



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

**CARACTERIZACIÓN DE CIRCUITOS SENSORIALES EN UN MODELO ANIMAL ANÉLIDO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:

**DRA. ALEJANDRA GONZÁLEZ VELIZ**

TUTORES:

**DR. JAVIER PÉREZ ORIVE**

**DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

COMITÉ TUTORAL:

**DR. PAUL CARRILLO MORA**

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

**DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para mi formación académica.

A mi tutor, Dr. Javier Pérez Orive, gracias por hacerme parte de este gran proyecto, por sus conocimientos y enseñanzas, y por su paciencia.

Al equipo de laboratorio, especialmente a Xíhuitl Herrera Jiménez por su colaboración para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Citlali Trueta Segovia, por el apoyo tan importante e invaluable que nos ha brindado para la realización de este proyecto de investigación y por compartimos sus conocimientos.

Al Dr. Paul Carrillo Mora quien, junto con la Dra. Citlali, formó parte de mi comité tutorial, muchas gracias por sus comentarios y observaciones.

A mi familia: a mi esposo por su apoyo incondicional, a mi hermana porque nunca me permite rendirme y especialmente a mi padre y mi madre, porque todo el camino que he andado hasta aquí es por tratar de seguir sus pasos.

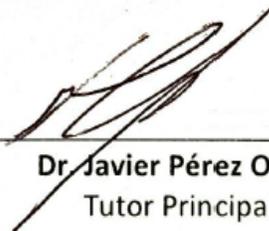
A todos los animales de laboratorio que permiten contribuir de manera importante a los avances científicos, y que son los verdaderos protagonistas de cada uno de estos proyectos.

**Caracterización de circuitos sensoriales en un modelo animal anélido**



---

**Dra. Alejandra González Veliz**  
Alumna de Maestría en Ciencias Médicas



---

**Dr. Javier Pérez Orive**  
Tutor Principal



---

**Dr. Alberto Hidalgo Bravo**  
Bitutor y Responsable de la Entidad Académica

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
	<b>a. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
	<b>b. Justificación</b>	<b>13</b>
<b>II.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
	<b>a. Objetivo Principal</b>	<b>13</b>
	<b>b. Objetivos Específicos</b>	<b>13</b>
<b>III.</b>	<b>Material y Métodos</b>	<b>14</b>
	<b>a. Modelo de estudio</b>	<b>14</b>
	<b>b. Descripción de variables</b>	<b>15</b>
	<b>c. Registros de electrofisiología</b>	<b>16</b>
	<b>d. Análisis de datos</b>	<b>17</b>
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	<b>19</b>
<b>V.</b>	<b>Discusión</b>	<b>33</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>VII.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>37</b>

## I. Introducción

### a) Marco Teórico

#### *Los modelos animales en el estudio de las neurociencias*

Los organismos obtienen información de su entorno a través de los órganos sensoriales, los cuales envían esta información al sistema nervioso central que, al procesarla, permite que el individuo reaccione adecuadamente según el ambiente en el que se encuentre. Un área clave de las neurociencias es entender cómo es que la información sensorial es procesada e interpretada por el sistema nervioso, y, específicamente, cuáles aspectos de la actividad neuronal son importantes para esta representación sensorial y cuáles están vinculados a elecciones de comportamiento (*Chong & Rinberg, 2018; Kriegeskorte & Diedrichsen, 2019*). A lo largo de las últimas décadas se ha tratado de comprender el código neuronal que representa la información sensorial, y, si bien algunos neurocientíficos han realizado avances, aún falta comprender de manera completa ciertos aspectos de la actividad neuronal, por lo que esta área de investigación sigue siendo sumamente relevante en la actualidad.

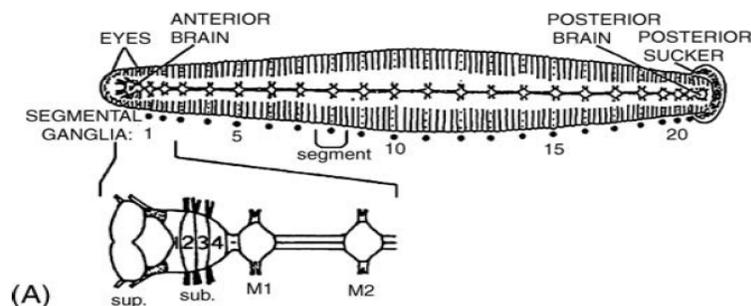
Gran parte del trabajo que se ha realizado sobre sistemas sensoriales ha sido utilizando modelos animales de mamíferos. En éstos, existen poblaciones neuronales grandes, distribuidas en varias áreas cerebrales diferentes, que pueden llegar a estar lejos de los órganos sensoriales en la periferia. Esto representa un reto para los investigadores, ya que aumenta la dificultad de comprender aspectos específicos de la actividad cerebral, así como de tratar de tener un cuadro completo de la información sensorial en el cerebro. Además, plantea desafíos sustanciales para identificar la actividad neuronal específica que vincula causalmente la entrada sensorial con la percepción y el comportamiento. En años previos se ha demostrado que estos retos se han superado al estudiar modelos animales más pequeños, como los invertebrados. Ejemplo de ello es el trabajo de investigación realizado en moluscos, por ejemplo el calamar, utilizado para comprender los mecanismos biofísicos que generan potenciales de acción (*Hodgkin & Huxley, 1952*) y la babosa marina, *Aplysia*, para la plasticidad sináptica (*Hawkins et al., 1983*). Estos

aprendizajes han demostrado la utilidad de modelos animales más pequeños, como son los invertebrados.

El presente estudio utilizó un modelo animal invertebrado que ha recibido una atención más limitada que los modelos animales mamíferos: la sanguijuela, la cual forma parte del filo de los anélidos, y, de manera más específica, se estudió la especie *Haementeria officinalis* (sanguijuela mexicana), una de las especies prevalentes en nuestro país.

### Anatomía de la sanguijuela

La sanguijuela es un anélido segmentado semiacuático que en las últimas décadas ha servido como modelo animal en el estudio de las neurociencias (Wagenaar, 2015; Kristan et al., 2005); la especie más estudiada y de la que mayor conocimiento se tiene de su anatomía es *Hirudo medicinalis*. Tiene un sistema nervioso pequeño, compuesto por un ganglio cefálico, un cordón nervioso ventral que une 21 ganglios segmentarios, y un ganglio caudal (Figura 1). Cada uno de los ganglios del segmento se encuentra compuesto por alrededor de 400 neuronas, que han sido identificadas y numeradas, con los somas organizados como un caparazón alrededor de un neuropilo central. Una de las ventajas que ofrece este modelo animal es el tamaño relativamente grande de sus neuronas, entre 15-70  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que permite realizar registros de electrofisiología intracelular de manera sencilla (Wagenaar, 2015).



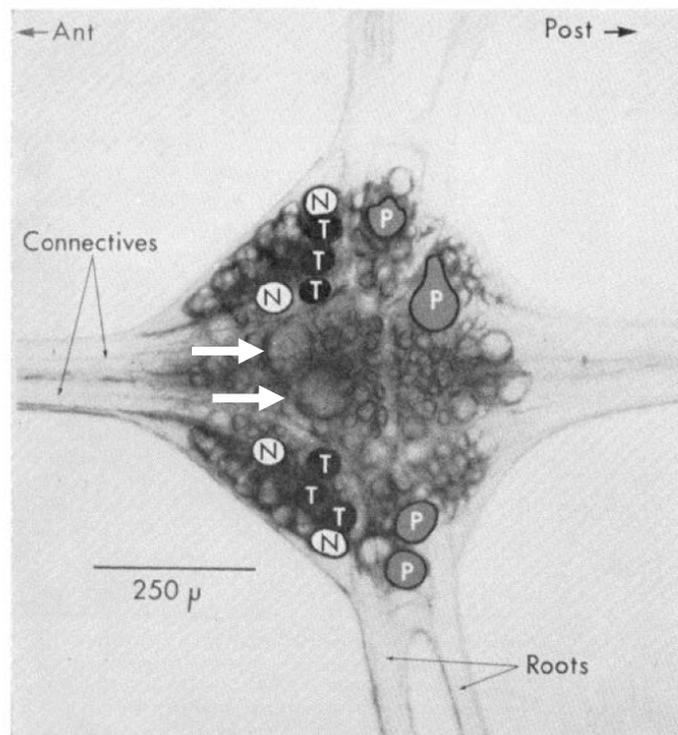
**Figura 1.** Diagrama esquemático de la anatomía de *Hirudo medicinalis*. En la imagen superior se observa el sistema nervioso a lo largo de todo el cuerpo de la sanguijuela. Se describe 1 ganglio cefálico, 21 ganglios del segmento y 1 ganglio caudal. En la imagen inferior se observa un esquema del ganglio cefálico, conformado por el ganglio supraesofágico y el subesofágico, que a su vez se conforma por 4 ganglios fusionados.

Tomado de Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005).

### *Circuitos sensoriales en la sanguijuela*

Se han desarrollado una variedad de preparaciones semi-intactas en las que las neuronas están disponibles para el registro mientras que se evalúa la conducta del animal de manera simultánea. Con ello, se han proporcionado resultados muy interesantes en el área de la neurociencia mecanosensorial y motora.

En los ganglios del segmento se han identificado mecanorreceptores que responden a diferentes estímulos aplicados en la superficie de la piel de la sanguijuela: las células T responden a estímulos táctiles, las células P a estímulos de presión y las células N a estímulos nocivos (Nicholls & Baylor, 1968) (**Figura 2**). Se ha descrito que existen células en el ganglio cefálico subesofágico que comparten características similares a las descritas en los ganglios del segmento en cuanto al sistema mecanosensorial (Yau, 1976).



**Figura 2.** Microfotografía de un ganglio del segmento. Se aprecia la distribución de las neuronas que conforman el ganglio. Se destacan las neuronas mecanosensoriales (T, P, N). Las flechas blancas señalan las células Retzius.

Tomado de Nicholls & Baylor (1968).

En términos de fotocepción, se sabe que hay fotorreceptores en 5 pares de ojos dispuestos en dos líneas longitudinales en la superficie dorsal de la cabeza y 7 pares de sensillas distribuidas de manera circunferencial en cada uno de los 21 segmentos del cuerpo (Kretz *et al.*, 1976). Se han identificado varias interneuronas fotosensibles en los ganglios segmentarios y algunas de ellas han comenzado a estudiarse electrofisiológicamente (Stowasser *et al.*, 2019).

Dentro de las caracterizaciones que se han hecho acerca de la anatomía de la sanguijuela *Hirudo*, se ha descrito que el ganglio cefálico se compone de dos partes: el ganglio supraesofágico y el ganglio subesofágico. El ganglio cefálico subesofágico está compuesto por 4 ganglios fusionados. Cada uno de estos ganglios que componen el ganglio subesofágico mantiene ciertas características de los ganglios segmentarios, como la organización de los paquetes celulares y la presencia de células gigantes localizadas en el sector central de cada ganglio, las células Retzius, descritas en 1891 por el anatomista sueco Gustaf Retzius (Grant, 1999; Lent, 1977). Por otro lado, el ganglio supraesofágico, aunque de apariencia diferente, se encuentra formado por 2 ganglios fusionados (Yau, 1976). En la región más posterior de la sanguijuela se encuentra el ganglio caudal, el cual se describe que se encuentra conformado por 7 ganglios fusionados (Lent & Dickinson, 1988).

### *Conducta de alimentación*

El comportamiento de la alimentación en la sanguijuela se ha explorado en las últimas tres décadas (Lent & Dickinson, 1988; Wilson *et al.*, 1996). Como se describió previamente, las sanguijuelas son anélidos segmentados que tienen ventosas a los extremos de sus cuerpos. En su hábitat, las sanguijuelas hambrientas tienden a tener un nado espontáneo cerca de la superficie del agua, alertas a cualquier movimiento causado por una potencial presa (especialmente mamíferos). Al hacer contacto con algún objeto, la sanguijuela detiene el nado, explora y se arrastra hacia el objeto y, al estar en contacto con una región más tibia que la del ambiente en donde se encuentra, inicia el movimiento de fijación, mordedura y extracción de sangre de su presa

(Lent & Dickinson, 1988). Existen especies, como *Hirudo*, que pertenece al orden Arhynchobdellida, que se caracterizan por la presencia de mandíbulas; por otro lado, *Haementeria*, pertenece al orden Rynchobdellida, que tiene proboscis.

Posterior a la mordedura la faringe de la sanguijuela se contrae de manera rítmica y, tanto la frecuencia de succión, como la de peristalsis, disminuye durante la fase de consumo; además durante la fase de ingestión, la respuesta a estímulos nocivos disminuye (Wilson et al., 1996).

Una vez que la sanguijuela se sacia, existe una distensión de las paredes del cuerpo, lo que inhibe los impulsos de las células, disminuye los niveles de serotonina y detiene el comportamiento de alimentación. En este caso las sanguijuelas tienden a disminuir el nado espontáneo y esconderse entre las grietas de rocas y troncos que pudieran haber en aguas más profundas. Puede pasar hasta un año en que la sanguijuela repita el proceso de búsqueda de alimento.

En las sanguijuelas, los neurotransmisores liberados por las neuronas son semejantes a los encontrados en sistemas nerviosos de mamíferos. Entre ellos se encuentran el glutamato, la acetilcolina, el ácido gamma aminobutírico (GABA), octopamina, dopamina y serotonina (Lent & Dickinson, 1988). La serotonina tiene una función importante en las neuronas de los ganglios de la sanguijuela, específicamente en las células Retzius (Grant, 1999; Lent, 1977). Cada uno de los ganglios del segmento alberga un par de células Retzius cuyos axones entran por medio de las raíces laterales y sus ramificaciones proyectan hacia órganos periféricos del cuerpo (Lent, 1977). Las células contienen enzimas que sintetizan serotonina y las membranas de cada una las acumula de manera activa.

Se ha descrito que la serotonina tiene un papel importante en la conducta de alimentación de la sanguijuela. Experimentos realizados por Lent y Dickinson (1988) mostraron que al colocar una sanguijuela en un baño de serotonina, las acciones asociadas a la alimentación (como el nado, la salivación y la frecuencia de mordedura) aumentaban de manera considerable. Uno de los estímulos que desencadenan la liberación de serotonina es la exposición del labio de la sanguijuela al calor, ya que se observa que este estímulo provoca la excitación de las células Retzius, que responden con impulsos a frecuencias altas. También se describió que, al inyectar a

las sanguijuelas una neurotoxina (5,7-dihidroxitriptamina), que depleta los niveles de serotonina de las células Retzius, mas no es tóxica, ya que en las células se continúa observando disparos de potenciales de acción; sin embargo, al estar presente esta toxina se encontró que las sanguijuelas no iniciaban la conducta de alimentación al estar en contacto con un medio cálido y, por el contrario, se comportaban como aquellas sanguijuelas no hambrientas.

Al regresar a las sanguijuelas al baño de serotonina se observó que al exponer el labio a una temperatura alta, la conducta de alimentación que implica movimiento de mandíbulas, salivación y la succión, se presentaba. Estos experimentos muestran el rol que tiene la serotonina en el comportamiento de alimentación.

Los resultados obtenidos de los estudios realizados por Wilson, Kristan y Kleinhaus (1996) en los que se describió el comportamiento durante la fase de alimentación, y, además se realizaron registros de electrofisiología en las células Retzius, muestran que, la actividad de estas células serotninérgicas aumenta cuando se inicia el proceso de alimentación, disminuye durante la fase de ingestión, lo cual sugiere que la serotonina tendría un papel importante al iniciar la conducta de alimentación, no así al iniciar el proceso de ingestión. Si bien, el rol de la serotonina ya se había descrito en estudios previos, basado en los resultados de este estudio, éste podría tener otras implicaciones en el comportamiento de alimentación.

#### *Quimiocepción en la sanguijuela*

Se sabe relativamente poco acerca de la quimiocepción en la sanguijuela. Se ha descrito que la detección sensorial de sangre se encuentra en la región más anterior del labio dorsal, la cual se forma por líneas de cientos de estructuras ciliadas, conocidas como sensillas, compuestas por neuronas bipolares cuyos axones se dirigen hacia el ganglio cefálico a través de ocho nervios quimiosensoriales. Las sensillas miden entre 75-100  $\mu\text{m}$  y cada una contiene de 200 a 300 neuronas aferentes (*Elliott, 1986; Li et al., 2001*).

Elliott (1986) describe que al extirpar de manera quirúrgica la región anterior que corresponde al labio de la sanguijuela, pierde habilidad para detectar sangre y posteriormente iniciar el proceso de alimentación.

Los estudios conductuales han identificado estímulos atractivos y aversivos (*Kornreich & Kleinhaus, 1999*).

En los experimentos realizados acerca del comportamiento de la sanguijuela ante estímulos quimiosensoriales, Elliott (1986) describe que la aplicación de una solución con NaCl 150 mM + Arginina 1mM es necesaria y suficiente para desencadenar el proceso de alimentación, descrito como exploración, fijación e ingestión. En los estudios de Kornreich y Kleinhaus (1999) demostraron que con estos estímulos no sólo se inició el proceso de alimentación, sino que se completó la fase de ingestión. Estos experimentos se realizaron con Quinina y Denatonio, donde se describe que estos estímulos no desencadenan el proceso de alimentación y que inducen un comportamiento de aversión. También se describió que estímulos térmicos pueden activar el proceso de alimentación (*Groome et al., 1995*).

Los resultados obtenidos por Zhang (2000) en donde se estudian los efectos de los estímulos químicos y térmicos sobre las células Retzius y los nervios cefálicos, muestran que la actividad eléctrica correspondiente a la transmisión de señales de los quimioceptores periféricos encontrados en el labio hacia el ganglio cefálico se puede detectar mediante registros de electrofisiología en los nervios cefálicos. Se observó también que la aplicación de NaCl 150 mM y Arginina 1 mM aumentan la frecuencia de disparo durante el primer minuto de exposición.

Wilson *et al.* (1996) describen que en la fase apetitiva en la conducta de alimentación en *Hirudo* se correlaciona con un aumento en la frecuencia de disparo en las células Retzius. Se supone que estos hallazgos obtenidos en los ganglios del segmento reflejan la actividad en las células homólogas que se encuentran más anterior a donde se realizaron los registros. Estos resultados se correlacionan con los reportados por Groome *et al.* (1995), quienes describen que la exposición a NaCl + Arginina tiene un efecto de activación sobre los nervios cefálicos, el cual también se

observó en las células Retzius de los ganglios del segmento, esto no es observado al aplicar sólo el estímulo Arginina.

En los experimentos realizados por Li (2001), en donde se registra la actividad de los nervios cefálicos al exponer el labio a estímulos quimiosensoriales, describe que al aplicar una solución con NaCl 150 mM + Arginina 1mM aumentaba la frecuencia de disparo en los nervios cefálicos; sin embargo, al cambiar la solución a una con Quinina 3 mM la actividad neuronal disminuía por debajo de niveles basales.

Como puede verse, los sistemas sensoriales en la sanguijuela se han investigado poco, y la mayoría de sus funciones y mecanismos aún no se han descrito.

### **a) Justificación**

Hasta donde sabemos, en la literatura no existe información acerca de la anatomía del ganglio cefálico de la sanguijuela de la especie *Haementeria*, y aportar datos es necesario para el uso de este modelo animal, el cual es uno de los más prevalentes en nuestro país.

En cuanto a la actividad electrofisiológica a la aplicación de los estímulos quimiosensoriales, no existen estudios en el ganglio cefálico, por lo que la información que se obtenga podría dar una orientación para estudios futuros que será necesaria para la comprensión del sistema quimiosensorial en la sanguijuela. Por otro lado, se han reportado pocos estudios con estimulación quimiosensorial en las células de Retzius; esto es importante tanto para entender el sistema quimiosensorial como para entender el sistema neuronal que dirige la conducta de alimentación.

## **II. Objetivos**

### **a) Principal**

- Describir la actividad electrofisiológica que presentan neuronas del sistema quimiosensorial de la sanguijuela, aportando información sobre un componente importante del control de la alimentación mediante estímulos quimiosensoriales.

### **b) Específicos**

- Describir la actividad intracelular de las células Retzius de los ganglios del segmento y caracterizar sus respuestas a estímulos quimiosensoriales.
- Describir la actividad extracelular en el ganglio cefálico y determinar las áreas del ganglio en donde se observa un porcentaje de respuesta mayor al exponer el labio a estímulos quimiosensoriales.
- Descripción de hallazgos relacionados con la anatomía del ganglio cefálico en la sanguijuela *Haementeria officinalis* y sus diferencias y similitudes con la especie *Hirudo*.

### III. Materiales y métodos

Se trata de un estudio descriptivo de investigación básica.

#### *Modelo de estudio*

- Cuidado de Animales:
  - Las sanguijuelas adultas (*Haementeria officinalis*) se mantuvieron en tanques de 40-80 individuos, con un peso de 0.2 a 1.5 g, llenos con 2 litros de agua potable (E-pura, México) y un fondo de grava.
  
- Disección del modelo animal:
  - Preparación animal: Las sanguijuelas se anestesiaron durante 30 minutos dentro de Etanol al 70% a una temperatura de 4°C. Bajo un microscopio estereoscópico de disección, las sanguijuelas se inmovilizaron con la cara ventral hacia arriba en una placa de Petri de 60 mm, con una capa de silicón transparente de 3 mm, y con solución fisiológica que contiene 115.0 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10.0 mM cristales Tris maleato, pH 7.4 (**Figura 3a**).
  - Se fijaron las sanguijuelas con alfileres de insectos con el lado ventral hacia arriba lo cual permitió el acceso al ganglio cefálico compuesto por el ganglio supraesofágico y el ganglio subesofágico (**Figura 3b**).
  - Para la caracterización de la anatomía, se aplicó un colorante (Carbocianina DiD) en los nervios conectivos, posteriormente se incubó en medio de cultivo L15 adicionado con suero fetal bovino y .
  - Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 1% ó al 4% o glutaraldehído al 2.5% y posteriormente se observaron con un microscopio de luz, de epifluorescencia y/o microscopio confocal.
  - Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager 2) y confocal (Zeiss LSM 510 META y Zeiss LSM 900).

## Descripción de estímulos químicos

### **Cloruro de sodio (NaCl):**

- Compuesto químico iónico, formado por un catión sodio (Na<sup>+</sup>) y un cloruro (Cl<sup>-</sup>), conocido como sal común. Es una sustancia ordinariamente blanca, cristalina, de sabor salado, muy soluble en agua. El NaCl se ha utilizado como estímulo químico palatable que induce la conducta de ingesta. Aplicado en el labio dorsal de la sanguijuela en concentraciones de 150 mM aumenta la actividad neuronal en los nervios cefálicos aferentes (*Li et al., 2001*).

### **Arginina (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>):**

- Es un aminoácido que forma parte de las proteínas, nombrado ácido 2-amino-5-(diaminometilidenoamino) pentanoico. La arginina a concentración de 1 mM, se evaluó como una solución apetitosa que provoca la ingestión en la sanguijuela (*Elliott, 1986; Kornreich, Kleinhaus, 1999*) y aumenta la actividad neuronal en los nervios cefálicos aferentes (*Li et al., 2001*).

### **Quinina (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):**

- Compuesto químico alcaloide, con sabor amargo. La exposición de este estímulo mostró un comportamiento aversivo a la conducta de alimentación (*Kornreich, Kleinhaus, 1999*) y reducción de la actividad neural de los nervios aferentes (*Li et al., 2001*). Para la realización de los experimentos se utilizó una concentración de 1 mM.

### **Denatonio (C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>):**

- Compuesto químico amargo, nombrado Benzoato de fenilmetil-[2- [(2,6-dimetilfenil)amino]- 2-oxoetil]-dietilamonio. Se ha utilizado como estímulo aversivo de alimentación en la sanguijuela (*Kornreich, Kleinhaus, 1999*), mostrando una reducción de la actividad neural en los nervios aferentes durante la estimulación con este compuesto

(Kornreich, Kleinhaus, 1999). Para la realización de los experimentos se utilizó una concentración de 0.3 mM.

- Posterior a cada aplicación de estímulo en el labio dorsal, se realizaron 3 lavados con agua de garrafón con la intención de eliminar cualquier rastro del estímulo previo, y que esto no interfiera con la respuesta del estímulo siguiente a aplicar. Estos lavados también tendrían la función de actuar como controles negativos, ya que pueden fungir como estímulos mecanosensoriales, sin el componente quimiosensorial.

#### **Carbocianina (DiD):**

- Colorante lipofílico ampliamente utilizado como trazador neuronal anterógrado y retrógrado en tejido vivo o fijado. La velocidad de difusión en célula fijada es aprox. 0.2-0.6 mm por día. Es un colorante fluorescente al ser excitado con una luz con longitud de onda. Se aplicaron cristales directamente en los nervios cefálicos o del segmento. Se identificó la presencia o ausencia del colorante por medio de la exposición de la muestra en un rango de excitación de 644-665 nm para su visualización. El tiempo de incubación varió entre cada muestra desde 8 hasta 72 horas.

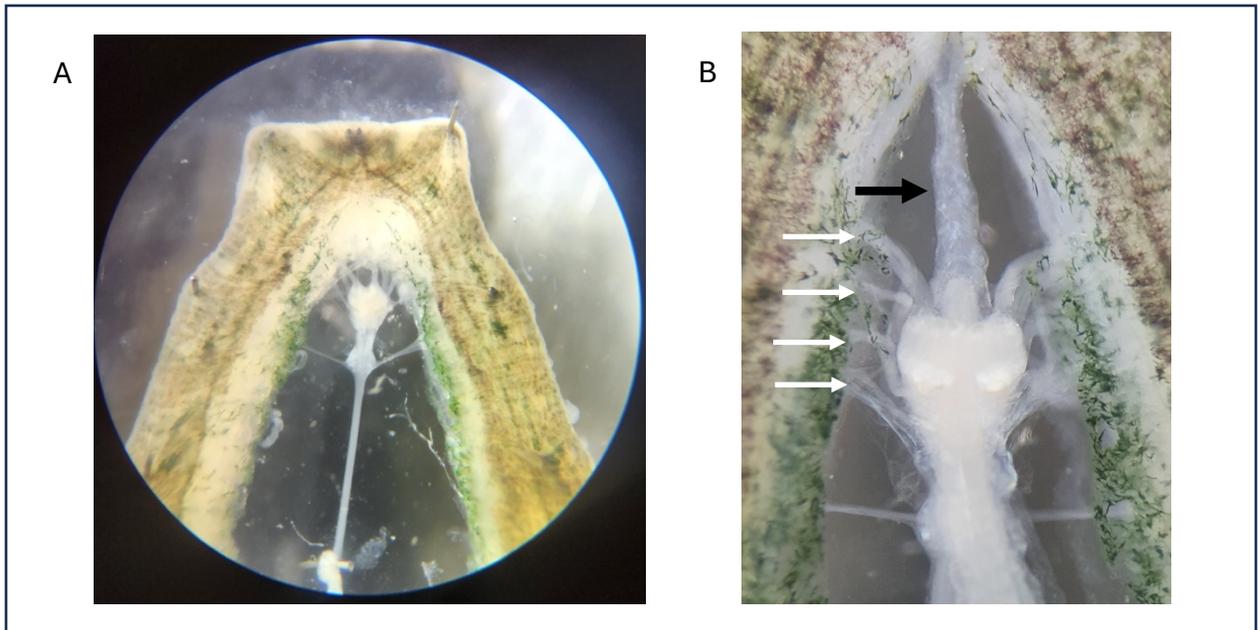
#### *Registros de electrofisiología*

- Para la estimulación quimiosensorial se siguió el mismo protocolo de disección, una vez que se expuso el ganglio cefálico, se eliminó la mayor parte de la masa muscular alrededor y se expusieron los nervios cefálicos; en algunas muestras se retiró la cápsula de glia que se encuentra rodeando el ganglio.
- Se colocó un puente de vaselina de modo que el labio quedó expuesto de un lado a los estímulos químicos, mientras que el resto del cuerpo de la sanguijuela se encontró con solución Ringer (**Figura 4**).

- Los estímulos químicos incluyen cloruro de sodio y arginina, los cuales activan el comportamiento de alimentación, así como sustancias amargas que se relacionan con un comportamiento aversivo, como lo son el denatonio y la quinina.
- El estímulo de prueba se aplicó por medio de una pipeta de transferencia, y el labio se mantendrá expuesto al mismo durante 30-60 segundos.
- Posteriormente se realizaron lavados del estímulo con agua de garrafón; lo previo a realizar en 3 ocasiones.
- Los registros electrofisiológicos extracelulares se realizaron por medio de microelectrodos de cristal de borosilicato llenos de Cloruro de Potasio 3 M con una resistencia de entre 3 y 10 MOhms. Las señales se registraron mediante un amplificador para registro extracelular.
- En el caso de los registros intracelulares, éstos se realizaron por medio de microelectrodos de cristal de borosilicato llenos de Acetato de Potasio 1 M, con una resistencia de entre 100-200 MOhms. Se utilizó un amplificador Axoclamp-2B (Axon Instruments, Union City, CA) para el registro de las señales.
- Los datos se adquirieron 10 segundos antes de la colocación del estímulo, 30 segundos después de haber aplicado el mismo, durante los lavados y por lo menos 20 segundos después de haber realizado el último lavado.

*Análisis de datos.*

- Para la captura de los registros extracelulares se utilizó el programa LabScribe (iWorx); para el análisis de datos, el cual se realizó en colaboración con Xíhuitl Herrera Jiménez, se utilizó el programa Matlab (MathWorks), se utilizó un filtro pasabandas de 100 a 3000 Hz para la detección de potenciales de acción. Con este programa se realizó la clasificación de espigas, comentado más adelante en la sección de Resultados. En los registros intracelulares se utilizó el paquete de software pClamp (Molecular Devices). Para la captura de registros se utilizó el programa Clampex, mientras que para el análisis de datos simplificado se utilizó el programa Clampfit.



**Figura 3.** Microfotografías de las preparaciones experimentales realizadas de la sanguijuela. En la imagen A se observa que, en la parte anterior de la sanguijuela, incluida parte de la cabeza, se realizó un corte longitudinal tanto ventral como dorsal, de modo que se expuso el ganglio cefálico y el cordón central que une los ganglios del segmento. En la imagen B se observa un acercamiento del ganglio cefálico. Se visualizan los nervios cefálicos (señalados por flechas blancas), así como los sectores supraesofágico y subesofágico. La flecha negra señala la proboscis, que atraviesa el ganglio cefálico.



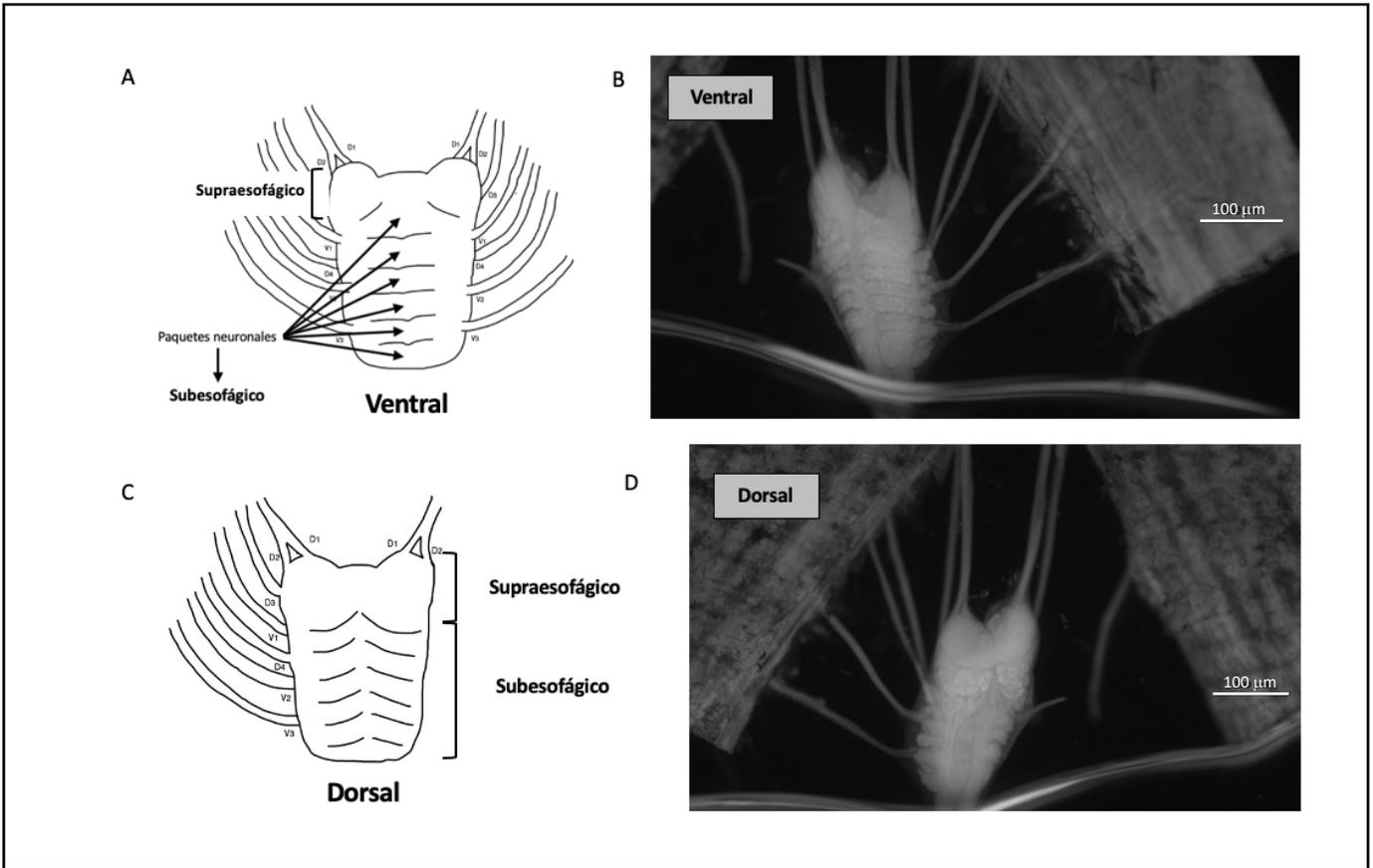
**Figura 4.** Microfotografía que muestra la disposición del puente de vaselina que separa el labio de la sanguijuela del cuerpo, del cual se conservaron los primeros tres ganglios del segmento. El área circular señala el sitio en donde se aplicaron los estímulos quimiosensoriales. Del otro lado del puente se encuentra el resto del cuerpo de la sanguijuela en solución Ringer.

## IV. Resultados

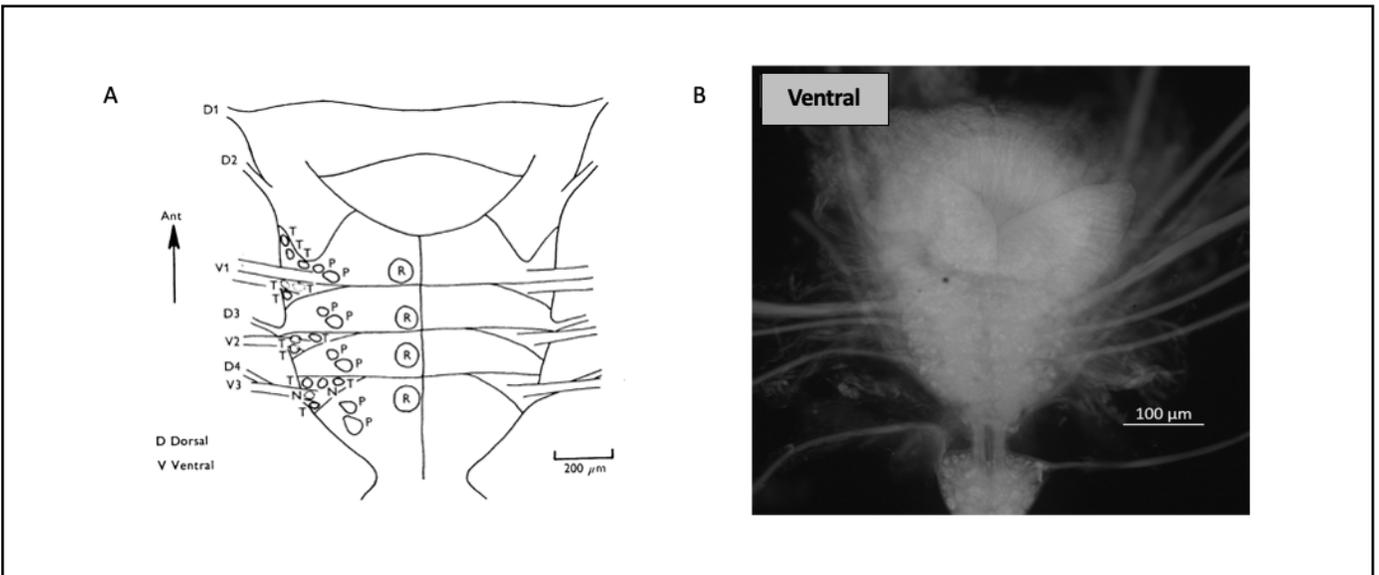
### *Anatomía*

Con los resultados de este trabajo, encontramos diferencias y similitudes en el ganglio cefálico de las especies *Hirudo medicinalis* y *Haementeria officinalis* (**Figuras 5 y 6**).

- Similitudes:
  - Existen 7 pares de nervios cefálicos, los cuales emergen tanto del lado ventral así como del lado dorsal, y se dirigen hacia la parte anterior del animal.
  - En ambas especies se distinguen claramente el ganglio supra y el subesofágico.
  
- Diferencias:
  - En la especie *Hirudo medicinalis* se describe la presencia de un espacio que separa los ganglios supra y subesofágico y por donde pasa el esófago. Sin embargo, este espacio no se visualiza en las disecciones de *Haementeria officinalis*. No obstante, dicho espacio sí está presente en esta especie, debido a que la proboscis atraviesa el ganglio cefálico a través de un orificio que divide las regiones supra y subesofágico, pero al retirar la proboscis dicho espacio se colapsa impidiendo su visualización (**Figura 5**).
  - En *Hirudo* se ha descrito la presencia de 4 paquetes neuronales en el ganglio cefálico subesofágico, considerados como ganglios fusionados (Yau, 1976; Peterson, 1985; Daberkow, 1996) (**Figura 6**). En *Haementeria* se identificaron entre 6 y 7 paquetes neuronales en el ganglio cefálico subesofágico, esto se puede observar con mayor detalle en la **Figura 7A**. En algunos de los paquetes neuronales se puede observar lo que aparentan ser las células Retzius, esto nos hace creer que el ganglio subesofágico en esta especie, podría estar conformado por ganglios del segmento fusionados, ya que el parecido con los ganglios del segmento (**Figura 7B**) es notable.



**Figura 5.** Ganglio céfalico de la especie *Haementeria officinalis*. En la imagen A se observa un esquema del lado ventral y en la imagen C un esquema del lado dorsal. Existen 7 pares de nervios céfalicos los cuales emergen tanto del lado ventral como del dorsal, y de acuerdo con el sitio de emergencia es su nomenclatura. En las imágenes B y D se observa una microfotografía de epifluorescencia con filtro rojo B/N que muestran el lado ventral y el lado dorsal respectivamente. Se aprecia la emergencia de los nervios céfalicos, los cuales se dirigen hacia la parte anterior de la sanguijuela. (Microfotografías tomadas en colaboración con Xihuitl Jiménez Herrera).

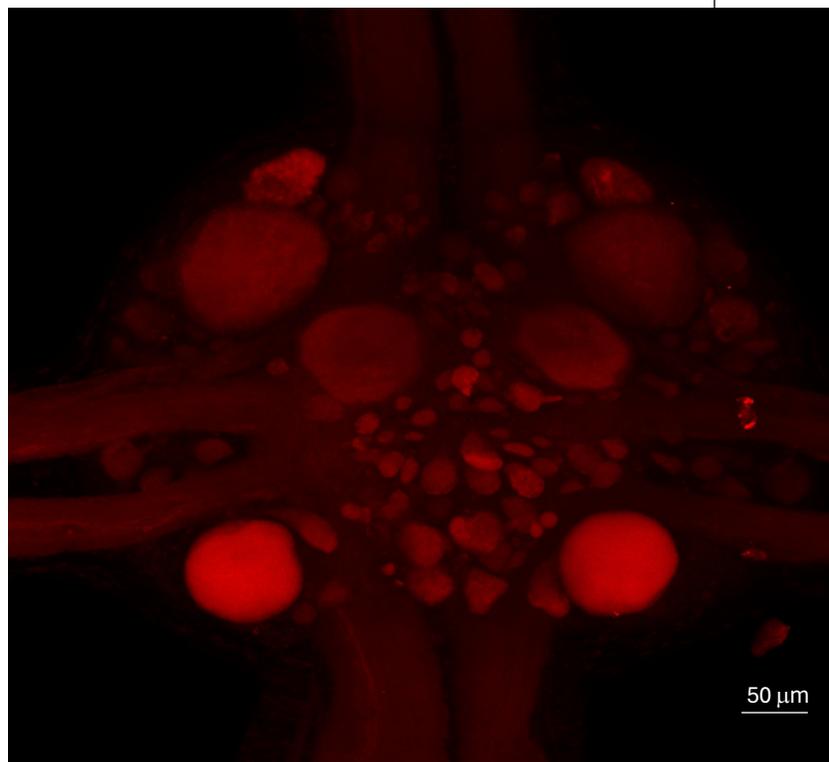


**Figura 6.** Ganglio céfalico de la especie *Hirudo medicinalis*. En la imagen A se observa un esquema del lado ventral. En la imagen B se observa una microfotografía de epifluorescencia con filtro rojo B/N que muestra el lado ventral. En ambas imágenes se observa el orificio descrito en esta especie. Esquema tomado de Yau K. (1976, J Physiol). (Microfotografía tomada en colaboración con Xihuitl Jiménez Herrera).

A



B

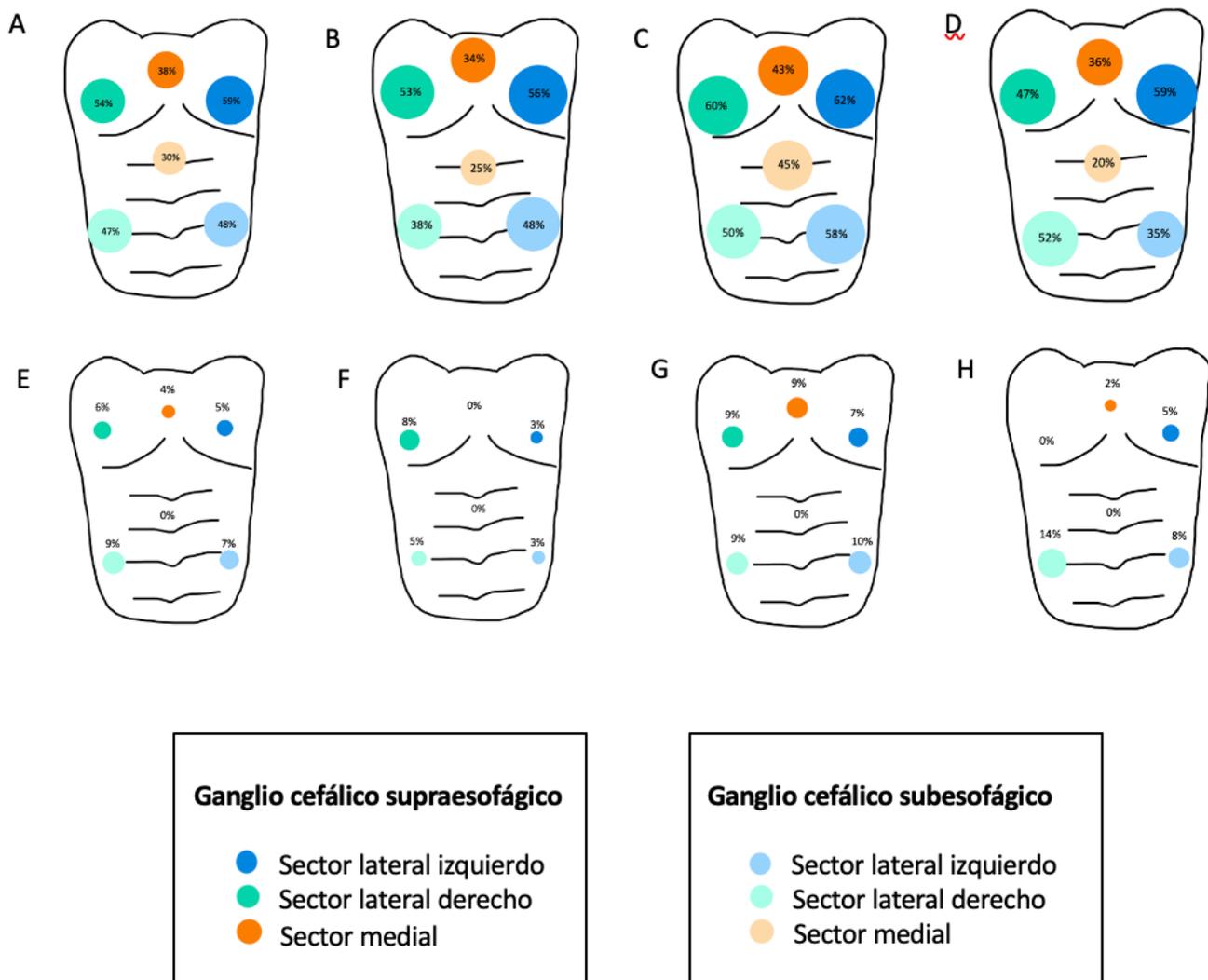


**Figura 7.** Microfotografías tomadas del ganglio cefálico (ventral) (A) y de un ganglio del segmento (B) con microscopía confocal. Se aplicó Carbocianina DiD a una concentración de 0.5 uL en el nervio cefálico D2 derecho del ganglio cefálico, y en la raíz nerviosa derecha del ganglio del segmento. El tiempo de incubación fue de 40 horas. En el ganglio cefálico destaca la separación de los paquetes neuronales, así como las neuronas que conforman cada uno. Las flechas blancas señalan lo que aparentan ser las células Retzius. Nótese el parecido que existe entre cada paquete neuronal con el ganglio del segmento observado en la parte inferior.

*(Microfotografía tomada en colaboración con M. en C. Lenin Tamay de Dios).*

## *Electrofisiología Extracelular*

- Se realizó un total de 683 registros, obtenidos de 44 sanguijuelas, al exponer el labio de la sanguijuela a diferentes estímulos quimiosensoriales.
- Los registros se realizaron en diferentes sectores del ganglio cefálico, los cuales se enumeran a continuación:
  - I. Ganglio Supraesofágico:
    1. Sector Medial.
    2. Sector Lateral Derecho.
    3. Sector Lateral Izquierdo.
  - II. Ganglio Subesofágico:
    1. Sector Medial.
    2. Sector Lateral Derecho.
    3. Sector Lateral Izquierdo.
- En colaboración con Xíhuitl Jiménez Herrera se realizó una clasificación de acuerdo con el número de espigas por segundo encontradas: **pocas** (<5 espigas), **algunas** (5-10 espigas), **varias** (10-20 espigas) y **muchas** (>20 espigas).
- Es importante mencionar que el análisis presentado en esta sección fue hecho previo a una formal clasificación de las espigas (*spike sorting*), lo cual constituye un proyecto separado. Por lo tanto estos resultados pueden ser revisados o ajustados en base a dicho segundo proyecto.



**Figura 8.** Porcentaje de respuesta en cada uno de los sectores del ganglio céfálico (lado ventral). Hiler superior (A-D): actividad electrofisiológica, independiente a un estímulo. Hiler inferior (E-H): respuestas a estímulos quimiosensoriales **A.** Actividad de espigas total. **B.** Actividad de espigas con la aplicación de NaCl + Arginina. **C.** Actividad de espigas con la aplicación de Quinina. **D.** Actividad de espigas con la aplicación de Denatonio. **E.** Respuestas quimiosensoriales total. **F.** Respuestas quimiosensoriales con la aplicación de NaCl + Arginina. **G.** Respuestas quimiosensoriales con la aplicación de Quinina. **H.** Respuestas quimiosensoriales con la aplicación de Denatonio. El área de los círculos es proporcional al porcentaje de respuesta.

- Basado en los resultados destaca que un mayor porcentaje de eventos de espigas se observó en el ganglio céfálico supraesofágico (51%) comparado con el subesofágico (44%). De acuerdo a un análisis de Chi cuadrado se concluye que no existe diferencia significativa entre la presencia o ausencia de eventos de espigas en los sitios del ganglio supraesofágico y subesofágico ( $p=0.098$ ), no así en los sectores laterales y medial ( $p=0.0001$ ) donde sí hubo una diferencia significativa.

- En cuanto a los sectores del ganglio cefálico, se observó mayor respuesta en los sectores laterales (54%) que en los mediales (36%) (**Tabla 1**).
- Los eventos con espigas se describen como aquellos en donde en el registro electrofisiológico se observa la presencia de potenciales de acción.
- Respecto a las respuestas quimiosensoriales, no se vio diferencia entre el ganglio cefálico supraesofágico (5%) y el subesofágico (5%) (**Tabla 2**).
- Se observó un mayor porcentaje de respuestas en los segmentos laterales que en los mediales (7% Vs. 2%). Con excepción del estímulo Quinina, en donde se encontró un porcentaje de respuestas similar en la zona medial que en las laterales (específicamente, en la medial del ganglio supraesofágico). Aunque no se notó en otros estímulos, en el Denatonio, se encontró un mayor porcentaje de respuestas en el ganglio subesofágico que en el supraesofágico (**Tabla 3**).
- De acuerdo a la clasificación del número de espigas, en 92% de registros de los cuales se obtuvo una respuesta, el número de espigas por segundo fue clasificada en el rango definido como de “pocas” espigas (<5).
- El estímulo que mostró una mayor respuesta al aplicación de estímulos quimiosensoriales fue Quinina, con un porcentaje de 8% basado en el total de registros.
- El estímulo NaCl + Arginina obtuvo un porcentaje de respuesta de 4%, al igual que el estímulo Denatonio.

Posición	No. Registros		Respuestas			Eventos				Porcentaje				Total con respuesta			
			Sin Respuesta	%	Con Respuesta	%	0	<5	5 a 10	10 a 20	>20	0	<5		5 a 10	10 a 20	>20
Supraesofágico	Medial	138					86	37	8	2	5	62%	27%	6%	1%	4%	38%
	Lateral Derecho	500	243	49%	257	51%	78	55	12	13	11	46%	33%	7%	8%	7%	54%
	Lateral Izquierdo	193					79	59	25	14	16	41%	31%	13%	7%	8%	59%
Subesofágico	Medial	33					23	5	2	2	1	70%	15%	6%	6%	3%	30%
	Lateral Derecho	183	102	56%	81	44%	34	21	0	3	6	53%	33%	0%	5%	9%	47%
	Lateral Izquierdo	86					45	27	3	2	9	52%	31%	3%	2%	10%	48%
<b>Total registros</b>		<b>683</b>	345	51%	338	49%	<b>Total eventos</b>				<b>338</b>						
Medial		171	109	64%	62	36%											
Lateral		512	236	46%	276	54%											

**Tabla 1.** Se muestra el total de registros en donde se registraron eventos, divididos de la siguiente manera: pocas (<5), algunas (5-10), varias (10-20) y muchas (>20), con el sitio del ganglio cefálico donde se realizó el registro. También se observa el porcentaje de los registros correspondiente a cada división.

Respuestas quimiosensoriales													
Posición		No. Registros	Eventos					Porcentaje					Total con respuesta
			0	<5	5 a 10	10 a 20	>20	0	<5	5 a 10	10 a 20	>20	
Supra-esofágico	Medial	138	133	5	0	0	0	96%	4%	0%	0%	0%	4%
	Lateral Derecho	169	159	7	1	2	0	94%	4%	1%	1%	0%	6%
	Lateral Izquierdo	193	183	10	0	0	0	95%	5%	0%	0%	0%	5%
Sub-esofágico	Medial	33	33	0	0	0	0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
	Lateral Derecho	64	58	6	0	0	0	91%	9%	0%	0%	0%	9%
	Lateral Izquierdo	86	80	6	0	0	0	93%	7%	0%	0%	0%	7%

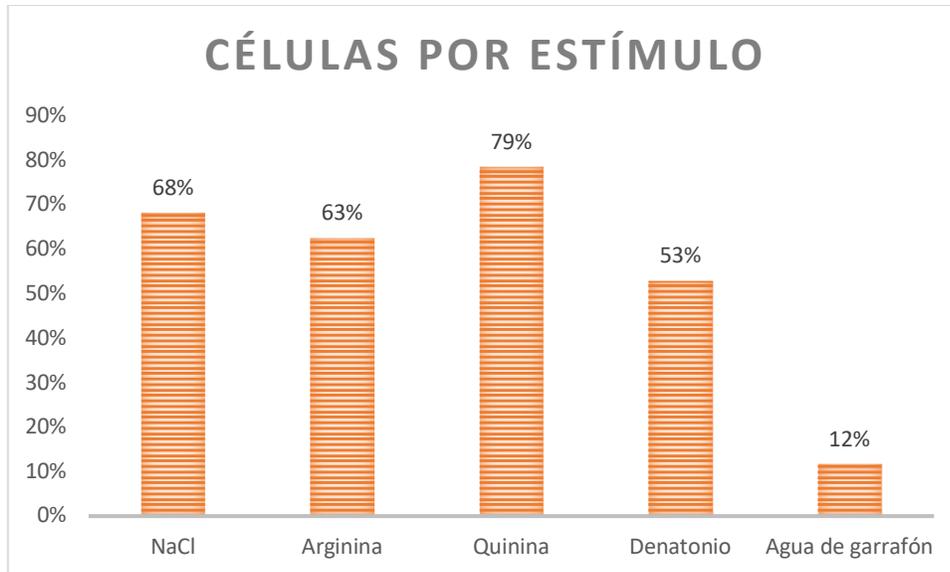
**Tabla 2.** Se muestra el total de registros en los cuales se observaron respuestas a la aplicación de los estímulos quimiosensoriales, así como el porcentaje de los registros correspondiente a cada división.

Total de respuestas quimiosensoriales por estímulo										
Posición		NaCl + Arginina			Quinina			Denatonio		
		No. Eventos	Total de registros	Porcentaje	No. Eventos	Total de registros	Porcentaje	No. Eventos	Total de registros	Porcentaje
Supra-esofágico	Medial	0	47	0%	4	47	9%	1	44	2%
	Lateral Derecho	5	60	8%	5	58	9%	0	51	0%
	Lateral Izquierdo	2	66	3%	5	68	7%	3	59	5%
Sub-esofágico	Medial	0	12	0%	0	11	0%	0	10	0%
	Lateral Derecho	1	21	5%	2	22	9%	3	21	14%
	Lateral Izquierdo	1	29	3%	3	31	10%	2	26	8%

**Tabla 3.** Se muestra el total de registros en los cuales se observaron respuestas a la aplicación de los estímulos quimiosensoriales, de acuerdo al estímulo aplicado, así como el porcentaje de los registros correspondiente a cada división.

## *Electrofisiología Intracelular*

- Se realizaron 74 registros en las células Retzius, localizada en el sector central en los ganglios del segmento, obtenidos de 17 sanguijuelas.
  
- Se realizó una clasificación de acuerdo con el tipo de respuesta a estímulos quimiosensoriales:
  - **Inhibición:** se observa actividad electrofisiológica estable previo a la aplicación del estímulo, posterior a la aplicación de éste se observa ausencia de actividad con posterior recuperación de actividad electrofisiológica.
  - **Aumento menor de espigas:** existe un aumento discreto de espigas posterior a la aplicación del estímulo quimiosensorial.
  - **Ráfaga:** se observa un aumento importante en el número de espigas (*burst*) posterior a la aplicación del estímulo quimiosensorial.
  - **Actividad multifásica:** se describe como el aumento en el número de espigas posterior a la aplicación del estímulo quimiosensorial con una disminución y posterior aumento “en picos” del número de espigas.
  
- En base a los registros que obtuvieron alguna respuesta se determinó que Quinina fue el estímulo al que un mayor porcentaje de células respondieron, NaCl y Arginina obtuvieron un porcentaje de respuesta similar; Denatonio fue el estímulo que obtuvo un menor porcentaje de respuesta (**Figura 9**).

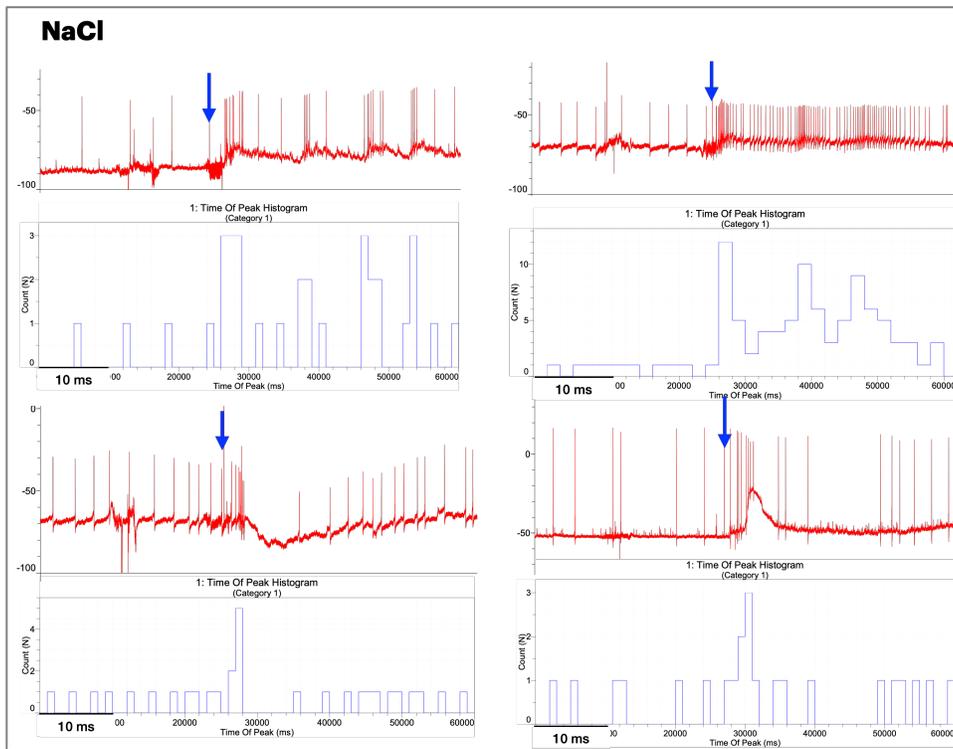


**Figura 9.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de respuesta de acuerdo a los registros realizados por célula.

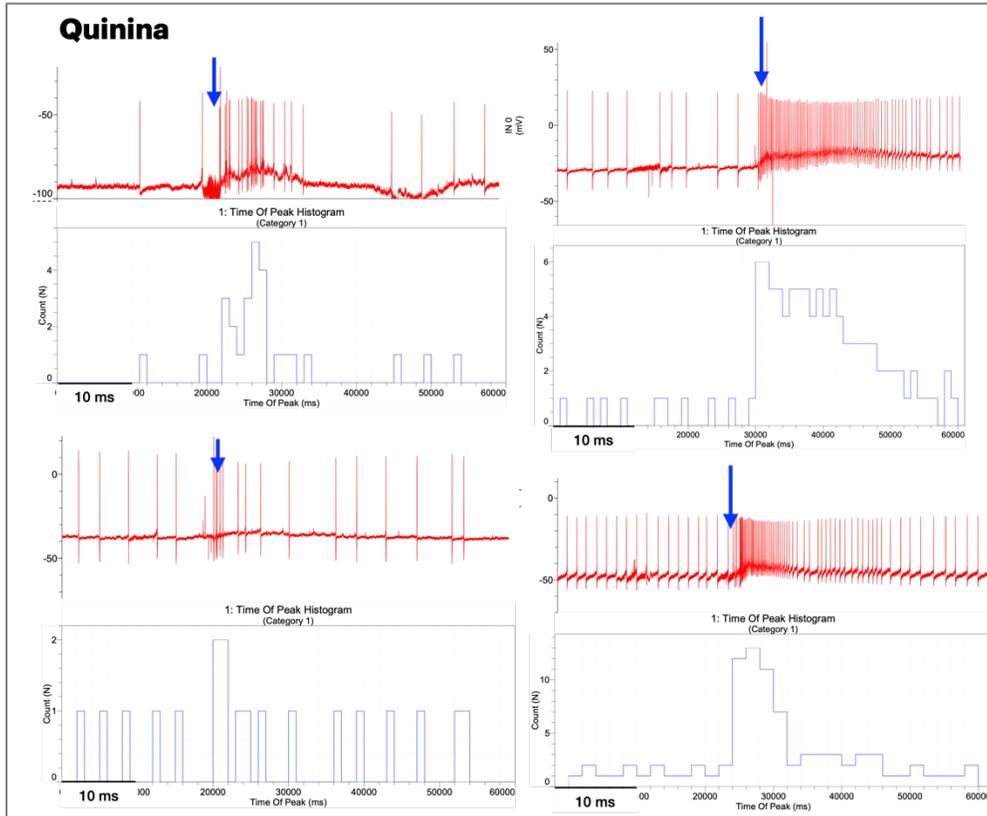
- De acuerdo a la respuesta que se obtuvo a la aplicación de los diferentes estímulos se determinó lo siguiente:
- De los estímulos aplicados, **Quinina** fue el estímulo en donde se observó mayor cantidad de registros con respuestas de ráfaga. En otros casos se observó aumento leve en el número de espigas al aplicar el estímulo (**Figura 10C**).
- **Denatonio** generalmente desencadena respuestas de inhibición, en algunos experimentos se observó una respuesta de rebote segundos después de la inhibición evocada por el estímulo. En pocos registros se observó un aumento leve en el número de espigas al aplicar el estímulo (**Figura 10D**).
- En los registros observados al aplicar **NaCl** desencadena respuestas de actividad multifásica (**Figura 10A**).

- Las respuestas de **Arginina** muestran generalmente un leve aumento de actividad en los potenciales de acción hasta actividad multifásica en algunos casos (**Figura 10B**).

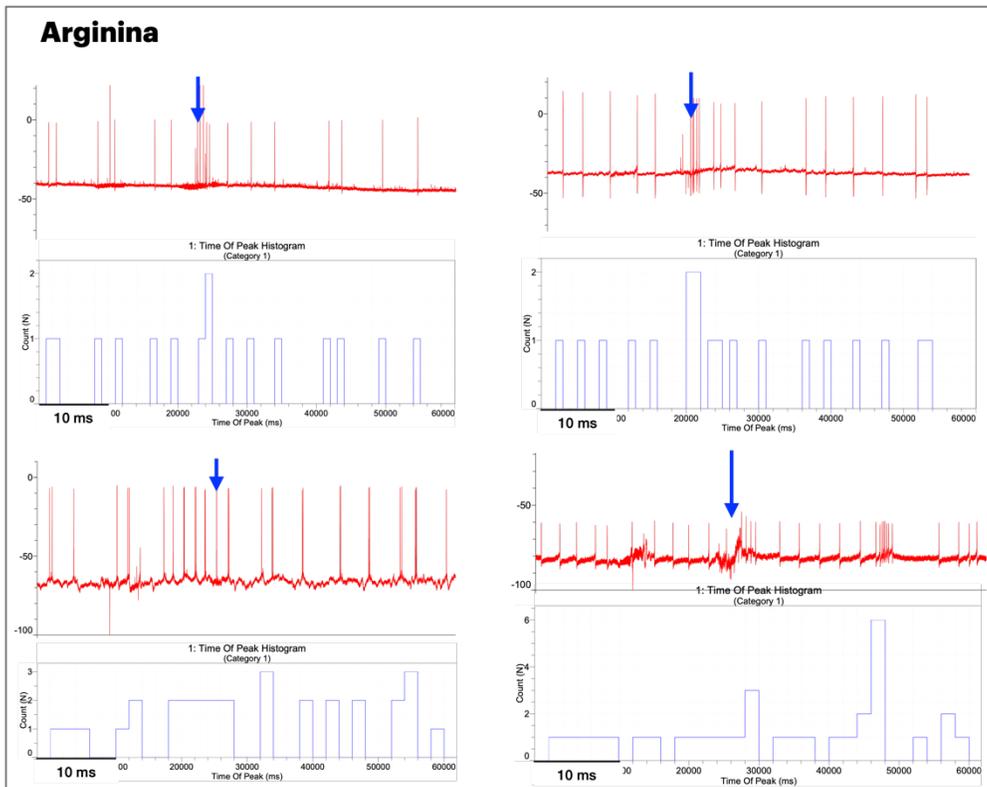
A



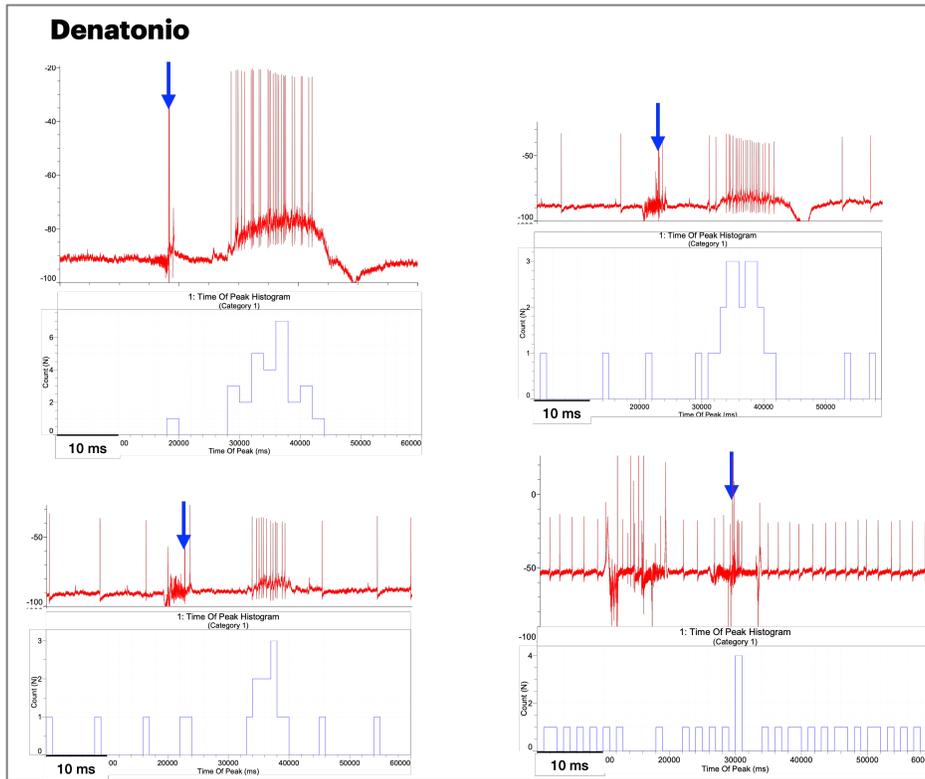
**B**



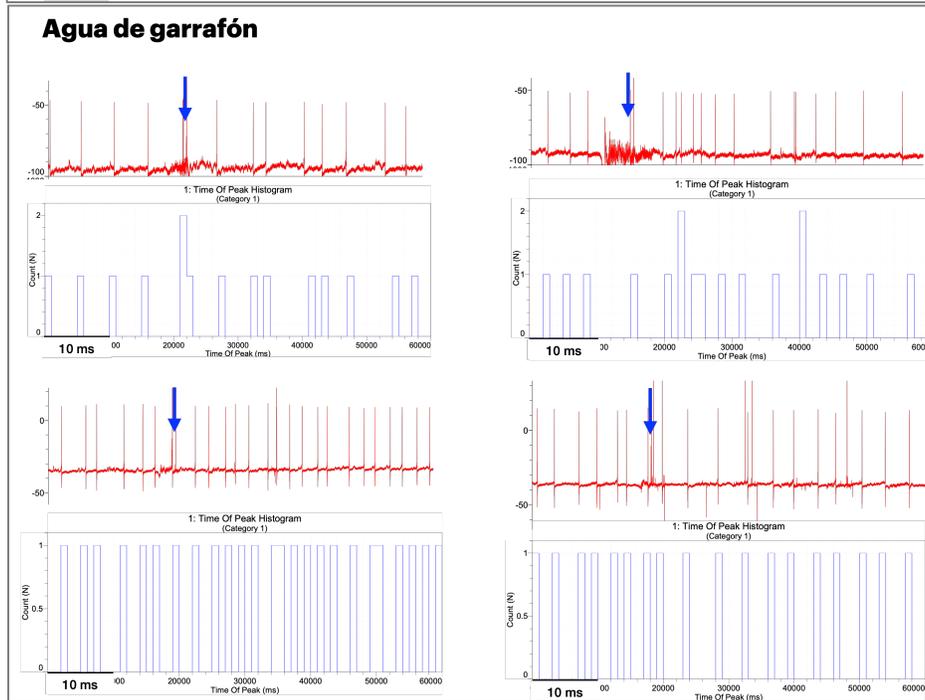
**C**



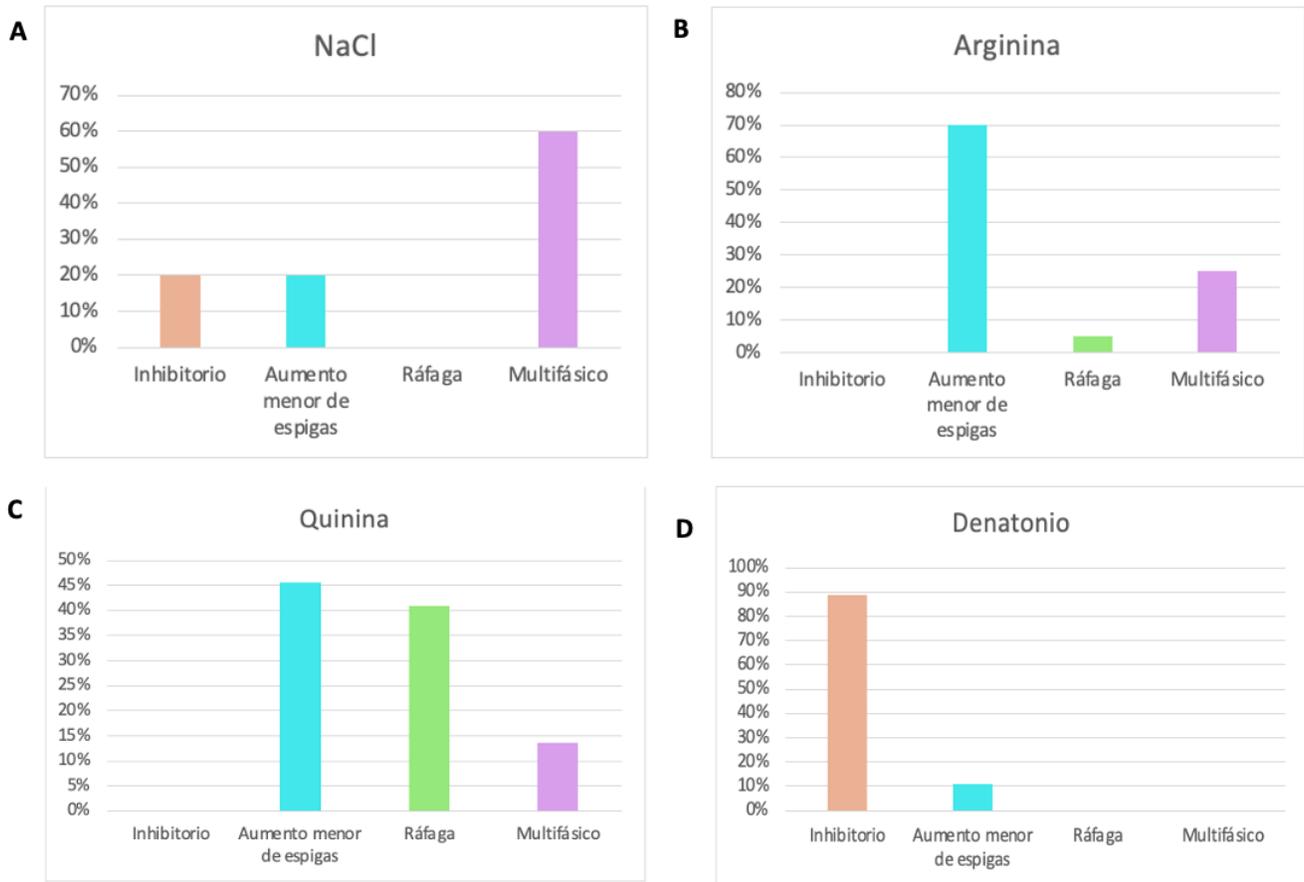
D



E



**Figura 10.** Ejemplos de registros de electrofisiología intracelular que muestran la respuesta a la aplicación de los diferentes estímulos quimiosensoriales. Los trazos se observan en la parte superior de cada ejemplo, en la parte inferior se observa el histograma correspondiente. La flecha azul indica el momento en que se aplicó el estímulo.



**Figura 11 .** Gráficas de barras que muestra el porcentaje del tipo de respuesta de cada estímulo considerando los registros que tuvieron alguna respuesta: **A.** NaCl (68%). **B.** Arginina (67%). **C.** Quinina (81%). **D.** Denatonio (53%).

## V. Discusión

### *Anatomía*

En las disecciones que se realizaron del ganglio cefálico de *Haementeria officinalis* se encontró lo siguiente:

- El ganglio subesofágico está compuesto por entre 6-7 paquetes neuronales,
- Se describe la presencia de 7 pares de nervios cefálicos, al igual que los descritos en *Hirudo medicinalis*.
- Entre el ganglio supraesofágico y el subesofágico existe un espacio por donde atraviesa la proboscis estas estructuras, sin embargo, dicho espacio se colapsa al retirar la proboscis. En *Hirudo* este espacio se conserva y se observa en las disecciones.

Una posibilidad acerca de la causa de las diferencias podría deberse al orden de las especies de sanguijuelas. *Hirudo* es del orden Arhynchobdellida, que no tienen proboscis sino mandíbulas, por otro lado, *Haementeria* pertenece al orden Rhynchobdellida que tienen proboscis.

Podría resultar de gran interés que en estudios comparativos futuros, se exploren otras diferencias en el ganglio cefálico de estas dos especies.

Al encontrar una mayor cantidad de paquetes neuronales en el ganglio subesofágico de *Haementeria officinalis*, comparado con la cantidad que se ha descrito en *Hirudo*, surge la cuestión de si existe alguna diferencia entre la cantidad de neuronas del ganglio cefálico de cada especie, lo cual podría relacionarse con la actividad electrofisiológica.

Estudios comparativos de distintas especies de sanguijuela, han encontrado que el número de neuronas en los ganglios de los segmentos tiene solo variaciones pequeñas, alrededor de 400 neuronas (*Macagno, 1980*). Sin embargo, a la fecha no existe información similar de estudios comparativos sobre el ganglio cefálico, por lo que esta pregunta queda abierta.

En *Hirudo*, los paquetes neuronales se han relacionado con ganglios fusionados (Yau, 1976). Por lo tanto, surge la duda para *Haementeria*, acerca de si el mayor número de paquetes neuronales estará también relacionado con un número diferente de ganglios fusionados, o bien, es independiente de esto.

### *Electrofisiología Extracelular*

Los resultados encontrados en el ganglio cefálico orientan a que en el ganglio supraesofágico la actividad electrofisiológica es mayor que en el subesofágico, y esto también se observó en los sectores laterales comparados con los mediales.

Es interesante observar que la mayor actividad electrofisiológica que se observa en el ganglio cefálico supraesofágico, no existe al exponer el labio de la sanguijuela a estímulos quimiosensoriales, ya que, en este caso, la actividad es parecida tanto en el ganglio supraesofágico, como en el subesofágico (5% en ambos). Aunado a esto, el resultado que indica que hay más respuestas en sectores laterales que mediales, sugiere que la posible localización de las neuronas del ganglio cefálico que reciben aferentes quimiosensoriales, se encuentran en los sectores laterales del ganglio cefálico, lo cual es compatible con lo reportado en Daberkow, 1996.

En el ganglio subesofágico se observaron mínimas respuestas a los estímulos quimiosensoriales en los sectores mediales. Las respuestas que se observaron en estos sectores se dieron al aplicar el estímulo Quinina, y fueron en el ganglio supraesofágico.

Este resultado es novedoso, ya que no existen en la literatura estudios que determinen el sitio del ganglio cefálico de *Haementeria* en donde se observa mayor número de respuestas ante estímulos quimiosensoriales.

Junto con los hallazgos descritos de la anatomía del ganglio cefálico, estos resultados podrían ser de utilidad para estudios futuros en donde se busquen estudiar vías de conexión o comunicación entre el ganglio cefálico y el labio de la sanguijuela de la especie *Haementeria* (como el descrito por Daberkow, 1996).

La mayoría de las neuronas registradas tienen una tasa de disparo baja, menor a 5 espigas por segundo.

Mientras que en la literatura se describe que al exponer el labio al estímulo NaCl se observa una respuesta mayor que la que se observa con otros estímulos, en nuestro estudio se observó que Quinina fue el estímulo que mostró una mayor respuesta, lo cual no se había reportado en la literatura

### *Electrofisiología Intracelular*

Al exponer el labio de la sanguijuela a estímulos descritos como apetitivos, como NaCl y Arginina, se observó una respuesta que va desde actividad multifásica, en el caso de NaCl a un aumento leve de espigas en el caso de Arginina.

Sin embargo, al exponer el labio a estímulos descritos como aversivos, en el caso del estímulo Quinina, se observó que en el 86% de los registros se obtuvieron respuestas que van desde un aumento leve de espigas hasta respuestas de ráfaga; hasta nuestro conocimiento este tipo de respuesta no se encuentra reportada en la literatura, ya que se ha descrito que la aplicación a este estímulo disminuye la actividad neural en los nervios cefálicos (Li, 2001).

Por otro lado, ante la exposición al estímulo Denatonio, se observaron respuestas con componentes inhibitorios, en el 89% de los registros estudiados, este tipo de respuesta ya se había descrito por Li (2001), quien describe que al aplicar este estímulo disminuye la actividad espontánea en los nervios aferentes.

Estos resultados podrían relacionarse con el comportamiento de alimentación, ya que la exposición a estos estímulos alerta a la sanguijuela sobre una posible presa o un estímulo dañino.

Podría ser interesante describir la actividad simultánea en los nervios cefálicos y en las células Retzius de los ganglios segmentarios, así como trazar esta vía; esto nos podría mostrar los sitios de relevo que los circuitos quimiosensoriales tienen en el ganglio cefálico.

Se ha descrito que la temperatura también tiene un papel importante en el comportamiento de alimentación (*Zhang, 2000*), por lo que se podría realizar la aplicación de estímulos a diferente temperatura, y comparar las respuestas encontradas. Este tipo de prueba podría orientar hacia qué factor influye más en la conducta de alimentación.

Uno de los factores que influyen de manera importante en el comportamiento de alimentación de las sanguijuela, es la serotonina, ya que desencadenan las acciones asociadas a este comportamiento, y, en el caso de sanguijuelas no hambrientas, se describe que los niveles de este neurotransmisor disminuye (*Lent & Dickinson, 1988*). Resultaría de gran interés realizar los experimentos descritos en este trabajo utilizando este neurotransmisor, de este modo se podría ver si la actividad reportada aquí es similar a la que podría describirse bajo el efecto de la serotonina, de este modo se podrían comparar los resultados con los obtenidos por Wilson, Kristan y Kleinhaus (1996), quienes reportaron que la serotonina es importante para la fase de exploración, pero disminuye durante la fase de ingestión.

## **VI. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser la base de futuros estudios en donde se explore un poco más acerca de la anatomía del ganglio cefálico, así como los relevos hacia otras estructuras del sistema nervioso de la sanguijuela.

Se describen hallazgos interesantes acerca del proceso de alimentación de la especie *Hamenteria officinalis*, sin embargo aún quedan por dilucidar otros procesos, por ejemplo la influencia de serotonina, involucrados en la conducta de alimentación en esta especie.

El presente proyecto muestra resultados preliminares de un trabajo de investigación en curso, por lo que un análisis final se encuentra en desarrollo.

## VII. Referencias bibliográficas

1. Carradori D & Barreau K. The carbocyanine dye DiD labels in vitro and in vivo neural stem cells of the subventricular zone as well as myelinated structures. *J Neurosci Res*; 2016; 148, 139–148.
2. Chong E & Rinberg D. Behavioral readout of spatio-temporal codes in olfaction. *Curr Opin Neurobiol*. 2018; 52, 18–24.
3. Colgin LL. Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci*. 2013; 36, 295–312.
4. Elliott EJ. Chemosensory stimuli in feeding behavior of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Comp Physiol A*. 1986; 159, 391–401.
5. Daberkow DP, Vaughan DK. Dextran backfill tracers combined with Lucifer yellow injections for neuroanatomic studies of the leech head ganglion. *J Neurosci Methods*. 1996 Aug;67(2):149-55.
6. Fan RJ, Marin-Burgin A, French KA & Friesen WO. A dye mixture reveals extensive dye-coupling among neurons in leeches. *J Comp Physiol A*. 2005; 191, 1157–1171.
7. Grant, G. Gustaf Retzius and Camillo Golgi. *Journal of the History of the Neurosciences*. 1999; 8(2), 151–163.
8. Groome JR, Vaughan DK, Lent CM. Ingestive sensory inputs excite serotonin effector neurones and promote serotonin depletion from the leech central nervous system and periphery. *J Exp Biol*. 1995. Jun;198(Pt 6):1233-42.
9. Harris AZ & Gordon JA. Long-range neural synchrony in behavior. *Annu Rev Neurosci*. 2015; 38, 171–194.
10. Hawkins RD, Abrams TW, Carew TJ & Kandel ER. A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*. *Science*. 1983; 219, 400–405.

11. Hodgkin AL & Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952; 117(4), 500–544.
12. Kretz JR, Stent GS & Kristan WB. Photosensory input pathways in the medicinal leech. *J Comp Physiol.* 1976; 106, 1–37.
13. Kriegeskorte N & Diedrichsen J. Peeling the onion of brain representations. *Annu Rev Neurosci.* 2019; 42, 407–432.
14. Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, 2005; 279–327.
15. Kornreich L & Kleinhaus AL. Postingestive chemosensation and feeding by leeches. *Physiol Behav.* 1999; 67, 635–641.
16. Lent, C. M. The Retzius cells within the central nervous system of leeches. *Progress in Neurobiology.* 1977; 8, 81–117.
17. Lent C & Dickinson M. The Neurobiology of Feeding in Leeches. *Sci Am.* 1988; 258(6): 98-103.
18. Li Y, Perruccio E, Zhang X & Kleinhaus AL. Bitter substances suppress afferent responses to an appetitive mixture. *J Neurobiol.* 2001; 49, 255–263.
19. Macagno ER. Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J Comp Neurol.* 1980 Mar 15;190(2):283-302.
20. Muller K, Nicholls J, Stent G; *Neurobiology of the Leech.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1981. Pp 247.
21. Nicholls, J. G., & Baylor, D. A. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology.* 1968. 31(5), 740–756.
22. Sawyer, R. T., Jones, C. P., & Munro, R. The biological function of Hementin in the proboscis of the leech *Haementeria ghilianii*. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 1991; 2(1), 153–160.

23. Stowasser, A., Stahl, A., Benoit, J. B., & Wagenaar, D. A. Electrophysiology and transcriptomics reveal two photoreceptor classes and complex visual integration in *Hirudo verbana*. *The Journal of Experimental Biology*. 2019. jeb.201764.
24. Wagenaar, D. A. A classic model animal in the 21st century: recent lessons from the leech nervous system. *Journal of Experimental Biology*. 2015; 218(21), 3353–3359.
25. Wilson RJ, Kristan WB Jr, Kleinhaus AL. An increase in activity of serotonergic Retzius neurones may not be necessary for the consummatory phase of feeding in the leech *Hirudo medicinalis*. *J Exp Biol*. 1996 Jun;199(Pt 6):1405-14.
26. Yau, K. W. Physiological properties and receptive fields of mechanosensory neurones in the head ganglion of the leech: comparison with homologous cells in segmental ganglia. *The Journal of Physiology*. 1976; 263(3), 489–512.
27. Zhang X, Wilson RJ, Li Y, Kleinhaus AL. Chemical and thermal stimuli have short-lived effects on the retzius cell in the medicinal leech. *J Neurobiol*. 2000 Jun 5;43(3):304-11.