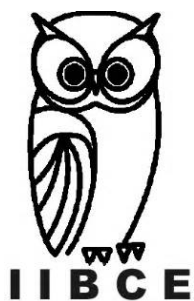

Codificación electrosensorial temprana en peces eléctricos de Pulso

Alejo Rodríguez



Montevideo 2017

Codificación electrosensorial temprana en peces eléctricos de Pulso

Alejo Rodríguez

Tesis de Doctorado
realizada en el IIBCE
PEDECIBA, UDELAR
Montevideo

Autor: Alejo Rodríguez
Tutor: Angel Caputi

Fecha de defensa: 20/12/2017

Tribunal:

Presidente: Omar Macadar

Secretario: Omar Trujillo-Cenóz

Vocal: Curtis Bell

Índice general

Resúmen	VIII
1. Introducción	1
1.1. El sistema electrosensorial	1
1.1.1. Codificación periférica	2
1.1.2. Procesamiento central de la información electrosensorial	4
2. Hipótesis y objetivos	7
2.1. Objetivo específico 1	7
2.2. Objetivo específico 2	7
3. Materiales y Métodos	9
3.1. Anatomía	9
3.2. Registros extracelulares	10
3.2.1. Registros agudos	10
3.2.2. Registros crónicos	10
3.2.3. Adquisición de datos y análisis	11
4. Caracterización de la descarga de los receptores	13
4.1. Campo receptivo con objeto metálico	13
4.2. Receptores tipo “B”	16
4.3. Efecto generados por objetos resistivos y capacitivos	16
4.3.1. Sensibilidad a la forma de onda	16
4.3.2. Análisis del espacio perceptual del estímulo	17
4.3.3. Variables de codificación	20
4.3.4. Adaptación de la respuesta	20
5. Estructura y fisiología de las células del LE	25
5.1. Anatomía del Lóbulo Eléctrico	25
5.2. Electrofisiología del Lóbulo Eléctrico	27
5.2.1. Potenciales de campo evocado por la DOE en animales descerebrados en ausencia de objetos	28

5.2.2. Patrón de descarga neuronal unitaria basal y respuesta a objetos resistivos	30
5.3. Registros en libre movimiento	42
5.3.1. Registros unitarios.	42
6. Discusión	47
6.1. Codificación periférica	47
6.1.1. Variables de codificación	47
6.1.2. Los receptores procesan las señales imagen por imagen	48
6.1.3. Consecuencias sensoriales a la sensibilidad a la forma de onda	49
6.2. ¿Codificación dual en el Lóbulo Eléctrico?	51
6.2.1. Posibles explicaciones de los patrones de descarga observados	51
6.2.2. Adaptación de la descarga	53
6.2.3. La presencia de patrones sugiere un posible código de latencias	54
7. Conclusiones	57
8. Perspectivas	59

Índice de figuras

3.1. Diseño experimental	12
4.1. Campo Receptivo	15
4.2. Resistencia vs Capacitor:igual RMS	17
4.3. Resistencia vs Capacitor:igual respuesta	18
4.4. Modulación con escalones capacitivos	19
4.5. Curso temporal vs RMS	21
4.6. Latencia Vs intervalo	22
4.7. Adaptación de la descarga	23
5.1. Anatomía	26
5.2. Potenciales de campo evocados por la DOE	29
5.3. Perfiles de descarga post-DOE	31
5.4. Unidad con decarga en fase fija	32
5.5. Neuronas bimodales	33
5.6. Modulación de neuronas bimodales	35
5.7. Neurona Monomodal “On” tardía	36
5.8. Monomodales tempranas	37
5.9. Neurona multimodal	39
5.10. Lisas con centro “Off”	40
5.11. Modulación de neuronas lisas centro “Off”	41
5.12. Raster post-DOE de unidades crónicas	44
5.13. Modulación de unidad en registro crónico	45
5.14. Registro crónico de neurona bimodal	46

Resumen

Este trabajo se enfoca en la codificación periférica y central temprana de las imágenes eléctricas; por un lado la codificación de los electrorreceptores y por otro lado la respuesta del primer relé sensorial, el lóbulo eléctrico.

Por primera vez, hasta donde sabemos, se realizó la exploración de la descarga y/o codificación de los electrorreceptores en un gymnotiforme de descarga pulsátil mediante estímulos naturales.

El principal hallazgo de esta etapa del procesamiento electrosensorial, es que la respuesta de los electrorreceptores se ve más afectada cuando cambia la energía total y el curso temporal del pulso, que cuando sólo cambia la energía total del pulso. Esta modificación fue realizada colocando objetos capacitivos frente al campo receptivo del electrorreceptor mientras el pez descargaba de forma natural. Por otro lado, encontramos que la relación entre la latencia y el intervalo es lineal, por lo que estas dos posibles formas de codificación estarían codificando la misma información de manera redundante.

Con respecto a las neuronas del lóbulo eléctrico, encontramos distintos fenotipos electrofisiológicos. Las diferentes neuronas pueden ser clasificadas según el patrón post-DOE de descarga y no sólo por su respuesta a estímulos (“On” u “Off”) como en gymnotiformes de onda.

También observamos que diferentes neuronas del lóbulo eléctrico podrían codificar los cambios en el estímulo utilizando códigos diferentes.

Por último, encontramos que las neuronas del lóbulo eléctrico tienen dos tipos de adaptación, una rápida y una lenta.

Los resultados de esta tesis fueron publicados en Pereira y col. 2014; Rodríguez-Cattaneo y col. 2017a; Rodríguez-Cattaneo y col. 2014, 2017b, los cuales se adjuntan.

Capítulo 1

Introducción

1.1. El sistema electrosensorial

Los animales poseen estructuras especializadas compuestas por células excitables (receptores sensoriales) que responden con un cambio de su actividad frente a variaciones de uno o más parámetros de una forma de energía específica. Estos receptores sensoriales informan al sistema nervioso central acerca del cambio, dando origen a experiencias perceptuales y modificaciones del comportamiento. La sensibilidad específica de los receptores sensoriales y su conexionado con el sistema nervioso determinan una modalidad sensorial. A los receptores involucrados con cada modalidad se los denomina de acuerdo a su selectividad mecanorreceptores, fotorreceptores, termorreceptores quimiorreceptores, electrorreceptores, etc.

Ningún animal es capaz de responder a todas las formas energéticas, ni tampoco cubrir todo el rango de los diversos parámetros de cada forma energética (i.e., a todas las frecuencias de luz o sonido, a todas las intensidades de presión o a todos los tipos de estímulos químicos). Por el contrario, los sistemas sensoriales son selectivos; la evolución hubo de adaptar los sistemas sensoriales de cada especie para responder sólo a los parámetros energéticos que contienen la información necesaria para la supervivencia de la especie. Tinbergen (1951) ha definido el “Merkwelt” o “ universo perceptual” como la capacidad de cada individuo de representar el mundo desde el punto de vista sensorial: “ cada animal tiene su propio mundo perceptual y este universo difiere de su entorno tal cual nosotros lo percibimos, lo cual es lo mismo que decir: de nuestro propio mundo perceptual”

Entre las modalidades sensoriales desarrolladas por los peces, aparece la electrorrecepción. Algunas especies han desarrollado receptores capaces de detectar la diferencia de potencial a través de su piel (electrorreceptores). Esta modalidad permite a los peces detectar la presencia de presas o predadores utilizando la información derivada de las corrientes eléctricas generadas por la actividad muscular y/o nerviosa de los animales. Se considera que aproximadamente 30 % de las especies de peces poseen esta capacidad. A esta modalidad de electrorrecepción se le llama electrorrecepción pasiva y está mediada por los llamados receptores ampulares.

Dos familias de peces, los Gymnotiformes en América del Sur y los Mormyriiformes en África han desarrollado en forma paralela un sentido electrosensorial activo. Los peces eléctricos (así son llamados estos dos grupos) generan un campo eléctrico en el agua a través de su órgano eléctrico (OE). Estos peces además poseen un sistema especializado de receptores en la piel, los electrorreceptores tuberosos, que informan al animal de la intensidad de la corriente generada por la descarga del OE (DOE), en cada punto de la piel. Los objetos cercanos a la piel con impedancia diferente al agua provocarían distorsiones de diferente intensidad, lo cual es evaluado inicialmente por los receptores y posteriormente en diferentes regiones cerebrales especializadas de dicho sistema (Caputi y col. 2002; Scheich y Bullock 1974; Szabo y Fessard 1974).

Estos peces también utilizan la DOE para comunicarse. Las diferencias inter-específicas en las formas de onda sirven como mecanismos de aislamiento reproductivo precopulatorio mientras que las diferencias intra-específicas sirven como signo de género y también para determinar la jerarquía entre machos.

Los peces eléctricos también son capaces de seguir líneas de campo de un pulso emitido artificialmente (similar al emitido por un congénere) hasta encontrar la fuente de la misma (Shieh y col. 1996). Esto indica que los electrorreceptores utilizados en la electrorecepción “activa” son utilizados para la electrorecepción “pasiva” de señales emitidas por congéneres.

Los campos eléctricos producidos por varias especies de estos animales pueden ser divididos en dos categorías distintas: descargas de “onda”, consistentes en una variación de voltaje continua casi sinusoidal y descargas de “pulso” consistentes en una serie de descargas cuya duración es corta con relación al intervalo entre descargas (Bullock 1974).

La frecuencia fundamental de la sinusoide generada por una especie de onda varía en un determinado rango, según la especie (por ejemplo, para los individuos de *Eigenmannia virescens* la frecuencia fundamental está entre 250 a 600 Hz Scheich 1977), pero es constante (o el rango es mucho menor) para un individuo de esa especie. En algunas especies como *Apteronotus albifrons* la frecuencia fundamental de la onda puede superar 1 KHz.

En los peces de pulso, por otro lado, si bien descargan más lento, los pulsos tienen un espectro de frecuencia con considerable energía alrededor de los 800 Hz en *Gymnotus carapo*, llegando a 3 KHz en *Gymnotus coropinae* (Castelló y col. 2009; Rodríguez-Cattaneo y col. 2008). En *Gymnotus omarorum*, la especie estudiada en esta tesis, el pico de frecuencia está alrededor de 500 Hz.

Estas dos estrategias de “electrificar” el ambiente implican diferencias estructurales y fisiológicas en el OE, en los receptores y también en los centros neurales que procesan la información reaférente.

1.1.1. Codificación periférica

Estudios sobre las propiedades de filtro de los receptores de las especies de onda muestran que los electrorreceptores se ajustan a la frecuencia fundamental de la onda emitida por el individuo (Hopkins 1976). Los receptores de los gymnotiformes de onda son de dos tipos: T y P (Scheich y col. 1973). Bajo condiciones naturales los receptores T (por “Time

coders” en inglés) disparan de manera regular, en fase con descarga del órgano eléctrico (DOE), independientemente de la amplitud del estímulo, por lo que codifican la información temporal vinculada a la ocurrencia del estímulo. La probabilidad de descarga de los receptores P (por “Probability coders” en inglés) en cada ciclo depende de la intensidad del estímulo, por lo que codifican la amplitud del mismo.

En los peces de pulso también se encuentran dos tipos de electrorreceptores: PM (por “pulse markers” en inglés, equivalentes a los T en cuanto codifican información relativa a la ocurrencia de la DOE, Szabo y Fessard 1974) y los que codifican la información relativa a la intensidad del estímulo. En este caso los axones descargan un tren de espigas cuya duración se correlaciona con la intensidad del estímulo (llamados “burst durations coders” en inglés, denominados BDC en algunos artículos, pero en esta tesis usaremos la nomenclatura utilizada por Bullock (Bullock y col. 1982), que los llama receptores tipo B). Los T responden de la misma manera que en los peces de onda, codificando la ocurrencia del estímulo con una sola descarga, utilizan un código de latencia con precisión del orden de los μs . La amplitud del estímulo puede modificar la latencia. Estos receptores hacen sinapsis con las células esféricas del lóbulo eléctrico, las cuales a su vez tienen un único axón hacia el núcleo Magnocellularis, constituyendo la denominada “vía rápida” (Castello y col. 1998; Matsushita y col. 2013; Szabo y col. 1975).

Los receptores B (Bullock 1969; Szabo y Fessard 1974) en gymnotiformes de pulso fueron estudiados principalmente por Bastian en la década de los 70 y por Hopkins en los 90'. Encontraron que estos receptores responden con un tren de espigas al ser estimulados. Por lo que estos receptores son ideales para registrar pequeños cambios en la amplitud de la DOE, con al menos tres parámetros: el número de espigas en el tren, la latencia de la respuesta y el intervalo inter-espiga intra-tren. Bastian (Bastian 1976; Watson y Bastian 1979) dividió esta categoría de electrorreceptores en tres subcategorías sobre la base del umbral de sus respuestas a distintas frecuencias. Los receptores de baja frecuencia (LF, por Low Frequency) tienen su menor umbral a estímulos menores a 100 Hz. Los de Banda ancha (WB, wide band), que mostraron curvas de sintonía muy planas, con umbrales constantes para un amplio rango de frecuencias, que iban de 125 Hz hasta 1 KHz. La tercer categoría es la de banda angosta (NB, narrow band). Como su nombre lo indica respondían a una banda más pequeña de frecuencias, aunque si tenemos en cuenta la población, esta subcategoría también tenía sus umbrales más bajos para un gran rango de frecuencias, desde 500 a 2000 Hz.

En los peces mormiriformes de pulso (familia Mormyridae) además de los electrorreceptores ampulares, se han descrito otros dos subtipos de electrorreceptores llamados mormiromastos y knollen órganos (denominados receptores tipo K, en Bullock y col. 1982). Dentro de los mormiromastos se encuentran a su vez dos tipos de células receptoras inervadas por aferentes distintas (aferentes A y B, Bell et al., 1989). Los mormiromastos típicamente descargan un único potencial de acción por DOE y la latencia de esta espiga respecto a la DOE depende de la intensidad del estímulo. A su vez, los receptores K descargan una única espiga en fase con la DOE y por lo tanto codifican cambios en la frecuencia de la DOE. Los receptores K individuales son selectivos a la polaridad del estímulo, por lo que la diferencia de latencia entre lados opuestos del pez informan al pez receptor sobre la forma

de onda del emisor (Hopkins y Bass 1981). Por último, en los mormiriformes de onda se han descrito los receptores O y los receptores S que codifican la amplitud y la frecuencia de la DOE respectivamente. Mientras que los receptores O exhiben propiedades similares a los receptores P de los gymnotidos de onda, los receptores S son similares a los receptores T de estos peces (Chacron y col. 2011; Kawasaki 2005).

Los estudios electrofisiológicos previos sobre la respuesta de los dos tipos de receptores tuberosos en peces gymnotiformes de pulso (foco de este trabajo) fueron hechos en su mayoría con el animal curarizado y estímulos artificiales. Además, generalmente se utilizaron métodos previamente diseñados para los peces de onda: estímulos sinusoidales y posterior correlación entre los componentes de frecuencia del pulso y del mejor estímulo.

Sabemos, por estudios comportamentales previos (Caputi y col. 2003) que la sensibilidad a cargas capacitivas es mucho mayor que a las resistivas, ya que objetos capacitivos evocan respuestas de novedad mayores que las resistivas.

Cuando se modifica experimentalmente la resistencia del objeto, el RMS de la LEOD aumenta hasta tres veces desde la resistencia más alta hasta la más baja. En este caso la forma de onda prácticamente no cambia. Cuando se modifica la capacitancia del objeto, además de cambiar el RMS de la LEOD, la forma de onda sufre importantes cambios: la onda negativa inicial (V_1) disminuye su amplitud y la onda negativa final (V_4) aumenta (figura 3.1C). Esto conlleva un aumento en la proporción de altas frecuencias en el espectro de potencias y un corrimiento de fase de la LEOD, lo cual es importante para entender la fisiología de los receptores (Cilleruelo y Caputi 2012).

En este estudio reportamos resultados obtenidos en condiciones más naturales que los anteriores, ya que el estímulo es la DOE autogenerada, modificada por la presencia de objetos de distinta impedancia (puramente resistivos, puramente capacitivos y en algunos casos una combinación de ambos).

Nuestro diseño experimental se enfoca principalmente en la exploración de la respuesta de los receptores al explorar el ambiente y no tanto para la función de comunicación y/o navegación, ya que utilizamos estímulos locales. De todas formas, no hay evidencia de fibras eferentes sobre los receptores que medien anticipación, descarga corolario o inhibición lateral, por lo que la codificación para las otras funciones a este nivel no tendría porqué ser diferente.

1.1.2. Procesamiento central de la información electrosensorial

El primer sitio de procesamiento de la información electrosensorial es el lóbulo eléctrico (LE), localizado en la región dorso-lateral del tronco encefálico. Es una estructura tipo cerebelosa, laminada, que contiene al menos 11 tipos celulares. El LE es el único sitio que recibe proyecciones de los electrorreceptores (Maler y col. 1981; Réthelyi y Szabo 1973). Está dividido en cuatro regiones o mapas (piscículos) contiguos, cada una con el mismo patrón laminado. El mapa más medial recibe la entrada de los receptores ampulares (pasivos, en el sentido que son capaces de responder a muy bajas frecuencias, las cuales son características de los campos eléctricos generados por cualquier actividad muscular y/o nerviosa (i.e., de una presa quiescente entre raíces de camalotes). Cada uno de los

otros tres segmentos, denominados centro medial (CM), centro lateral (CL) y lateral (L) reciben una proyección somatotópica de los electrorreceptores tuberosos (Carr y col. 1982; Heiligenberg y Dye 1982), los cuales se trifurcan. Cada tipo de receptor proyecta sobre dos grupos celulares distintos, los receptores PM, como se dijo proyectan sobre las células esféricas constituyendo la vía rápida mientras que los receptores B proyectan sobre distintas células de una red tipo cerebelosa, la cual es denominada vía lenta. Por la vía lenta llega información de más alta frecuencia, sobre las modulaciones generadas por la propia DOE y de otros peces eléctricos. En el caso de los mormíridos, cada mapa recibe información de un tipo diferente de electrorreceptor (Bell y col. 1989).

Las células de salida del LE pertenecientes a la vía lenta proyectan sus axones eferentes hacia al menos tres estructuras, 2 mesencefálicas: el Torus semicircularis y el núcleo Praeminentialis (Prae). Estas últimas, a su vez, envían señales de feedback al LE de manera directa e indirecta a través del cerebelo.

En los mormiriformes de pulso, las fibras aferentes de los mormiromastos que responden a cambios en la amplitud del estímulo terminan somatotópicamente en las capas más profundas de las zonas medial y dorsolateral del LE (Bell y col. 1989), donde establecen contactos sinápticos con diferentes neuronas (Bell y Maler 2005). Entre estas se destacan las células ganglionares medias (interneuronas inhibitorias tipo-Purkinje que terminan localmente sobre las células eferentes del LE, muy numerosas y con múltiples dendritas y espinas en la capa molecular del LE (Bell y col. 1997; Meek y col. 1996) y las células eferentes del LE (células ganglionares grandes y células fusiformes grandes) cuya actividad es fuertemente afectada por la entrada aferente desde la periferia. En ambos tipos de células, se distingue un subtipo que es inhibido por el estímulo electrosensorial (célula ganglionar media MG1 y célula eferente del LE ganglionar grande) y otro que es excitada por el mismo estímulo (célula ganglionar MG2 y célula eferente del LE fusiforme grande Bell y Grant 1992; Bell y col. 1997). En el LE de los mormíridos se han descrito otros tipos de interneuronas como las células granulares, las células estrelladas y las células fusiformes medias (Meek y col. 1996). Una característica particular de esta familia de peces es la existencia de una descarga corolario asociada al comando motor que desencadena a la DOE. A nivel del LE, la información descendente provista por la descarga corolario se integra a la entrada reaferente de origen periférico desde los electrorreceptores activados por la DOE (Bell y Grant 1989; Bell 1981, 1982; Zipser y Bennett 1976). Tanto las células ganglionares medias como las células eferentes del LE reciben la entrada electrosensorial, vía las células granulares del LE, sobre sus dendritas basilares. A su vez, ambos tipos de células presentan dendritas apicales que se extienden en la capa molecular del LE donde establecen contacto con las fibras paralelas originadas en la eminencia granularis posterior (EGp). De esta forma, estas células son capaces de integrar las dos entradas principales del LE ((Bell y Grant 1992; Bell y col. 1997; Caputi y col. 2003; Mohr y col. 2003)). Los efectos de la descarga corolario sobre las unidades del LE son plásticos (Bell y Grant 1992). La modulación plástica de las propiedades de integración de las células ganglionares medias jugarían un rol central en el procesamiento de las señales del LE.

Se ha demostrado que las estructuras sensoriales tipo cerebelosas de los mormiriformes de pulso, los gymnotiformes de onda y los peces elasmobranchios generan una imagen

negativa previsible a partir de la historia previa de la entrada sensorial. Son por lo tanto un sistema predictor. Esta imagen negativa que predice la entrada sensorial al integrarse con la entrada real elimina sus características predecibles, permitiendo que las características que no se prevén se destaquen con mayor claridad (Bell 2001; Bell y col. 1993, 1997; Pereira y col. 2005).

En gymnotiformes de pulso, los estudios previos en el LE son muy escasos, enfocados en potenciales de campo (Pereira y col. 2005) y uno muy preliminar con unidades (Schlegel 1973).

Estos estudios mostraron que hay un patrón post-DOE de activación del LE y que algunos componentes de dicho patrón presentan adaptación al variar el estímulo.

Desde el punto de vista estructural, el LE es más similar al de sus primos cercanos, los gymnotidos de onda (mucho mejor estudiados). Pero su régimen de estimulación (pulsátil) es muy similar al que reciben los bien estudiados mormíridos de pulso, que tienen un LE que evolucionó de manera independiente y convergente.

El hecho de que dos circuitos tan similares y homólogos funcionen bajo regímenes de estimulación tan diferente, sin haber cambiado su estructura, puede poner a prueba los límites de procesamiento de los sistemas cerebelosos. También facilita la comprensión de otros, incluyendo al cerebelo propiamente dicho, el cual también funciona como filtro adaptativo, procesando información de distintos sistemas sensoriales, así como cognitivos y motores los cuales también podrían tener diferentes regímenes de estimulación. Por lo tanto, el estudio del LE de los gymnotidos de pulso puede aportar una nueva perspectiva al conocimiento de la función de las estructuras tipo cerebelosas.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

Los objetivos generales de la presente tesis fueron caracterizar las respuestas de las neuronas electrosensoriales periféricas y del primer relé sensorial a la imagen eléctrica.

2.1. Objetivo específico 1

Estudiar la respuesta de los receptores a modificaciones de la propia DOE local tanto en amplitud como en forma de onda.

Sabemos por estudios anteriores (Watson y Bastian 1979) que los aferentes primarios responden con trenes de espigas. El mismo estudio demuestra que al aumentar la energía total del estímulo en el centro del campo receptivo la respuesta de los aferentes primarios disminuye en latencia y aumenta en duración y frecuencia del tren de espigas. Por otra parte sabemos (Aguilera y Caputi 2003) que los peces son capaces de responder comportamentalmente a cambios en forma de onda. Por lo tanto propuse y puse a prueba la siguiente hipótesis:

Hipótesis 1: Los electrorreceptores en los peces gymnotiformes, son sensibles a cambios en la forma de onda, es decir, responden mejor a cambios en las combinaciones de fase y frecuencia de la DOE local.

2.2. Objetivo específico 2

Sabemos por estudios previos que existen más de 10 tipos neuronales anatómicos en el lóbulo eléctrico (Krahe y Maler 2014; Maler y col. 1981). Sabemos además que existe un patrón temporal de respuesta evidenciado por potenciales de campo en el intervalo entre DOEs (Pereira y col. 2005) y que dicho patrón cambia con la modificación de los estímulos electrosensoriales autogenerados. Por lo que la información acerca del cambio en el estímulo podría estar en el patrón de activación post-DOE

Nuestro segundo objetivo fue caracterizar la respuesta de las diferentes unidades del lóbulo eléctrico a la DOE propia en ausencia de objetos y su modificación por los mismos.

Hipótesis 2: El patrón de activación post-DOE de las neuronas del lóbulo eléctrico lleva información relevante sobre el estímulo.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

Se utilizaron 35 individuos de la especie *G. omarorum*. Los protocolos de experimentación cumplieron con las normas de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, ordenanza 4332-99, Universidad de la República Oriental del Uruguay) y fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (protocolo N° 001/03/2011). Los peces fueron recolectados en Laguna del Cisne (Maldonado, Uruguay) 1 a 4 meses antes de los experimentos y mantenidos en acuarios individuales.

Con la excepción de los peces implantados con electrodos crónicos, los registros electrofisiológicos se realizaron en peces descerebrados. Al final de los los experimentos los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital (10 mg, i/m).

3.1. Anatomía

Se realizaron análisis histológicos del LE en cinco peces. Los cerebros fueron cortados en rodajas de 100 μm de espesor con un micrótopo vibratorio. En 3 de ellos se realizaron tinciones tipo Golgi de las células eferentes del LE usando tinción retrógrada con Neurobiotin (Vector Laboratories). Ésta fue inyectada por iontoforesis en la decusación del lemnisco lateral. Utilizamos pipetas de vidrio con 1% de Neurobiotin y KCL 2M. La decusación está localizada a 2500 μm por debajo de la sutura media de los huesos del cráneo. La ubicación es también revelada por un característico potencial evocado por la DOE. Luego de transcurrido cierto tiempo (entre 14 y 36 hs para el transporte retrógrado), el animal ulteriormente fue anestesiado con pentobarbital (10 mg, i/m), la región cardíaca expuesta y perfundido 50 mL de una mezcla de formaldehído (4%) y glutaraldehído (1%) a través de una cánula en el cono aórtico.

Una vez extraído el cerebro, fue cortado en rodajas de 100 μm de espesor perpendiculares al eje principal del cuerpo. En el caso de las tinciones retrógradas con Neurobiotina, ésta fue revelada siguiendo el protocolo estándar (avidina-peroxidasa-diaminobencidina, www.vectorlabs.com/protocols/PK-4000.pdf). Finalmente, los cortes fueron montados serialmente en porta objetos, secados y contrateñidos en solución al 1% de azul de Metileno

por dos minutos, deshidratados en etanol a concentración creciente y montados con bálsamo de Canadá. Las muestras fueron examinadas con microscopio de luz transmitida (Zeiss, Primo Star) y las imágenes capturadas con una cámara digital (Pixelink, 2040x1536 pixels).

En el estudio de potenciales de campo se procesó una correcta correlación anatómico-funcional. Para identificar el plano de registro se inyectó Chicago Sky Blue en dos puntos extremos del tracto de registro, uno superficial y el otro en el punto más profundo de registro. En dichos casos, finalizados los experimentos se removió el cerebro y se lo sumergió en 4% de paraformaldehído por 24 horas. Luego se cortó en rodajas de 100 μ de espesor y se identificó la posición de las marcas azules con microscopía de transmisión. Se realizó el mismo procedimiento en uno de los peces en que se realizó el análisis de potencial de campo con electrodo tipo Michigan, para corroborar la correcta posición del mismo en el LE. En este caso se buscó la visibilidad post-mortem de la cicatriz del electrodo, el cual fue dejado con ese propósito una hora en la posición de registro, a posteriori del experimento.

3.2. Registros extracelulares

3.2.1. Registros agudos

Descerebración

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con los peces bajo anestesia con Eugenol (0,01% en el agua de la pecera), hasta completar la decerebración. Una vez que se detuvo la descarga del OE, se removió con un bisturí la piel de la cabeza y con un microtaladro se realizaron dos pequeños agujeros en el hueso, a nivel del cerebro anterior, uno a cada lado de la línea media. A través de dichos orificios se aspiró el telencéfalo. Luego se colocó al pez en la pecera de experimentación con agua sin anestesia (tanque de 26 x 45 cm con 6 cm de agua del acuario a 100 μ S.cm⁻¹ sobre una mesa aislada de las vibraciones). Luego se pasó un alambre (150 μ de diámetro) a través de los orificios para fijar el cráneo del pez a un soporte de madera. Para minimizar los movimientos se reforzó la unión del cráneo y el alambre con cemento dental. El cuerpo del pez se inmovilizó mediante un hilo colocado a lo largo del cuerpo y atado a la misma madera que el cráneo. El animal quedó fijo y el nivel del agua se subió hasta que sólo la porción superior de la cabeza quedara en el aire. Una vez fijado, se eliminó por medio de un microtaladro una amplia porción del cráneo de modo de exponer el LE izquierdo. Antes de comenzar los registros experimentales verificamos la recuperación de la frecuencia de la DOE y la ocurrencia de respuestas de novedad ante distintos estímulos (mecánicos y eléctricos). No se realizaron registros en animales que no cumplieran estos dos requisitos.

3.2.2. Registros crónicos

En los registros crónicos no realizamos descerebración. El resto del procedimiento quirúrgico en este caso era similar al anterior, a excepción del lugar del cráneo donde

se realizó el orificio de entrada del electrodo, que fue rostral al punto medio del canal vestibular. El electrodo fue construido a partir de un par de cables de nicrome aislados, de 50 μm de diámetro que fueron torneados entre sí y las puntas cortadas de forma oblicua para separarlas 50-100 μm entre sí. Este electrodo fue colocado por el agujero anteriormente descrito hasta una profundidad de 1400 μm . Cuando observamos actividad unitaria procedimos a sellar el agujero con una mezcla de cemento dental y cianocrilato de forma de fijar el lugar de registro.

3.2.3. Adquisición de datos y análisis

El procedimiento para los registros de las aferentes y para las neuronas del LE fue idéntico en todos los aspectos excepto en la localización del electrodo de registro. Los receptores fueron registrados únicamente con electrodos tipo "Michigan" (16 electrodos distribuidos a lo largo de una línea, separados 50 μ), mientras que las neuronas del LE también fueron registradas con pipeta de vidrio con NaCl 3M. El electrodo de referencia fue colocado en la cisterna magna. Cuando utilizamos los electrodos tipo "Michigan", modificamos digitalmente la referencia hasta encontrar el sitio donde el artefacto de la DOE fuera menor y no se registraran unidades a través del mismo. Según el electrodo utilizado (electrodo único o multitrodo), se empleó un amplificador diferencial (AM system 1800) o uno diferencial multiplexado (AM system 3600) con ganancia entre 5.000 y 20.000 ajustada según el tamaño de la unidad. Otro par de electrodos fue colocado en los bordes opuestos del tanque para registrar la DOE cabeza-cola (DOE-HT, por sus siglas en inglés: Head to Tail), necesaria como referencia temporal de los registros. El filtro del amplificador para el registro del potencial de campo fue ajustado a 10 Hz-1 kHz y para registros de unidades a 300 Hz-5 kHz. Todas las señales fueron digitalizadas a 20 kHz o más por canal (Datawave SciWorks, 8.0) y guardadas en una computadora para su posterior análisis.

En el registro unitario, la ubicación del electrodo de registro sobre el LE expuesto se orientó mediante claves visuales de modo de asegurar un sitio similar de registro entre los diferentes peces. Se apuntó a la región de ingreso del nervio electrosensorial para registros de aferentes y al mapa centro medial para registrar neuronas centrales. Una vez posicionado el electrodo de registro sobre la superficie del cerebro, se lo bajó en pasos de 50 o 100 μm hasta la profundidad deseada (capa polimórfica del LE). La actividad eléctrica registrada como potenciales de campo durante el descenso del electrodo permitió en cada caso estimar la profundidad correcta del electrodo de registro.

En el caso de multitrodos de 16 canales fue posible cubrir simultáneamente una profundidad de registro total de 750 μ . En este caso la profundidad de los electrodos fue establecida de forma que la actividad de las aferentes primarias se observara en el canal más profundo. De esta forma era posible estimar la capa en la cual estaba la neurona en estudio. En ambos tipos de registros, una vez identificada la actividad unitaria claramente separable del ruido, se grabó durante 1 a 3 minutos para su posterior procesamiento.

Mediante un algoritmo de selección de espigas provisto en el software Sciworks 8.0 identificamos unidades que coincidieran en al menos tres parámetros (i. e, amplitud pico a pico, amplitud del pico principal, duración de la espiga) En el caso de las espigas registradas

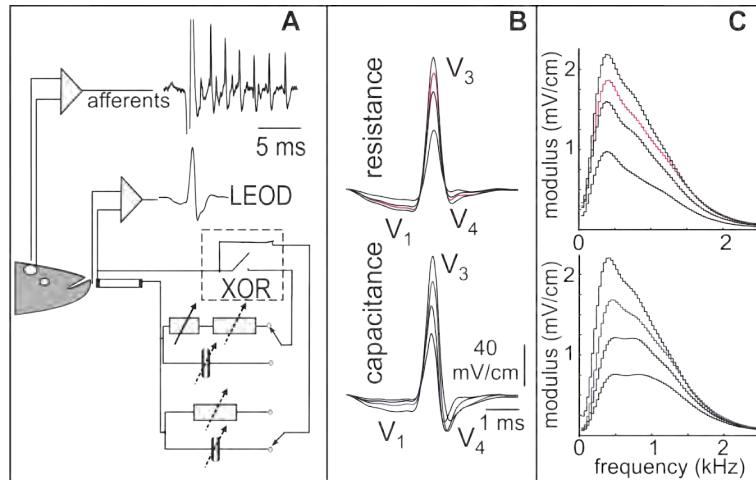


Figura 3.1: **Diseño experimental.** A) Registramos simultáneamente 16 canales en la entrada del nervio electrosensorial y la forma de onda de la DOE local (LDOE) modificada por el objeto (mostrado en B). Mediante un circuito diseñado y fabricado en el laboratorio cambiamos digitalmente la conductancia del objeto entre 12 posibles valores (6 resistencias y 6 capacitancias). B) Formas de onda locales registradas cuando cambiamos la resistencia (arriba) y la capacitancia (abajo) C) Espectros de potencias de las DOEs locales mostradas en B

con pipeta no es posible estar seguros que todas las espigas registradas pertenecen a la misma neurona. En el caso de las espigas registradas con multitrodos la fiabilidad es casi del 100 %; ya que cada espiga era registrada generalmente por dos y/o tres de los canales.

A partir de la serie de tiempos correspondientes a cada forma de onda seleccionada, se construyeron rasters peri-DOE, histogramas peri-DOE, histogramas interespigas de primer orden e histogramas de autocorrelación. La observación de los histogramas post-DOE en condiciones basales nos permitió preclasificar diferentes perfiles neuronales independientemente de su respuesta a diferentes estímulos. Los histogramas fueron realizados con bins de 1 ms de duración, comenzando 2 ms después del pico de la DOE.

Con el fin de lograr una mejor descripción de la estructura del histograma peri-DOE, se calcularon los histogramas por separado para cada una de las tres primeras espigas consecutivas de la DOE. Esto permitió refinar la clasificación de los tipos de unidades. Como se observó que muchas unidades tenían una probabilidad relativamente baja de descarga justo después de la DOE, en algunos casos se calculó y se comparó para cada unidad la probabilidad de disparo en el intervalo de 4-8 ms después del DOE con la probabilidad de disparo 8-4 ms antes de la DOE.

Para modular la actividad de las unidades, ya fueran receptores o neuronas, primero se buscaba el campo receptivo con un objeto metálico (cobre). Una vez ubicado el sitio de mayor influencia sobre la descarga de la unidad, colocábamos en este sitio el objeto con impedancia variable. Con este objeto podíamos cambiar la forma de onda de la DOE local (LDOE) del campo receptivo, al variar la resistencia o la capacitancia (Fig. 3.1, por más detalles de este procedimiento ver Rodríguez-Cattaneo y col. 2017b).

Capítulo 4

Caracterización de la descarga de los receptores

Los resultados de este capítulo fueron publicados en Rodríguez-Cattaneo y col. 2017b (se adjunta).

Para explorar si la sensibilidad mostrada comportamentalmente (Aguilera y Caputi 2003) existe a nivel de receptores utilizamos el procedimiento clásico de mantener una secuencia de estímulos constantes y cambiar de forma súbita el mismo, mediante una función escalón (0-1).

El análisis se divide en dos partes, las características de la respuesta después de adaptada, o en estado estacionario y el estudio de la adaptación de la descarga ante cambios escalonados de la LEOD.

En resumen, nuestros hallazgos indican que los cambios escalonados en la impedancia de un objeto en el centro del campo receptivo causa un escalón también en la respuesta, seguido de una adaptación rápida y parcial de la misma.

4.1. Campo receptivo con objeto metálico

El campo receptivo fue explorado con un cilindro de metal (1 cm de diametro y 3 de largo) en posición vertical a una distancia de 1 mm de la piel. Ambos tipos de receptores muestran un perfil tipo “sombrero mexicano” con centro “On” y periferia “Off”

Los receptores MP no eran el objetivo de este proyecto, de todas formas, decidimos estudiar su campo receptivo para compararlo con los receptores B. Dado que los receptores MP (vía rápida) descargan de manera muy sincronizada su actividad se ve como un gran potencial de campo. La descarga ocurre alrededor de 2 ms después de la DOE y es difícil obtener una espiga única como en la que se pudo registrar en este estudio (figura 4.1A) arriba. Esta aferente disparó, en reposo, con una latencia de 1.62 ms y un error estandar de 10 μ s.

El cambio en la latencia en estos receptores es pequeño (menos de 15 μ s) pero aún así significativo (figura 4.1B). Confirmamos estudios anteriores que han mostrado que estos

receptores tienen un código de latencia con una precisión en el orden de microsegundos y no muestran adaptación (Szabo y col. 1975).

Los receptores B tienen una modulación mayor que los marcadores de pulso en todas sus variables. La figura 4.1C muestra la modulación de la latencia de hasta cuatro espigas de un receptor. Las figuras 4.1D, E y F muestran la latencia de la primera espiga, el intervalo entre la primera y la segunda descarga y el número de espigas de otro receptor, respectivamente. En todos los casos el objeto estaba quieto y los promedios fueron hechos luego de que el receptor adaptara su descarga. Todas las variables muestran el mismo perfil de sombrero mexicano, con centro "On".

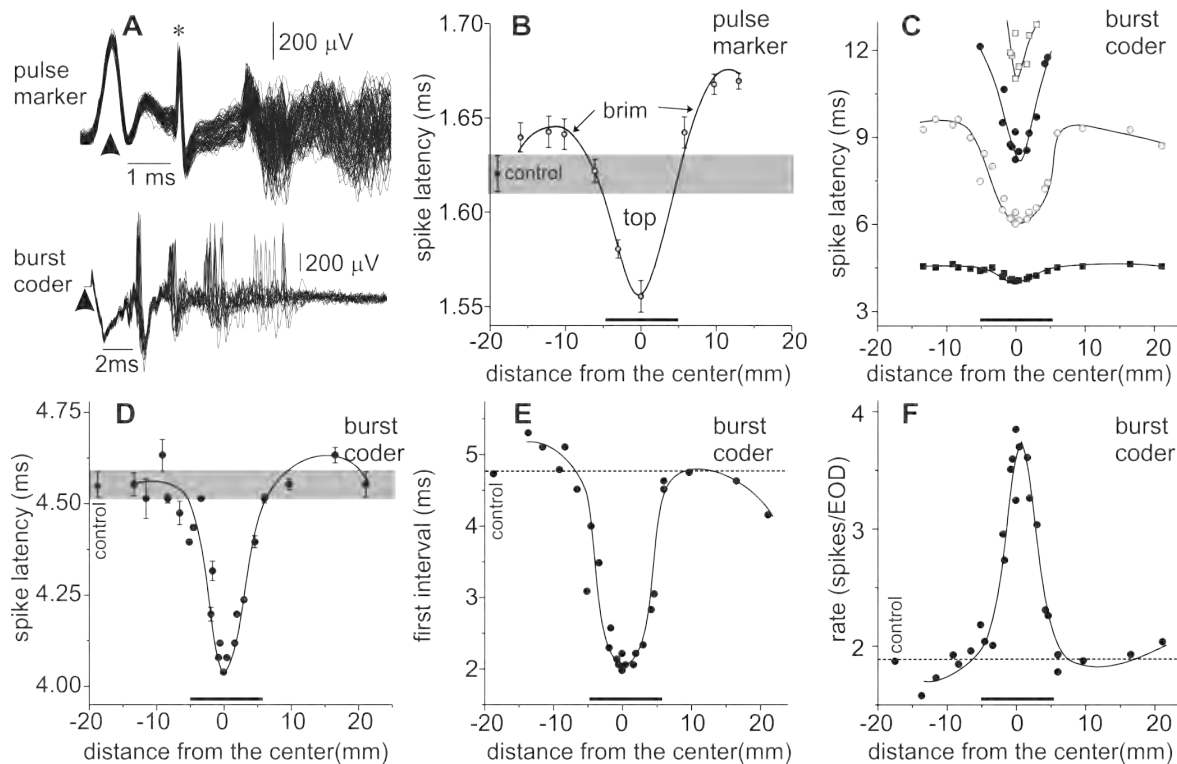


Figura 4.1: **Campo Receptivo** A) registros superpuestos de un marcador de pulso (arriba) y de un Receptor B (abajo). El marcador de pulso tiene una única descarga y de muy baja variabilidad, mientras que el tipo B tiene 2 ó 3 descargas y la variabilidad aumenta según el orden de aparición. B) Latencia del marcador de pulso según la posición del objeto en su campo receptivo. C) Promedio de las latencias de hasta cuatro espigas de un receptor B según la posición del objeto en su campo receptivo. D) Amplificación de la latencia de la primera espiga en respuesta al objeto en diferentes posiciones del campo receptivo. E) Variación del primer intervalo del receptor B. F) Número de espigas en el campo receptivo de un receptor B.

4.2. Receptores tipo “B”

Registramos 25 receptores tipo B en reposo cuyos trenes de respuesta a la LDOE iban desde 2 hasta 6 espigas (Fig 4.1A, abajo). La latencia de la primera espiga tuvo un rango de entre 3.5 y 4.5 ms (3.82 ± 0.76 media y SD, N=18) y la duración varió entre 4 y 10 ms. La latencia de la primera espiga está relacionada con la ubicación del receptor, cuanto mas caudal, mayor latencia. De todas maneras la gran mayoría de nuestros registros fueron hechos en la región de la fovea, donde la forma de la LDOE es más constante y hay mayor densidad de receptores.

Una observación frecuente fue que el tamaño de las espigas disminuye en la segunda espiga, cuando el intervalo intra tren es muy pequeño y se recupera en las últimas espigas, que generalmente tienen mayor intervalo (3.1A y B).

La primera espiga siempre descarga 1 a 1 con la DOE, el promedio de descargas por DOE fue de 2.68 en ausencia de objetos. El intervalo de cada espiga en el tren aumenta su valor, variabilidad y proporción de fallos en función de su posición en el tren (figura 4.1, abajo. Es importante destacar que la latencia, la duración del tren y el número de espigas son fuertemente dependientes unos de otros, de modo que un sólo parámetro podría caracterizar la respuesta.

4.3. Efecto generados por objetos resistivos y capacitivos

4.3.1. Sensibilidad a la forma de onda

En la figura 4.2 se muestra la respuesta de un receptor a una secuencia escalonada de estímulos. El primer estímulo es generado por un objeto capacitivo y el segundo, por uno resistivo. Para eliminar el efecto de la amplitud del estímulo, se utilizó un capacitor y una resistencia cuyo efecto sobre la energía total de la LDOE (RMS) es el mismo. Por lo que en este caso las únicas diferencias entre los estímulos es la forma de onda (el espectro de frecuencias y de fases). Los rasters (figura 4.2A) e histogramas (figura 4.2B) muestran la diferencia en la respuesta de un receptor durante un ensayo. En todos los receptores estudiados, la latencia y el primer intervalo fue menor y el número de espigas mayor durante el estímulo capacitivo (test de rangos signados para 100 DOEs, $p < 0.001$, con corrección de Bonferroni, N=16).

Bajo el mismo marco conceptual, variamos la resistencia hasta que la respuesta fue indiferenciable entre ambos estímulos (3 unidades). En la figura 4.3 A se muestra el raster de una de ellas. Al igual que en el experimento anterior, el estímulo pasó de capacitivo (azul) a resistivo (rojo). Puede verse que la latencia y el número de espigas se mantienen casi constantes después del escalón. (figura 4.3 B y C. En los tres casos el rms de la LEOD fue mayor para la carga resistiva. En la figura 4.3 D se muestran las formas de onda de las LDOEs registradas

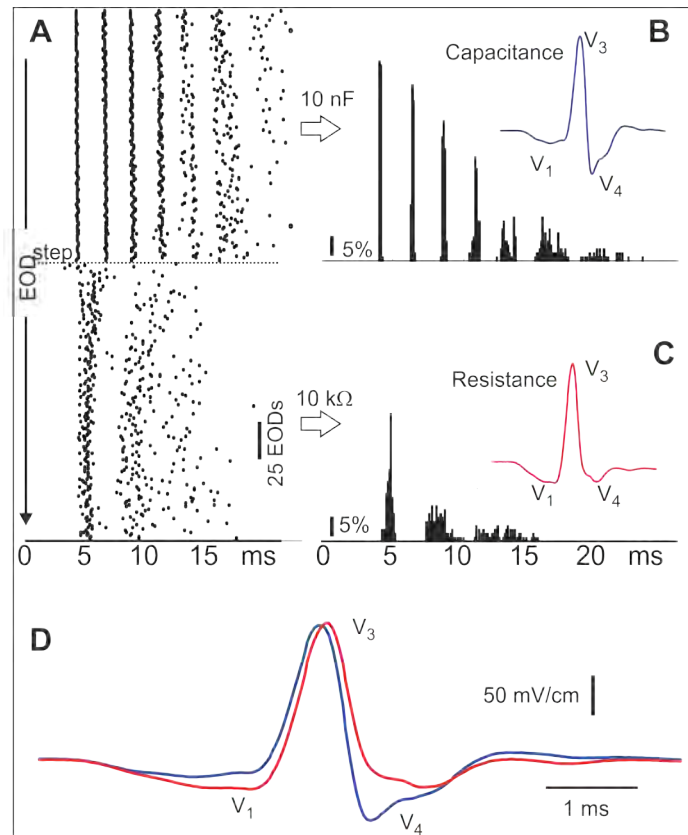


Figura 4.2: **Resistencia vs Capacitor**. Escalones entre estímulos capacitivos y resistivos. El raster (A) y los correspondientes histogramas post-DOE (B y C) muestran un cambio muy marcado después del escalón que pasa de capacitivo (inset en B) a resistivo (inset en C). D) LDOE registrada durante los distintos estímulos (mismos que en los inset de B y C). Puede observarse que la energía total es muy similar pero cambia la amplitud relativa de V_1 y V_4 .

4.3.2. Análisis del espacio perceptual del estímulo

Para explorar el espacio perceptual, en otra serie experimental estudiamos la respuesta de los receptores a resistencias y capacitores con valores diferentes. En la figura 4.4, puede verse un ejemplo con una serie de capacitores. A la izquierda se muestra la LDOE registrada, donde la línea punteada muestra el tiempo de ocurrencia del pico de V_3 de la DOE-HT. Es de resaltar que el capacitor de 33 nF, el cual tiene el mayor RMS pero un curso temporal similar al de las cargas resistivas, causa una respuesta más débil que el de 10 nF. Por lo tanto, para los receptores podría ser más importante la energía en determinada banda de frecuencias o el sincronismo de fase entre algunas frecuencias.

Como referencia del grado de distorsión de la onda con las diferentes cargas, las figuras 4.5A y B muestran cómo se ven afectadas la relación de amplitud entre los picos de la LDOE (V_4/V_3 , figura 4.5A y V_1/V_3 , figura 4.5B) y el RMS con las diferentes cargas aplicadas al objeto (azul=capacitancias, rojo=resistencias). Las formas de ondas de ambos

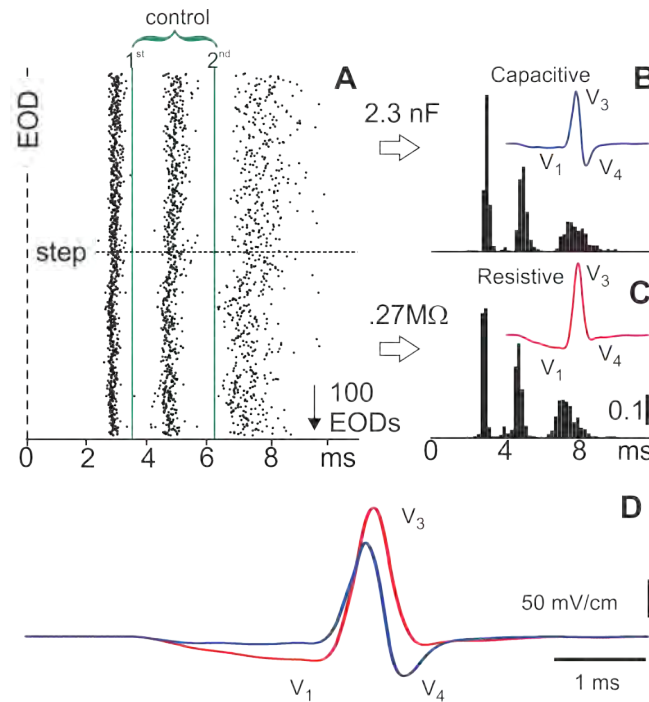


Figura 4.3: **Resistencia vs Capacitor: igual respuesta.** Escalones entre estímulos capacitivos y resistivos pueden causar cambios muy pequeños en las respuestas. El raster en (A) y los histogramas post-DOE (B y C) prácticamente no cambia después de un cambio de estímulo capacitivo a resistivo. En este caso el RMS del estímulo resistivo se ajustó durante el experimento hasta que la energía total del estímulo compensara el aumento en la respuesta por el cambio en la forma de onda que genera el capacitor. Las líneas verdes corresponden a la latencia media de la respuesta de misma aferente en ausencia de objetos, mostrando que ambos objetos están en el campo receptivo y alteran la respuesta. D) Estímulos superpuestos registrados mostrando las diferencias en el curso temporal de ambos (rojo: resistivo; azul: capacitivo)

tipos de objetos convergen en los extremos (circuito abierto (izquierda) y cerrado (derecha)). Teóricamente la relación entre los picos para las diferentes resistencias debería ser constante, pero puede observarse que provocan un cambio casi constante en la relación de los picos (V_4/V_3 aumenta de manera lineal y V_1/V_3 disminuye). Esto es debido al efecto “funneling” (Pereira y col. 2005), pero la distorsión de la LDOE ocasionada es casi despreciable con respecto a la ocasionada por las capacitancias. Puede observarse que el capacitor, además de modificar la amplitud de los diferentes componentes de onda, también modifica el tiempo de ocurrencia del pico máximo de la LDOE con respecto al pico máximo de la DOE-HT.

Las cargas capacitivas provocaron respuestas más intensas que las resistivas con similar RMS. Esta diferencia en las respuestas fue dependiente de las diferencias observadas en la forma de onda (Fig. 4.5A y B). La figura 4.5 muestra un ejemplo (de 6 unidades de las cuales tenemos suficientes registros para realizar el análisis completo). En la figura 4.5C

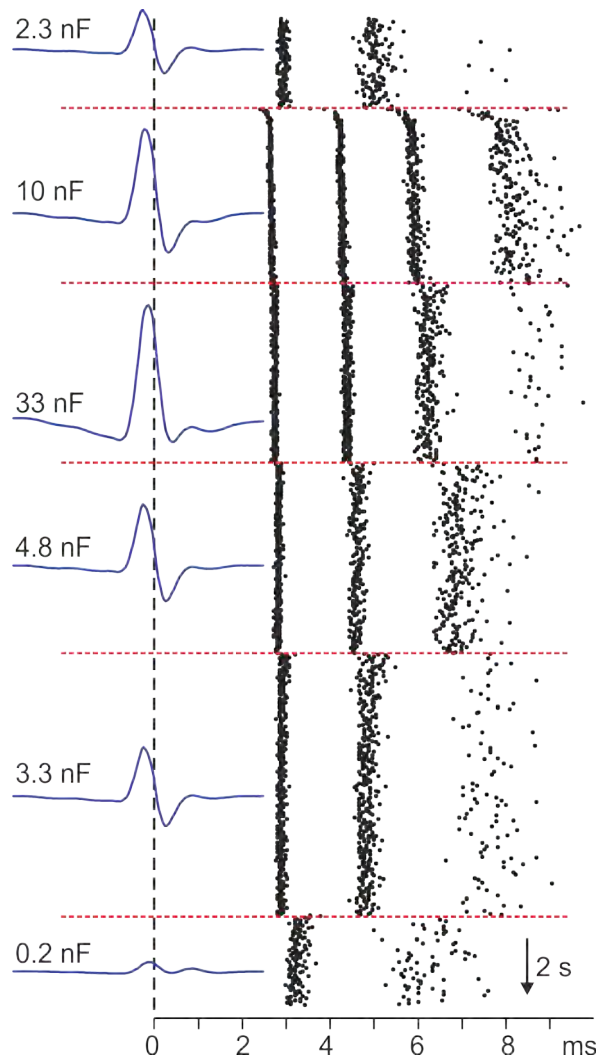


Figura 4.4: **Modulación con escalones capacitivos.** El raster muestra el curso temporal continuo de un experimento en el cual el electrodo de estimulación fue cambiado de manera secuencial con diferentes capacitores. Cada escalón está señalado con una línea roja horizontal. El estímulo correspondiente a cada respuesta, mostrando los cambios en amplitud y curso temporal se muestran a la izquierda. Los estímulos están alineados mediante laq DOE-HT, por lo que los retrasos o adelantos de los diferentes componentes se deben al capacitor. Notar que el capacitor de 33 nF es el que tiene la mayor amplitud, sin embargo la mayor respuesta corresponde al capacitor de 10 nF.

se muestra la latencia de la primera hasta la 5ta espiga (cuando existen) en función del RMS de la LDOE. La respuesta a cargas resistivas (rojo) muestra cambios monotónicos en la latencia con el RMS, mientras que la respuesta a cambios en la capacitancia (azul) muestra la máxima respuesta a valores de RMS intermedios. Estos resultados sugieren que tanto el curso temporal de la onda, así como el RMS actúan de forma sinérgica. Puede observarse que la respuesta máxima de este receptor para cargas resistivas fue de 4 espigas, para los valores de máximo RMS, mientras que para las capacitancias intermedias hay hasta 5 espigas (círculos azules). Ambos extremos de las respuestas convergen, como era de esperarse ya que como dijimos las formas de onda de ambos tipos de estímulos lo hacen.

Aunque la relación de las respuestas entre capacitancias y resistencias es cualitativamente similar al observado en el espacio de estímulos (Fig 4.5A), la diferencia máxima en la latencia de las espigas ocurre en 10 nF y no en 3.3 nF, que es donde ocurre la mayor distorsión de la forma de onda. Dado que las cargas capacitivas cambian tanto el RMS como la forma de onda, el cambio en el máximo sugiere que ambos parámetros tienen efectos sinérgicos sobre la respuesta de los receptores.

4.3.3. Variables de codificación

Dado que los receptores podrían utilizar hasta 3 parámetros de codificación distintos: 1) latencia de la primera espiga; 2) intervalo entre espigas y 3) duración de la ráfaga, estudiamos como se relacionan estas variables entre sí. Además, dada las diferencias que existen en las respuestas a resistencias y capacitores, podría ser que cada una de las variables y/o distintas combinaciones de las mismas, codificaran parámetros diferentes de la LDOE.

En los 6 receptores que fuimos capaces de registrar las respuestas a 6 capacitores y 6 resistencias diferentes, estudiamos la relación entre los parámetros de la ráfaga (Fig 4.6), para determinar si la latencia y el primer intervalo codifican el mismo atributo del estímulo. Encontramos que el logaritmo del primer intervalo es una función lineal del incremento en la latencia de la primera espiga (figura 4.6 $r^2 > 0.95$ en los 12 casos, 6 resistencias y 6 capacitores). Además, la relación muestra pendientes muy similares, sin diferencias significativas entre las respuestas a las resistencias y las capacidades (Test de rangos signados, $p=0.4$, $N=6$). Los datos obtenidos con los cilindros metálicos dan resultados similares ($r^2 > 0.90$), aunque en este caso la modulación es por posición del objeto y la modificación de la forma de onda es menor. Esto indicaría que la información de la latencia y del primer intervalo es redundante.

4.3.4. Adaptación de la respuesta

Los escalones causaron cambios abruptos en la latencia de la primera espiga, el intervalo entre espigas dentro del tren y el número de espigas. Este efecto fue máximo en la primera DOE después del escalón (Fig. 4.7A) y mostró una rápida adaptación en los tres parámetros (Fig 4.7B-G). El curso temporal de la adaptación se ajustó bien con una función hiperbólica (Fig. 4.7B-D), Esta función coincide con la función de adaptación de los receptores de los gymnotiformes de onda (Benda y col. 2005; Clarke y col. 2015). Otro

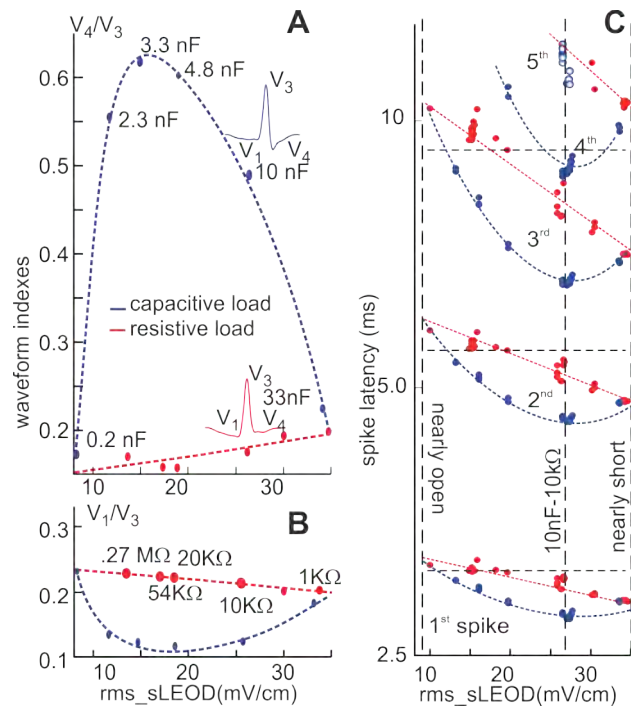


Figura 4.5: **Curso temporal vs RMS.** Los gráficos A y B muestran la relación entre dos índices de los estímulos (LDOE registrada en el objeto) Vs su RMS cuando el objeto de estimulación fue cargado con capacitores (líneas y símbolos azules) o resistencias (líneas y símbolos rojos) de diferentes valores. Los dos índices fueron calculados como el cociente entre el pico negativo inicial de la LDOE y el pico positivo (V_4/V_3 , A) y como el cociente entre el pico negativo inicial de la LDOE y el pico positivo (V_1/V_3 , B). Latencias de las espigas de un receptor registradas en el mismo pez mientras se registraban las LDOEs mostradas en A y B. Notar que mientras que para los estímulos resistivos (en rojo) la latencia disminuye de manera lineal con el RMS de la LDOE, para las cargas capacitivas la relación no es lineal. La latencia disminuye de manera más rápida con el RMS que con las resistencias hasta un mínimo en 10 nF para volver a aumentar aunque el RMS continúe en ascenso. En este receptor solamente el mejor estímulo capacitivo es capaz de evocar una quinta espiga.

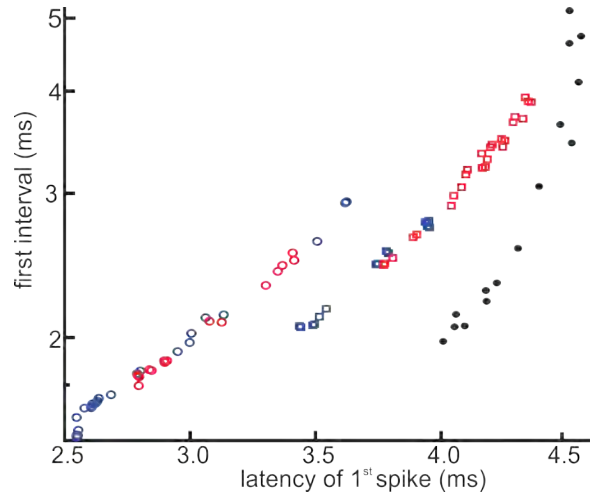


Figura 4.6: **Correlación entre la latencia y el primer intervalo.** Se comparan los gráficos obtenidos de tres receptores diferentes. Análisis estadístico: a) receptor marcado con símbolos cuadrados: Capacitancia (azul), $r=0.99$, $r^2=0.98$, pendiente=1.2, $N=12$; resistencia (rojo), $r=0.99$, $r^2=0.99$, pendiente= 0.94, $N=27$; b) receptor marcado con círculos: capacitancia (azul), $r=0.99$, $r^2=0.99$, pendiente=0.8, $N=20$; resistencia (rojo): $r= 0.99$, $r^2=0.99$, pendiente=0.80, $N=15$. Círculos negros corresponden a datos obtenidos durante la exploración del campo receptivo con un cilindro metálico ($r^2 > 0.90$).

aspecto que podría ser importante en la codificación es la variabilidad en la precisión temporal. Las espigas que con diferentes estímulos que descargan a latencias similares pero tienen posición en la secuencia, muestran diferente variabilidad. Observar en la figura 4.7E, la tercer espiga (puntos azules antes del escalón: tiempo=0) ocurre a una latencia similar a la cuarta espiga después del escalón (puntos verdes), sin embargo es notorio que después del escalón la variabilidad es menor.

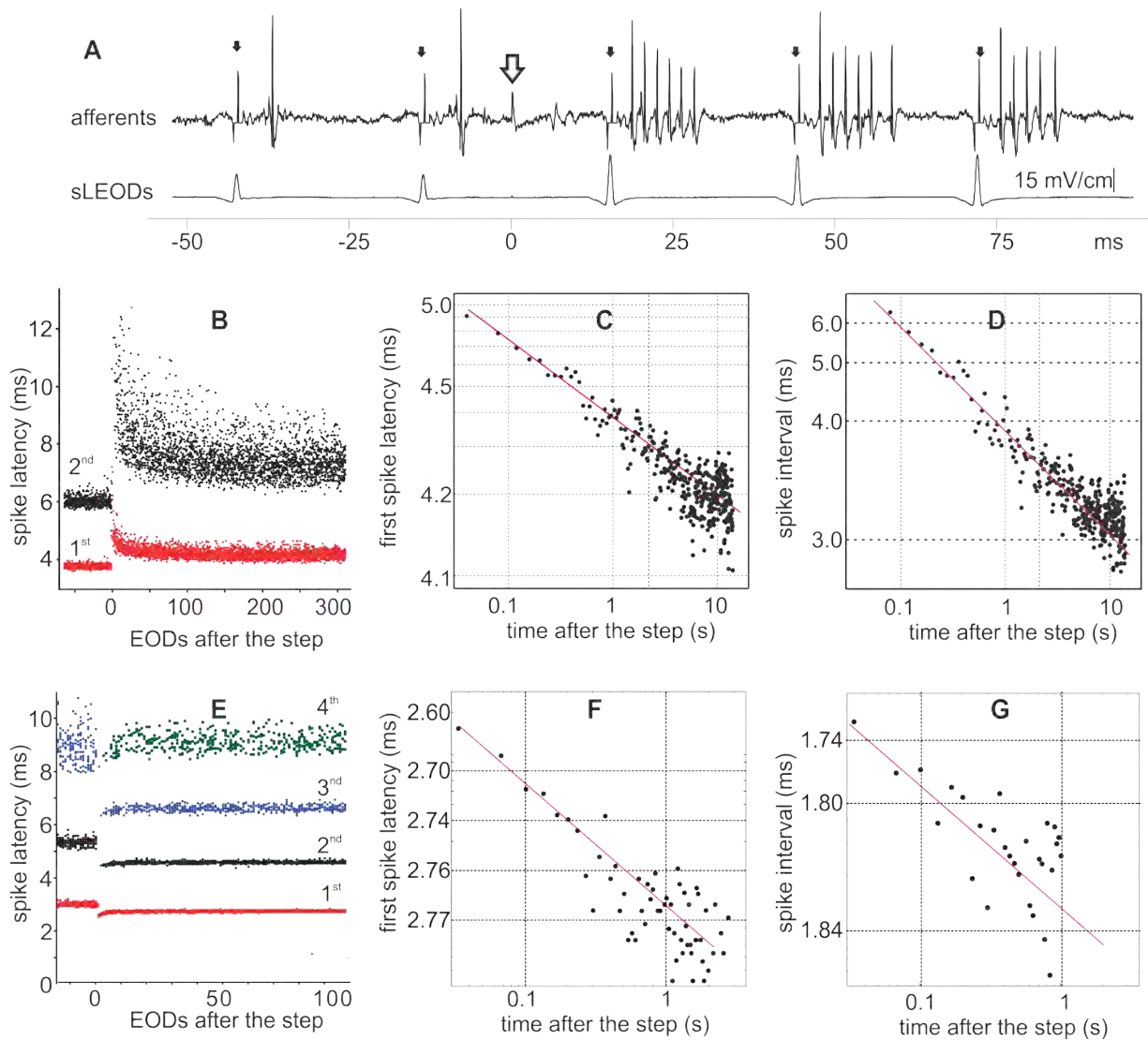


Figura 4.7: **Adaptación de la descarga.** A) Registro crudo mostrando el cambio en la respuesta de un receptor cuando cambiamos la resistencia del objeto de $2.5 \text{ M}\Omega$ a $1 \text{ k}\Omega$. B) Diez rasters superpuestos mostrando la adaptación de la latencia de las dos primeras espigas después de un escalón de un estímulo de mayor a menor intensidad. C) Latencia promedio de la primera espiga de las 10 repeticiones en función del tiempo después del escalón. D) Intervalo promedio entre la primera y la segunda espiga de las 10 repeticiones en función del tiempo después del escalón. E) Diez rasters superpuestos mostrando la adaptación de las primeras cuatro espigas después de un escalón aumentando la amplitud de la LDOE. F) Latencia promedio de la primera espiga de las 10 repeticiones en función del tiempo después del escalón. G) Intervalo promedio entre la primera y la segunda espiga de las 10 repeticiones en función del tiempo después del escalón. Los paneles de B a D corresponden a un electrorreceptor y de E a G a otro.

Capítulo 5

Estructura y fisiología de las células del LE

En la primera parte de este capítulo confirmamos la similitud de tipos neuronales y estructura general del LE entre *G. omarorum* y los gymnotiformes de onda. En la segunda parte abordamos desde tres puntos de vista la electrofisiología del LE: potenciales de campo; registros de unidades en el pez descerebrado y registros crónicos con el pez en libre movimiento. Los resultados de la anatomía y de los potenciales evocados reportados en este capítulo fueron publicados en Pereira y col. 2014 (se adjunta). Los patrones basales de descargas unitarios fueron publicados también en Pereira y col. 2014. El estudio más exhaustivo sobre la modulación y adaptación de la descarga de dichas unidades constituye la base de un manuscrito enviado para su publicación (“Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”, se adjunta). Las figuras fueron extraídas y modificadas en algunos casos, para adaptarlas al presente texto.

5.1. Anatomía del Lóbulo Eléctrico

La estructura del LE de *G. omarorum* es muy similar a lo reportado en peces de onda. (Castello y col. 1998; Maler 1979; Réthelyi y Szabo 1973; Sas y Maler 1987; Shumway 1989); Si bien no está hecha la correlación anatómica y electrofisiológica de casi ninguna célula del LE de *G. omarorum*, para que el lector tenga una referencia de la red estudiada, se hace un breve resumen estructural del LE.

En la figura 5.1A se muestra un corte transeversal del LE a la altura del núcleo relé (R en la figura), con tinción de Nissl. Como en todos los gymnotiformes, el LE muestra tres mapas tuberosos (i.e que reciben proyecciones de los electrorreceptores tuberosos) lamina-dos (fig. 5.1A, CM, centromedial; CL, centrolateral; L,lateral). La metodología empleada consistió en inyección de neurobiotina en el lemnisca lateral (ver capítulo 3).

Las diferentes capas son según Maler y col. 1981 (en adelante utilizaremos las siglas en inglés ya que es como se encuentra en toda la bibliografía): (1) Capa de las fibras profundas (DFL, por sus siglas en inglés: Deep Fiber Layer) la cual contiene las fibras de

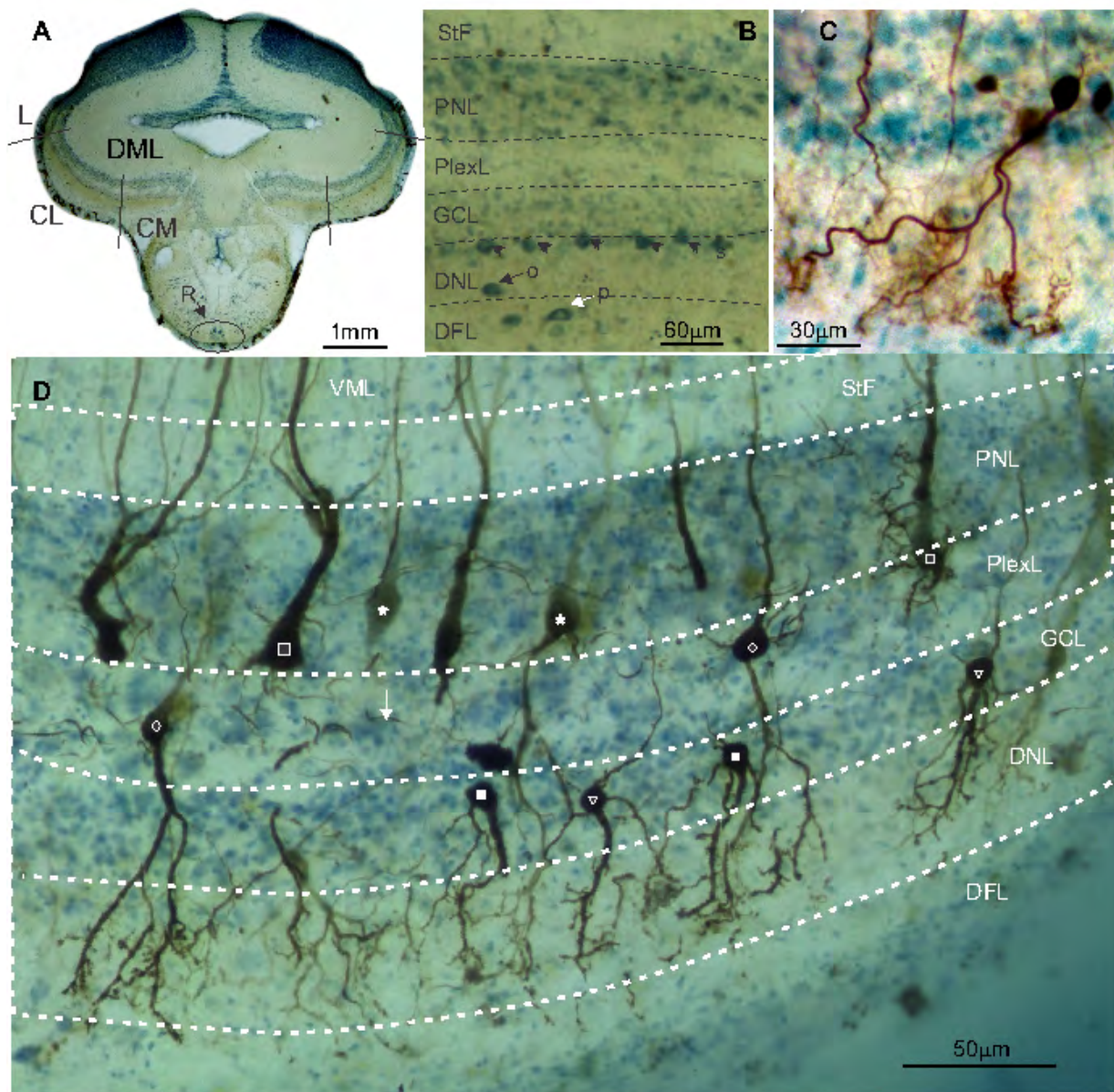


Figura 5.1: **Anatomía** A) Corte transversal del LE a la altura del núcleo relé (R), con tinción de Nissl. Se pueden observar los tres mapas tuberosos laminados CM, centromedial; CL, centrolateral; L, lateral. B) Diferentes neuronas pueden observarse en las capas más profundas: Multipolar (flecha blanca), ovoide (flecha negra) y esférica (doble cabeza de flecha). Neurona basilar “calva” marcada de forma retrógrada. D) Capas celulares y neuronas eferentes reveladas con el procedimiento con Avidina-Diamino bencidina. Solamente las neuronas eferentes fueron marcadas dado que la inyección de Neurobiotina fue en el lemnisco lateral. Reproducida de Pereira y col. 2014

las células aferentes y los somas de las células multipolares (flecha blanca en fig 5.1B). (2) Capa profunda de neuropilo (DNL, deep neuropil layer), donde las aferentes hacen contacto con las dendritas basilares (fig 5.1C) de diferentes células, cuyos somas pueden estar en diferentes capas. El límite entre la DFL y la DNL está marcada por la presencia de células ovoides que están presentes también en la DNL (flecha negra en la fig 5.1B). Estas células así como las multipolares llevan señales inhibitorias tanto ipsi como contralateral del propio LE (Berman y Maler 1999; Maler y Mugnaini 1994). Datos no publicados de Caputi y Castelló muestran en estas células, en *G. omarorum*, tinción inmunohistoquímica para GABA. El límite superior de esta capa está marcada por la presencia de las células esféricas (cabezas de flecha en fig 5.1B). Éstas son las únicas que reciben sinapsis de los receptores de pulso, siendo el único tipo neuronal del LE que participa de la vía rápida. (3) Capa de los granos (GCL, Granule cell layer) debe el nombre a la abundancia de las inter-neuronas “grano”, aunque también se encuentran marcadas neuronas eferentes con árbol dendrítico basilar bien desarrollado. Estas neuronas eferentes pueden ser de dos tipos, con árbol dendrítico apical (“deep basilar pyramids”, fig 5.1D, triángulo hacia abajo) o sin él (denominadas calvas, fig 5.1C y D, triángulo hacia arriba). (4) Capa plexiforme (PLexL, Plexiform layer) contiene neuronas piramidales basilares intermedias (fig 5.1D, círculos), neuronas polimórficas y axones eferentes hacia centros superiores (fig 5.1D, flecha blanca). (5) Capa de las neuronas polimórficas (PNL, polymorphic neural layer) contiene los somas de todas las células piramidales que pueden ser clasificadas como basilares (fig 5.1D, asteriscos) o no basilares (fig 5.1D, cuadrados) según tengan o no dendritas basilares. (6) Estrato Fibroso (StF, stratum fibrosum), está compuesto por axones descendentes del núcleo praemientialis (Prae), (7) Capa molecular ventral (VML, ventral molecular layer) en el cual las terminales de las fibras del Prae e interneuronas inhibitorias contactan las raíces de las dendritas de las células piramidales (Maler 1979) (8) Capa molecular dorsal (DML, dorsal molecular layer), que contiene los árboles dendríticos apicales de las neuronas piramidales y fibras descendentes de la eminencia granular posterior (EGP) del cerebelo.

5.2. Electrofisiología del Lóbulo Eléctrico

Parte de los resultados correspondientes a este capítulo fueron publicados en Pereira y col. 2014 y en Rodriguez y col 2017b (enviado).

Las neuronas del LE no responden 1 a 1 con la DOE, pero sí tienen un patrón post-DOE bastante definido. De acuerdo a lo mostrado en el capítulo 4, reciben de las aferentes la información en un código basado en el intervalo inter espigas del tren y la latencia de la primera espiga. Sin embargo, según nuestros resultados las neuronas del LE no recodifican esta información en el mismo “lenguaje”, sino que el patrón post-doe y la fase en que descarga probablemente tenga información adicional a la codificada por la tasa de descarga.

Las neuronas del LE, al igual que los receptores muestran adaptación. Esta adaptación puede tener tres causas: 1) la adaptación de los receptores que las estimulan 2) propiedades intrínsecas y 3) la influencia de centros superiores que contactan los árboles dendríticos apicales

Los neuronas registradas en peces crónicos (con el cerebro completo) en libre movimiento muestran patrones similares a algunas de las neuronas registradas in-vitro, por lo que este patrón registrado no estaría determinado por la descerebración.

5.2.1. Potenciales de campo evocado por la DOE en animales descerebrados en ausencia de objetos

La secuencia de activación de los diferentes componentes en las distintas regiones fue similar en los 7 peces registrados, con pequeñas diferencias, debido a la temperatura (entre 17 y 23 grados) y/o posición de los electrodos. Esto sugiere que la red neural del LE tiene un patrón de respuesta estereotipado en estas condiciones. De todas maneras, la interpretación de los potenciales de campo requiere del conocimiento y correspondiente correlación con la anatomía de la estructura estudiada. Un sumidero de corriente ocurre cuando un grupo de neuronas vecinas son depolarizadas de forma sincrónica. La depolarización implica una corriente entrante hacia las neuronas (i.e el soma). Dado que esa corriente entrante tiene que salir en otro punto de las neuronas, generando así una fuente de corriente. Por lo tanto, en una estructura regular como lo es el LE, éstas fuentes y sumideros representadas en función del tiempo nos muestran cómo evoluciona la actividad de la estructura y qué partes están activas de la red a diferentes momentos después de la actividad.

Como se describe en la sección 5.1 las fibras aferentes tuberosas se dividen en tres para inervar de manera paralela a cada uno de los 3 mapas somatotópicos del LE (el mapa medial, que recibe aferentes ampulares no fue estudiado). Estos 3 piscículos son paralelos y están orientados a 45 grados con respecto al eje longitudinal del pez (cabeza rostral y medial). Las capas de los granos, la plexiforme y la polimórfica, que contienen la mayoría de los somas neuronales, muestran una concavidad hacia arriba centrada a lo largo del eje principal del LE. Mientras que el mapa centro-medial es prácticamente horizontal, el lateral es prácticamente vertical. Esto implica que cuando el electrodo penetra el LE en los diferentes mapas tendrá una orientación diferente relativa a los ejes celulares según en qué mapa esté ubicado.

Teniendo en cuenta esta geometría y que según Maler (Maler 2009), el LE está ordenado en forma columnar, primero estudiamos el curso temporal de la actividad en una línea perpendicular al mapa centro-medial (fig 5.2). Los registros fueron hechos de forma simultánea con un electrodo de 16 canales (3 peces) o de forma consecutiva (4 peces) en puntos igualmente espaciados. Esto nos permitió visualizar el curso espacio-temporal de la actividad en una columna única correspondiente a un punto en la piel del animal. El mapa de color de la figura 5.2 de arriba, muestra estos registros promediados ($N > 100$) El eje horizontal muestra el intervalo inter-DOE y el vertical la profundidad. Ambas dimensiones fueron interpoladas con Matlab para una mejor visualización. El código de colores corresponde al potencial registrado entre cada punto y el electrodo de referencia. Tres trazos (V vs t) fueron superpuestos en el mapa de color como referencia, en la correspondiente profundidad. Se destacan 3 picos a 3 diferentes tiempos en el trazo del medio, denominados N7, N13 y N23. A la derecha se muestran la ubicación aproximada de las diferentes capas

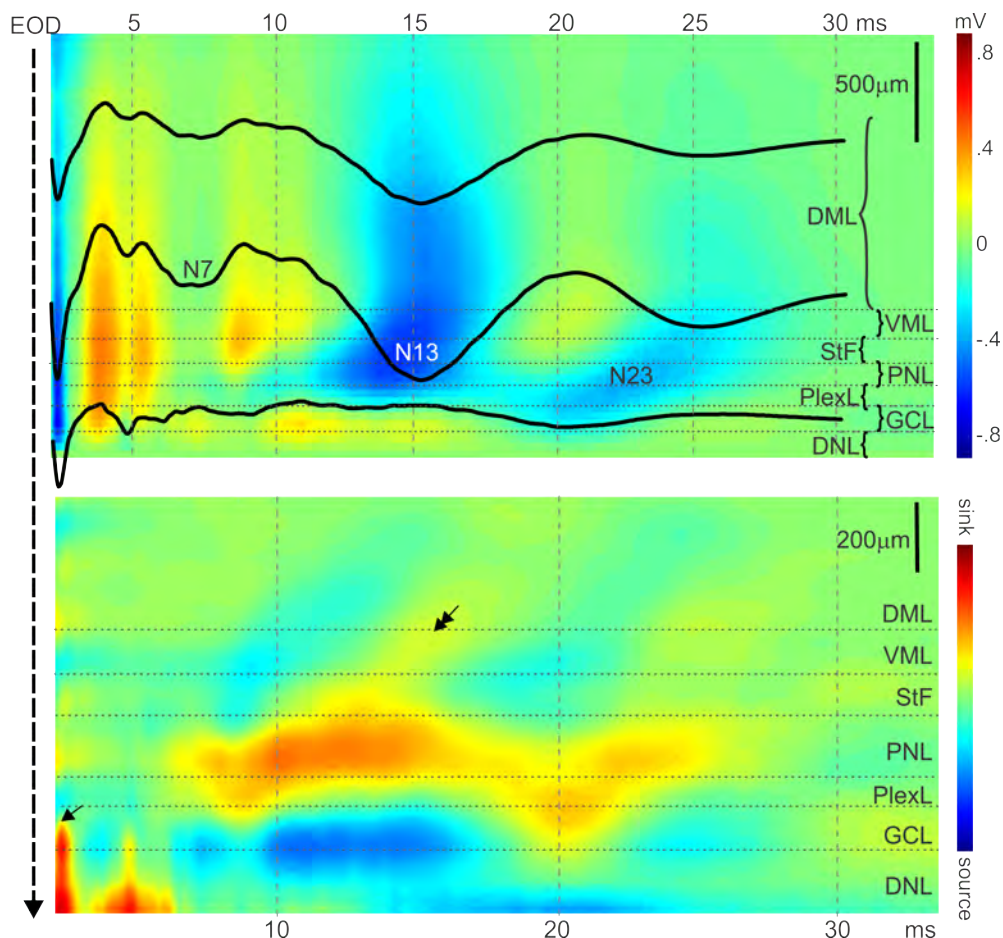


Figura 5.2: **Potenciales de campo evocados por la DOE.** A) Mapa de colores del perfil espacio temporal del potencial de campo. El eje vertical corresponde a la profundidad desde la superficie del LE y el horizontal corresponde al tiempo. El tiempo Cero es el pico de la DOE. El código de colores indica el potencial registrado entre cada punto y un electrodo de referencia lejano. Los perfiles histológicos y las capas son indicadas en cada posición de registro (las capas tienen las mismas siglas que en la fig 5.1. DML: dorsal molecular layer; VML: ventral molecular layer; StF: stratum fibrosum; PNL: polymorphic layer; PlexL: plexiform layer; GCL: granule cell layer; DNL: deep neuropil layer). Los registros crudos superpuestos, en negro, corresponden al curso temporal de los potenciales registrados a 600, 1350 y 2000 μm de profundidad. B) Mapa de colores mostrando la segunda derivada espacial del potencial (equivalente en este caso a la divergencia del campo eléctrico) mostrado en (A). Al igual que en A, los datos fueron interpolados espacialmente después de calculada la segunda derivada. Explicación en el texto. Reproducida de Pereira y col. 2014.

descritas en la figura 5.1. Las líneas punteadas representan sus límites.

La actividad en el LE comienza con una negatividad muy pronunciada y breve a los 2 ms después de la DOE, que corresponde a llegada de la ráfaga de activación de la vía rápida. A continuación puede apreciarse una positividad en la DNL, más lenta y doble que corresponde a la llegada de la vía lenta, menos sincrónica que la vía rápida. Posiblemente la segunda positividad, mas leve, se deba a la una segunda descarga de algunos receptores. En el período que va de 5 a 8 ms ocurre una pequeña negatividad en PlexL y PNL, (marcada como N7, previamente identificada como actividad de la vía lenta en Pereira y col. 2005). En 8 ms ocurre una positividad en la franja donde se ubica el StF y la VML (mayoría de los somas piramidales). Esta actividad es sustituida por una gran negatividad que se extiende desde estas mismas capas hasta la PNL por debajo y la DML por encima (N13). La última actividad a destacar es la marcada como N23, que comienza en la DNL y se propaga hacia arriba hasta la DML de forma difusa en espacio y tiempo.

Al estar alineados los puntos de registro con la orientación de la mayoría de las células es válido calcular la segunda derivada espacial, ya que las corrientes fluirán en el sentido de la ubicación de los electrodos. De esta forma podemos observar en un mapa bidimensional los gradientes de potencial y la ubicación de las fuentes y sumideros en las diferentes capas en función del tiempo (figura 5.2B, el eje horizontal corresponde al tiempo y la vertical al gradiente de campo). El primer sumidero (2.6ms, flecha) corresponde como dijimos en 5.2A a la vía rápida. Tiene una fuente muy pronunciada en la DNL que se continúa hasta la GCL, donde se ubican los somas de las células esféricas.

La actividad de la vía lenta se puede observar también como un sumidero pero restringido a la parte más ventral de la DML. En 7 ms el sumidero se ubica en la PNL (ubicación de los somas piramidales) con su correspondiente fuente en el límite entre la GCL y la DNL (ubicación de las dendritas basilares de las piramidales basilares y las calvas). También tiene una fuente más débil en la zona del StrF y la VML (dendritas apicales). Este sumidero desciende un poco y vuelve a subir para ubicarse en la zona de la PNL exclusivamente (entre los 10 y 15 ms). En este momento el sumidero se continúa (aunque débil, flecha doble) hacia la VML y progresa hasta la DML. Luego, en 20 ms el sumidero vuelve a zonas más profundas, ocupando parte de la PlexL y GCL. La fuente en este caso es también doble, débil en la zona apical (ZtF y VML) y más fuerte y concentrado en la zona más ventral del registro. La actividad termina con el sumidero principal en PNL nuevamente con su fuente en la GCL.

5.2.2. Patrón de descarga neuronal unitaria basal y respuesta a objetos resistivos

Los tipos electrofisiológicos principales registrados fueron publicados en Pereira y col. 2014. En dicha publicación fueron analizadas 84 unidades registradas en condiciones basales de estimulación (DOE natural sin objetos). Las neuronas fueron agrupadas según el histograma de descarga post-DOE. Ninguna neurona registrada en el LE descarga de forma homogénea en todo el intervalo inter-DOE (Fig 5.3). Todos tienen al menos una moda

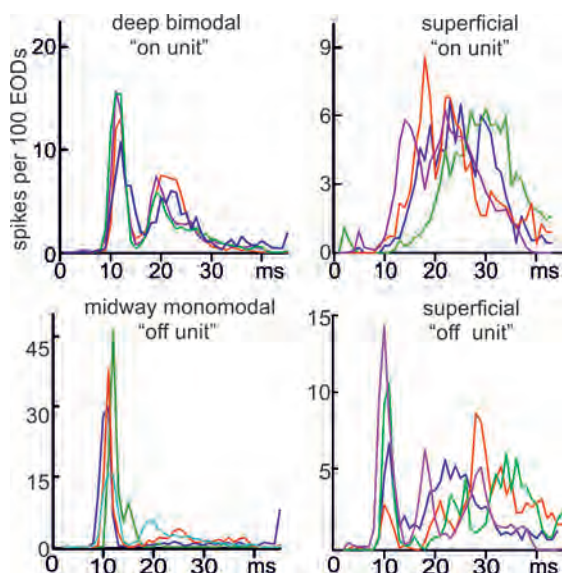


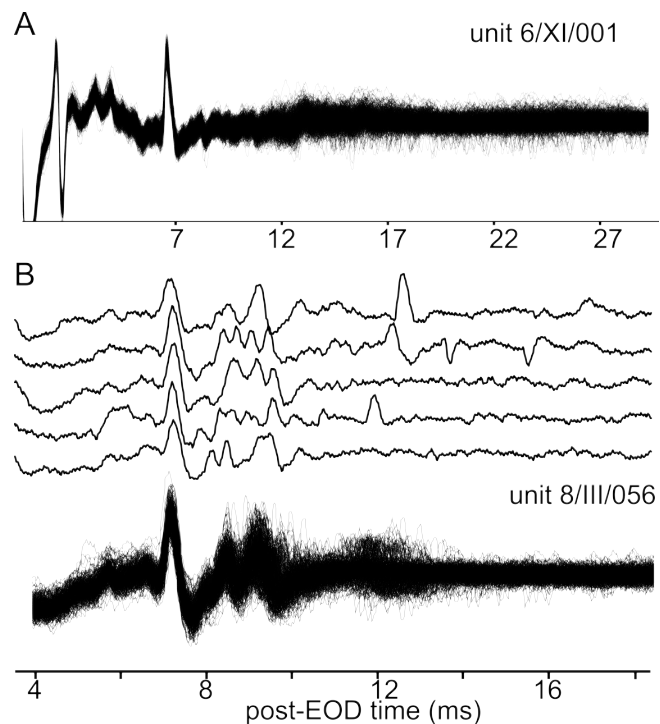
Figura 5.3: **Perfiles de descarga post-DOE** Perfiles de descarga unitaria. Histogramas post-DOE de 4 tipos celulares identificados según su patrón de descarga en ausencia de objetos: Bimodales, monomodal tardía (superficial “On”), monomodal (“Off”), multimodal o superficial “Off”.

clara, y pueden llegar a tener 3 ó 4 modas. Éstas modas tienen cierta variabilidad según el pez y la temperatura pero tienden a ser en intervalos claros: 5 ms, 12 ms, 20, ms y/o 30 ms (Fig 5.3). En una segunda tanda de registros fueron analizadas 49 unidades, claramente identificadas mediante el algoritmo de clasificación de espigas, provisto en el software de registro y análisis Sciworks. En estas últimas también se registró la actividad en respuesta a objetos resistivos colocados en el lugar del campo receptivo que más afectaba el patrón o la frecuencia de descarga. En esta tesis nos enfocamos en la modulación y análisis de aquellas unidades con un patrón post DOE que se repitió en al menos 5 unidades ($n=36$).

Las diferentes categorías de células fueron clasificadas como células “On” si aumentaban su descarga al aumentar la conductividad del objeto, y como células “Off” en caso contrario. Dos categorías de células “On” con diferentes profundidades preferenciales e histogramas post EOD fueron registradas: 1) unidades bimodales ($n=9$), ubicadas entre 50 y 100 micras por encima de las aferentes, con la primer moda cerca de 12 ms después de la DOE y la segunda, más dispersa, entre 17 y 25. 2) Monomodales tardías, ubicadas entre 150 y 250 micras por encima de las aferentes. Estas neuronas tienen la moda alrededor de 24 ms y son las que tienen la distribución con mayor variabilidad. También encontramos 3 tipos de células “Off”, localizadas a profundidades similares 1) Monomodales tempranas ($n=6$), a 200 micras (175 ± 68) por encima de los receptores, con una moda muy aguda temprana en 12 ms. y 2). Células multimodales ($n=12$, 191 ± 58) con modas en 5 ms, 12 ms y una o a veces dos modas después de los 20 ms y 3 células con inhibición central.

Se muestra el análisis de la respuesta a cambios en la conductancia de un objeto solamente en las neuronas pertenecientes a alguna de estas 5 categorías y el patrón basal de una sexta categoría, de muy baja variabilidad en la fase de descarga, la cual denominamos (según esta propiedad y no por sus modas) como “fase fija”.

Figura 5.4: **Unidad con descarga en fase fija** Las unidades fase fija muestran latencias cortas y muy baja desviación estándar (A) En un pez la unidad descargó 1 a uno con la DOE. Notar en el registro la baja variabilidad en el tiempo de ocurrencia ($SD=0.02$) para mil espigas superpuestas. (B) Cinco descargas seleccionadas y 1000 trazos superpuestos de otras dos unidades de fase fija. La primera descarga con cada DOE y la segunda cae cerca de 1.7 ms después. La segunda descarga cae al mismo tiempo que una gran actividad basal, tal vez perteneciente a un haz por donde vienen estas unidades. Reproducida de Pereira y col. 2014



Unidades de fase fija

Seis de las unidades registradas en la primer etapa de registros Pereira y col. 2014 se clasificaron como fase fija. Los histogramas post-DOE que corresponden a estas unidades muestran cortas latencias respecto a la DOE y desviaciones estándares muy pequeñas (rango de latencias: 6,6 - 13,7 ms, rango de STD: 0,02 - 0,7 ms, $N = 6$). Estas unidades son, además, las únicas que descargan uno a uno con la DOE y siempre un sólo disparo. En uno de los peces se registró una pareja de unidades de fase fija, separables por la forma diferente del pico, en la cual dispara la unidad temprana o el par (Fig. 5.4). Después del par de espigas se observó un trazo de fondo ondeado (Fig. 5.4B, trazos individuales), lo cual sugiere que este par de unidades pertenece a un haz de fibras. El raster post-DOE y los histogramas de unidades fase fija más variables (desviación estándar 0,61 ms) pueden presentar una pequeña reducción en la variabilidad con las aceleraciones espontáneas de la DOE (Fig 5.4 C, D y E).

Estas neuronas son profundas, como puede observarse en la figura 5.4A se ve la actividad de los receptores de la vía lenta previo a la descarga de esta neurona, en 7 ms. Durante los registros de los receptores era habitual encontrar alguna de estas neuronas. Maler (comunicación personal) afirma que son las neuronas horizontales, las cuales llevan señales inhibitorias cruzadas entre ambos lóbulos. En algunos casos estas neuronas mostraron una leve variación de la latencia en condiciones de reposo. Nuestra hipótesis es que tal vez el pez estuviera moviendo la cola, lo cual afectaría los tiempos de activación de los receptores a ambos lados del LE, provocando esa desviación. La observación fue hecha durante el análisis offline, por lo que no lo podemos afirmar con seguridad. Por otro lado, la única

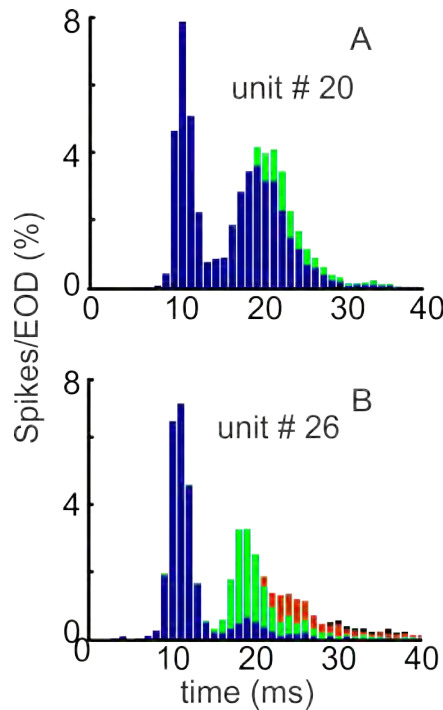


Figura 5.5: **Neuronas Bimodales** Histogramas post-DOE de dos neuronas bimodales en ausencia de objeto. Las barras azules corresponden a la descarga de la primer espiga, las barras verdes a la segunda espiga y las rojas a la tercera. Modificado de "Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*"

manera de afectar de manera significativa la latencia de estas neuronas fue con un objeto contraletaral.

Es importante destacar que el momento de descarga de estas células inhibitorias coincide con una inhibición en la descarga de prácticamente todas los tipos de unidades registradas.

Neuronas "On" bimodales

Registramos 9 neuronas bimodales. Estas neuronas presentan descargas en una de cada tres DOEs (0.33 ± 0.09 , $N=9$), pero no siempre descargan una sola espiga, por lo que su tasa de descarga efectiva fue de 0.4456 ± 0.14 espigas/DOE ($N=9$). La primer moda y mayor en casi todos los casos se ubica alrededor de las 12 ms. La segunda, con menor número de espigas y mayor dispersión se ubica entre 17 y 23 ms. La figura 5.5A y B muestran los histogramas post-DOE de dos neuronas bimodales. Las barras azules corresponden a la descarga de la primer espiga, las barras verdes a la segunda espiga y las rojas a la tercera. La primer moda se debe casi exclusivamente a la descarga de la primer espiga. En algunas casos, ambas modas se deben a una única espiga que descarga en una u otra moda (Fig 5.5A). Cuando hay una segunda descarga normalmente, ésta contribuye a la segunda moda. En otros casos, como en la figura 5.5B, ambas modas se deben casi exclusivamente a la primer espiga, que cae en una u otra. Esto sugiere que reciben dos volleys sinápticos, uno excitatorio en cada moda, o uno lento, excitatorio, y una inhibición que lo modula.

La figura 5.6A es un mapa de colores de histogramas sucesivos antes y después del escalón en la resistencia (abierto-corto-abierto, 28 s-2 s-28 s) del objeto en la misma unidad. El eje horizontal representa el intervalo inter-DOE, el eje vertical son las DOEs ordenadas

a partir del inicio del estímulo (a la izquierda del mapa de colores se muestra el aumento en la conductividad del objeto). Al final del ciclo de 28s en circuito abierto (parte inicial del mapa de colores hasta el escalón) la neurona está adaptada y muestra un patrón post-DOE similar al patrón basal (fig 5.6B, arriba). Después del escalón hacia arriba hay un aumento en la descarga global (ver rate en fig 5.6C, abajo), con adaptación fásico-tónica. El pico inicial baja rápidamente a valores intermedios que sigue bajando lentamente. La adaptación fásica corresponde a la primer moda (fig 5.6C arriba) mientras que la adaptación tónica se observa en la segunda moda (fig 5.6C medio). La probabilidad de descarga en la primer moda baja a niveles inferiores que en circuito abierto y la segunda moda adapta pero se mantiene en niveles de descarga superiores que en circuito abierto y se convierte en la moda principal. Lo opuesto ocurre con el escalón hacia abajo, hay una inhibición global, las velocidades de adaptación de ambas modas es distinta, con rápida adaptación de la primer moda y una adaptación mucho más lenta de la segunda.

En el mapa de color de la izquierda se muestra los histogramas post DOE consecutivos calculados de 29 repeticiones del escalón en el estímulo. El escalón de aumento en la conductividad es por encima de la línea blanca y la disminución por debajo. Cuando se mantiene la conductividad muy baja durante 28 segundos la neurona muestra el mismo patrón bimodal que sin objeto (histograma de arriba en la figura 5.6B). En la figura 5.6C) se muestra la tasa de descarga para la primer moda (arriba), la segunda moda (medio) y para todo el intervalo inter DOE (abajo) promedio para las 9 neuronas bimodales incluidas en este análisis. Tanto en el patrón como en la tasa de descarga puede verse que hay dos adaptaciones, una rápida y una lenta. En el histograma de la primer DOE después del cambio puede verse una disminución en la latencia del primer pico y un aumento en la probabilidad de descarga en todo el intervalo, incluso hay descargas en el hueco a 15 ms que había en reposo y en alta resistencia. Luego hay una disminución en la probabilidad de descarga en la primer moda (incluso a valores inferiores que previo al escalón) con aumento de la latencia a valores mayores que previo al cambio y un aumento significativo en la probabilidad de descarga en la segunda moda (tercer histograma).

Si observamos solamente el rate global (fig 5.6C abajo), se puede observar ambas adaptaciones, rápida y lenta pero se pierde el hecho que éstas ocurren en tiempos post DOE diferentes.

Neuronas monomodales tardías “On”

La respuesta de las monomodales tardías está presente en el 1 de cada 4 DOEs (0.26 ± 0.08 , $N=6$). La respuesta es generalmente una única espiga ($N=4$) o dos ($N=2$) separadas por más de 10 ms cuya latencia es muy variable. Esto determina un histograma post-DOE monomodal y el más disperso de los registrados (figura 5.7A, arriba). La tasa de descarga total fue de 0.31 ± 0.11 ($N=6$). Al poner objetos en su campo receptivo (Fig. 5.7 B-D) estas neuronas muestran un cambio tanto en el histograma post-DOE (Fig. 5.7B y C) como en la tasa de descarga excepto por la tasa de descarga (Fig. 5.7D). Con el objeto de alta resistencia (Fig. 5.7B arriba y C, asterisco) la neurona descarga similar que sin objeto. El cambio más drástico se observa en el histograma de la primer DOE después del escalón

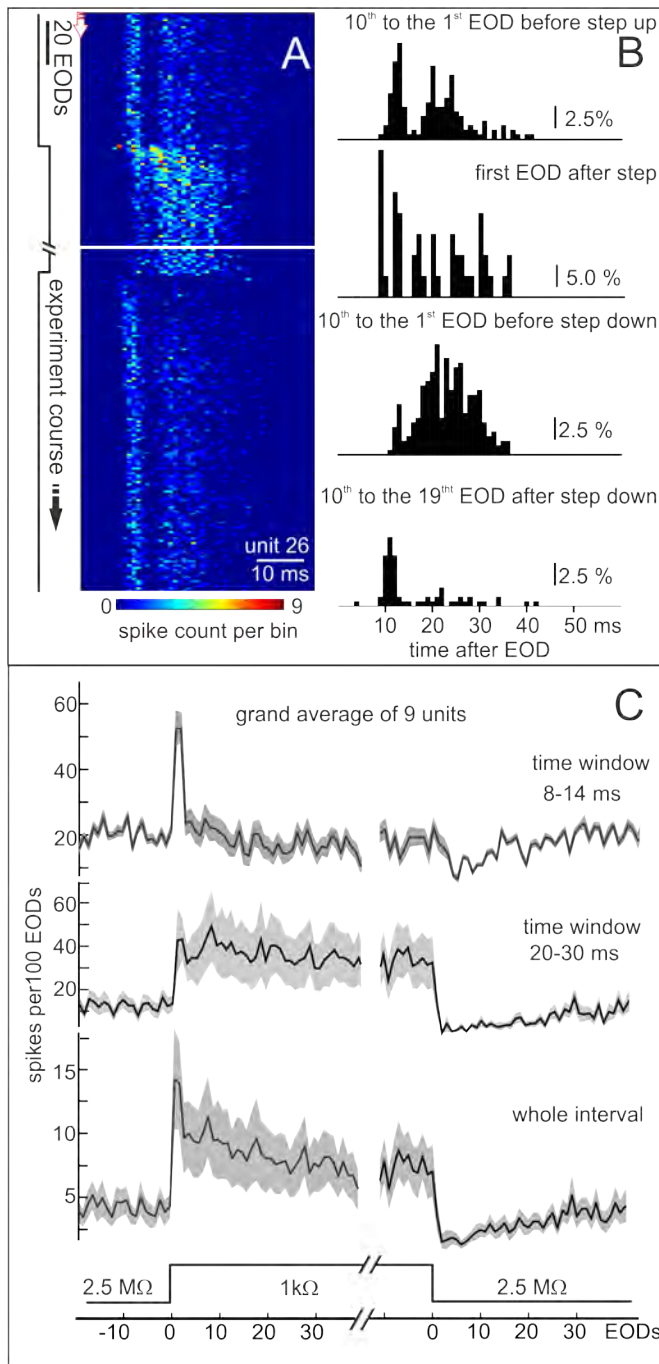


Figura 5.6: **Modulación de neuronas bimodales.** A) Mapa de colores donde se representa el curso temporal de los histogramas observados en 1 ciclo de trabajo de 2-28s. La altura del histograma está codificada en escala de colores. Cada línea horizontal corresponde a un histograma post-DOE. Éstos están ordenados a partir del escalón de aumento en la conductividad ("On") por encima de la línea blanca y la disminución de la conductividad del objeto ("Off") por debajo. B) Histogramas post-DOE correspondientes a 4 tiempos extraídos de (A). Nótese la diferencias de forma entre dichas distribuciones (bimodal antes del escalón, multimodal justo después del escalón "On", monomodal tardía luego de un tiempo de adaptación y monomodal temprana justo después del escalón "Off"). C) se muestra la tasa de descarga para la primera moda (arriba), la segunda moda (medio) y para todo el intervalo inter DOE (abajo) promedio para las 9 neuronas bimodales incluidas en este análisis. Modificado de "Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*".

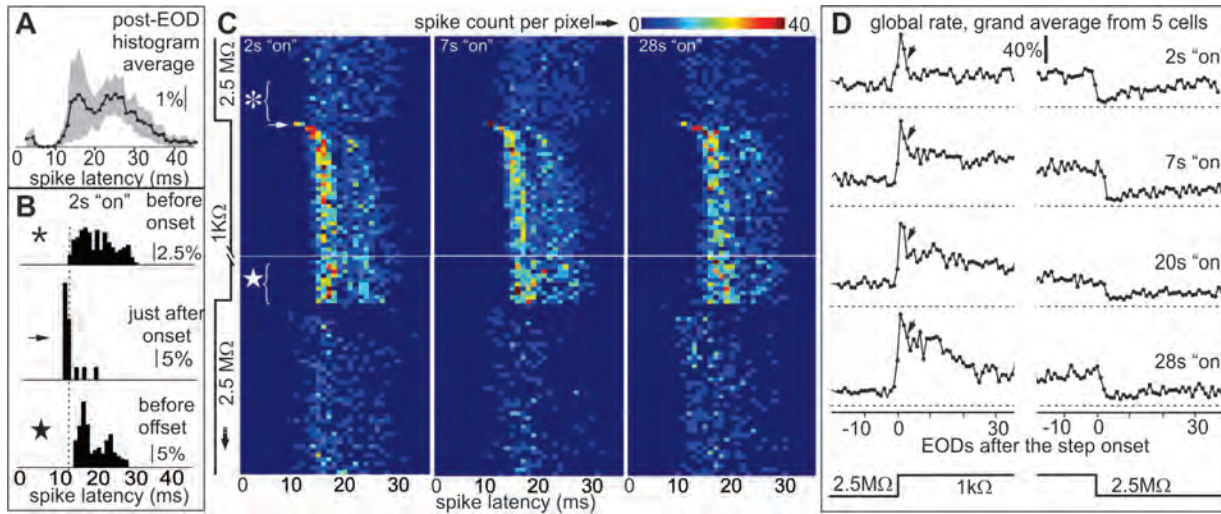


Figura 5.7: **Neurona Monomodal “On” tardía.** A) Histogramas post-DOE promediados de 5 neuronas. B) Histogramas post-DOE del experimento mostrado en C) (panel de la izquierda), antes del escalón hacia arriba (arriba), justo después del escalón (medio), después de adaptado (abajo). Los símbolos indican los tiempos y el número de DOEs de cada histograma en (C). C) Mapas de colores donde se representan los cursos temporales de los histogramas observados en 3 experimentos con ciclos de trabajo de 2-28s, 7-23s, y 28-2s. La altura del histograma está codificada en escala de colores. Cada línea horizontal corresponde a un histograma post-DOE. Éstos están ordenados a partir del escalón “Off-On” (panel de arriba de la línea blanca) y “On-Off” (panel de abajo). D) Tasa de descarga promedio de 5 unidades en las cuales se compararon 4 ciclos de trabajo. Puede observarse que hay una respuesta fásico tónica, donde la respuesta fásica inicial es similar en los cuatro ciclos, pero la caída rápida es mayor en el ciclo 2-28s y menor en el ciclo 28-2s (flechas). Correspondientemente, la adaptación posterior muestra pendientes claramente diferentes. Modificado de “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”.

(Fig. 5.7B, medio) donde la neurona cambia completamente la fase de mayor probabilidad de descarga, siendo ahora la fase inicial, en 9 ms, y con muy baja variabilidad. Luego de este transitorio, una vez que la descarga se estabilizó, la célula mostró un patrón bimodal (Fig. 5.7B, abajo).

La tasa de descarga también mostró un patrón fásico tónico (Fig. 5.7D). El aumento inicial es similar en los 4 ciclos de trabajo utilizados, sin embargo la adaptación rápida de este aumento inicial (flechas en Fig. 5.7), es menor a medida que aumentamos el tiempo con el objeto “encendido”, es decir poco tiempo con la neurona inhibida. El escalón hacia abajo provoca un breve silencio y luego una lenta recuperación.

Monomodales “Off” tempranas

Esta categoría presenta un pico a 12 ms y algunas neuronas presentan una segunda descarga muy poco frecuente y dispersa de forma tardía. que no alcanza a configurar una

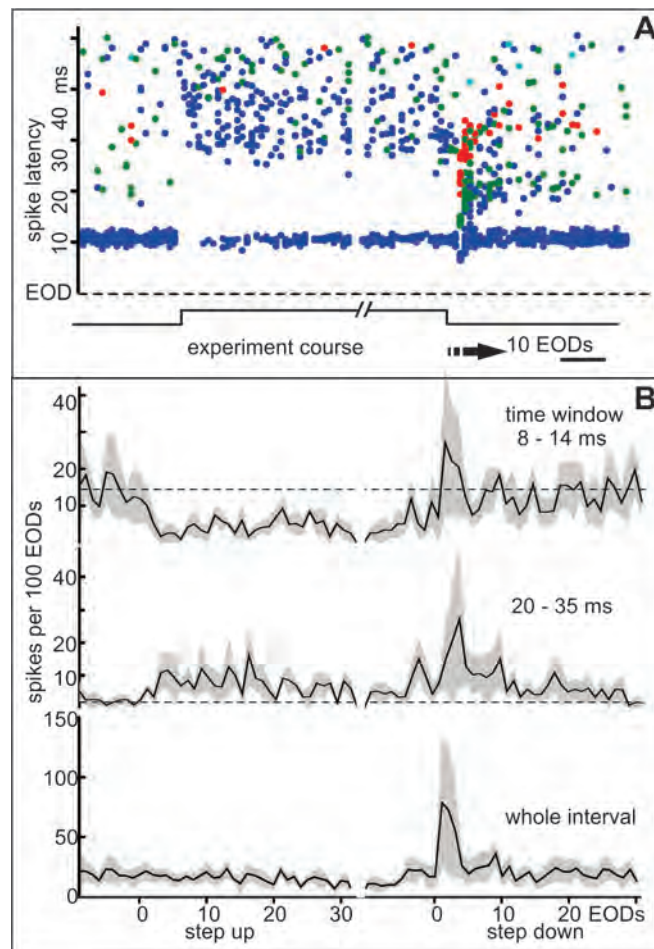


Figura 5.8: **Neurona monomodal temprana.** A) Raster del experimento con ciclo 2-28s. Los puntos azules corresponden a la primera espiga, los verdes a la segunda y los rojos a la tercera. Puede observarse que la neurona se silencia en la primera mitad del intervalo y tiene un aumento compensatorio de la descarga en la segunda mitad del intervalo. La inhibición de la moda en 10-11 ms presenta un breve silencio y luego adapta lentamente al igual que el incremento tardío, en sentido opuesto. B) Se muestra el rate por sub-intervalos (temprano:arriba, tardío: medio) y la tasa global (abajo). Estas neuronas responden de manera fásica al “Off”. Modificado de “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”

segunda moda (Fig. 5.3 abajo, izquierda). Como su nombre lo indica, la probabilidad de descarga de esta neuronas disminuye prácticamente a cero en la moda principal (8-14ms) con objetos conductivos (Fig. 5.8A y B, arriba). Sin embargo tienen un aumento en la probabilidad de descarga en fases tardías (entre 20 y 35 ms, Fig. 5.8A y B trazo medio). Una característica llamativa de estas neuronas es que la tasa de descarga total se mantiene constante durante el escalón hacia arriba (Fig. 5.8B, abajo). De todas formas la clasificamos como célula “Off” debido a que la moda principal de la descarga basal se apaga con el escalón arriba. Esta respuesta es el principal argumento para afirmar que en el LE el patrón post-DOE tiene información que no está en la tasa de descarga.

El escalón hacia abajo causa un pico de rebote importante que afecta tanto las modas tempranas como tardías. Esto es seguido por una rápida adaptación.

Multimodales

La respuesta de las multimodales en condiciones de reposo muestran al menos tres modas, y frecuentemente están en 5ms, entre 10-15 ms la segunda y entre 20-35 la tercera. La figura 5.9 muestra la respuesta de una neurona que tiene 4 picos en el histograma post-DOE. Al aplicarle el ciclo de estimulación, se aprecia la inhibición casi total al escalón conductivo, sin adaptación visible luego de dos segundos. La respuesta al escalón abajo es la aparición de las 4 modas vistas en reposo, seguida de una adaptación donde se inhibe la segunda moda (en 10-15 ms) casi completamente y disminuye el tamaño de la tercera y la cuarta. Es de resaltar que la primer moda no tiene adaptación lenta, sólo física. Aumenta la descarga de la primer moda solamente durante la primer DOE después del escalón.

Superficiales “Off”

Este tipo de neuronas se caracteriza por una moda muy temprana (5 ms) que corresponde a un pico agudo del histograma (5.10A, izquierda). Dicha moda es seguida por un período de inhibición que comienza en 7 ms y cuya duración e intensidad se modula ampliamente por la conductividad del objeto (5.10A centro y derecha). Este efecto inhibitorio presenta una clara adaptación lenta que se observa mejor en las fases largas del hemicycle conductivo de estimulación, como se observa en la Fig 5.10B, donde se comparan los grandes promedios de todas las neuronas registradas de este tipo, bajo 4 ciclos de estimulación. Los rasters de dos neuronas individuales de esta categoría muestran en detalle este proceso adaptativo (Fig 5.11) Por otra parte, durante el hemicycle no conductivo se observan al menos dos períodos de adaptación. El primero, muy rápido (cabeza de flecha, 5.10) comienza en la segunda DOE después del cambio conductivo-no conductivo y dura de 3 a 4 DOEs. EL segundo, como en otras neuronas, es lento y sucede al primero luego de una recuperación parcial de la tasa de descarga.

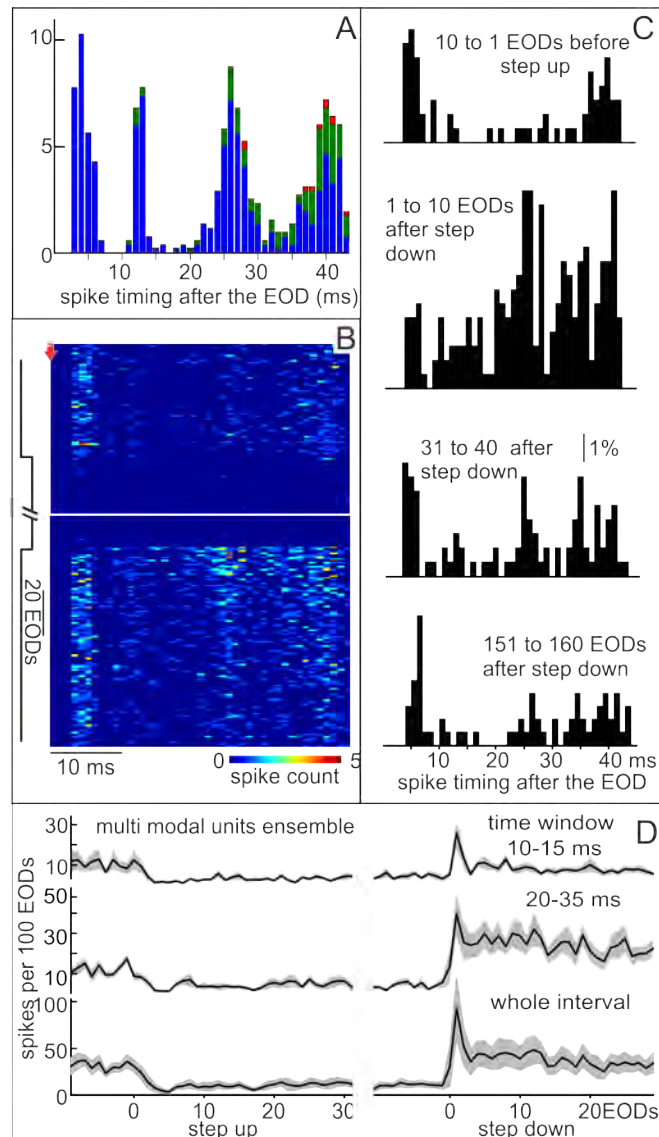


Figura 5.9: **Neurona multimodal** Histograma post-DOE en ausencia de objeto. Barras azules corresponden a la primer espiga, las verdes a la segunda espiga y las rojas a la tercera espiga. B) Mapa de colores donde se representa el curso temporal de los histogramas codificados en escala de color. Cada línea horizontal corresponde a un histograma post-DOE. Éstos están ordenados a partir del escalón “Off-On” (panel de arriba) y “On-Off” (panel de abajo). Modificado de “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”

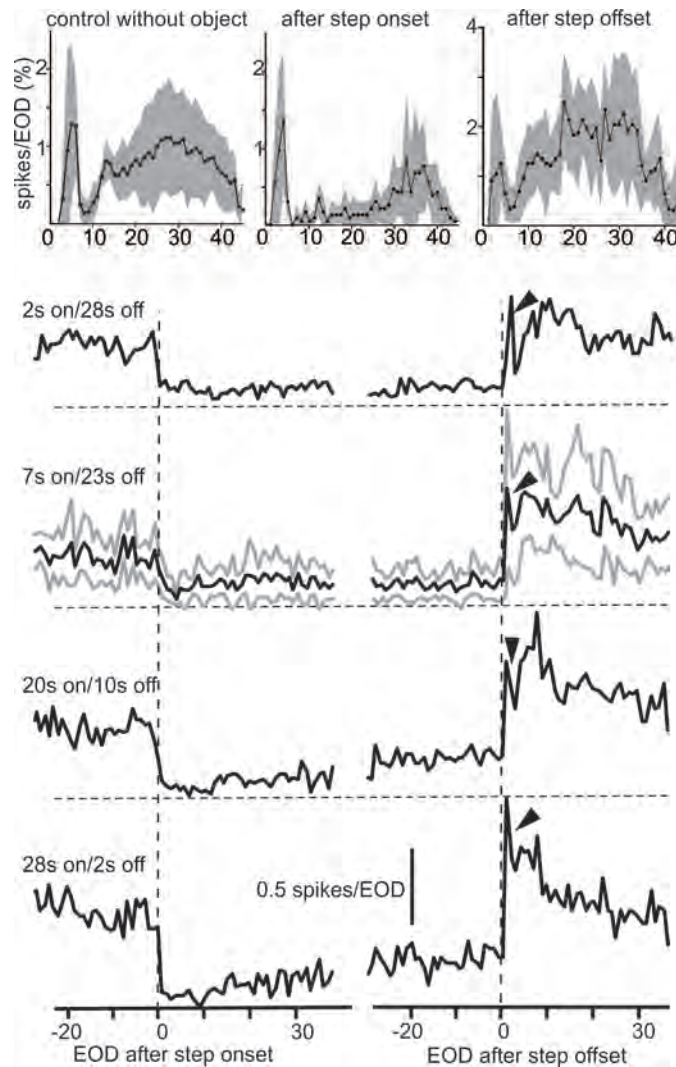


Figura 5.10: **Superficial “Off”** A) Promedio los raster post-DOE de 6 unidades de esta categoría. Izquierda: sin objeto; centro: Respuesta inmediata al escalón de resistivo a conductivo; Derecha: Respuesta inmediata al escalón de conductivo a resistivo. B) Adaptación lenta de la descarga global. El experimento consistió en 20 repeticiones de 4 ciclos de estimulación de 30 segundos de período (2-28; 7-23, 20-10 y 28-2 ms). Se calculó el número de espigas por DOE para cada descarga ordinal definiendo como “DOE cero” la última antes del cambio de impedancia del objeto. Cada trazo negro corresponde al gran promedio (6 neuronas) de la tasa de espigas por DOE. Las líneas grises corresponden a 2 errores estándar por encima y por debajo de la media. Los trazos de la izquierda corresponden al cambio de la resistencia del objeto de circuito abierto a cortocircuito y los de la derecha al cambio en sentido opuesto. Nótese: a) el aumento de la diferencia entre la tasa de disparo justo después de la instalación del estímulo conductivo y justo antes de la instalación del estímulo no conductivo con el tiempo de adaptación; b) la presencia de una “hendidura” (punta de flecha) seguidamente al aumento de la tasa evocado por la instalación del estímulo no conductivo. Modificado de “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”

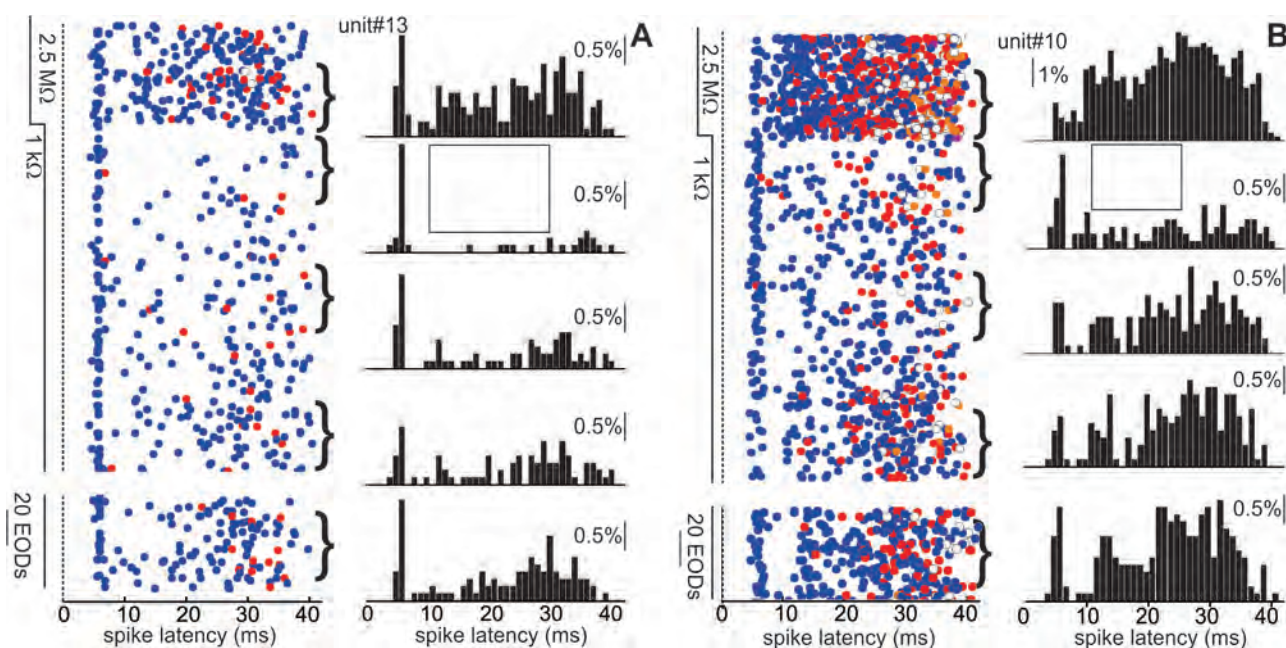


Figura 5.11: Modulación de neuronas lisas centro “Off”. A) Raster e histogramas correspondientes a un experimento con ciclo de estimulación 20-10. En el raster se superponen los tiempos de descarga correspondientes a 20 ensayos. Puntos azules, verdes y rojos corresponden a primera segunda y tercera espiga después de la DOE respectivamente. Las llaves indican el conjunto de espigas integrado en los histogramas de la derecha. B) Igual que en A para otra unidad del mismo subtipo. Modificado de “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”

5.3. Registros en libre movimiento

Estos resultados describen el desarrollo de una técnica que al presente no ha sido posible de implementar en forma sistemática en peces eléctricos. Fueron presentados en forma de póster en 2012 y son la base de un artículo en preparación. Las 10 unidades estudiadas por este método no pudieron ser localizadas precisamente dado que se utilizó un registro bipolar con una separación entre electrodos del mismo orden que la distancia entre las capas polimórfica y granular del lóbulo eléctrico y por otra parte la ausencia de un estudio post mortem de la localización del electrodo impide establecer con certeza a que mapa pertenecen. No obstante la profundidad de implementación 1400 micras desde la superficie sugiere que se trata de unidades del mapa centrolateral. Por estas razones no podemos establecer si estas neuronas pertenecen a alguna de los subtipos descritos en la sección anterior. No obstante claramente observamos perfiles “on” y “off” en relación con la presencia de cubos metálicos y plásticos (2cm de lado). Por otra parte en un pez se estudió el efecto del refugio en tubos sobre la descarga unitaria. Como se describe previamente este comportamiento provoca una modulación global de la imagen eléctrica (Pereira y col. 2005).

5.3.1. Registros unitarios.

Al igual que en los registros agudos, cuando el animal estaba en reposo, en ausencia de objetos cercanos, estas neuronas presentaron patrones post-DOE no homogéneos, con modas en 5, 12 y/o 23 ms. Cuando el pez exploraba un objeto, se acercaba a una pared o un objeto era colocado manualmente cerca de su cuerpo, el número de espigas y la latencia mostraron alteraciones claras. Como era de esperarse, los objetos plásticos y metálicos causaron objetos opuestos (Fig 5.12. Dependiendo del tipo de neurona, encontramos que los objetos metálicos colocados en determinadas regiones de la piel causaron incrementos o decrementos en la tasa de descarga y cambios en el histograma post-DOE. Esto se corresponde con lo encontrado en los registros agudos, donde encontramos neuronas centro “On” y centro “Off”.

En otro pez estudiamos el comportamiento de refugio en un tubo plástico. Observamos cambios en la tasa de descarga y en el patrón post-DOE dependientes de la posición relativa del pez en el tubo. En el ejemplo de la figura 5.12 había una célula centro “Off” con campo receptivo en el costado de la cabeza, que redujo su tasa de descarga cuando el pez se encontraba con el cuerpo dentro del tubo pero la cabeza afuera (Fig 5.12A). En esta posición relativa con respecto al tubo la LDOE en la cabeza es mayor que cuando no está en el tubo (ver Pereira y col. 2005). Esta reducción de la descarga fue acompañada por un cambio en el patrón post-DOE, pasando de tener 2 modas en reposo (Fig 5.12B, modas en 17 y 30 ms) a una única (moda en 17, fig 5.12A).

Cuando la cabeza del pez se encuentra dentro del tubo la intensidad de la LEOD es menor que sin tubo. En este caso la actividad de la unidad en la moda temprana aumenta de manera marcada (Fig 5.12C) y aumenta la inhibición entre modas a la vez que disminuye la amplitud de la segunda.

Para comparar las distribuciones post-DOE seleccionamos tres momentos de descarga

estable de 300 descargas cada una, representando cada una de las tres condiciones: incremento del estímulo local, control y disminución del estímulo local. El test de χ^2 muestra diferencias significativas entre las dos condiciones y el control ((Fig 5.12C), abajo).

En un tercer pez, exploramos los efectos del movimiento manual de un cubo de cobre en la región del campo receptivo de una neurona cuyo perfil basal es similar a las neuronas superficiales off descritas en experimentos agudos. En la cara proxima al pez se talló un perfil en “diente de sierra” con bordes verticales con un periodo interborde de 2 mm, de modo que dependiendo de la posición relativa de los bordes cercanos al pez se pudiese generar un estímulo “On” u “Off” y generar cambios rápidos entre estímulos al mover dicha cara paralela a la piel.

Dicho movimiento a 1 o 2 mm paralelo a la piel en la zona del campo receptivo provocó fuertes modulaciones de la descarga, tanto en la frecuencia como en el patrón post-DOE. Tres patrones diferentes fueron observados en tres contextos sensoriales diferentes. Movimiento del objeto (indicado como 1 en fig 5.14), objeto quieto (indicado como 2 en fig 5.14) y sin objeto (indicado como 3 en figura 5.14)

Los patrones tienen en común el silencio entre 8 y 12 ms. Los picos en 4-7 ms y en 12-18 ms cambiaron dependiendo del contexto.

En la figura 5.14B se muestran los histogramas post-DOE de 200 espigas representando los tres contextos diferentes. (barras grises) comparados al histograma normalizado a lo largo de todo el experimento (histograma en escalera, rojo, el test de χ^2 después de la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones muestra diferencias significativas entre los histogramas, $p < 0.005$, $DF = 24$).

Estos experimentos sirvieron para: 1) Los registros de unidades en libre movimiento son posibles. La combinación de esta técnica con el modelado de imágenes desarrollado en este laboratorio en colaboración con el Dr. Budelli puede ayudar mucho a la comprensión del sistema eléctrico. 2) La similitud entre estas unidades y las unidades registradas en agudo, con el pez descerebrado, sugiere que el cerebro anterior no interviene de forma directa en la modulación del patrón post-DOE, y por lo tanto las observaciones hechas son válidas para el pez crónico.

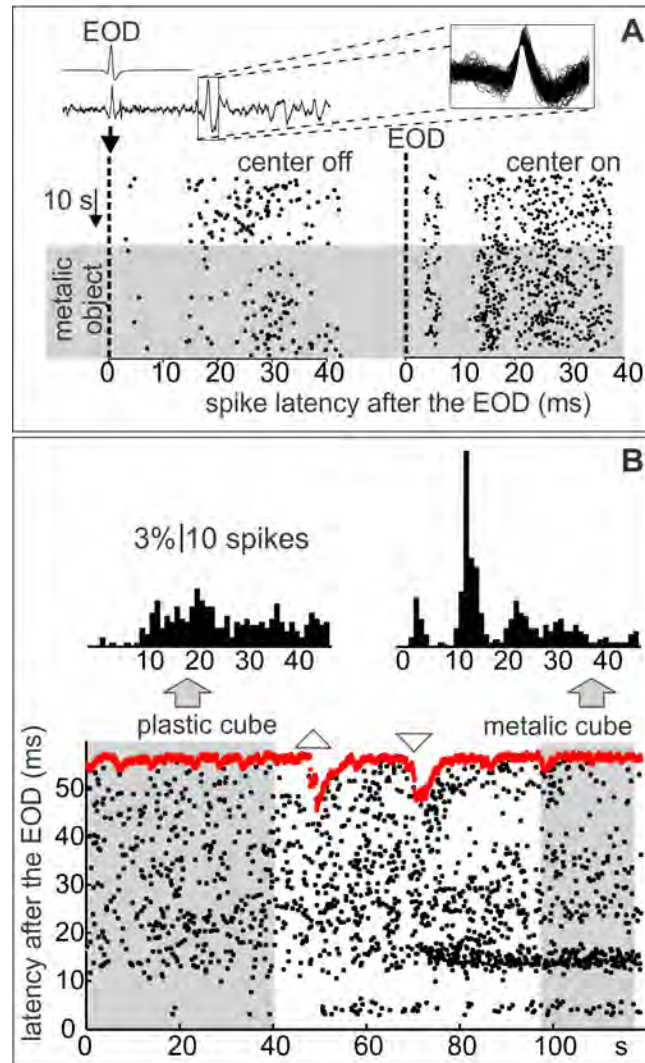


Figura 5.12: **Raster post-DOE de unidades crónicas.** A) Raster post-DOE de una neurona "Off" y una neurona "On" al ser estimuladas con un cubo metálico. El inset muestra un trazo crudo de referencia y la superposición de las unidades extraídas de la neurona "Off" B) Histogramas y raster post-DOE de la descarga de una unidad "On" estimulada sucesivamente por un cubo plástico y un cubo metálico. Los puntos rojos corresponden a la DOE siguiente a la de referencia (en cero). Las respuestas de novedad (puntas de flecha) corresponden a los momentos de retiro y colocación de los objetos)

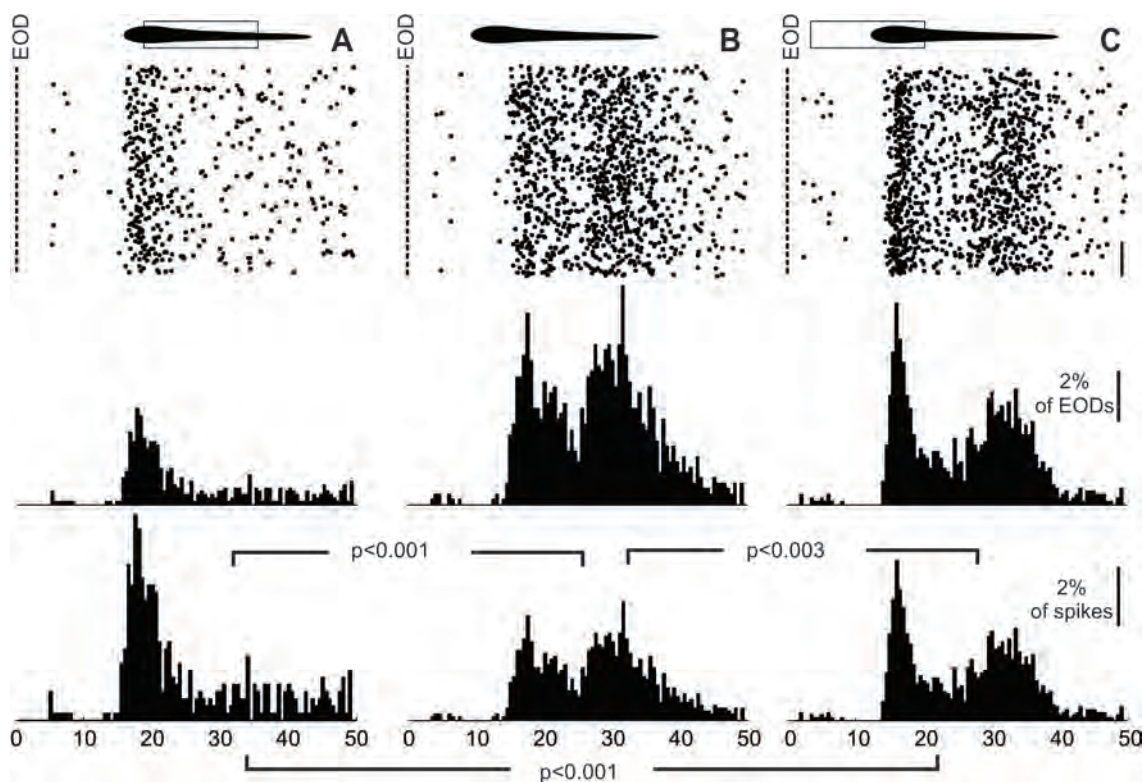


Figura 5.13: **Modulación de unidad en registro crónico.** A) Raster e histograma post-DOE histograma post-DOE con el pez dentro del tubo. Puede observarse que la segunda moda es suprimida. B) Neurona registrada en situación control, fuera del tubo y sin objeto. Puede observarse ambas modas prominentes. C) Tercera condición con el pez solamente con la cabeza dentro del tubo, donde la primera moda se hace más fina y la segunda disminuye y se retrasa en el tiempo

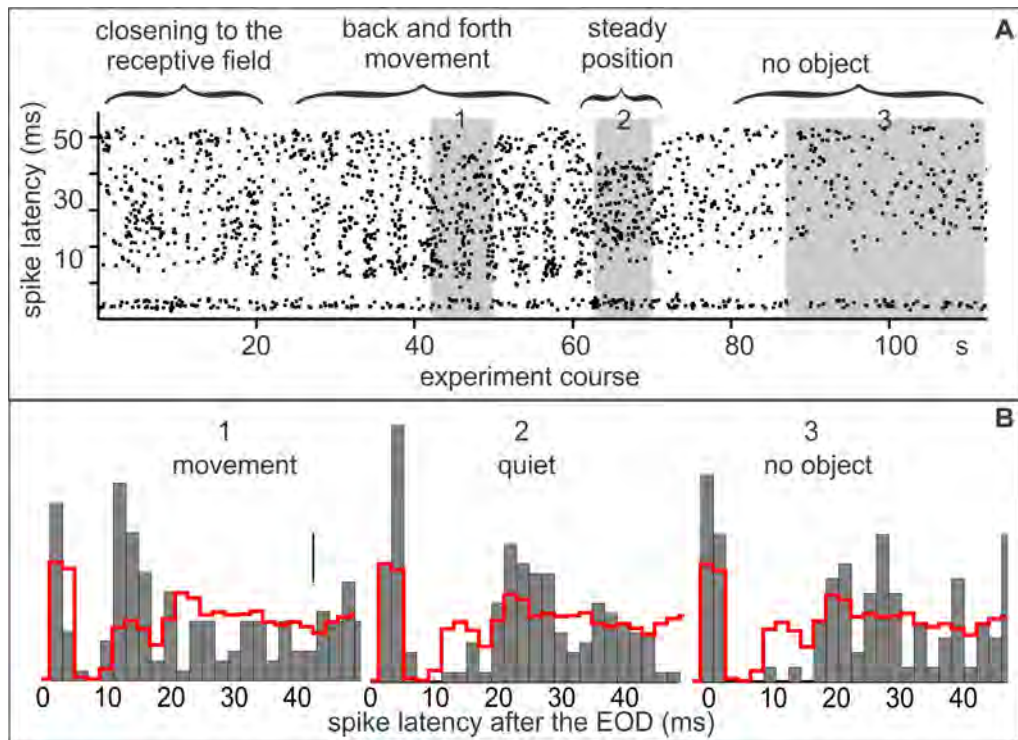


Figura 5.14: **Registro crónico de neurona bimodal.** Neurona bimodal. A) Frecuencia de la unidad a diferentes regiones temporales después de la DOE. Puede observarse que la modulación no es homogénea en todo el intervalo. Derecha, histograma post-DOE Raster e histograma post-DOE histograma post-DOE en los tiempos indicados a la izquierda.

Capítulo 6

Discusión

6.1. Codificación periférica

El hallazgo más novedoso de este estudio es que los aferentes primarios de *G. omarorum* conocidos como “burst duration coders” (denominados B en esta tesis) son muy sensibles a cambios en la forma de onda. El significado de estos hallazgos son discutidos desde tres puntos de vista: a) Las propiedades de la codificación; b) la capacidad de responder 1 a 1 con la DOE, y c) La importancia de la distorsión de la forma de onda en el procesamiento electrosensorial

6.1.1. Variables de codificación

Los cambios en la latencia, intervalos y número de espigas están bien correlacionados entre sí. El coeficiente de determinación (r^2), indica que más del 95 % de la varianza en los intervalos intra-tren son explicados por la varianza de la latencia (4.6). Esto sugiere que llevan información similar y/o redundante sobre el evento codificado. Además, el número de espigas se incrementa a medida que decrece la latencia y el intervalo. Teniendo en cuenta que la respuesta de las neuronas del LE están caracterizadas por la probabilidad de disparo en determinada fase post-DOE y ésta es diferente para cada tipo neuronal (Pereira y col. 2014), podría postularse que las diferentes variables tienen efecto sobre distintas neuronas y/o que actúan de manera sinérgica. De todas formas, la variable eponima, duración, no parece ser el parámetro más fiable, ya que es la más variable o ruidosa.

La correlación entre los parámetros del tren indica también que codifican una sola variable del estímulo. Esta variable sería una combinación de amplitud y fase de los diferentes componentes de frecuencia de la sLEOD. Dado que la latencia de la primera espiga del tren depende de la distancia del receptor a la cabeza (Bastian 1977 y observación personal), y que los receptores más alejados están más dispersos que en la fovea electrosensorial (por lo tanto receptores vecinos tendrán latencias más diferentes entre sí en la zona de la cola que receptores vecinos en la fovea) Tal vez la latencia sea más importante en la región de la fovea, y el intervalo intra tren lo sea para receptores de la región de la cola, donde hay mayor variabilidad de distancia y latencia entre receptores vecinos.

El modelo heurísticos de la respuesta de los receptores desarrollado en este laboratorio (Cilleruelo y Caputi 2012) explica los datos de investigaciones anteriores (Bastian 1976, Bastian 1977, Bennett 1971, McKibben y col. 1993, Yager y Hopkins 1993, Watson y Bastian 1979). Dicho modelo, que consta de 4 etapas (filtro pasa alto, resonancia, rectificación y codificación) predice la sensibilidad de los receptores a las distorsiones en la amplitud y el espectro de fases del estímulo natural.

Los grandes cambios en la respuesta a una distorsión del espectro de frecuencias sin cambiar la energía total, concuerdan con estudios previos (Bastian 1977; Bennett 1971; McKibben y col. 1993; Watson y Bastian 1979; Yager y Hopkins 1993) que muestran que el umbral de los receptores depende de la frecuencia del estímulo. Además, Bastian (Bastian 1976) encuentra que la frecuencia de sintonía es más alta que la frecuencia de pico del espectro de potencias (PPF) de la DOE propia. Esto concuerda con el aumento de la respuesta de los receptores al aumentar la energía de los componentes de mayor frecuencia al colocar un capacitor. Estudios con estímulos aún más naturales, por ejemplo presas vivas, son necesarios para saber qué componentes de la onda se ven más afectados en la naturaleza.

Estos resultados explican los resultados comportamentales (Aguilera y Caputi 2003) que muestran que la respuesta de novedad es más sensible a objetos capacitivos que resistivos. En dicho estudio el valor de las capacitancias a las cuales es más sensible la respuesta de novedad es coincidente con este el hallazgo en el presente estudio (10-16 nF).

En el estudio hecho por Watson y Bastian (Watson y Bastian 1979) en *G. carapo* encuentra receptores cuya frecuencia óptima de respuesta es 1 KHz (el doble que el PPF de la LDOE propia) pero coincidente con la PPF de la DOE local generada por un conespécifico. Esta propiedad de estos receptores lo hacen un candidato adecuado también para la comunicación.

La codificación de fase también fue postulado en el modelo citado previamente (Cilleruelo y Caputi 2012). En nuestros experimentos las capacitancias provocan un cambio en amplitud y fase de los diferentes componentes de la onda imposibles de aislar, dado que son ambos función de la misma variable, la impedancia. Por lo tanto, estudios reduccionistas, que alteren sólo la fase o sólo la amplitud de los diferentes componentes son necesarios para determinar su importancia relativa,

Finalmente, una propiedad importante encontrada en este estudio es la adaptación de la respuesta, caracterizada por una fase inicial rápida seguida de una lenta, que parece seguir una función potencial como la descrita para peces de onda (Benda y col. 2005; Clarke y col. 2015). Esta propiedad no fue predicha por el modelo heurístico de Cilleruelo y Caputi (Cilleruelo y Caputi 2012) aunque podría hacerlo cambiando las propiedades sinápticas entre la célula receptora y las terminales nerviosas (comunicación personal).

6.1.2. Los receptores procesan las señales imagen por imagen

Nuestros resultados confirman hallazgos anteriores (Bastian 1976, Bastian 1977; Fessard y Szabo 1961, Hagiwara y Morita 1963 McKibben y col. 1993, Watson y Bastian 1979, Yager y Hopkins 1993 que ambos receptores, tipo B y MP codifican cada DOE. Aunque el

número de espigas en cada DOE podrían codificar las imágenes eléctricas en una manera relativamente similar a los peces de onda, la modulación de la latencia y del intervalo inter-espiga en los tipo B sugieren que los peces de pulso codifican de manera más precisa las señales locales. La adaptación fásico-tónica de la respuesta a cambios locales junto a la evaluación imagen por imagen podrían facilitar la detección de estímulos novedosos y contribuir a la típica respuesta de novedad que puede ser provocada por una sola DOE (Caputi y col. 2003).

Esta evaluación imagen por imagen es más similar a lo que ocurre en los peces mormíridos (Bell 1990b, Bell 1990a Emde y Bleckmann 1992), que a lo que ocurre en los gymnotidos de onda los cuales tienen un intervalo inter DOE menor al requerido para que llegue la espiga del receptor al LE (en las especies de alta frecuencia, al menos). Por ejemplo, muchas células del LE descargan alrededor de 12 ms después de la DOE, por lo que ese sería el tiempo mínimo que le lleva al LE evaluar si la nueva imagen es diferente de la anterior. En un pez de onda (*Apteronotus*), 12 ms después habrán ocurrido entre 10 y 12 DOEs más. Dada la alta frecuencia de descarga y las propiedades adaptativas del receptor la evaluación imagen por imagen de las señales son imposibles en los peces de onda.

6.1.3. Consecuencias sensoriales a la sensibilidad a la forma de onda

Este estudio también muestra la importancia de los estímulos naturales en el estudio del sistema nervioso. La sensibilidad a cambios en la forma de onda implica varias consecuencias sensoriales. Primero, en muchas especies de pulso el campo eléctrico generado tiene formas de onda diferente en diferentes partes del cuerpo (Caputi y col. 1998; Rodríguez-Cattaneo y col. 2008), dado que la fuente tiene varios componentes diferentes distribuidos a lo largo del cuerpo. Por lo tanto, el mismo objeto colocado en distintos puntos del cuerpo modificará de forma diferentes cada uno de estos componentes de la DOE dependiendo de su distancia relativa a la fuente de dicho componente. Esto implica que en un objeto resistivo colocado en un lado del pez puede provocar cambios en la forma de onda, cosa que no sucede, o es despreciable, en la fovea, salvo objetos muy grandes.

Segundo, dado que la forma de onda de la LDOE es bastante constante en toda la zona rostral, los cambios en la forma de onda local sólo podrían indicar la presencia de un organismo vivo, los cuales tienen mayores capacitancias que los no vivos, por la presencia de las membranas celulares.

Finamente, en el caso *G. omarorum* al menos, la LDOE generada por los coespecíficos en la fovea tiene algunas características en común con forma de onda local de la LDOE modificada por un capacitor. Ambas formas de onda se caracterizan por una disminución de la relación de V_1/V_3 y un aumento de V_4/V_3 Aguilera y Caputi 2003. La forma de onda local de los co-específicos cambia con la posición relativa entre los peces, lo cual podría tener importancia durante el cortejo. En el género *Brachypomus*, durante la época reproductiva los machos aumentan la relación V_4/V_3 (denominadas Negativa y Positiva en esta especie bifásica), lo que podría aumentar el alcance de la detectabilidad de la señal

por parte de las hembras. Está descrito que un despliegue común durante las interacciones antagonistas en estos peces, es la posición antiparalela, que maximiza la relación V_4/V_3 en la fóvea del rival.

6.2. ¿Codificación dual en el Lóbulo Eléctrico?

6.2.1. Posibles explicaciones de los patrones de descarga observados

Nuestros resultados anatómicos confirman la estructura del lóbulo electrosensorial de *G. omarorum* descrita previamente por Réthelyi y Szabo 1973 y su similitud con el mejor estudiado LE de los Gymnotiformes de onda (Berman y Maler 1999; Carr y col. 1982; Chacron y col. 2011; Krahe y Maler 2014; Maler 1979, 2009; Marsat y Maler 2010; Shumway 1989). En particular, confirmamos hallazgos relativamente recientes (Maler 2009) indicando la presencia de somas de neuronas eferentes a diferentes niveles, desde la capa granular hasta la piramidal (Fig 5.1). Es de destacar un tipo neuronal, el cual no está muy estudiado en peces de onda y al que no se hace demasiada referencia, el cual llamamos células calvas, caracterizadas por un bien desarrollado árbol dendrítico basilar y sin dendritas apicales (Fig 5.1C).

A pesar de las similitudes histológicas, el LE de peces de onda y de pulso trabajan con imágenes eléctricas de forma muy diferente. Los peces de onda pueden llegar a descargar con un intervalo equivalente al período refractario de descarga, mientras que los peces de pulso descargan con una tasa entre uno y dos órdenes de magnitud menor, dependiendo la especie. Además, mientras que el tipo de descarga (continua) en los peces de onda implica la necesidad de extraer la información de la envolvente de la señal (Chacron y col. 2011; Marsat y col. 2012; Metzen y Chacron 2014), los peces de pulso evalúan la entrada imagen por imagen (Aguilera y col. 2001; Caputi y col. 2008; Pereira y col. 2005). De acuerdo con esto, nuestros registros y análisis de los potenciales de campo y de la actividad unitaria indican que la vía lenta de *G. omarorum* tiene un patrón de activación después de cada DOE complejo, pero preciso.

El análisis de densidad de corrientes muestra que los generadores principales del patrón espacio temporal de activación del LE están localizados entre la GCL y la PNL, donde están localizados la mayoría de los somas neuronales. Al ser tan similares el conexionado y las morfologías celulares, es muy probable que las piramidales basilares correspondan a algunas tipos de unidades “On” y las piramidales no basilares, que reciben inervación aferente de manera indirecta, a través de las interneuronas granulares inhibitorias correspondan a algunas tipos “Off” reportadas en este estudio. Sin embargo podría ocurrir que más de un tipo de piramidal basilar o no basilar o que otros tipos neuronales también se expresen de manera “On” y “Off”. Nuestro estudio muestra que en los gymnotiforme de pulso la modulación de los estímulos sensoriales no solo afecta la tasa de descarga de las neuronas del LE sino también la latencia de las espigas tal como se observa en mormiriformes de pulso. Los diferentes períodos o fases post-DOE tienen modulaciones diferentes en cada sub tipo de neurona “On” y “Off”. Sin embargo es posible identificar períodos de mayor o menor probabilidad de descarga que son comunes a mas de un tipo neuronal.

Una característica común a las neuronas “On” es un patrón bi o trifásico (excitación 4-5 ms -silencio 6-9- excitacion 10-17 o silencio 1-9 ms -excitación 10-17 ms) que ocurre entre los 4 y los 17 ms y coincide con los picos y valles observados en los potenciales de campo.

Haciendo un estudio comparado es posible que esta secuencia de excitación-inhibición excitación inicial pueda ser explicada por la inhibición cruzada recurrente mediada por las células ovoides. Maler y Mugnaini (Maler y Mugnaini 1994) muestran varios tipos de interneuronas gabaérgicas en las capas profundas, que reciben entradas directas o indirectas de los receptores tuberosos, siendo las ovoides una de ellas. Resultados similares aún sin publicar fueron encontrados en este laboratorio para *G. omarorum* (Castelló, Pereira y Caputi). Estas neuronas forman parte de una proyección comisural que provoca inhibición recíproca entre los mapas homólogos de ambos hemisferios del LE y potencialmente participando del mecanismo de “rechazo de modo común” (Bastian y col. 1993). Según Maler y Mugnaini (Maler y Mugnaini 1994) las células ovoides proyectan al hemisferio contralateral y sus axones inervan densamente las células basales piramidales profundas y las dendritas de las basales piramidales. En este estudio registramos en numerosas ocasiones unidades tardías (6 ms) de descarga única en la capa de los receptores. Estas unidades probablemente sean células ovoides (Maler, comunicación personal). La actividad principal en la capa de los somas piramidales ocurre entre 10 y 17 ms. En este período los histogramas post-DOE de las neuronas monomodales tempranas y las multimodales tienen sus modas principales. En esta ventana temporal se observan con mayor claridad algunos de los efectos adaptativos discutidos mas abajo.

Luego de esta moda principal, Las neuronas bimodales profundas tienen una segunda inhibición, de menor intensidad que la primera, para luego mostrar, en algunos casos, una moda alrededor de 25 ms. En esta región del histograma la latencia es más variable DOE a DOE. La mayor dispersión alrededor de esta moda se debe, posiblemente, a que no está limitada por la fuerte inhibición previa y posterior observada en la moda principal. Esta moda es también más diversa en el sentido que su origen sináptico puede ser distinto en cada tipo neuronal. En las bimodales se puede deber a una segunda espiga luego de la que generó la moda principal (Fig 5.5B) o reflejar un patrón de activación complejo en el cual se distinguen dos picos (Fig 5.5A). Es de destacar que la moda principal (en 12 ms) tiene una respuesta fásica rápida reflejando cambios en el estímulo, mientras que la fase tardía, después del valle posterior a la moda principal, muestra una adaptación lenta, probablemente codificando el nivel estacionario del estímulo. En las monomodales tardías reflejan un patrón de activación monomodal aunque cuando es excitada puede generar dos disparos sucesivos separados 10 ms, transformándose en bimodal (tercer histograma de la derecha de la figura 5.7).

En las neuronas superficiales “Off” se observa una clara moda temprana alrededor de 5 ms después de la DOE. Dicha moda se afecta poco por la presencia de objetos. La posición relativa de estas neuronas con respecto a la capa de aferentes primarios y su característica “Off” sugiere que tanto los dos subtipos (tanto las que presentan varias modas como las que presentan un incremento lento de la probabilidad de descarga) corresponden a neuronas piramidales no basales. En ambas las fase tardía de la descarga se bloquea ante la presencia de objetos metálicos y se incrementa frente a no conductivos. Esto sugiere la presencia de un “tono basal” ya sea originado en una actividad marcapaso (Nogueira y Caputi 2011) en la activación indirecta a través de los granos de la capa inferior o de la eminencia granularis posterior a través de las fibras paralelas. Dicho tono es modulada por una fuerte

inhibición por la entrada sensorial a través de neuronas inhibitorias (posiblemente granos propios del LE o polimórficas). Un aspecto difícil de explicar es la presencia sistemática del pico precoz a 4-5 ms post DOE en neuronas que no reciben contactos sinápticos directos de los aferentes. Este pico podría corresponder en algunos casos a un silencio artefactual entre el fin del intervalo pre DOE y el comienzo del intervalo post-DOE (no es posible identificar las espigas durante la DOE). Sin embargo existen neuronas en las cuales claramente la probabilidad de descarga justo antes de la DOE es significativamente menor que la observada en dicho pico. Esto genera la duda sobre la posibilidad de una descarga corolario o la convergencia de comandos descendentes disparados por la vía rápida, la cual arriba al mesencefalo con una latencia de 2-3 ms. Tanto durante la activación con la depresión de la respuesta por la presencia de objetos de conductancia distinta a la del agua (aunque menos en el caso de la depresión, posiblemente debido a un efecto “piso” ya que no existe probabilidad de descarga negativa) el efecto inicial se atenúa lentamente sugiriendo que dichos cambios lentos corresponden a plasticidad en las entradas sinápticas tardías, posiblemente mediadas por los contactos entre las fibras paralelas y las dendritas apicales ya sea de dichas neuronas o de las interneuronas que proyectan sobre ellas. Es interesante destacar que la presencia de más de un tipo de neurona “Off” en la capa polimórfica podría corresponder a distintos subtipos anatómicos. La correlación anatomo funcional deberá hacerse por registros intracelulares in vivo. El desarrollo técnico de un preparado descerebrado aportado por el trabajo conjunto con la Dra. Pereira (Tesis de Doctorado PEDECIBA, 2016; Pereira y col. 2014) permitirá dicho estudio en peces con descarga espontánea.

6.2.2. Adaptación de la descarga

Dado que en los experimentos comportamentales de Caputi y col. 2003 se observa plasticidad en la respuesta de novedad, decidimos explorar el proceso de adaptación de la respuesta neuronal con protocolos similares al utilizado en dicho estudio comportamental. La adaptación de las respuestas a estímulos escalonados muestra tres etapas distintas, que pueden ser observados conjuntamente en el mismo tipo celular o no. Una característica del proceso de adaptación de las respuestas en más (es decir el aumento de la tasa de descarga células “On” frente al incremento del estímulo o en células “Off” luego de la reducción del estímulo) es que luego de un aumento de la probabilidad de descarga debido a un escalon en el estímulo existe reducción rápida de la misma durante 3 o 4 DOEs que es seguida de un nuevo incremento. Esto provoca una “hendidura” en el curso temporal de la respuesta. Dicho efecto, “adaptación inmediata” podría estar mediado por realimentación inhibitoria proveniente de centros superiores. En efecto, el bucle LE-núcleo praeminencialis podría ser el substrato morfológico de dicho efecto, tal como se describe no solo en los peces de onda sino además en los mormiridos de pulso.

Un segundo proceso de adaptación remeda el curso temporal de la respuesta receptorial. En efecto como se observa en las células monomodales tardías dicho proceso se prolonga durante decenas de DOEs y probablemente sea el reflejo en la red neural de la adaptación de la señal de entrada. Finalmente, existe un proceso de adaptación lenta que dura decenas

de segundos, mas claramente observado en las neuronas “Off” mas apicales posiblemente dependiente de plasticidad sináptica a nivel de los contactos de las fibras paralelas sobre las dendritas apicales.

6.2.3. La presencia de patrones sugiere un posible código de latencias

Además, las diferentes dinámicas adaptativas observadas en las distintas fases post-DOE y la diversidad de probabilidad de descarga en dichas fases en los distintos tipos neuronales determina que los patrones post-DOE pueden cambiar con los estímulos y con la historia de los mismos. Este efecto, que no se puede observar en peces de onda, sugiere que una forma de codificación por “spike timing” podría haber evolucionado de manera convergente junto con la habilidad de explorar el entorno con una descarga pulsátil. Entender los códigos empleados por el sistema nervioso para representar las señales sensoriales es un problema general de la neurociencia. Se ha debatido durante mucho tiempo si la tasa de espigas o la secuencia de intervalos son las variables relevantes en la codificación sensorial. El papel de la tasa de espigas es evidente y fue reconocido como una variable importante desde el comienzo de los registros unitarios (Adrian y Zotterman 1926) y la importancia de la secuencia de intervalos se estableció claramente cuando Segundo y colaboradores (Segundo y col. 1963) muestran que la respuesta de las neuronas post-sinápticas es dependiente del patrón de espigas presinápticas. Hoy sabemos que las características dinámicas de los componentes pre y post-sinápticos de la sinapsis y las propiedades intrínsecas de la neurona postsináptica determinan como la secuencia temporal de las espigas aferentes condiciona la probabilidad de disparo de la neurona post-sináptica. Además, las espigas aferente a una célula tendrán diferentes efectos dependiendo de la temporización con respecto a otras entradas aferentes a la misma célula (Bell y Grant 1989; Bell 1989; Carr y Konishi 1988; Gawne y col. 1996; Monier y col. 2003) y los cambios dependientes del tiempo en la eficacia sináptica y las propiedades intrínsecas de las neuronas críticas en un circuito neuronal pueden conducir a cambios en las respuestas de la red como resultado de las entradas recibidas en el pasado inmediato (Bell y col. 1993, 1997; Bender y col. 2006; Jacob y col. 2007). Los códigos de latencia también pueden proporcionar ventajas computacionales adicionales tales como: operación a diferentes escalas de tiempo; reducción de la ambigüedad en comparación con los códigos de frecuencia; y la generación de representaciones neurales más robustas al ruido ambiental (Panzeri y col. 2001, 2010). Sin embargo, cada código de latencias es específico del circuito y no se puede evaluar correctamente sin una descripción detallada de la conectividad del circuito, la función y la dinámica en condiciones naturales. Esto requiere registrar la actividad neuronal en animales que se mueven libremente. El desarrollo de dicha técnica en peces eléctricos aportado en esta tesis y las facilidades de estudio anatómico del LE, así como la posibilidad de modelar la imagen eléctrica en peces en libre movimiento desarrollada en el laboratorio previamente, permitirán en el futuro estudiar en detalle dicho proceso de codificación en el LE.

Es importante destacar que la postulación de un código de latencias requiere identi-

ficar el tiempo de referencia de la descarga de una espiga. Por ejemplo en el caso de los mormíridos de pulso existe una descarga corolario del núcleo comando del órgano eléctrico que sirve como referencia temporal para la comparación entre el estímulo esperado y el que llega. Dicha descarga asociada a fenómenos plásticos antihebbianos (también observados en este estudio) podría servir para implementar la detección de novedad en el patrón del estímulo. Son necesarios más estudios comparados para entender mejor esta convergencia con los mormíridos de pulso. En gymnotidos no hay evidencia de descarga corolario, pero existen varios mecanismos que podrían proveer una referencia temporal alternativa. En primer lugar ha sido propuesto que la vía rápida podría tener función de referencia temporal de ocurrencia de la DOE. Dada la velocidad con que la señal llega al Magnocelularis (2-3 ms después del pico de V_3), las señales podrían proyectar retrogradamente sobre LE indicando la llegada de la DOE propia conjuntamente con la señal de los receptores que dan origen a la vía lenta (Castello y col. 1998). Por otra parte la descarga global involucrando regiones amplias del LE (las características del estímulo en sombrero mejicano frente a la presencia de un objeto mantendría una latencia promedio incambiada) podría también proveer una referencia temporal relativa. Esto requiere convergencia de señales con orígenes espaciales distintos sobre centros superiores. La otra condición necesaria para establecer si existe dicho código de latencias es identificar neuronas sobre las cuales exista convergencia de las señales de referencia y la entrada sensorial o al menos que su probabilidad de descarga dependa de intervalo entre la ocurrencia de ambas señales. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren la presencia de un código de latencias y promueven la investigación de posibles señales de referencias y de neuronas decodificadoras que utilicen dichas señales para decodificar la información proveniente de las señales aferentes.

Capítulo 7

Conclusiones

Del presente trabajo podemos concluir que los receptores presentan una correlación entre las tres variables de codificación posibles: latencia, intervalo inter-espigas dentro del tren y número de descargas por tren. De estas tres, las más fiables son la latencia y el intervalo inter-espigas.

Los receptores de *G. omarorum* presentan sensibilidad tanto a cambios en el RMS de la señal como a cambios en el curso temporal de la misma. Los mayores cambios en la respuesta de los electrorreceptores se dieron cuando cambiamos simultáneamente ambas variables de la señal, mediante un objeto capacitivo.

Las neuronas del lóbulo eléctrico de *G. omarorum* presentan respuestas más complejas que en sus primos gymnotiformes de onda, ya que al modularlas cambia, además de la frecuencia de descarga, la fase con respecto a la DOE.

En algunas neuronas con adaptación fásico-tónica los componentes fásicos ocurren a diferente latencia que los tónicos. En otras neuronas, al cambiar el estímulo cambia el patrón post-DOE sin cambios en la tasa global de descarga.

Por lo tanto, en el lóbulo eléctrico de *G. omarorum* existe codificación por la tasa de descarga y el tiempo de ocurrencia de las descargas neuronales.

Capítulo 8

Perspectivas

Las perspectivas a corto plazo y realizables en el laboratorio con el equipamiento actual, serían completar el estudio sobre los receptores, cambiando el diseño experimental. Ya tenemos resultados previos de los efectos sobre los receptores de un pulso externo de corriente, localizado, aplicado en diferentes fases de la DOE. Sería importante repetir los experimentos de Bastian para corroborar que en *G. omarorum* también existen tres submodalidades de electrorreceptores tuberosos. Una vez comprobado eso, habría que diseñar nuevos experimentos para explorar cuáles son los mejores estímulos naturales para cada una de las tres categorías. Una posibilidad sería que una submodalidad respondiera mejor a la propia DOE local mientras que otra submodalidad lo hiciera para la DOE local generada por un congénere y permitiera, ya a este nivel, la identificación de especies.

Por otro lado, los resultados obtenidos con este trabajo van a permitir mejorar el modelo realizado por Cilleruelo y Caputi 2012 en este laboratorio. Lo cual a su vez daría nuevas ideas sobre el diseño experimental. Otro desarrollo interesante, pero más a largo plazo, sería integrar en el modelo del pez (Rother et al, Sanguinetti, et al), el cual proporciona imágenes eléctricas en la piel del pez, el modelo de los electrorreceptores. Además, por Castello y col. 1998 conocemos la distribución de los electrorreceptores en la piel. Esto que nos proporcionaría la primer imagen neural que llega al LE.

Con respecto al lóbulo eléctrico, el siguiente paso a realizar es la identificación anatómica de los diferentes fenotipos electrofisiológicos encontrados, mediante el registro intracelular y marcado *in vivo*.^{En} conjunto con este marcado, sería importante realizar diferentes técnicas histológicas para conocer el conexionado interno del LE y poder avanzar en el modelado de este circuito.

Es de destacar que el conocimiento sobre estos peces y sobre los receptores está llegando a un nivel donde ya empiezan a surgir investigaciones sobre aplicaciones tecnológicas plausibles (Boyer y col. 2012; Gottwald y col. 2017) En este sentido hemos propuesto en un artículo reciente (se adjunta) que el próximo desafío para la construcción de sistemas electrorreceptivos biomiméticos es el desarrollo de detectores de forma de onda (Rodríguez-Cattaneo y col. 2017a).

Bibliografía

- Adrian, Edgar Douglas e Yngve Zotterman (1926). "The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a single end-organ". En: *The Journal of physiology* 61.2, págs. 151-171.
- Aguilera, Pedro A y Angel A Caputi (2003). "Electroreception in *G. carapo*: detection of changes in waveform of the electrosensory signals". En: *Journal of experimental biology* 206.6, págs. 989-998.
- Aguilera, Pedro A, María E Castello y Angel A Caputi (2001). "Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers". En: *Journal of Experimental Biology* 204.2, págs. 185-198.
- Bastian, J, J Courtright y J Crawford (1993). "Commissural neurons of the electrosensory lateral line lobe of *Apteronotus leptorhynchus*: morphological and physiological characteristics". En: *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 173.3, págs. 257-274.
- Bastian, Joseph (1976). "Frequency response characteristics of electroreceptors in weakly electric fish (Gymnotoidei) with a pulse discharge". En: *Journal of Comparative Physiology* 112.2, págs. 165-180.
- (1977). "Variations in the frequency response of electroreceptors dependent on receptor location in weakly electric fish (Gymnotoidei) with a pulse discharge". En: *Journal of comparative physiology* 121.1, págs. 53-64.
- Bell, CC (1990a). "Mormyromast electroreceptor organs and their afferent fibers in mormyrid fish. III. Physiological differences between two morphological types of fibers". En: *Journal of neurophysiology* 63.2, págs. 319-332.
- Bell, CC y K Grant (1989). "Corollary discharge inhibition and preservation of temporal information in a sensory nucleus of mormyrid electric fish". En: *The Journal of Neuroscience* 9.3, págs. 1029-1044.
- Bell, CC, H Zakon y TE Finger (1989). "Mormyromast electroreceptor organs and their afferent fibers in mormyrid fish: I. Morphology". En: *Journal of Comparative Neurology* 286.3, págs. 391-407.
- Bell, Curtis C (1981). "An efference copy which is modified by reafferent input". En: *Science*, págs. 450-453.
- (1982). "Properties of a modifiable efference copy in an electric fish." En: *Journal of Neurophysiology*.

- Bell, Curtis C (1989). "Sensory coding and corollary discharge effects in mormyrid electric fish". En: *Journal of Experimental Biology* 146.1, págs. 229-253.
- (1990b). "Mormyromast electroreceptor organs and their afferent fibers in mormyrid fish. II. Intra-axonal recordings show initial stages of central processing". En: *Journal of neurophysiology* 63.2, págs. 303-318.
- (2001). "Memory-based expectations in electrosensory systems". En: *Current opinion in neurobiology* 11.4, págs. 481-487.
- Bell, Curtis C y Kirsty Grant (1992). "Sensory processing and corollary discharge effects in mormyromast regions of mormyrid electrosensory lobe. II. Cell types and corollary discharge plasticity". En: *Journal of neurophysiology* 68.3, págs. 859-875.
- Bell, Curtis C y Leonard Maler (2005). "Central neuroanatomy of electrosensory systems in fish". En: *Electroreception*. Springer, págs. 68-111.
- Bell, Curtis C, Angel Caputi, Kirsty Grant y Jacques Serrier (1993). "Storage of a sensory pattern by anti-Hebbian synaptic plasticity in an electric fish." En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.10, págs. 4650-4654.
- Bell, Curtis C, Victor Z Han, Yoshiko Sugawara y Kirsty Grant (1997). "Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order." En: *Nature* 387.6630, págs. 278-281.
- Benda, Jan, André Longtin y Len Maler (2005). "Spike-frequency adaptation separates transient communication signals from background oscillations". En: *The Journal of Neuroscience* 25.9, págs. 2312-2321.
- Bender, Vanessa A, Kevin J Bender, Daniel J Brasier y Daniel E Feldman (2006). "Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex". En: *The Journal of neuroscience* 26.16, págs. 4166-4177.
- Bennett, Michael VL (1971). "Electroreception". En: *Fish physiology* 5, págs. 493-574.
- Berman, Neil J y Leonard Maler (1999). "Neural architecture of the electrosensory lateral line lobe: adaptations for coincidence detection, a sensory searchlight and frequency-dependent adaptive filtering". En: *Journal of Experimental Biology* 202.10, págs. 1243-1253.
- Boyer, Frédéric, Pol Bernard Gossiaux, Brahim Jawad, Vincent Lebastard y Mathieu Porez (2012). "Model for a sensor inspired by electric fish". En: *IEEE transactions on robotics* 28.2, págs. 492-505.
- Bullock, Theodore H (1969). "Species Differences in Effect of Electroreceptor Input on Electric Organ Pacemakers and Other Aspects of Behavior in Electric Fish". En: *Brain, Behavior and Evolution* 2.2, págs. 85-101.
- Bullock, Theodore Holmes (1974). *Handbook of Sensory Physiology*. Vol. 3. Springer-Verlag.
- Bullock, Theodore Holmes, RG Northcutt y DA Bodznick (1982). "Evolution of electroreception". En: *Trends in Neurosciences* 5, págs. 50-53.
- Caputi, A. A., P. A. Aguilera y M. E. Castelló (2003). "Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*". En: *Journal of Experimental Biology* 206.6, págs. 999-1010.
- Caputi, AA, R Budelli, K Grant y CC Bell (1998). "The electric image in weakly electric fish: physical images of resistive objects in *Gnathonemus petersii*." En: *Journal of experimental biology* 201.14, págs. 2115-2128.

- Caputi, Angel A, Maria E Castelló, Pedro Aguilera y Omar Trujillo-Cenóz (2002). “Electrolocation and electrocommunication in pulse gymnotids: signal carriers, pre-receptor mechanisms and the electrosensory mosaic”. En: *Journal of Physiology-Paris* 96.5, págs. 493-505.
- Caputi, Ángel A, María E Castelló, Pedro A Aguilera, Carolina Pereira, Javier Nogueira, Alejo Rodríguez-Cattaneo y Carolina Lezcano (2008). “Active electroreception in *Gymnotus omari*: imaging, object discrimination, and early processing of actively generated signals”. En: *Journal of Physiology-Paris* 102.4, págs. 256-271.
- Carr, Catherine E y Masakazu Konishi (1988). “Axonal delay lines for time measurement in the owl’s brainstem”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.21, págs. 8311-8315.
- Carr, Catherine E, Leonard Maler y Emilia Sas (1982). “Peripheral organization and central projections of the electrosensory nerves in gymnotiform fish”. En: *The Journal of comparative neurology* 211.2, págs. 139-153.
- Castello, Maria E, Angel Caputi y O Trujillo-Cenóz (1998). “Structural and functional aspects of the fast electrosensory pathway in the electrosensory lateral line lobe of the pulse fish *Gymnotus carapo*”. En: *Journal of Comparative Neurology* 401.4, págs. 549-563.
- Castelló, María E, Alejo Rodríguez-Cattáneo, Pedro A Aguilera, Leticia Iribarne, Ana Carolina Pereira y Ángel A Caputi (2009). “Waveform generation in the weakly electric fish *Gymnotus coropinae* (Hoedeman): the electric organ and the electric organ discharge”. En: *Journal of Experimental Biology* 212.9, págs. 1351-1364.
- Chacron, Maurice J, André Longtin y Leonard Maler (2011). “Efficient computation via sparse coding in electrosensory neural networks”. En: *Current opinion in neurobiology* 21.5, págs. 752-760.
- Cilleruelo, Esteban R y Ángel Ariel Caputi (2012). “Encoding electric signals by *Gymnotus omarorum*: heuristic modeling of tuberous electroreceptor organs”. En: *Brain research* 1434, págs. 102-114.
- Clarke, Stephen E, André Longtin y Leonard Maler (2015). “The neural dynamics of sensory focus”. En: *Nature communications* 6.
- Emde, G Von der y H Bleckmann (1992). “Extreme phase sensitivity of afferents which innervate mormyromast electroreceptors”. En: *Naturwissenschaften* 79.3, págs. 131-133.
- Fessard, A y Th Szabo (1961). “Mise en évidence dun récepteur sensible à lélectricité dans la peau des mormyres”. En: *COMPTES RENDUS HEBDOMADAIRES DES SEANCES DE L ACADEMIE DES SCIENCES* 253.17, pág. 1859.
- Gawne, Timothy J, Troels W Kjaer y Barry J Richmond (1996). “Latency: another potential code for feature binding in striate cortex”. En: *Journal of Neurophysiology* 76.2, págs. 1356-1360.
- Gottwald, Martin, Anna Matuschek y Gerhard von der Emde (2017). “An active electrolocation catheter system for imaging and analysis of coronary plaques”. En: *Bioinspiration & Biomimetics* 12.1, pág. 015002.
- Hagiwara, S y H Morita (1963). “Coding mechanisms of electroreceptor fibers in some electric fish”. En: *Journal of neurophysiology* 26.4, págs. 551-567.

- Heiligenberg, Walter y John Dye (1982). “Labelling of electroreceptive afferents in a gymnotoid fish by intracellular injection of HRP: the mystery of multiple maps”. En: *Journal of comparative physiology* 148.3, págs. 287-296.
- Hopkins, Carl D (1976). “Stimulus filtering and electroreception: tuberous electroreceptors in three species of gymnotoid fish”. En: *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 111.2, págs. 171-207.
- Hopkins, Carl D y Andrew H Bass (1981). “Temporal coding of species recognition signals in an electric fish”. En: *Science* 212.4490, págs. 85-87.
- Jacob, Vincent, Daniel J Brasier, Irina Erchova, Dan Feldman y Daniel E Shulz (2007). “Spike timing-dependent synaptic depression in the in vivo barrel cortex of the rat”. En: *The Journal of Neuroscience* 27.6, págs. 1271-1284.
- Kawasaki, Masashi (2005). “Physiology of tuberous electrosensory systems”. En: *Electroreception*. Springer, págs. 154-194.
- Krahe, Rüdiger y Leonard Maler (2014). “Neural maps in the electrosensory system of weakly electric fish”. En: *Current opinion in neurobiology* 24, págs. 13-21.
- Maler, Leonard (1979). “The posterior lateral line lobe of certain gymnotoid fish: quantitative light microscopy”. En: *Journal of Comparative Neurology* 183.2, págs. 323-363.
- (2009). “Receptive field organization across multiple electrosensory maps. I. Columnar organization and estimation of receptive field size”. En: *Journal of Comparative Neurology* 516.5, págs. 376-393.
- Maler, Leonard y Enrico Mugnaini (1994). “Correlating gamma-aminobutyric acidergic circuits and sensory function in the electrosensory lateral line lobe of a gymnotiform fish”. En: *Journal of Comparative Neurology* 345.2, págs. 224-252.
- Maler, Leonard, Emilia KB Sas y Joanne Rogers (1981). “The cytology of the posterior lateral line lobe of high-frequency weakly electric fish (gymnotidae): Dendritic differentiation and synaptic specificity in a simple cortex”. En: *Journal of Comparative Neurology* 195.1, págs. 87-139.
- Marsat, Gary y Leonard Maler (2010). “Neural heterogeneity and efficient population codes for communication signals”. En: *Journal of neurophysiology* 104.5, págs. 2543-2555.
- Marsat, Gary, Andre Longtin y Leonard Maler (2012). “Cellular and circuit properties supporting different sensory coding strategies in electric fish and other systems”. En: *Current opinion in neurobiology* 22.4, págs. 686-692.
- Matsushita, Atsuko, Grace Pyon y Masashi Kawasaki (2013). “Time disparity sensitive behavior and its neural substrates of a pulse-type gymnotiform electric fish, *Brachyhyopomus gauderio*”. En: *Journal of Comparative Physiology A* 199.7, págs. 583-599.
- McKibben, JR, CD Hopkins y DD Yager (1993). “Directional sensitivity of tuberous electroreceptors: polarity preferences and frequency tuning”. En: *Journal of Comparative Physiology A* 173.4, págs. 415-424.
- Meek, J, Kirsty Grant, Y Sugawara, TGM Hafmans, M Veron y JP Denziot (1996). “Interneurons of the ganglionic layer in the mormyrid electrosensory lateral line lobe: morphology, immunohistochemistry and synaptology”. En:

- Metzen, Michael G y Maurice J Chacron (2014). “Weakly electric fish display behavioral responses to envelopes naturally occurring during movement: implications for neural processing”. En: *Journal of Experimental Biology* 217.8, págs. 1381-1391.
- Mohr, Claudia, Patrick D Roberts y Curtis C Bell (2003). “The mormyromast region of the mormyrid electrosensory lobe. I. Responses to corollary discharge and electrosensory stimuli”. En: *Journal of neurophysiology* 90.2, págs. 1193-1210.
- Monier, Cyril, Frédéric Chavane, Pierre Baudot, Lyle J Graham e Yves Frégnac (2003). “Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning”. En: *Neuron* 37.4, págs. 663-680.
- Nogueira, Javier y Ángel Ariel Caputi (2011). “Timing actions to avoid refractoriness: a simple solution for streaming sensory signals”. En: *PLoS One* 6.7, e22159.
- Panzeri, Stefano, Rasmus S Petersen, Simon R Schultz, Michael Lebedev y Mathew E Diamond (2001). “The role of spike timing in the coding of stimulus location in rat somatosensory cortex”. En: *Neuron* 29.3, págs. 769-777.
- Panzeri, Stefano, Nicolas Brunel, Nikos K Logothetis y Christoph Kayser (2010). “Sensory neural codes using multiplexed temporal scales”. En: *Trends in neurosciences* 33.3, págs. 111-120.
- Pereira, Ana Carolina, Viviana Centurión y Angel Ariel Caputi (2005). “Contextual effects of small environments on the electric images of objects and their brain evoked responses in weakly electric fish”. En: *Journal of experimental biology* 208.5, págs. 961-972.
- Pereira, Ana Carolina, Alejo Rodríguez-Cattaneo y Angel A Caputi (2014). “The slow pathway in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*: Field potentials and unitary activity”. En: *Journal of Physiology-Paris* 108.2, págs. 71-83.
- Réthelyi, M y T Szabo (1973). “Neurohistological analysis of the lateral lobe in a weakly electric fish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces)”. En: *Experimental brain research* 18.4, págs. 323-339.
- Rodríguez-Cattaneo, A, C Pereira y A Caputi (2017a). “Waveform Sensors: The Next Challenge in Biomimetic Electroreception”. En: *Int J Biosen Bioelectron* 2.6, pág. 00047.
- Rodríguez-Cattaneo, Alejo, Ana Carolina Pereira, Pedro A Aguilera y Angel A Caputi. “Spike timing patterns in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*”. En: *Enviado*.
- Rodríguez-Cattaneo, Alejo, Ana Carolina Pereira, Pedro A Aguilera, William GR Crampton y Angel A Caputi (2008). “Species-specific diversity of a fixed motor pattern: the electric organ discharge of *Gymnotus*”. En: *PLoS One* 3.5, e2038.
- Rodríguez-Cattaneo, Alejo, Pedro A Aguilera y Angel A Caputi (2017b). “Waveform sensitivity of electroreceptors in the pulse-type weakly electric fish *Gymnotus omarorum*”. En: *Journal of Experimental Biology* 220.9, págs. 1663-1673.
- Sas, Emilia y Leonard Maler (1987). “The organization of afferent input to the caudal lobe of the cerebellum of the gymnotid fish *Apteronotus leptorhynchus*”. En: *Anatomy and embryology* 177.1, págs. 55-79.
- Scheich, H (1977). “Neural basis of communication in the high frequency electric fish, *Eigenmannia virescens* (jamming avoidance response)”. En: *Journal of comparative physiology* 113.2, págs. 181-206.

- Scheich, H, Th H Bullock y RH Hamstra (1973). "Coding properties of two classes of afferent nerve fibers: high-frequency electroreceptors in the electric fish, *Eigenmannia*." En: *Journal of Neurophysiology* 36.1, págs. 39-60.
- Scheich, Henning y Theodore H Bullock (1974). "The detection of electric fields from electric organs". En: *Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates*. Springer, págs. 201-256.
- Schlegel, Peter A (1973). "Perception of objects in weakly electric fish *Gymnotus carapo* as studied in recordings from rhombencephalic neurons". En: *Experimental brain research* 18.4, págs. 340-354.
- Segundo, JP, GP Moore, LJ Stensaas y TH Bullock (1963). "Sensitivity of neurones in *Aplysia* to temporal pattern of arriving impulses". En: *Journal of Experimental Biology* 40.4, págs. 643-667.
- Shieh, KT, WILLARD Wilson, MICHAEL Winslow, DW McBride y CARL D Hopkins (1996). "Short-range orientation in electric fish: an experimental study of passive electrolocation." En: *Journal of Experimental Biology* 199.11, págs. 2383-2393.
- Shumway, Caroly A (1989). "Multiple electrosensory maps in the medulla of weakly electric gymnotiform fish. I. Physiological differences". En: *Journal of Neuroscience* 9.12, págs. 4388-4399.
- Szabo, T y A Fessard (1974). "Physiology of electroreceptors". En: *Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates*. Springer, págs. 59-124.
- Szabo, T, H Sakata y M Ravaille (1975). "An electrotonically coupled pathway in the central nervous system of some teleost fish, *Gymnotidae* and *Mormyridae*". En: *Brain research* 95.2, págs. 459-474.
- Watson, Deborah y Joseph Bastian (1979). "Frequency response characteristics of electroreceptors in the weakly electric fish, *Gymnotus carapo*". En: *Journal of comparative physiology* 134.3, págs. 191-202.
- Yager, DD y CD Hopkins (1993). "Directional characteristics of tuberous electroreceptors in the weakly electric fish, *Hypopomus* (*Gymnotiformes*)". En: *Journal of Comparative Physiology A* 173.4, págs. 401-414.
- Zipser, BIRGIT y Michael V Bennett (1976). "Interaction of electrosensory and electro-motor signals in lateral line lobe of a mormyrid fish". En: *Journal of neurophysiology* 39.4, págs. 713-721.