TESINA DE GRADO

Titulo:

Papel de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas en la transmisión a través de sinapsis eléctricas entre neuronas del núcleo mesencefálico del trigémino en ratas.

Br. Martín Martinez

Tutor: Dr. Sebastian Curti.

Laboratorio de Neurofisiología Celular, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.

Diciembre de 2011.

Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Resumen

La presente Tesina se enmarca en el estudio de las propiedades de las sinapsis eléctricas en el cerebro de los mamíferos. Se empleó a tales efectos la técnica del patch clamp en su configuración de célula entera aplicado a un preparado in-vitro del núcleo mesencefálico del trigémino (NMT). Mediante esta aproximación fuimos capaces de aportar evidencias a favor de la presencia de contactos eléctricos bi-direccionales y relativamente poderosos entre las neuronas de dicho núcleo. Asimismo, experimentos farmacológicos muestran que las neuronas del NMT están dotadas de un rico conjunto de conductancias activas de membrana responsables de su fenotipo electrofisiológico. Más aún, la aplicación en forma combinada de aproximaciones experimentales y de simulaciones computacionales mediante el programa NEURON, permitió obtener por primera vez evidencias que indican que contrariamente a lo que ocurre en los contactos hasta ahora descritos, las sinapsis eléctricas entre las neuronas del NMT no se comportan como simples filtros pasa-bajos. En efecto, los resultados muestran que dichos contactos presentan cierta selectividad en frecuencia en el entorno de los 50 Hz, y que esta propiedad es consecuencia de la activación de conductancias activas, particularmente la corriente de sodio persistente y una corriente de potasio de tipo A. Estas corrientes parecen jugar un papel decisivo en el establecimiento de las características de la transferencia a nivel de estos contactos, posiblemente con la finalidad de optimizar el acoplamiento por potenciales de acción.

1.- Introducción

La presente Tesina se enmarca en el estudio de las propiedades y papel funcional del acople eléctrico mediado por uniones gap en el sistema nervioso central. Evidencias recientes demuestran la amplia distribución y relevancia funcional de esta modalidad de transmisión sináptica en los mamíferos (Connors y Long, 2004). Sin embargo sus propiedades, interacción con las propiedades activas de las neuronas acopladas y rol funcional en la determinación de la dinámica de los circuitos neurales permanecen esencialmente inexplorados. El Núcleo Mesencefálico del Trigémino (NMT) de la rata es una estructura ideal a tales efectos, dado que puede ser empleado para analizar mecanismos celulares y subcelulares en un sistema intacto con un nivel de detalle únicamente alcanzado hasta ahora en los sistemas de expresión. En efecto, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de los contactos eléctricos en el cerebro de los mamíferos, donde los mismos se encuentran en sitios remotos de los árboles dendríticos haciendo imposible el control del potencial de membrana de los compartimientos acoplados, las uniones gap entre las neuronas del NMT están localizadas en los somas, con un acceso experimental excepcional. Por otra parte, las neuronas del NMT son aferentes primarias cuya morfología se caracteriza por un soma relativamente grande del cual emerge una única prolongación celular, permitiendo un muy buen control espacial y temporal del potencial de membrana. En base a estas características, estudiamos algunas de las propiedades de estos contactos eléctricos, particularmente la eficacia de la transmisión sináptica en función de la frecuencia, mediante un abordaje experimental y teórico gracias a la generación de simulaciones computacionales empleando el paquete informático NEURON.

1.1) Las sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas son sitios especializados de contacto entre dos neuronas adyacentes, en los que un tipo particular de canales iónicos unen los citoplasmas de ambas neuronas. Estos sitios de contacto proveen de vías de baja resistencia para el flujo directo de corriente eléctrica de una célula a otra –acoplamiento eléctrico-, así como permiten el pasaje de

- 3 -

moléculas de pequeño tamaño como los segundos mensajeros –acoplamiento metabólico-. Esta modalidad de comunicación intercelular ha sido ampliamente descrita y caracterizada en el cerebro de los invertebrados y de los vertebrados inferiores, donde es posible realizar en forma relativamente sencilla registros simultáneos intracelulares de las neuronas acopladas, incluso en preparaciones de animales enteros (in-vivo).

1.1.a) Las sinapsis eléctricas en el cerebro de los mamíferos. En los mamíferos sin embargo, el menor tamaño de sus neuronas así como la enorme complejidad morfológica que caracteriza a los circuitos del cerebro de estos animales, no ha permitido un estudio tan detallado, colaborando al establecimiento de la concepción errónea de que los contactos eléctricos están restringidos a pocas regiones o que tiene un papel secundario respecto de la transmisión de tipo química. El avance metodológico que implicó el empleo de nuevas técnicas electrofisiológicas, en particular el "patch clamp" en su configuración de célula entera aplicado a rebanadas de cerebro, así como la técnica de microscopía DIC-IR que permite la visualización de neuronas vivas, mostraron en los últimos años que contrariamente a la concepción clásica, las sinapsis eléctricas se presentan en múltiples regiones del cerebro de los mamíferos, y que la presencia de las mismas tiene un importante impacto funcional sobre la dinámica de los circuitos neuronales (Galarreta y Hestrin, 2001; Connors y Long, 2004). Recientemente, el clonado en ratones de un gen que codifica para una proteína que forma canales de las uniones gap, la conexina36 (Cx36), conjuntamente con estudios inmunohistoquímicos y de hibridización in-situ mostrando la expresión de dicha proteína y sus RNA mensajeros en casi todas las regiones del cerebro de los mamíferos, llamaron fuertemente la atención de la comunidad neurocientífica sobre esta modalidad de comunicación intercelular (Condorelli et al, 2000).

Sin embargo, estos estudios mostraron que la mayoría de las sinapsis eléctricas entre neuronas en mamíferos ocurren en contactos dendro-dendríticos que están localizados en áreas remotas del árbol dendrítico (Connors y Long, 2004), lo que las hace inaccesibles para la exploración biofísica debido a dificultades del control espacial del potencial de membrana, así como también inaccesibles a exploraciones bioquímicas a los efectos de determinar la maquinaria molecular responsable de los procesos de modulación. En consecuencia, más allá de los notables

- 4 -

avances realizados en los últimos años en la comprensión del funcionamiento de los contactos eléctricos en los mamíferos, los estudios más detallados acerca de las propiedades biofísicas de estos contactos así como sus mecanismos moleculares de regulación, se han realizado en forma casi exclusiva en invertebrados y vertebrados inferiores como los peces (Pereda et al., 2004).

En contraste, las células del núcleo mesencefálico del trigémino (NMT) son un conjunto de aferentes primarias del cerebro de los mamíferos, que evidencias electrofisiológicas y morfológicas muestran que se encuentran eléctricamente acopladas y que dichos contactos son de tipo soma-somáticos (Hinrichsen, 1970; Hinrichsen y Larramendi, 1970; Baker y Llinás, 1971; Curti et al, 2010), presentando por lo tanto un acceso directo desde el punto de vista experimental. <u>Esta Tesina contribuye a una mejor comprensión de la transmisión a través de las sinapsis eléctricas en el cerebro de los mamíferos, empleando como modelo experimental a las neuronas del NMT. Este modelo sumamente ventajoso se presenta como una ventana para la exploración de esta modalidad de comunicación intercelular en los mamíferos.</u>

1.1.b) El sustrato molecular de las sinapsis eléctricas. A nivel de microscopía electrónica el correlato estructural de las sinapsis eléctricas son las uniones en hendidura o uniones gap. Estas uniones representan regiones de aposición entre las membranas de neuronas contiguas, caracterizadas por un estrechamiento considerable del espacio extracelular que separa a las células, y la presencia de cúmulos de canales iónicos especiales. Estos canales conectan los citoplasmas de las células acopladas, gracias a que cada uno está constituido por dos hemicanales o conexones, uno por cada célula que participa del contacto. Los conexones interactúan en el espacio extracelular para formar un canal intercelular funcional. A su vez, cada hemicanal está formado por seis subunidades denominadas conexinas (Cx) conformando un hexámero (Harris, 2001). En la actualidad alrededor de una veintena de conexinas han sido identificadas en los humanos y ratones, en base a su peso molecular y secuencia de aminoácidos. Los canales formados por diferentes conexinas presentan propiedades biofísicas diferentes, como ser conductancia unitaria, regulación y permeabilidad. Técnicas inmunohistoquímicas, de biología molecular y electrofisiológicas soportan la idea de que la Cx36 es el sustrato molecular de las sinapsis eléctricas en el cerebro de los mamíferos (Connors y

- 5 -

Long, 2004). Asimismo, evidencias experimentales indican que la Cx36 está presente en regiones de aposición entre las neuronas del NMT, sugiriendo su participación en el acople eléctrico entre estas neuronas (Curti et al., 2010).

1.1.c) Rol de las propiedades electrofisiológicas. La eficacia de la transmisión sináptica eléctrica no solo depende de la conductancia de los contactos propiamente dichos, sino también de las propiedades eléctricas de las células acopladas. Por ejemplo, la relación entre la resistencia eléctrica del contacto y las resistencias de entrada de las neuronas participantes es un determinante esencial en tal sentido. En efecto, cuanto mayor sean las resistencias de entrada y menor sea la resistencia del contacto, mayor será el grado de acoplamiento. Asimismo, para que una sinapsis eléctrica sea bidireccional, es necesario que las resistencias de entrada de las neuronas acopladas sean similares, condición denominada acople de impedancias. En caso contrario, y a pesar de que los contactos intercelulares no presenten rectificación, la sinapsis será unidireccional, siendo la dirección de la transmisión más eficiente desde la neurona de menor resistencia de entrada hacia la de mayor (Bennett, 1966; 1977). También la constante de tiempo de las neuronas que participan del contacto eléctrico es altamente relevante en la determinación de la eficacia de dichos contactos. En este sentido, cabe destacar que los contactos eléctricos típicamente presentan propiedades de filtro pasa-bajos, es decir permiten más fácilmente el pasaje de las señales con contenidos de frecuencia más bajos. Esta propiedad surge de la combinación de la resistencia del contacto dispuesta en serie con el circuito RC de la neurona postsináptica (Bennett y Zukin, 2004; Connors y Long, 2004). Como consecuencia de esta propiedad, <u>el impacto sobre la célula postsináptica no solo depende de la amplitud de las señales</u> de la célula presináptica sino también del contenido de frecuencia de las mismas.

Por otra parte las propiedades electrofisiológicas activas también juegan un papel relevante en la eficacia de la transmisión a través de los contactos eléctricos. En efecto, se ha determinado que ciertas propiedades activas son capaces de incrementar la eficacia de la transmisión a través de estos contactos promoviendo la sincronización de la actividad de las neuronas acopladas (Mann-Metzer y Yarom, 1999; Curti y Pereda, 2004). Por ejemplo, en el sistema de la célula de Mauthner la presencia de una corriente de sodio persistente en las

aferentes auditivas Club endings amplifica los potenciales de acoplamiento retrógrados, promoviendo la sincronización de la actividad de esta población de aferentes, haciendo más eficiente las acciones sinápticas de las mismas sobre la célula de Mauthner (Curti y Pereda, 2004). En suma, la interacción del acoplamiento eléctrico con las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas de las neuronas que participan de los contactos determina en forma crítica la eficacia de esta modalidad de comunicación intercelular. <u>En los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT, la comparación entre los resultados experimentales y de las simulaciones computacionales permiten especular acerca de un papel significativo de las propiedades electrofisiológicas electrofisiológicas de las neuronas en la transmisión eléctrica.</u>

1.2) Las neuronas del núcleo mesencefálico del trigémino (NMT)

Las neuronas del NMT son grupo de aferentes primarias únicas por presentar sus somas celulares dentro del sistema nervioso central, en el tronco encefálico. Estas neuronas son células unipolares que presentan un soma grande (20 a 30 µm de diámetro), de forma esférica u ovoide, del cual surge una única prolongación, la cual se divide en un proceso periférico y uno central. El proceso periférico inerva los husos neuromusculares de los músculos cerradores de la mandíbula y los mecanorreceptores del ligamento periodontal. Los procesos centrales de estas neuronas contactan a las motoneuronas del núcleo del V par craneal, neuronas de la formación reticular rostral parvocelular, y al núcleo supratrigeminal (Dessem et al, 1989; Liem et al, 1991). A su vez, las neuronas del NMT reciben provecciones desde el hipotálamo así como de varias estructuras del tronco encefálico, y una gran variedad de neurotransmisores y moduladores se han descrito en el NMT, así como diversos receptores postsinápticos (Lazarov, 2002; 2007). Estos datos permiten especular que aun cuando las neuronas del NMT pueden ser consideradas funcional y morfológicamente homólogas a las neuronas del ganglio del trigémino y a las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, su localización dentro del sistema nervioso central les permitiría controlar los movimientos orofaciales no solo a través del reflejo de estiramiento, sino también formado parte de circuitos neuronales más complejos. En efecto, estas neuronas se desempeñarían como interneuronas integrando información sensorial proveniente de la periferia con comandos

- 7 -

descendentes provenientes de centros jerárquicamente superiores (Kolta et al, 1990; Del Negro y Chandler, 1997). <u>La presente tesina presenta evidencias directas indicando que las neuronas del NMT están organizadas en circuitos de células eléctricamente acopladas, hecho que posiblemente constituya un elemento significativo en la actividad de esta población celular y por lo tanto en las conductas que estas organizan.</u>

1.2.a) Evidencias acerca del acople eléctrico entre las neuronas del NMT. Interesantemente, las primeras evidencias acerca de la transmisión sináptica eléctrica en el cerebro de los mamíferos fueron aportadas por estudios considerados clásicos, realizados in-vivo en el NMT de la rata por Baker y Llinás (Baker y Llinás, 1971). Estos experimentos fueron realizados mediante registros únicos, dada la enorme dificultad que presentan los registros simultáneos intracelulares in-vivo en mamíferos. No obstante lo cual, los autores fueron capaces de obtener evidencias experimentales que sugerían la presencia de acople eléctrico entre algunas neuronas del NMT. En efecto, estos autores emplearon un protocolo experimental que consistía en la estimulación del nervio trigémino (por donde transcurren los procesos periféricos de estas neuronas) a intensidades subumbrales para la activación de la neurona registrada, o mediante la aplicación de corriente hiperpolarizadora a lo efectos de impedir la activación de la misma. En estas condiciones, los registros intracelulares mostraban en un porcentaje de aproximadamente un 10%, la presencia de despolarizaciones subumbrales de breve latencia (short latency depolarization, SLD), posiblemente producto de la activación de neuronas eléctricamente acopladas a la neurona registrada (Fig. 1). La breve latencia de las SLD sugiere fuertemente que la misma no se debe a una acción sináptica de tipo química entre las neuronas del NMT. Estas evidencias fueron complementadas con experimentos de colisión en los que la activación a nivel periférica se combinó con activación directa mediante la inyección de pulsos de corrientes despolarizadora a través del electrodo de registro. Cuando la relación temporal entre los dos métodos de activación era el adecuado, la invasión del soma por parte del potencial de acción periférico era impedida debido a la colisión de los impulsos a nivel del axón, dejando al descubierto la SLD (Baker y Llinás, 1971).

- 8 -



Figura 1. Evidencias previas sugiriendo la presencia de acople eléctrico entre neuronas del NMT. A, Imagen obtenida mediante microscopía de luz de neuronas del NMT, mostrando tres pares de neuronas contiguas (Tomado de Hinrichsen y Larramendi, 1969). B, Detalle de una zona de adhesión celular mostrando áreas de estrecha aposición de las membranas plasmáticas entre dos neuronas del NMT, compatibles con uniones gap (Tomado de Liem et al., 1991). C, Panel superior, Esquema del diseño experimental empleado por Baker y Llinás. Panel inferior, En los barridos superiores y medios se muestran a alta y baja ganancia respectivamente registros intracelulares de una neurona del NMT mediante electrodos afilados, a la vez que se activa su axón a nivel periférico, mediante estímulos eléctricos al nervio masetero. La flecha hacia arriba indica el instante de la aplicación del estímulo. Superpuestos se muestran barridos sucesivos. Cuando el estímulo periférico no es capaz de activar a la neurona registrada se puede observar una despolarización de breve latencia (flecha roja). En los trazados inferiores, se disminuyó la intensidad del estímulo, para observar el carácter todo o nada de la despolarización de breve latencia. Pulso de calibración al final de los barridos: 2 mV. Tomado de Baker y Llinás (1971). Poro otra parte, en línea con estos hallazgos electrofisiológicos, estudios morfológicos de microscopía electrónica muestran imágenes compatibles con uniones gap en las regiones de aposición entre los somas de las neuronas del NMT (Hinrichsen y Larramendi, 1970; Liem et al., 1991).

Tomadas en su conjunto, este cuerpo de evidencias indirectas sugiere que las neuronas del NMT se encuentran acopladas en forma eléctrica mediante uniones gap. En este sentido, en la presente Tesina se aportan evidencias directas empleando registros simultáneos mediante la técnica del patch clamp en su configuración de célula entera, indicando que efectivamente estas neuronas se encuentran acopladas mediante contactos eléctricos. <u>Estos resultados aportarán significativamente a la comprensión de los circuitos del NMT y de las conductas que estos organizan, así como a la caracterización de las sinapsis eléctricas de mamíferos en general.</u>

1.2.b) *Propiedades electrofisiológicas activas de las neuronas del NMT*. Las neuronas del NMT presentan un fenotipo electrofisiológico caracterizado por la presencia en forma espontánea de oscilaciones subumbrales del potencial de membrana y descargas repetitivas en brotes, en el rango de frecuencias comprendido entre 50 y 100 Hz (Pedroarena et al., 1999; Wu et al., 2001). Esta modalidad de actividad celular surge de la interacción de una corriente de potasio de tipo A (I_A) con las propiedades pasivas de estas células, particularmente la constante de tiempo de la membrana. Dicha interacción determina la presencia de una resonancia eléctrica de membrana centrada en el rango de frecuencias antes mencionado. A su vez, la presencia de una prominente corriente de sodio de tipo persistente (I_{NaP}), por su carácter amplificador de las despolarizaciones, se presenta como un poderoso mecanismo amplificador de la resonancia, siendo determinante para la presencia de oscilaciones subumbrales del potencial de membrana y descargas repetitivas en brotes (Wu et al., 2001, 2005; Enomoto et al., 2006).

Por otra parte, las neuronas del NMT presentan una corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h), que es capaz de inducir descargas "rebote" ante hiperpolarizaciones de suficiente amplitud (Khakh y Henderson, 1998).

- 10 -

La presente propuesta pretende contribuir al establecimiento de una función novedosa de las corrientes activas de membrana de las neuronas del NMT, esto es, la determinación de la eficacia de la transmisión eléctrica, particularmente sus propiedades de filtro. En efecto, se aporta evidencias que sugieren que estos contactos presentan selectividad en frecuencia en torno de los 50 Hz, y que dicha propiedad es producto de la interacción con corrientes dependientes de voltaje.

2.- Objetivos

2.1.- Obtención de evidencias directas de acople eléctrico entre las neuronas del NMT mediante registros simultáneos empleando la técnica del patch clamp en su configuración de célula entera.

2.2.- Caracterizar en forma somera de algunas de las principales propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas del NMT en fijación de corriente.

2.3.- Evaluación del rol de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas en la transferencia a través de los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT.

3.- Materiales y métodos

El cumplimiento de los objetivos específicos planteados en la presente propuesta se llevó a cabo mediante un abordaje complementario empleando un modelo experimental de un preparado in-vitro de las neuronas del NMT de la rata recién nacida, y la generación de simulaciones computacionales a partir de los datos experimentales empleando el software Neuron.

El preparado experimental consistió en rebanadas de tronco encefálico que contenían dicho núcleo, en las cuales los pequeños circuitos de neuronas eléctricamente acopladas se encontraban intactos. Este modelo experimental permitió realizar registros electrofisiológicos intracelulares en forma simultánea de pares de neuronas durante períodos prolongados, a la vez que aplicar drogas en el medio extracelular a concentraciones conocidas, así como la visualización de las neuronas registradas.

3.1. Obtención de las rebanadas de cerebro de rata

Se emplearon ratas recién nacidas de 9 a 18 días de edad. Los animales fueron decapitados rápidamente mediante el empleo de una guillotina. El tronco encefálico se extrajo y se cementó a la platina de un vibratomo (Leica, VT1000S), donde fue seccionado transversalmente a 250 µm de espesor en presencia de solución de extracción (sodio sustituido por sucrosa), fría (2-4 °C) y barboteada en forma continua con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Una vez obtenidas, las rebanadas se incubaron durante una hora en solución de extracción a temperatura ambiente y barboteada en forma permanente con carbógeno. Posteriormente la solución de extracción fue sustituida en forma paulatina por solución de Registro (con sodio). Las rebanadas se mantuvieron en estas condiciones hasta el momento en que fueron transferidas a la cámara de registro. El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos a tales efectos por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), minimizando todo lo posible el sufrimiento de los mismos.

3.2. Composición de las Soluciones

3.2.a) Solución de Registro (en mM): 124 NaCl, 5 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucosa y 2.4 CaCl₂, pH 7.3 – 7.4. 3.2.b) Solución de Extracción (en mM): 248 sucrosa, 5 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucosa, y 2.4 CaCl₂, pH 7.3 – 7.4.

3.3 Registros electrofisiológicos

Los registros se realizaron bajo control visual mediante el empleo de un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con óptica de contraste diferencial de interferencia (DIC) e iluminación infrarroja (IR). El preparado se perfundió en forma permanente con solución de registro normal. Se realizaron registros intracelulares de pares de neuronas contiguas mediante la técnica de Patch Clamp en su configuración de célula entera.

Las neuronas del NMT fueron identificadas gracias a su ubicación formando un triángulo a cada lado de la línea media inmediatamente por debajo del piso del IV ventrículo a nivel del bulbo, y en la región periacueductal a nivel del mesencéfalo, así como por su tamaño y morfología caracterizada por un soma esférico u ovoide. Criterio adicionales de identificación fueron las respuestas del potencial de membrana de estas neuronas a la inyección de pulsos de corriente así como la presencia de oscilaciones subumbrales (Enomoto et al., 2006; Pedroarena et al., 1999; Wu et al., 2001).

Los electrodos se llenaron con una solución conteniendo (mM): 144 K-gluconato, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 4 MgATP, y 0.3 NaGTP, pH 7.2 (295 mOsm). La resistencias de los mismos variaron entre 6 y 9 MΩ. Una vez establecida la configuración de célula entera la resistencia en serie fue compensada entre un 75% y un 95%. Se empleó un amplificador Axopatch 200B y un Axoclamp 2A (Axon Instruments). Las señales registradas fueron adquiridas mediante un conversor análogo-digital Axodata 1322 y el programa informático Axograph 4.6.

- 13 -

3.4. Caracterización de la dependencia de frecuencia de la transmisión a través de los contactos eléctricos entre neuronas del NMT y los mecanismos responsables

A los efectos de caracterizar las propiedades de filtro de las sinapsis eléctricas entre las neuronas del NMT, se inyectaron corrientes sinusoidales de frecuencia variable (protocolo ZAP, Puil et al., 1986) a través del electrodo de una de las células de un par eléctricamente acoplado, a la vez que se registraron las modificaciones del potencial de membrana en ambas neuronas. A partir de estos registros se calculó el espectro de potencias de ambas señales mediante la transformada rápida de Fourier (FFT), y el cociente de la FFT de la célula postsináptica dividido la FFT de la célula inyectada, nos brinda una medida de la eficiencia de la transferencia de las señales en función de la frecuencia a través de los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT. Estos experimentos se realizaron en condiciones de control, y en presencia de Tetrodotoxina (TTX, 100 – 500 nM), Cloruro de Cesio (CsCl, 1 mM), 4-aminopiridina (4-AP, 1mM), Tetraetilamonio (TEA, 10mM) y Cloruro de Cadmio (Cl₂Cd, 0.2mM), bloqueadores específicos de la I_{NaP}, I_{NaT}, I_h, I_A e I_{Ca} respectivamente, principales corrientes activas presentes en estas neuronas. De esta manera fue posible evaluar la contribución de estos mecanismos activos a la determinación de las propiedades de filtro de estos contactos intercelulares.

3.5 Modelado Computacional

En forma complementaria se desarrolló un modelo computacional empleando el programa informático NEURON (<u>http://www.neuron.yale.edu/neuron/</u>) (Hines y Carnevale, 1997; Carnevale y Hines, 2005, 2006), basado en las características morfológicas y electrofisiológicas de estas neuronas reportadas en la literatura y obtenidas por nosotros en el curso del desarrollo de la presente tesina. Es de destacar que las evidencias experimentales indican que la mayoría de las neuronas acopladas del NMT se encuentran formando pares (Curti et al., 2010), aspecto que simplifica enormemente la generación de modelos realistas de estas redes neurales.

3.5.a. Hardware y Software

El equipo utilizado para la simulación, Hewlett Packard G62 usando un sistema operativo de Windows 7. El software para modelar, Neuron versión 7.1. El análisis de los datos se realizó con en el software Igor Pro versión 5.00.

3.5.b. Mecanismos de membrana

Para desarrollar el modelo a nivel biofísico se generó un modelo enteramente pasivo tanto para los somas como los axones. La capacitancia específica de la membrana de estos compartimientos se fijó en 2.12 μ f/cm² a partir de la capacitancia de entrada medida experimentalmente (60 pF) y el cálculo de la superficie del soma (ver más abajo). Esta capacitancia es consistente con la constante de tiempo para carga y descarga del voltaje de la membrana que presentó un valor aproximado de 22 ms en neuronas desacopladas. La conductancia de fuga pasiva (g_pas) para los somas se fijó en 0.00064 S/cm² y para los axones en 0.00001 S/cm², estos parámetros permitieron reproducir una resistencia de entrada de 100 MΩ, que es próximo al valor experimentalmente medido en células desacopladas y cuyas principales conductancias activas fueron bloqueadas o cuando fue medido al inicio de las respuestas a pulsos hiperpolarizadores de corrientes, previo a la activación de la I_h (Fig. 3C). La resistencia axial (Ra) de cada segmento de la red esta dada por defecto y es de 35.4 Ω/cm, salvo para el segmento que simula la unión gap que tiene un valor de 1.5 GΩ/cm para lograr un coeficiente de acoplamiento entre los somas de 0.1. El potencial en reposo se fijó en -70 mV tanto para somas como axones.

3.5.c. Topografía y Geometría

Evidencias obtenidas mediante la técnica de acople por colorantes, indican que en la enorme mayoría de los casos las neuronas del NMT se encuentran acopladas en pares. Por otra parte, experimentos empleando técnicas inmunohistológicas muestran que dicho acople se da mediante contactos intercelulares de tipo soma-somáticos que contienen a la conexina 36 (Curti et al., 2010). Asimismo, los estudios de acople por colorantes muestran que los somas de las

neuronas el NMT presentan una forma esférica u ovoide cuyo diámetro se encuentra en el rango de 20 – 30 µm, del cual emerge una única prolongación que puede tener una longitud de 700 - 1000 µm. En base a estas características morfológicas, se generó un modelo de una pequeña red de dos neuronas del NMT acopladas eléctricamente, de acuerdo a las características que se detallan más abajo.

Dado que software genera segmentos cilíndricos y no esferas, se simularon segmentos cuya superficie de membrana fue equivalente a la calculada para somas esféricos de 30 µm. De acuerdo a esto, se determinó que:

Área de la esfera = $4.\pi$.r² = $4.\pi$.(0,0015)² = 0,00002827 cm². En base a este cálculo se simuló un cilindro de 30 µm de diámetro y 15 µm de longitud. Área del cilindro = $2.\pi$.r(r+h) = $2.\pi$.0,0015.(0,0015+0,0015) = 0,00002827 cm².

En el caso del axón que surge de cada soma se le da una longitud de 1000 µm y un diámetro de 2 µm que resulta de las imágenes obtenidas mediante acople por colorantes (Curti et al., 2010; Verdier et al., 2004). Estos estudios muestran que si bien estas neuronas presentan un proceso periférico y otro central, en la enorme mayoría de los casos el segmento intercalar indiferente (entre el soma y la bifurcación), puede presentar una longitud de hasta 1 mm. Como es de esperar, la inclusión del axón en el modelo es determinante en el establecimiento tanto de la resistencia de entrada como de la constante de tiempo de las neuronas.

3.5.d. Implementación de la onda sinusoide de frecuencia variable (ZAP) y posterior análisis de la transferencia de los contactos eléctricos.

Para simular la onda sinusoide se utilizo en rango de frecuencia entre 1 – 666 Hz con un compilado de la onda ZAP obtenido del foro alojado en el sitio de Neuron (Yale). El análisis de la trasferencia de los contactos se realizo con la herramienta de análisis de impedancia, submenú "Frecuency". Esta herramienta realiza la operación Vm(postsináptica) / Vm(presináptica).

- 16 -

4.- <u>Resultados</u>

4.1. Acople eléctrico entre las neuronas del NMT

Como fuera mencionado, evidencias previas aportadas por Baker y Llinás (1971) empleando un ingenioso paradigma experimental de registros intracelulares unitarios y estimulación periférica en el animal entero, sugieren la presencia de acople eléctrico entre las neuronas del NMT. Sin embargo, la presencia de las SLD no puede ser tomada como evidencia concluyente en este sentido, por la posibilidad de que las mismas sean producto de la actividad tanto del segmento inicial del axón, como nodos de Ranvier lejanos de la célula registrada. En este sentido, nos propusimos en primera instancia obtener evidencias directas que permitan confirmar la presencia de esta modalidad de comunicación intercelular entre las neuronas del NMT. A tales efectos, se realizaron registros intracelulares simultáneos de pares de neuronas contiguas del NMT bajo control visual mediante la técnica del patch clamp en su configuración de célula entera, en la modalidad de fijación de corriente (Fig. 2A). En estas condiciones, pudo observarse en una fracción de los pares ensayados que frente a la inyección de pulsos hiperpolarizadores en una de las células, se produjo una modificación del potencial de membrana tanto de la célula invectada como de la célula vecina. En forma característica, la caída del potencial de membrana en la célula vecina mostró una amplitud menor, un curso temporal más lento y el mismo signo respecto de la modificación del potencial de membrana en la célula inyectada (Fig. 2B). Estas evidencias indican claramente que estas neuronas están acopladas en forma eléctrica, corroborándose los hallazgos reportados por Baker y Llinás.

Por otra parte, el cálculo del coeficiente de acoplamiento (definido como el cociente de la amplitud de la caída de voltaje en la célula postsináptica sobre el de la célula presináptica) para este par mostró un valor de 0.1 en una dirección y de 0.08 en la dirección contraria, sugiriendo que se trata de contactos bidireccionales. Estos cálculos fueron realizados midiendo las caídas de voltaje hacia el final de los pulsos de corriente, próximo al estado estacionario de las respuestas de membrana, donde la capacidad está cargada en forma prácticamente completa. La comparación de estos valores con los reportados por otros autores en diferentes regiones del

- 17 -



Figura 2. Las neuronas del NMT se encuentran eléctricamente acopladas. A, Microfotografía de una rebanada (X40) obtenida con la técnica DIC-IR donde puede apreciarse un par de micropipetas para el registro mediante el patch clamp en su configuración de célula entera, de un par de neuronas cuyos somas se encuentran contiguos. B, Registro intracelular simultáneo de un par de neuronas del NMT en fijación de corriente, en el que puede apreciarse que la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de 400 pA en la célula 1, panel izquierdo, o en la célula 2, panel derecho, produce una modificación del potencial de membrana en la célula inyectada caracterizada por la presencia de un "sag" y una espiga al cese del pulso de corriente, seguramente producto de la activación de la corriente Ih. Por su parte, las células vecinas mostraron modificaciones del potencial de membrana del mismo signo, aunque de menor amplitud y curso temporal más lento, indicando que se encuentran acopladas eléctricamente. El coeficiente de acoplamiento (CC) calculado en el estado estacionario, en ambas direcciones, indica que se trata de contactos bidireccionales.

cerebro de los mamíferos (Connors y Long, 2004), indican que el grado de acoplamiento eléctrico entre las neuronas del NMT es relativamente alto.

4.2. Caracterización de las principales propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas del NMT

Dada la relevancia que las propiedades eléctrofisiológicas intrínsecas neuronales, pueden desempeñar en la transmisión eléctrica a través de uniones gap (Bennett y Zukin, 2004), nos propusimos caracterizar algunas de estas propiedades. Las neuronas del NMT presentan en forma característica robustas oscilaciones del potencial de membrana y descargas repetitivas, cuando su potencial de membrana se encuentra en el entorno de los -50mV (tanto en forma espontánea como por la inyección de corriente despolarizadora DC) (Fig. 3A,B) (Pedroarena et al., 1999; Wu et al., 2001). Esta característica permite especular acerca de una riqueza de mecanismos activos en la membrana plasmática de estas neuronas, cuya interacción en forma dinámica determina un comportamiento eléctrico de tales características.

En una aproximación más formal al estudio de estas propiedades, se aplicó un protocolo estándar en la modalidad de fijación de corriente, que consistió en la inyección desde el potencial de membrana de reposo de una serie de pulsos de corriente (200 ms de duración) de ambas polaridades y amplitudes crecientes en pasos de 50 pA (Fig. 3C, panel izquierdo). Como puede apreciarse, las respuestas a los pulsos de corriente despolarizadora supraumbrales están dominadas por la presencia de una espiga al inicio de los pulsos, en tanto que para los pulsos en sentido hiperpolarizante de mayor amplitud, la respuesta del potencial de membrana muestra un desplazamiento en sentido de la despolarización luego de los 30 - 40 ms de iniciado el pulso de corriente. Esta peculiar respuesta conocida como sag, sugiere fuertemente la presencia de una corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h).

La construcción de curvas de voltaje de membrana en función de la corriente inyectada (curvas V-I), midiendo las caídas de voltaje en un instante próximo al máximo de la respuesta hiperpolarizante (Fig. 3C, círculos abiertos), y hacia el final del pulso de corriente, cuando la respuesta de voltaje está próxima a alcanzar su estado estacionario (Fig. 3C, círculos cerrados),

- 19 -



Figura 3. Las neuronas del NMT se caracterizan por la presencia de oscilaciones subumbrales y descargas repetitivas. A, La despolarización del potencial de membrana mediante la aplicación de corriente despolarizadora DC (40 - 50 pA), es capaz de inducir oscilaciones subumbrales del potencial de membrana y descargas repetitivas. B, Trazado del potencial de membrana mostrado a mayor ganancia y desplegado en el tiempo para apreciar mejor las características de las oscilaciones subumbrales. C, Panel izquierdo, Respuestas del potencial de membrana obtenidas frente a la aplicación de una familia de pulsos de corriente de distinta intensidad, en pasos de 50 pA, y en ambas polaridades, donde puede apreciarse que las respuestas a los pulsos despolarizadores supraumbrales están caracterizadas por la presencia de una espiga al inicio del pulso, en tanto que las respuestas a pulsos hiperpolarizadores de mayor intensidad presentan un "sag" y descargas al cese de los pulsos. Panel derecho, Curva I-V obtenida a partir de los registros mostrados en el panel izquierdo, en dos instantes, al inicio del pulso, cuando la respuesta a los pulsos hiperpolarizadores es máxima (círculos vacíos), y en el estado estacionario (círculos llenos). Como puede apreciarse, la membrana al inicio del los pulsos muestra un comportamiento lineal para los pulsos hiperpolarizadores, y es en base a estos valores que se calculó la resistencia de entrada (Rin) de estas neuronas mediante el ajuste a una línea recta.

se aleja marcadamente de la linealidad sugiriendo fuertemente la presencia de importantes mecanismos activos. No obstante lo cual, la respuesta de membrana al principio de los pulsos de corriente en sentido hiperpolarizante ajusta razonablemente a una línea recta que cruza el origen, indicando el comportamiento ohmico de la membrana en este instante. Por este motivo, la pendiente de esta recta es considerada como una medida de la resistencia de entrada de la neurona (Rin), que en este caso particular fue de 134 M Ω . Por otra parte, para este mismo instante pero en sentido despolarizante, la respuesta de la membrana es sublineal (pendiente de menor valor), sugiriendo la activación en forma rápida de una corriente de membrana cuyo potencial de equilibrio se encuentra en un valor relativamente hiperpolarizado, posiblemente una corriente de potasio.

Estos resultados sugieren la presencia de un conjunto de corrientes activas fundamentales para la determinación del fenotipo electrofisiológico de las neuronas del NMT. A los efectos de la identificación de dichas corrientes se realizaron experimentos farmacológicos en los que se ensayó las respuestas del potencial de membrana en presencia de diferentes bloqueadores específicos.

En este sentido y teniendo en cuenta el importante papel de las conductancias de potasio en el control de la excitabilidad neuronal, se ensayaron en primera instancia las acciones del tetraetilamonio (TEA), el cual es un bloqueador de diversas corrientes de potasio (K⁺) entre las que se encuentra el rectificador retardado ($I_{K(DR)}$). En la Figura 4B se observan las respuestas de membrana al protocolo de pulsos de corriente aplicado en presencia de tetraetilamonio (TEA, 10 mM). Como puede observarse, dicha maniobra experimental induce la presencia de oscilaciones subumbrales del potencial de membrana para los pulsos despolarizantes de mayor amplitud. Asimismo, los pulsos de corriente que en condiciones control fueron incapaces de generara más de una espiga, ahora en presencia de TEA fueron capaces de generar la descarga de una segunda espiga. Estos efectos fueron acompañados por un incremento moderado de la duración de los potenciales de acción y del nivel del potencial de membrana hacia el final de los pulsos despolarizantes de mayor intensidad. Estos resultados sugieren la presencia de una corriente de tipo rectificador retardado.

- 21 -



Figura 4. Las neuronas del NMT presentan un variado conjunto de conductancias iónicas dependientes de voltaje. Respuestas del potencial de membrana obtenidas frente a la aplicación de una familia de pulsos de corriente de distinta intensidad, y en ambas polaridades, en condiciones control y tras la adición al medio extracelular de los siguientes bloqueadores: tetraetilamonio (TEA, 10 mM), CsCl (1 mM), tetrodotoxnina (TTX, 0.5 μ M), 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM) y CdCl₂ (0.2 mM).

Por otra parte, como fuera mencionado previamente las respuestas en condiciones control frente a pulsos hiperpolarizadores sugieren la presencia de una corriente de tipo I_n . En forma consistente la aplicación de Cloruro de Cesio (CsCl, 1 mM), bloqueador de esta corriente cationica monovalente no selectiva o rectificador de entrada retardado, produce una clara modificación del curso temporal del sag sugiriendo la participación de dicha corriente. Sin embargo, cabe mencionar la presencia de cierto grado de rectificación más lenta, posiblemente producto de un bloqueo no total de la corriente I_n . Asimismo, la aplicación de CsCl produce un desplazamiento del potencial de reposo en sentido hiperpolarizante, que si bien es de escasa magnitud fue altamente consistente, sugiriendo que esta corriente también participa en la determinación del potencial de membrana en reposo.

La participación de las corrientes de sodio fue evaluada mediante la aplicación de Tetrodotoxina (TTX, 0.5 μ M), bloqueador específico de las corrientes de sodio. Como puede observarse en la Figura 4D, la aplicación de la TTX produce el bloqueo de los potenciales de acción seguramente como consecuencia de su efecto sobre la corriente de sodio transitoria. Asimismo, desaparecen las oscilaciones subumbrales que se observan durante los pulsos despolarizantes, sugiriendo la presencia de una corriente de sodio persistente (I_{NaP}) responsable de dichas oscilaciones (Wu et al., 2001).

Por otra parte, como puede apreciarse en la Figura 4D, la respuesta del potencial de membrana frente a pulsos de corriente despolarizadora presentan un hombro al inicio de los mismos (flecha roja). Esta respuesta es consistente con la participación de una corriente de potasio de tipo A (I_A). En efecto, estas corrientes se caracterizan por presentar una cinética de activación rápida y de bajo umbral. Esta posibilidad fue confirmada mediante la aplicación en forma extracelular de 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), el cual es un bloqueador de corrientes de K⁺ entre las que se encuentra la corriente transitoria A (I_A). En forma sorprendente, tras la aplicación de 4-AP y en presencia de TEA, los pulsos despolarizantes inducen la generación de espigas cuyo curso temporal es significativamente más lento a aquellas mediadas por el ión sodio y sensibles a la TTX. El curso temporal de estas respuestas y su nivel de activación, junto con el

- 23 -

hecho de que las mismas fueron obtenidas en presencia de TTX, sugieren la posible participación del ión calcio como responsable. Esta posibilidad fue confirmada mediante la aplicación de Cd++, bloqueador de las corrientes de calcio. En efecto, como puede apreciarse en la Figura 4D, estas espigas lentas fueron abolidas por la aplicación de Cl₂Cd (0.2 mM) confirmando la participación del calcio en la generación de las mismas. Estos resultados sugieren que en condiciones control, estas espigas mediadas por calcio están suprimidas por el potente control sobre la excitabilidad que ejercen el conjunto de corrientes de potasio que expresan las neuronas del NMT.

Esta evidencia experimental tomada en su conjunto indica la presencia de una gran variedad de corrientes activas de membrana en las neuronas del NMT, que están en la base de su complejo fenotipo electrofisiológico, entre las que se destacan la corriente de sodio transitoria y persistente, la corrientes de potasio rectificador retardado e I_A, la corriente catiónica inespecífica activada por hiperpolarización (I_h), y al menos una corriente de calcio. Es de destacar que aun en presencia de una combinación de bloqueadores (TTX/TEA/4-AP/Cs/Cd), la membrana de estas neuronas aun muestra un comportamiento no lineal, indicando la participación de otras corrientes iónicas dependientes de voltaje no identificadas en este estudio.

4.3. Determinación de la dependencia en frecuencia de la transferencia de señales a través de los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT

Si bien la estimación del grado de acoplamiento eléctrico mediante los pulsos rectangulares de corriente, permite una evaluación de la eficacia de dicha modalidad de comunicación intercelular, es probable que este paradigma experimental no recree las condiciones fisiológicas. En efecto, las señales neuronales presentan formas de onda más complejas con contenidos en frecuencia relativamente altos tales como los potenciales de acción, las oscilaciones y los potenciales sinápticos. En este sentido, por tratarse de aferentes primarias, es posible que los potenciales de acción sean las señales presinápticas más comúnmente transmitidas a través de estos contactos. Por otra parte, la propiedades de filtro pasa-bajos de los contactos eléctricos es una característica bien establecida en todos los contactos hasta ahora

estudiados (Connors y Long, 2004; Bennett y Zukin, 2004), haciendo por lo tanto necesario el estudio del acoplamiento empleando señales con contenidos de frecuencia variados.

A tales efectos, como primera aproximación se estudió la transferencia de señales en función de la frecuencia mediante simulaciones computacionales empleando el modelo NEURON. En este entorno se simuló un par de neuronas del NMT acopladas eléctricamente (coeficiente de acoplamiento de 0.1) de acuerdo a las propiedades pasivas (resistencia de entrada y constante de tiempo) experimentalmente determinadas (ver Materiales y métodos). En condiciones de fijación de corriente se inyectó una corriente cuya forma de onda consistió en una sinusoide de frecuencia modulada en el rango de 1 a 600 Hz (protocolo ZAP). Este estimulo generó en la célula inyectada (presináptica) una variación del potencial de membrana que presentó una disminución en forma progresiva conforme crece la frecuencia de la sinusoide, de acuerdo a las características de filtro pasa-bajo determinadas por las propiedades pasivas de las membranas celulares. Por su parte, a nivel de la célula postsináptica, se observan variaciones del potencial de membrana de curso temporal similar pero de menor amplitud (Fig. 5). La eficacia de la transferencia a través de estos contactos en función de la frecuencia de las señales presinápticas se muestra en la Figura 6A (trazado gris, simulación). Como puede apreciarse hay una disminución progresiva de dicha transferencia a medida que se incrementa la frecuencia, consistente con un filtro pasa-bajo, el cual representa un comportamiento típico de la mayoría de los contactos eléctricos del SNC hasta ahora caracterizados.

A los efectos de validar los resultados de las simulaciones computacionales, se diseñaron experimentos en los que se emplearon protocolos de estimulación ZAP, de características similares a los empleados en las simulaciones, a la vez que se monitorizaron las modificaciones del potencial de membrana de la célula pre- y postsináptica. Las propiedades de la transferencia a través de estos contactos en función de la frecuencia, se evaluó mediante la determinación del cociente de la transformada rápida de Fourier (FFT) de la respuesta del potencial de membrana de la Célula pre- y postsináptica (ver Materiales y métodos).

En forma sorprendente, la evaluación en forma experimental de la transferencia en función de la frecuencia de los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT, mostró resultados

- 25 -



Figura 5. Resultados de simulaciones de neuronas acopladas eléctricamente mediante la aplicación de protocolos ZAP. La aplicación de un protocolo ZAP a una de las neuronas perteneciente a un par acoplado eléctricamente (CC = 0.1), y con propiedades puramente pasivas, muestra una atenuación progresiva de la respuesta del potencial de membrana a medida que se incrementa la frecuencia de la sinusoide (presinapsis). La respuesta de la neurona acoplada (postsinapsis), presentó características similares aunque de mucha menor amplitud.

cualitativamente diferentes a aquellos obtenidos a partir de las simulaciones. En efecto, como puede apreciarse en la Figura 6A, en condiciones control la transferencia mostró un incremento de la magnitud para los valores en el rango de 10 a 100 Hz, con un máximo alrededor de los 50 Hz, incluso mayor que para las señales DC. Esto indica claramente que los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT no se comportan como un simple filtro pasa-bajo, siendo más eficaz la transmisión de señales que presenten frecuencias alrededor de 50 Hz. La discrepancia entre los resultados experimentales y aquellos obtenidos de las simulaciones, junto con el hecho de que las características de la transferencia son compatibles con las propiedades de resonancia de las neuronas del NMT (24 a 90 Hz), en las que se ha mostrado un papel fundamental de las corrientes de potasio de tipo A (I_A) y la corriente de sodio persistente (I_{NaP}) (Wu et al., 2001), sugiere la participación de mecanismos activos de las neuronas acopladas.

Como puede apreciarse en la Figura 6A, la adición de TTX (0.5 µM) produce una marcada disminución de la magnitud de la transferencia, particularmente para los valores en el entorno de los 50 Hz, confirmando la participación de corrientes de sodio. Por otra parte, la adición de 4-AP (1 mM) produjo una mayor disminución de la magnitud de dicha transferencia, sugiriendo también la participación de corrientes de potasio en la determinación de la eficacia de la transmisión a este nivel. En presencia de bloqueadores de las corrientes de sodio y potasio, la magnitud de la transferencia se asemeja a aquella obtenida con el modelo simulando un par de neuronas puramente pasivas, aun cuando persisten algunas diferencias posiblemente por la participación en forma menor de alguna otra corriente activa no afectada por estos bloqueadores.

Finalmente, a modo de comparación se muestran superpuestos en la Figura 6B la transferencia obtenida a partir de las simulaciones de pares de neuronas pasivas del NMT, con aquellas determinadas en forma experimental en dos tipos de interneuronas neocorticales (FS y LTS) que obedecen a características de filtro pasa-bajos (Gibson et al., 2005). Como puede apreciarse, la transferencia entre estas interneuronas es razonablemente similar a la transferencia obtenida a partir de las simulaciones de pares de neuronas del NMT con propiedades únicamente pasivas.

- 27 -



Figura 6. Las características de la transferencia entre los contactos eléctricos de las neuronas del NMT están determinadas por las propiedades activas de estas neuronas. Panel superior, Determinación de la transferencia mediante la aplicación de protocolos ZAP en condiciones control, en presencia de TTX (0.5μ M) y en presencia de TTX y 4-AP (1 mM). Superpuesto se muestra la transferencia obtenida a partir de las simulaciones de pares de neuronas pasivas (trazado gris). Panel inferior, Atenuación en función de la frecuencia determinado en forma experimental para interneuronas inhibidoras de la neocorteza ("fast spiking" FS, y "low threshold spiking" LTS), tomado de Gibson et al., 2005. Superpuesto se muestra la transferencia de pares de neuronas pasivas (trazado gris).

5.-Discusión

5.1. Las Neuronas del NMT se encuentran acopladas eléctricamente

En la presente tesina se reevaluó la presencia de contactos eléctricos entre las neuronas del NMT mediante el empleo de técnicas modernas que implican la realización de registros simultáneos de pares de neuronas contiguas mediante el patch clamp en su configuración de célula entera. Estos registros fueron realizados en un preparado de rebanadas del tronco encefálico de la rata bajo control visual.

Mediante esta aproximación experimental se aportan evidencias directas que soportan la noción de la presencia de sinapsis eléctricas entre las neuronas del NMT, confirmando de esta forma los hallazgos realizados por Baker y Llinás (1971) quienes mediante aproximaciones indirectas aportaron las primeras evidencias de esta modalidad de comunicación intercelular en el cerebro de los mamíferos. Por otra parte, estos resultados también son consistentes con evidencias morfológicas previas obtenidas con microscopía electrónica, que muestran zonas de aposición entre los somas de las neuronas del NMT cuyas imágenes son compatibles con uniones gap (Hinrichsen y Larramendi, 1970). Seguramente estos contactos intercelulares constituyen la vía de baja resistencia para el flujo de corriente entre estas neuronas.

El calculo del coeficiente de acoplamiento entre las neuronas del NMT, si bien se presentan resultados de un único par de neuronas, sugiere que el grado de acoplamiento entre esta población neuronal es bidireccional y relativamente poderoso en comparación con otros contactos eléctricos del sistema nervioso de mamíferos (Connors y Long, 2004).

5.2. Las Neuronas del NMT presentan complejas propiedades electrofisiológicas

El estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del NMT en fijación de corriente mediante la aplicación de protocolos estándar en condiciones control y en presencia de bloqueadores específicos de diferentes corrientes iónicas dependientes de voltaje, indican la presencia de un conjunto de conductancias activas responsables del fenotipo electrofisiológico de estas neuronas.

En efecto, las evidencias aquí aportadas indican la presencia de corrientes de sodio, de potasio de bajo umbral (probablemente de tipo A), de una corriente de tipo H (corriente de entrada activada por hiperpolarización) y de un corriente de calcio de bajo umbral.

La interacción en forma dinámica de este conjunto de conductancias activas, seguramente está en la base del fenotipo electrofisiológico de este tipo neuronal caracterizado por la presencia de oscilaciones subumbrales de potencial de membrana y descargas repetitivas.

5.3. Rol de las conductancias iónicas activas en la transferencia a través de los contactos eléctricos entre las neuronas del NMT

En la presente tesis se aportan evidencias sustanciales, mediante aproximaciones teóricas y experimentales en favor de un rol preponderante de las conductancias activas en la determinación de las características de la transmisión a través de los contactos eléctricos en esta población neuronal.

El modelo computacional generado con el programa NEURON simulando un par de neuronas del NMT, donde se reproducen las características del contacto intercelular y las propiedades pasivas de estas neuronas, muestran una clara discrepancia con los resultados experimentales. En efecto, mientras que el modelo de neuronas pasivas presenta un comportamiento compatible con un filtro pasa-bajos, la transferencia entre neuronas acopladas del NMT en condiciones control muestra un comportamiento que indica cierto grado de selectividad en frecuencia, en el entorno de los 50 Hz. Este comportamiento no puede ser explicado por un circuito compuesto únicamente por elementos pasivos o lineales respecto del potencial de membrana.

En presencia de bloqueadores de las conductancias de sodio y potasio de bajo umbral, tetrodotoxina y 4-aminoiridina respectivamente, la transferencia entre las neuronas del NMT

- 30 -

presenta características de filtro pasa-bajo, similares a las predichas por el modelo. Estos resultados claramente apuntan a un rol central de las conductancias activas en tal sentido.

5.4. Consideraciones funcionales

En la presente Tesina se presentan evidencias indicando que la transferencia a través de los contactos eléctricos entre las NMT no se comporta como un simple filtro pasa-bajo, contrariamente a lo descrito hasta ahora para este tipo de contactos en el sistema nervioso de mamíferos.

Las características de dicha transferencia indican que señales con contenidos en frecuencia en el entorno de los 50 Hz serían capaces de ser transmitidas en forma menos atenuadas, incluso que las señales DC. Este hallazgo indica que estos contactos están optimizados para la transmisión de señales con el mencionado contenido de frecuencia, hecho sumamente novedoso por tratarse del primer contacto eléctrico que no se comporta como un simple filtro pasa-bajo.

Dado que los potenciales de acción probablemente sean el origen fisiológico de los potenciales de acoplamiento, es posible especular que estos contactos están optimizados para el pasaje de estas señales, probablemente con la finalidad de sincronizar la actividad de grupos de estas neuronas. Por otra parte, dicha optimización surge de la presencia de conductancias activas de membrana, particularmente corrientes de sodio y de potasio de tipo A.

Finalmente, es interesante destacar que las neuronas del NMT son aferentes primarias que en su mayoría inervan los husos neuromusculares de los músculos cerradores de la mandíbula (masetero), participando en la elaboración de conductas masticatorias a través del reflejo de estiramiento. En este sentido, es probable que los mecanismos aquí descritos puedan participar en el establecimiento de la ganancia de dicho reflejo y por lo tanto en la organización de conductas orofaciales.

6.-Conclusiones

- Las neuronas del NMT se encuentran acopladas en forma eléctrica mediante contactos poderosos y bi-direccionales.
- Las neuronas del NMT están dotadas de un rico conjunto de conductancias activas de membrana responsables de su fenotipo electrofisiológico.
- 3. Algunas de estas conductancias activas parecen jugar junto con las propiedades pasivas un papel decisivo en el establecimiento de las características de la transferencia a nivel de estos contactos, posiblemente con la finalidad de optimizar el acoplamiento por potenciales de acción.

7.-Bibliografía

- Baker R, Llinás R. (1971) Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. J Physiol. 212(1):45-63.
- Bennett MVL. (1966) Physiology of electrotonic junctions. Ann NY Acad Sci. 137(2): 509-539.
- Bennett MVL. (1977) Electrical transmission: a functional analysis and comparison with chemical transmission. In: Cellular biology of neurons, Vol I, Handbook of physiology. The nervous system (Kandel ER, ed) pp 357-416. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bennett MV, Zukin RS. (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. Neuron. 41(4):495-511.
- Carnevale NT, Hines ML. (2006) The NEURON Book. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Carnevale NT, Hines ML. (2005) The NEURON Simulation Environment. NEURON hands-on course.
- Condorelli DF, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudò G. (2000) Expression of Cx36 in mammalian neurons. Brain Res Rev. 32(1):72-85.
- Connors BW, Long MA. (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. Annu Rev Neurosci. 27:393-418.
- Curti S, Hoge G,Nagy JI,Pereda AE. (2010) Properties and molecular determinants of electrical coupling in the mesencephalic trigeminal nucleus (Mes-V). 40th Annual Meeting, Society for Neuroscience, San Diego CA, USA.
- Curti S, Pereda AE. (2004) Voltage-dependent enhancement of electrical coupling by a subthreshold sodium current. J Neurosci. 24(16):3999-4010.
- Del Negro CA, Chandler SH. (1997) Physiological and theoretical analysis of K+ currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. J Neurophysiol 77(2):537-53.
- Dessem D, Taylor A. (1989) Morphology of jaw-muscle spindle afferents in the rat. J Comp Neurol. 282(3):389-403.
- Enomoto A, Han JM, Hsiao CF, Wu N, Chandler SH. (2006) Participation of sodium currents in burst generation and control of membrane excitability in mesencephalic trigeminal neurons. J Neurosci. 26(13): 3412–22.
- Galarreta M, Hestrin S. (2001) Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. Nat Rev Neurosci. 2(6):425-33.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. (2005) Functional Properties of Electrical Synapses Between Inhibitory Interneurons of Neocortical Layer 4. J Neurophysiol 93: 467–480.
- Harris AL. (2001) Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. Q Rev Biophys. 34(3):325-472.
- Hines ML, Carnevale NT. (1997) The NEURON simulation environment. Neural Computation 9:1179-1209.
- Hinrichsen CFL. (1970) Coupling Between Cells of the Trigeminal Mesencephalic Nucleus. J Dent Res 49; 1369.
- Hinrichsen CF, Larramendi LM (1969) Features of trigeminal mesencephalic nucleus structure and organization. I. Light microscopy. Am J Anat. 126(4):497-505.

- Hinrichsen CF, Larramendi LM. (1970) The trigeminal mesencephalic nucleus. II. Electron microscopy. Am J Anat. 127(3):303-19.
- Khakh BS, Henderson G. (1998) Hyperpolarization-activated cationic currents (Ih) in neurones of the trigeminal mesencephalic nucleus of the rat. J Physiol. 510(Pt 3):695-704.
- Kolta A, Lund JP, Rossignol S. (1990) Modulation of activity of spindle afferents recorded in trigeminal mesencephalic nucleus of rabbit during fictive mastication. J Neurophysiol 64(4):1067-76.
- Lazarov NE. (2002) Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. Progress in Neurobiology 66(1):19–59.
- Lazarov NE. (2007) Neurobiology of orofacial proprioception. Brain Res Rev 56(2):362-83.
- Liem RS, Copray JC, van Willigen JD. (1991) Ultrastructure of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. Acta Anat (Basel). 140(2):112-9.
- Mann-Metzer P, Yarom Y. (1999) Electrotonic coupling interacts with intrinsic properties to generate synchronized activity in cerebellar networks of inhibitory interneurons. J Neurosci.19(9):3298-306.
- Pedroarena CM, Pose IE, Yamuy J, Chase MH, Morales FR. (1999) Oscillatory membrane potential activity in the soma of a primary afferent neuron. J Neurophysiol 82(3):1465-76.
- Pereda AE, Rash JE, Nagy JI, Bennett MV. (2004) Dynamics of electrical transmission at club endings on the Mauthner cells. Brain Res Rev. 47(1-3):227-44.
- Puil E, Gimbarzevsky B, Miura RM. (1986) Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. J Neurophysiol 55(5):995-1016.
- Verdier D, Lund JP, Kolta A. (2004) Synaptic inputs to trigeminal primary afferent neurons cause firing and modulate intrinsic oscillatory activity. J Neurophysiol ;92(4):2444-55.
- Wu N, Enomoto A, Tanaka S, Hsiao CF, Nykamp DQ, Izhikevich E, Chandler SH. (2005) Persistent Sodium Currents in Mesencephalic V Neurons Participate in Burst Generation and Control of Membrane Excitability. J Neurophysiol 93: 2710–2722.
- Wu N, Hsiao CF, Chandler SH. (2001) Membrane resonance and subthreshold membrane oscillations in mesencephalic V neurons: participants in burst generation. J Neurosci. 21(11):3729-39.