietzel R., y Spray D., 1993, "Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?". *TINS*, 16(5): 186-192.
- Draguhn A., Traub R.D., Schmitz D. y Jefferys G. R., 1998, "Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus *in vitro*", *Nature*, 394: 189-192.
- Eckert R., 1963, "Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech", *J. Gen. Physiol.* 46: 573-587.
- Fatt P., y Katz B., 1952, "Spontaneous subthreshold potentials at the motor nerve endings", *J. Physiol.* 117: 109-128.
- Fricker D. y Miles R., 2000, "EPSP Amplification and the Precision of Spike Timing in Hippocampal Neurons", *Neuron*, 28: 559-569.
- Furshpan E.J., y Potter D. D., 1959, "Transmission at the giant motor synapses of the crayfish", *J. Physiol.*, 145: 289-325.
- Galarreta M. y Hestrin S., 1999, "A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses", *Nature*, 402: 72-75.
- Galarreta M. y Hestrin S., 2001, "Spike Transmisión and Synchrony Detection in Networks of GABAergic Interneurons", *Science*, 292:2295-2298.
- García E., Vargas-Caballero, Minzoni A., De-Miguel F., "Amplitude modulation of unitary synaptic potentials by electrical coupling", en preparación.
- García E., Vargas-Caballero, Minzoni A., De-Miguel F., 2003, "Determinants of Synaptic integration in electrically-coupled neurons", enviado a *Biophysical Journal*.

- Giaume L., Kado R.T., Korn H., 1987, "Voltage-clamp analysis of a crayfish rectifying synapse". *J. Physiol.* 386: 91-112.
- Gibson J. R., Beierlein M. y Connors B., 1999, "Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex", *Nature*, 402: 75-79.
- Gillesen T. y Alzheimer C., 1997, "Amplification of EPSPs by Low Ni^{2+} and Amiloride-Sensitive Ca^{2+} Channels in Apical Dendrites of Rat CA1 Pyramidal Neurons", *J. of Neurophysiol.*, 77: 1639-1643.
- Hagiwara S. y Morita H., 1962, "Electrotonic transmiisión between two nerve cells in leech ganglion". *J. Neurophysiol.*, 25: 721-731.
- Henderson L., 1983, "The role of 5-Hydroxytamine as a transmitter between identified leech neurons in culture", *J. Physiol.* 339: 309-324.
- Hodgkin, A. L. y Rushton W. A., 1946, "The electrical constants of the crustacean nerve fibre". *Proc. R. Soc. B.*, 133: 444-479.
- Katz B. y Miledi R., 1967, "A study of synaptic transmiisión in the absence of nerve impulses", *J. Physiol.* 192: 407-436.
- Katz B. y Miledi R., 1967, "The timing of Ca^{2+} actino during neuromuscular transmiisión", *J. Physiol.* 189: 535-544.
- Kuffler D.P., Nicholls J., y Drapeau P., 1987, "Transmitter localization and vesicle turnover at a Serotonergic synapse between identified leech neurons in culture". *J. Comp Neurol.*, 256: 516-526.
- Kettenmann H., 1993, "Practical Electrophysiological Methods", Ed. Wiley-Liss, ed. 2a. New York, pags. 449.
- Kiehn O. y Tresch M., 2002, "Gap Junctions and Motor Behavior", *Trends in Neurosciences*, 25 (2): 108-115.
- Koch C., 1999, *Biophysics of Computation*, Oxford Univ. Press, New York.
- König P., Andreas K. Engel y Singer W., 1996, "Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisted", *Trends Neurosci.* 19, 130-137.
- Lent C., 1973, "Retzius cells from segmental ganglia of 4 species of Lecches: comparative neuronal geometry", *Comp. Biochem. Physiol.*, 44 (A): 35-40.
- Magee J. y Johnston D., 1995, "Chracterization of single voltage-gated Na^{+} and Ca^{2+} channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons", *J. Physiology*, 487: 67-90.
- Magee J.; 1998, "Dendritic Hyperpolarization-Activated Currents modify integrative properties of Hippocampal CA1 pyramidal Neurons", *Journal of Neuroscience*, 18(19): 7613-7624.
- Magee J, 2000, "Dendritic Integration of Excitatory Synaptic Input", *Nature Neuroscience*, 1: 181-190.
- Magee J. y Cook E., 2000, "Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons", *Nature Neuroscience*, 3(9):895-903.
- Mann K. H., 1961. "Leeches (Hirudinea)", Pergamon Press, New York.
- Manson A. y Leake L. D., 1978, "Morphology of leech Retzius cells demostrated by intracellular injection of horseradish peroxidase", *Comp. Biochem. Physiol.*, 61 (A): 213-216.

- Manson A., Suderland A.J., Leake L. D., 1979, "Effects of leech Retzius cells on body wall muscles". *Comp. Biochem. Physiol.* 63 (C): 359-361.
- Mastrorarde D.N., 1983, "Interactions between ganglion cells in the cat retina". *J. of Neurophysiology.* 49. 350-365.
- Migliore M. y Sheperd G., 2002, "Emerging Rules for the Distributions of Active Dendritic Conductances". *Nature Neuroscience*, 3: 362-370.
- Muller K., Nicholls J., y Stent G., 1981, "Neurobiology of the leech", ed. 1a., NY. Ed. CSH. pags. 51-53. 79-111 y 150-153.
- Nicholls J., Martin R., Wallace B. y Fuchs P., 2001, "From neuron to Brain", 4a. edición, Ed. Sinauer. pags. 155-176, 199-225, 291-314.
- Oviedo-Orta E., y Evans H., 2002, "Gap junctions and connexins: potential contributors to the immunological synapse", *J. of Leukocyte Biology*, 72: 636-642.
- Petit D. L., y Augustine G.J. , 2000, "Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons", *J. Neurophysiol.* , 84(1): 28-38.
- Retzius G., 1891, *Biologische untersuchungen. Neue Folge II.* Sampson and Wallin, Stockholm.
- Sahley C. L., 1995, "What we have learned from the study of learning in the leech", *J. of Neurobiology.* 27(3), 434-445.
- Seamans J., Gorelova N. y Yang C., 1997, "Contributions of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels in the proximal versus Distal Dendrites to Synaptic Integration in Prefrontal Cortical Neurons", *J. of Neuroscience.* 17(15): 5936-5948.
- Schoppa N. E. y Westbrook G.C., 1999, " Regulation of Synaptic timing in the Olfactory bulb by an A-type Potassium Current", *Nature Neuroscience*, 2(12): 1106-1113.
- Sheperd G., 1990, "The Synaptic Organization of the Brain", ed. 2a, NY, Oxford University Press. pags. 430-473.
- Smith P.A., Sunderland A.J., Leake L.D., Walker R. J., " Cobalt staining and electrophysiological studies of Retzius cells in the leech *Hirudo medicinalis* ", *Comp. Biochem. Physiol.*, 51(A): 655-661.
- Spruston N, 2000, "Distal Synapses raises their voices", *Nature Neuroscience.* 3(9): 849-851.
- Stuart G. y Sakmann B., 1995, "Amplification of EPSPs by Axosomatic Sodium Channels in Neocortical Pyramidal Neurons", *Neuron*, 15: 1065-1076.
- Szczupak L. y Kristan W., 1995, " Widespread mechanosensory activation of the Serotonergic System of the medicinal leech", *J. of Neurophysiology*, 74: 2614-2624.
- Tamás G., Buhl E.H., Lörincz A., y Somogyi P., 2000, "Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons" , *Nature Neuroscience*, 3(4): 366-371.
- Tamás G., Szabadics J., y Somogyi P. 2002, "Cell Type- and Subcellular Position – Dependent Summation of Unitary Postsynaptic Potentials in Neocortical Neurons", *Journal of Neuroscience.* 22(3): 740-747.
- Tructa C., Méndez B. Y De Miguel F., 2003, "Somatic exocytosis of Serotonin mediated by the L-type Calcium channels in cultured leech neurons", *J. Physiol.* 547(2): 405-416.

Willard A., 1981, "Effects of Serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech", J. of Neuroscience, 1(9): 936-944.

Williams R. y Stuar G., 2000, " Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I_h in Neocortical Pyramidal Neurons", J. Neurophysiol. , 83: 3177-3182.

Velázquez-Ulloa N., Blackshaw S. E., Szczupak L., Trueta C., García E., y De Miguel F. F., 2003.
" Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech", J. Neurobiol., 54: 604-617.

Yang J. y Chapman M., 1983, "Frequency domain analysis of electrotonic coupling between leech Retzius cells", Biophys. J., 44: 91-99.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN