

Tesis de Maestría
PEDECIBA - Biología
Subárea Neurociencia

**Estudio de las bases neurales de un proceso de
integración sensorio-motriz en vertebrados:
modulación central de un sistema sensorial por un
comando motor.**

Virginia Comas

Orientador: Dr. Michel Borde

Laboratorio de ejecución: Neurofisiología Celular y Sináptica
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina
Montevideo, Uruguay

Tribunal: Dr. Omar Macadar

Dr. Angel Caputi

Dra. Ana Silva

INDICE

Abreviaturas	iv
Resumen	1
Capítulo I: Introducción	3
a) Integración sensorio-motriz	3
b) Respuesta de escape en peces teleósteos	9
c) Sistema de electrorrecepción activa	14
d) Modulación de la electrorrecepción activa por un comando motor	19
Capítulo II: Hipótesis y objetivos	25
Capítulo III: Aspectos metodológicos generales	28
Capítulo IV: Identificación de las PPs de acuerdo a criterios anatómicos	31
a) Metodología	31
b) Resultados	35
Capítulo V: Identificación funcional de nPreMP	42
a) Metodología	42
b) Resultados	44
i) Neuronas diencefálicas	44
ii) Neuronas del área octavo-lateral	46
iii) Neuronas del bulbo raquídeo caudal	48
Capítulo VI: Participación de las nPreMP en el M-ARDOE	50
a) Metodología	50
i) Bloqueo irreversible de las nPreMP	51
ii) Bloqueo reversible de las nPreMP	52
b) Resultados	53
i) Inactivación permanente de las nPreMP diencefálicas	54
ii) Inactivación transitoria de las nPreMP	55
- Inactivación de las nPreMP diencefálicas	55
- Inactivación de las nPreMP bulbares	56
iii) Registro de unidades	61
Capítulo VII: Discusión	65
a) nPreMP en <i>G. omarorum</i>	66
b) Las nPreMP como nexo entre el sistema electrosensorial y los circuitos relacionados a la CM	71
c) El M-ARDOE: una modulación de un sistema sensorial activo por comando motor	74
Conclusiones y perspectivas	79
Referencias	81

Abreviaturas

AP5: ácido (\pm)2-amino-5-fosfonopentanoico
C: cisterna cerebelo-bulbar
CC: crista cerebellaris
CCb: cerebelo
CM: célula de Mauthner
cMP: célula marcapaso
CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
complejo HBC
CP: núcleo central posterior del tálamo
cR: célula de relevo
DC: descarga corolario
DFI: núcleo diffusus lateralis
DOE: descarga del órgano eléctrico
EHP: potencial hiperpolarizante extrínseco
(por su sigla en inglés)
ELL: lóbulo eléctrico
ERA: electrorrecepción activa
FR: formación reticular
Glu: glutamato
ISM: integración sensorio-motriz
M-ARDOE: aceleración rápida de la
frecuencia de la DOE dependiente de la
CM
MgVIII: núcleo octavo-lateral magnocelular
mlf: fascículo longitudinal medial
MNs: motoneuronas

MON: núcleo octavo-lateral medial
NEB: núcleo electromotor bulbar
nLL: nervio de la línea lateral
nPreMP: neurona premarcapaso
nTPP: núcleo periventricular del tubérculo
posterior
nVIII: nervio auditivo
OE: órgano eléctrico
PA: potencial de acción
PBS: buffer fosfato salino (por su sigla en
inglés)
PMRF: formación reticular paramediana
PPs: estructura premarcapaso
PreMP: premarcapaso
SI: segmento inicial
SNC: sistema nervioso central
SREE: sistema reticuloespinal de escape
TA: núcleo tuberis anterior
TeO: tectum óptico
tVd: tracto trigeminal descendente
V: ventrículo
WGA: aglutinina del germen de trigo (por
su sigla en inglés)
 τ_{DEC} : constante de tiempo de la
recuperación de la frecuencia basal

RESUMEN

A pesar de los avances recientes acerca de los efectos de las colaterales de comandos de origen motor sobre las estructuras de procesamiento sensorial, los mecanismos neurales involucrados en la modulación de los sistemas sensoriales activos por señales internas derivadas de estructuras de control motor aún se desconocen. Nuestro trabajo trata acerca de las bases neurales de la modulación del componente motor de un sistema sensorial activo provocado por una colateral de un comando motor en un gymnotiforme. *Gymnotus omarorum* emite descargas rítmicas de su órgano eléctrico (DOE) en respuesta a un comando originado en el núcleo electromotor bulbar (NEB). En esta especie, la activación de la célula de Mauthner (CM), célula comando para la respuesta de escape en la mayoría de los teleósteos, provoca un aumento abrupto y duradero de la frecuencia de la DOE (M-ARDOE). En este trabajo mostramos que las estructuras premarcapaso (PPs), que controlan la descarga del NEB, son el nexo entre la CM y el sistema de la electrorrecepción activa (ERA). Nos propusimos identificar las PPs involucradas en esta modulación de la DOE mediante criterios morfológicos y funcionales, así como también determinar su papel en la organización de esta modulación.

La inyección iontoforética de biocitina a nivel de las células marcapaso del NEB produjo el marcaje retrógrado de neuronas ubicadas bilateralmente a nivel del diencéfalo y una población de neuronas dispersas que integran el sector dorsal de la formación reticular bulbo-protuberancial. La aplicación local de glutamato en topografías seleccionadas según el marcaje obtenido provocó aceleraciones transitorias de la DOE de corta latencia. La inactivación de PPs sugiere que las neuronas premarcapaso diencefálicas son responsables de la

duración del M-ARDOE mientras que las neuronas bulbo-protuberanciales contribuyen a determinar la amplitud de la misma.

La correlación temporal de las consecuencias motoras y sensoriales de la activación de la CM sugiere que el M-ARDOE está involucrado en la selección de la trayectoria de escape.

Este trabajo ha dado origen a la publicación:

The neural substrate of a sensory modulation triggered by a motor command for escape in a gymnotid fish. **Virginia Comas & Michel Borde** *J Neurophysiol* (Epub 18 de agosto de 2010).

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

a) Integración sensorio-motriz

La integración de información sensorial y el consecuente desarrollo de respuestas adaptativas son la clave fundamental de la adaptación de un individuo al medio. En la mayoría de los casos estas respuestas involucran un despliegue motor. Este proceso, denominado genéricamente como de integración sensorio-motriz (ISM) pauta en gran medida la organización del sistema nervioso.

De acuerdo con los principales autores que han abordado el estudio de estos procesos (Sperry, 1950, von Holst y Mittelstaedt, 1950; Sherrington, 1961; Marsden y col., 1981; Eaton y col., 1991; Crapse y Sommer, 2008) entendemos como ISM a toda interacción anatómica y funcional entre los sistemas sensoriales y motores.

Los procesos de ISM operan a diferentes niveles de organización del sistema nervioso y determinan centralmente el desempeño motor. De acuerdo al tipo de interacción entre los sistemas sensoriales y motores, en el sistema nervioso es posible distinguir: I) procesos de ISM en los que la información sensorial aferente está involucrada en la generación del movimiento; II) ISM en la que la información sensorial desempeña un rol permisivo o modulador del movimiento; III) procesos de ISM en los que los comandos motores modulan la información sensorial aferente tanto en su origen a nivel receptorial como de su procesamiento central; y IV) procesos de ISM que involucran la modulación de sistemas sensoriales activos durante el movimiento, fenómeno que ha sido descrito en vertebrados. Estos diferentes tipos de interacción implican procesos de ISM de complejidad creciente.

I) Entre los procesos de ISM relativamente más simples podemos considerar a los que subyacen a reflejos espinales de origen muscular y a las respuestas de escape. En el primer caso, la información codificada por los husos neuromusculares, mecanorreceptores musculares, es integrada a nivel de la motoneurona (MN), cuya descarga provoca la contracción muscular. Las respuestas musculares que resultan de este proceso sencillo de ISM son estereotipadas, aunque pueden ser moduladas por entradas provenientes de otros sectores del sistema nervioso central (SNC). En estas respuestas reflejas, tanto la fuerza contráctil como la duración de la respuesta dependen de la intensidad del estímulo. Los parámetros que caracterizan a la respuesta muscular están determinados principalmente por las características de la información sensorial. Pese a su carácter relativamente estereotipado, estudios en vertebrados homeotermos han permitido determinar que los reflejos integrados a nivel medular segmentario son modulados de acuerdo al contexto comportamental en el que se desarrollan (Cole y col., 1984; Marsden y col., 1985).

Las respuestas de escape por su parte, aún cuando suelen involucrar niveles intermedios de integración motora (Eaton y col., 1991), resultan de un proceso relativamente simple de ISM en la que un estímulo sensorial, novedoso e intenso, desencadena un acto motor específico tendiente a alejar al individuo de la fuente del estímulo. En vertebrados, este tipo de respuestas han sido bien caracterizadas en los peces teleósteos (Eaton y col., 1977, 2001), y es organizada por un grupo de neuronas retículoespinales cuya activación por aferentes sensoriales provoca la contracción de los grupos musculares

responsables del acto motor. Más adelante ahondaremos en este tipo de estrategia de ISM.

II) El análisis del desempeño motor durante el desarrollo de respuestas adaptativas en vertebrados pone de manifiesto la existencia de procesos de ISM relativamente más complejos. Estos procesos comprenden p.ej. la integración sensorial en línea durante el desempeño motor a niveles intermedios de integración (Marsden y col., 1985).

En un simple movimiento como el de alcanzar un objeto de forma efectiva (“reaching” y “grasping”), que implica un nivel de ISM más complejo como el control motor dependiente de la retroalimentación sensorial, los músculos involucrados deben ser activados de acuerdo a una secuencia precisa y una adecuada fuerza de contracción. Para este fin, el sistema nervioso requiere de información acerca de la posición inicial de la extremidad tanto en relación al objeto como al cuerpo del individuo. Esta información se origina desde diferentes fuentes sensoriales (por ejemplo visión y propiocepción) y contribuye a la elaboración de una salida motora con un patrón específico, que debe ser monitorizado y actualizado a medida que se ejecuta el movimiento. Uno de los estudios pioneros que señalan la relevancia de la retroalimentación sensorial en el control motor corresponde al desarrollado por Mott y Sherrington (1895) en primates. En estos estudios se analizaron los efectos de la sección de las raíces dorsales de una de sus extremidades en el desempeño motor de animales entrenados. Durante un período de aproximadamente 2-6 meses luego de la deafferentización, los monos excluyeron a la extremidad afectada de su repertorio motor.

III) Como expresión de un proceso de ISM de mayor complejidad se ha descrito la modulación de la información sensorial aferente por parte de los comandos motores en el contexto de un acto motor. Entendemos por comando motor a toda descarga o patrón de descargas generada dentro del SNC que lleva a la excitación de MNs α espinales (McCloskey, 1981). Un ejemplo clásico que pone de manifiesto la modulación de la información sensorial desde el SNC lo constituye la modificación de la sensibilidad del huso neuromuscular que ocurre durante la ejecución de algunos actos motores (Matthews, 1964). Asimismo, la evidencia experimental tanto en vertebrados como invertebrados sugiere que la ejecución de un movimiento voluntario implica un comando motor hacia los efectores responsables del acto motor, así como una copia de dicho comando dirigida a estructuras centrales asociadas al procesamiento de información sensorial generada durante la ejecución del acto motor (Teuber, 1960; Crapse y Sommer, 2008). En términos generales, se ha denominado como comando colateral interno a toda señal neural que deriva de comandos motores, se mantiene dentro del SNC y proyecta a estructuras centrales de los sistemas sensoriales involucrados en el acto motor (McCloskey, 1981). Este comando colateral interno fue denominado como “copia eferente” por von Holst y Mittelstaedt (1950). Basados en estudios realizados en invertebrados, estos autores propusieron que la copia eferente proveería de un sustrato neural para diferenciar la reaferencia de la exaferencia. Se denomina reaferente a las señales sensoriales aferentes derivadas de la ejecución del acto motor y se distingue de la información exaferente en que esta última constituye la información sensorial proveniente del entorno cuyo origen no se relaciona con la ejecución del acto motor (von Holst y Mittelstaedt, 1950). Sperry (1950) por

su parte, de acuerdo a observaciones realizadas en peces, designó como “descarga corolario” (DC) a la colateral del comando motor que proyecta a estructuras centrales involucradas en el procesamiento sensorial. Según el autor, la DC de un comando motor permitiría anticipar las consecuencias sensoriales del acto motor sin que éstas interfieran en el procesamiento de información sensorial originada en el entorno, y la ulterior elaboración de la percepción.

Uno de los ejemplos de DC mejor conocidos puede encontrarse en peces mormyridos, peces eléctricos africanos, que poseen una modalidad sensorial particular: la electrorrecepción activa, que será detallada más adelante. Los peces eléctricos generan campos eléctricos que utilizan para la comunicación y la identificación de objetos en el entorno, denominada descarga del órgano eléctrico (DOE). A través de los nervios de la línea lateral, la información electrorreceptiva llega a la primera estación de procesamiento central en el cerebro de los mormyridos: el lóbulo eléctrico (ELL) (Bell, 1981).

Bell (1981) demostró la presencia de una copia eferente adaptativa en el ELL de peces mormyridos de pulso, que, en la mayoría de los casos, es utilizada para cancelar la entrada proveniente del estímulo autogenerado. La DC asociada al comando electromotor que controla la DOE proyecta sobre el ELL (Bennett y Steinbach, 1969; Zipser y Bennett, 1976; Bell, 1982) con diferentes cursos temporales y diferentes efectos sobre cada una de las regiones sobre las que proyecta. A los efectos de la cancelación de la información reafereente, las células ganglionares, células principales del ELL, operan como comparadores integrando la información electrorreceptiva generada con cada DOE que proyecta a nivel del árbol dendrítico basal y la DC

que lo hace sobre el árbol dendrítico apical. A través de este mecanismo, el animal es capaz de distinguir la información exaferente de la reaferente (Bell, 1989, 1990; Bell y col., 1992, 1997a, 1997b).

IV) En contraste con el caudal de conocimientos disponible para el análisis de los procesos de ISM que operan en niveles jerárquicos inferiores del control motor (p.ej. reflejo miotático) y a los mecanismos que subyacen a las estrategias clásicas de ISM tales como los mecanismos de las DC (Bell, 1989; Cullen, 2004; Sawtell y col., 2005; Poulet y Hedwig, 2006), la modulación de sistemas sensoriales activos¹ durante el movimiento sugiere una estrategia de ISM diferente cuyos mecanismos neurales empiezan a ser develados.

Ejemplos de la modulación de los sistemas sensoriales activos son la electrorrecepción, la ecolocalización y el “whisking”. El “whisking” es el movimiento rítmico de las vibrisas que generan ratas y ratones para obtener información táctil del entorno (Kleinfeld y col., 2006). La corteza motora de las vibrisas es capaz de controlar este movimiento, cuyas características básicas (frecuencia y patrón) parecen depender de un generador subcortical (Brecht y col., 2004). El “whisking” puede ser de exploración, con movimientos amplios de las vibrisas hacia delante y detrás, con una frecuencia de entre 5 y 15 Hz. Sin embargo, durante la exploración discriminativa (denominada foveación por Kleinfeld y col., 2006) el “whisking” alcanza frecuencias de 15 a 25 Hz, al tiempo que las vibrisas son impulsadas hacia delante con movimientos cortos. A pesar de que esta fenomenología ha sido ampliamente estudiada, aún no se ha determinado el sustrato neural responsable del aumento de frecuencia.

¹ Los sistemas sensoriales extraen información mediante el análisis de patrones de energía generados por, o reflejados desde, objetos en el entorno. En la mayoría de los casos, la energía se origina desde una fuente extrínseca al organismo. Por ejemplo, los sistemas sensoriales tales como la visión cuentan con la energía electromagnética proveniente del sol. Un modo alternativo de operar, adoptado por algunos organismos, es el uso de energía generada por el mismo animal para explorar el entorno. Los términos pasivo y activo son utilizados a menudo como un modo conveniente de distinguir entre estos dos tipos de detección (Nelson y MacIver, 2004).

En el pez eléctrico *Gymnotus omarorum* hemos descrito y caracterizado la modulación del sistema neural responsable de la electrorrecepción activa desencadenada por un potencial de acción en la célula de Mauthner, célula retículoespinal, origen del comando para el acto motor de escape (Falconi y col., 1995, 1997; Curti y col., 1999). Esta modulación constituye un ejemplo de ISM de relativa complejidad en la que un comando motor modula un sistema sensorial activo e implica la interacción entre dos sistemas vitales para el animal, i.e.: el sistema neural responsable del escape motor y el sistema de la electrorrecepción activa. En consecuencia, haremos referencia a las características más salientes de ambos sistemas.

b) Respuesta de escape en peces teleósteos.

La mayoría de los vertebrados acuáticos evaden sus predadores produciendo un comportamiento característico de escape (Fig. 1). Esta respuesta de escape presenta una duración aproximada de 100 ms y está compuesta por dos fases. En las especies de teleósteos en que se ha estudiado la cinemática de la respuesta de escape (la mojarra azul *Lepomis macrochirus*, el pez ángel *Pterophyllum eimekei* y el pez dorado *Carasius auratus*), la duración de la fase I es de aproximadamente 30 ms (Eaton y col. 1988; Domenici y Blake, 1991; Tytell y Lauder, 2008) y es evasiva. Durante la fase II el pez se aleja de la fuente del estímulo, es propulsiva y se desarrolla en los siguientes 70 ms. Experimentalmente, la respuesta de escape puede ser disparada por estimulación visual, acústica o de la línea lateral, lo que sugiere que en el hábitat natural de los peces estas modalidades sensoriales proveen información crítica acerca del ataque del predador. La latencia para el inicio del movimiento en respuesta a estímulos vibratorios es de 11-13 ms en el pez

dorado (Zottoli, 1977; Eaton y col., 1981). Una vez desencadenada, la fase I involucra casi toda la musculatura somática y presenta ciertas particularidades que la caracterizan: el animal adopta una forma hidrodinámica debido a la activación bilateral simétrica de los músculos de la cabeza que produce el cierre de mandíbula, la retracción de los ojos, el cierre de opérculos y la aducción de las aletas pares (componente cefálico). Al mismo tiempo, la característica más prominente es la curvatura rápida y unilateral del tronco y cola, dando como resultado la forma en C que le da nombre al comportamiento (C-start, componente espinal). A pesar de estas características relativamente constantes del comportamiento durante la fase I, hay cierta variabilidad en los detalles de la ejecución de la fase II que dependen de claves sensoriales obtenidas, presumiblemente, una vez finalizada la fase I (Eaton y col., 1988).

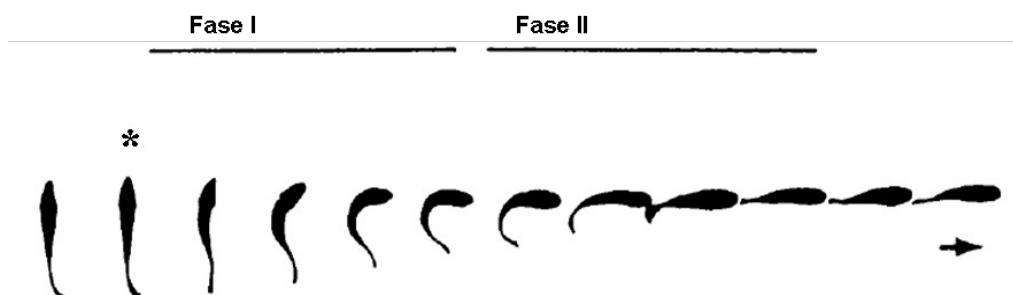


Figura 1: Respuesta de escape en el pez dorado. Siluetas obtenidas mediante cinematografía de alta velocidad de un animal ubicado en una pecera al que se le aplica un estímulo vibratorio (asterisco). Se ilustran las dos fases de la respuesta de escape. Los dibujos fueron realizados a intervalos de 5 ms (modificado de Eaton y col., 1977).

El registro extracelular de un animal implantado crónicamente y en nado semi-restringido reveló que el comportamiento de escape está precedido por un único potencial de acción (PA) restringido a una de las células de Mauthner (CM), 3-5 ms después del estímulo acústico (Zottoli, 1977, Weiss y col., 2006). Las CM (Fig. 2A), presentes también en anfibios durante el estado de larva y en algunos adultos, son un par de células retículoespinales grandes y

simétricas ubicadas en el bulbo raquídeo de los peces teleósteos, a la altura de la entrada del nervio del VIII par craneal. En términos generales, cada una de ellas posee dos dendritas primarias, una que corre en sentido caudo-lateral (dendrita lateral) y otra en sentido rostro-ventral (dendrita ventral). Sus axones de gran diámetro (aproximadamente 65 μm) cruzan la línea media en el bulbo y descienden a lo largo de toda la médula espinal, dando origen a colaterales cortas que contactan neuronas craneales y espinales en su recorrido (Funch y col., 1984; Trujillo-Cenóz y Bertolotto, 1990; Ritter y col., 2001). Los componentes cefálicos de la respuesta de escape resultan de la activación de un conjunto de interneuronas (neuronas de relevo craneales, NRC) que proyectan sobre las MNs craneales. Las NRC reclutan asimismo neuronas inhibitorias (PHP) responsables de las inhibiciones recurrente y recíproca de la CM (Furukawa y Furshpan, 1963; Faber y Korn, 1978; Charpier y col., 1994) cuya activación contribuye a la organización circuital del reflejo. De manera característica, los circuitos asociados a la CM poseen un alto factor de seguridad para la transmisión y en consecuencia para la ejecución del movimiento (Faber y col., 1989). Esta característica ha sido explicada por las peculiaridades del circuito involucrado: i) la elevada eficacia del contacto de la CM con sus células blanco (transmisión 1 a 1) y ii) la redundancia de la vía de las NRC (Auerbach y Bennett, 1969; Highstein y Bennett, 1975; Hackett y Faber, 1983). La elevada eficacia sináptica determina que la sinapsis de la CM con sus células postsinápticas presente depresión por frecuencia (estimulación repetitiva superior a 10 Hz; Hackett y col., 1989).

El comienzo de la fase I del escape se detecta como un desvío de la cabeza hacia el lado opuesto a la CM activada, aproximadamente 8 ms

después del PA en la CM (Eaton y col., 1981). Esta latencia es consistente con la existencia de una vía directa entre la CM y MNs espinales más el tiempo de contracción muscular.

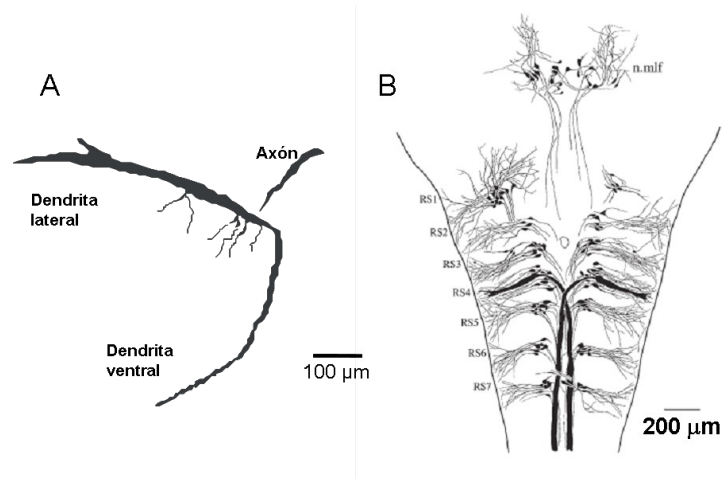


Figura 2: Célula de Mauthner y su localización en el tronco. **A:** Reconstrucción de la CM izquierda de *G. omarrorum* por superposición de dibujos en cámara clara obtenidos a partir de cortes transversales (80 µm de espesor). La CM fue caracterizada electrofisiológicamente y marcada intracelularmente utilizando biocitina (modificado de Borde y col., 2004). **B:** Ilustración del tronco encefálico del pez dorado en cámara clara a partir de cortes horizontales. Se muestran las neuronas retículoespinales, algunas de las cuales integran probablemente el sistema reticular de escape, así como las neuronas del núcleo del fascículo longitudinal medial (n. mlf) marcadas retrógradamente con peroxidada de rábano. Se indican los 7 segmentos o rombómeros (RS1- RS7), las CM se localizan en el RS4. Los somas presentan dendritas laterales, que se extienden hacia la periferia, y axones que cruzan la línea media y proyectan hacia la médula espinal (modificado de Lee y col., 1993).

El concepto de neurona comando emerge de los estudios de Wiersma e Ikeda (1964) en invertebrados. En este sentido, de acuerdo a Kupfermann y Weiss (1978), una célula puede ser considerada neurona comando si cumple con los criterios de correlación (actividad de la célula junto con la ocurrencia de la respuesta en estudio), necesidad y suficiencia (la activación de la célula es necesaria y suficiente para el inicio del comportamiento). En este contexto la CM fue postulada inicialmente como neurona comando para la respuesta de escape en los teleósteos (Faber y Korn, 1978). Si bien existe correlación entre el PA en la CM con el comienzo de la respuesta de escape, los criterios de

necesidad y suficiencia no se cumplen de forma totalmente satisfactoria. Cuando la CM es inactivada (ya sea de forma reversible como irreversible) es posible obtener una respuesta de escape aunque su latencia al comienzo del escape aumenta en aproximadamente 5 ms y algunas características cinemáticas se modifican (DiDoménico y col., 1988). Este aumento de latencia en la respuesta de escape puede ser decisivo en la supervivencia del individuo. Asimismo ha sido demostrado por otro grupo que la ablación de las CM provoca además una disminución en la probabilidad de la ocurrencia de la respuesta de escape (Zottoli y col., 1999).

Ante la estimulación de la CM a través de electrodos implantados a cada lado de la columna vertebral se obtiene una respuesta de escape robusta, pero el desempeño del animal está significativamente degradado en varios sentidos (Nissanov y col., 1990). Esta activación provoca una respuesta similar al C-start provocado por un estímulo sensorial, sin embargo la velocidad angular de la fase I se reduce un 22% mientras que la distancia recorrida durante la fase II se reduce un 15%. Estos resultados sugieren que si bien la CM participa en la respuesta de escape, no es la única célula que debe ser activada para que el comportamiento se ejecute de forma completa.

Recientemente, resultados obtenidos a partir de larvas de pez cebra utilizando microscopía confocal asociada a señales de calcio mostraron que un conjunto de neuronas retículoespinales presentan señales de calcio de corta latencia ante un golpe leve en la cabeza, estímulo que provoca respuestas de escape (Gahtan y col., 2001). Estas evidencias sugieren que la CM es una neurona que compone un sistema reticular de escape (SREE) del tronco encefálico (Eaton y col., 1991). Aún cuando las características generales del

escape motor en teleósteos dependen de la activación específica de un conjunto de células retículoespinales, incluyendo la CM, la participación de esta neurona incrementa la probabilidad de ocurrencia del escape motor ante un estímulo y le confiere a la respuesta de escape las siguientes características distintivas: una corta latencia y un robusto giro de aproximadamente 45° en dirección opuesta al sitio de aplicación del estímulo (Eaton y col., 2001).

c) Sistema de electrorrecepción activa

Entre las modalidades sensoriales desarrolladas por los animales acuáticos, y en particular por los peces, se destaca la electrorrecepción. Esta modalidad permite a los peces detectar la presencia de objetos y animales utilizando la información derivada de la emisión de energía eléctrica por estos objetos y de la heterogeneidad natural de la impedancia eléctrica del entorno. Se estima que el 30% de los peces son electrorreceptivos, y el 5% de éstos poseen órganos especializados para emitir electricidad (llamados órganos electrogénicos, OE) y por lo tanto a éstos últimos se los denomina comúnmente como peces eléctricos (Caputi, 1999). El sistema neural de estos peces está formado por un componente electrogénico, responsable de la emisión de la DOE, y por un sistema neural electrorreceptivo altamente desarrollado, encargado del procesamiento de señales sensoriales provocadas por los campos eléctricos que genera el propio animal durante cada DOE (Fig. 3; Lorenzo y col., 2001; Caputi, 2004). Los peces eléctricos utilizan los campos eléctricos generados por la DOE como transportadores de señales eléctricas con el fin de producir imágenes eléctricas del medio que los rodea (Lissman, 1958). Las DOEs llevan dos tipos de señales: información acerca del entorno (ERA; Lissman y Machin, 1958) e información acerca de presencia, localización

y atributos de individuos de la misma especie (electrocomunicación; Black-Cleworth, 1970). Los peces emiten descargas estereotipadas con forma de onda y frecuencia especie específica y presentan un arreglo bidimensional de electrorreceptores capaces de responder en forma selectiva a estos campos eléctricos y a la forma de onda de la especie (Lissman y Machin, 1958). El procesamiento de la imagen eléctrica permite al pez discriminar y reconocer objetos así como también comunicarse entre individuos de la misma especie (Bullock y Heiligenberg, 1986; Heiligenberg, 1991).

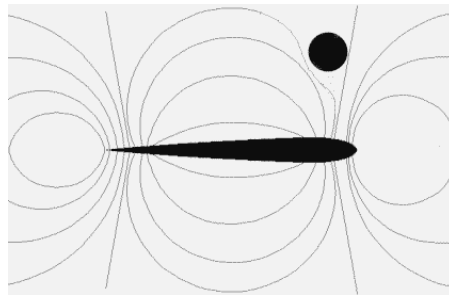


Figura 3: Electrorrecepción activa. Esquema de un pez eléctrico rodeado por las líneas de corriente emitidas por el mismo hacia su entorno cercano. El círculo negro representa un objeto de conductividad diferente a la del agua que distorsiona la distribución de las líneas de corriente. Los electrorreceptores de la piel permiten detectar estas distorsiones y promueven la construcción de la imagen neural del objeto (Tomado de Macadar y col., 2000).

En los gymnotiformes, el control de la secuencia temporal de los intervalos de las DOEs depende de la actividad de una población de neuronas bulbares (núcleo electromotor bulbar, NEB) compuesto por dos tipos neuronales: las neuronas marcapaso (cMP), electrotónicamente acopladas, y las células de relevo (cR). La frecuencia de descarga de las cMP determina la frecuencia de la DOE y está modulada por entradas excitadoras e inhibitoras. Este núcleo descarga sincrónicamente, disparando la activación de una red neural que coordina la actividad de cientos de unidades efectoras.

El circuito electrogénico que recibe la señal comando está compuesto por dos grupos celulares: las electromotoneuronas y los electrocitos. Las cR son comandadas por las cMP (Fig. 4A y B), y sus axones corren caudalmente por la médula espinal proyectando sobre electromotoneuronas espinales. Estas, a su vez, inervan los electrocitos, que constituyen el OE en la mayoría de los gymnotiformes, ocupando la región ventral del animal a lo largo del pez desde la papila anal hasta la punta de la cola. Los electrocitos son células de origen miogénico que perdieron la propiedad contráctil, pero mantuvieron su capacidad electrogénica.

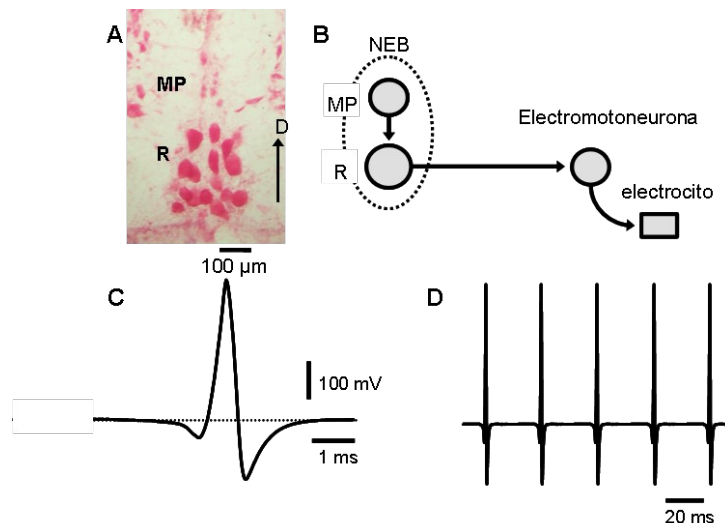


Figura 4: Características de la electrogeneración en *G. omarorum*. **A:** Microfotografía de un corte transversal del NEB, tinción con rojo de Pyronina Y. Se observan las células marcapaso (cMP, sector dorsal) y las células de relevo (cR, sector ventral). La flecha indica la dirección dorsal (D). **B:** Esquema del sistema electrogenerador en el que se ilustra el NEB, sus componentes celulares (cMP y cR) su proyección (axones de las cR) hacia las electromotoneuronas espinales. Estas últimas dan origen a la inervación motora de los electrocitos. **C:** Registro bitópico cabeza-cola de la DOE de *G. omarorum* ilustrando la forma de onda característica de esta especie. **D:** Mismo registro que en C a menor velocidad de barrido mostrando el carácter rítmico y regular de la DOE (modificado de Borde y col., 2004).

En los peces eléctricos de pulso, las DOEs son breves (4-5 ms de duración) y están separadas por intervalos comparativamente prolongados (20-50 ms; Fig. 4C y D). Estas características determinan que el pez obtenga información sobre el entorno durante el breve período de tiempo que dura cada

una de las descargas. Existe consenso en que **la frecuencia de la DOE determina la capacidad temporal discriminativa del sistema electrosensorial**, y por lo tanto la actualización de la imagen electrorreceptiva que tiene el animal del entorno.

En general en los gymnotiformes, durante despliegues comportamentales tales como de exploración o de interacción social se producen respuestas adaptativas que involucran modulaciones de la DOE (Lisman y Machin, 1958; Bullock y col., 1972; Heiligenberg, 1986; Barrio y col., 1991). Estas pueden presentarse como cambios de frecuencia, de forma de onda de la descarga, o ambas. En los gymnotiformes estudiados, tanto de pulso como de onda, las modulaciones de la frecuencia de la DOE son el resultado de la activación de estructuras premarcapaso (PPs) (Heiligenberg y col., 1981; Kawasaki y col., 1988; Keller y col., 1991) que proyectan sobre las células que componen el NEB. **Entendemos por PPs a toda estructura neural que proyecte en forma directa al NEB y cuya activación se exprese como una modificación de la frecuencia de la DOE.**

En los géneros que han sido estudiados (*Eigenmannia*, *Apteronotus*, *Brachyhypopomus*, *este último antes agrupado con el género Hypopomus*), los repertorios comportamentales incluyen aumentos y caídas de la frecuencia de la DOE, interrupciones de la misma, y brotes decrementales o chirps (Hopkins y Heiligenberg, 1978; Heiligenberg y Bastian, 1980; Heiligenberg y col., 1981; Hopkins y Westby, 1986; Kawasaki y col., 1988; Kawasaki y Heiligenberg, 1989). Estas modulaciones se originan en dos agrupaciones neuronales: el núcleo premarcapaso diencefálico (PPn) y el sublemniscal (sPPn), que proyectan sobre el NEB (Kennedy y Heiligenberg, 1994). El PPn ha sido

descrito como un núcleo bilateral del tálamo, en íntima relación con el núcleo central posterior (CP), y puede ser subdividido en dos regiones con características funcionales y citológicas diferentes: el PPnG con neuronas ovoideas pequeñas responsable de las aceleraciones graduales de la DOE, y el PPnC con neuronas estrelladas grandes cuya activación se asocia a los chirps. Las neuronas del PPnG proyectan sobre las cMP, mientras que las del PPnC lo hacen sobre las cR, activando receptores glutamatérgicos. En *Hypopomus* se reconoce una tercera región, el PPnI, compuesto por neuronas GABAérgicas (Kawasaki y Heiligenberg, 1990), que parecen ser responsables del enlentecimiento y apagado de la descarga de las cMP. Por su parte, el sPPn se encuentra representado por pocas neuronas dispersas, localizadas en un área medio-ventral al lemnisco lateral a nivel del rafe dorsal (Keller y col., 1991; Metzner, 1993). Las neuronas pertenecientes a este núcleo proyectan sobre las cR (ver por ejemplo Kawasaki y Heiligenberg, 1990 y Lorenzo y col., 2001), y su estimulación provoca interrupciones súbitas de la descarga de la DOE a través de la activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA.

En términos generales, las PPs pueden ser concebidas como un nivel de integración al que convergen diferentes señales neurales para ser subsecuentemente transformadas en modulaciones específicas de la actividad del NEB y con ello de las DOEs (Keller y col., 1990; Lorenzo y col., 2001; Santana y col., 2001; Caputi y col., 2005). Existe consenso en que la mayoría de estas señales neurales procede de estructuras de procesamiento de información electrosensorial. Sin embargo trabajos de marcaje retrógrado realizados por Wong (1997) han revelado que sobre las PPs diencefálicas proyectan estructuras tales como el telencéfalo ventral e hipotálamo. Por otra

parte, durante el cortejo, los peces modulan sus descargas, lo que sugiere que el eje neuroendócrino está vinculado a las PPs (Silva y col., 2008).

d) **Modulación de la electrorecepción activa por un comando motor.**

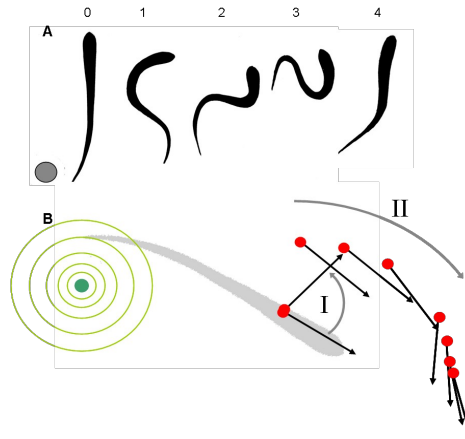


Figura 5: Escape en *G. omarorum*. **A:** Siluetas obtenidas del análisis cuadro a cuadro (intervalo 30 ms) de la respuesta del pez ante la caída de una esfera metálica (círculo gris). El estímulo es aplicado en el momento indicado por el 0, el animal se curva (1) y adopta sucesivas posturas durante el desplazamiento (2-4). **B:** Cambios de la postura y desplazamiento del pez analizados a partir del mismo registro videográfico (estímulo representado por círculos concéntricos). Los círculos rojos representan la posición aproximada del centro de masa del pez, y los vectores se extienden desde el mismo punto hacia la cabeza. Se ilustran las fases I y II de la respuesta de escape de acuerdo a las posturas adoptadas y los parámetros referidos por Eaton y col. (2001) (modificado de Borde y col., 2004).

Gymnotus omarorum es un pez gymnotiforme de pulso en el que nuestro grupo ha descrito las características electrofisiológicas de la CM (Borde y col., 1991). Las características del comportamiento en *G. omarorum* observadas en grabaciones de video sugieren una cinemática similar a la estudiada en el pez dorado (Fig. 5; Borde y col., 2004). Además de su carácter de neurona comando para el acto motor de escape, en esta especie la descarga de un único PA en la CM provoca un aumento abrupto y duradero de frecuencia de la DOE sin modificación de su forma de onda (Fig. 6; Falconi y col., 1995, 1997; Curti y col., 1999). Esta respuesta fue designada con el nombre de M-ARDOE².

² M-ARDOE: acrónimo de Aumento Rápido de la frecuencia de la DOE provocado por la CM.

Esta modulación pone de manifiesto la interacción entre el sistema neural responsable de un acto motor, como es el escape, y el sistema de la ERA.

En su descripción original, la estimulación de la médula espinal mediante un electrodo de estimulación bipolar sobre la columna vertebral provoca un incremento abrupto de la frecuencia de la DOE (hasta un 38% de la frecuencia control). La duración total de la modulación puede ser de hasta 5 segundos con un lento curso temporal de la recuperación de la frecuencia (Falconi y col, 1995).

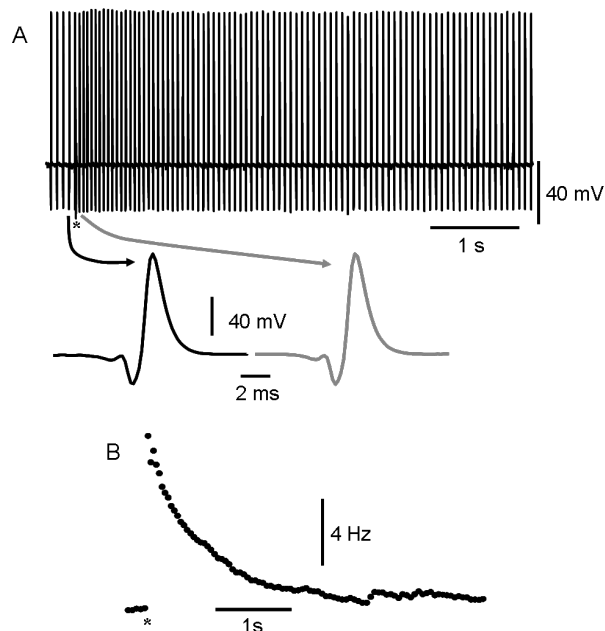


Figura 6: Aceleración rápida de la frecuencia de la DOE dependiente de la CM (M-ARDOE). **A:** Registro bitópico cabeza-cola de la DOE en un animal levemente curarizado (1 μ g/g) obtenido antes y después de la aplicación de un estímulo (asterisco) en la médula espinal mediante un electrodo bipolar apoyado en la columna vertebral, que provoca un aumento de la frecuencia de descarga. Se muestra la forma de onda de la DOE antes (trazo negro) e inmediatamente después de la aplicación del estímulo (trazo gris). **B:** Registro de frecuencia de la DOE en función del tiempo de la respuesta ilustrada en A. Como en A, en B el asterisco indica el instante de estimulación.

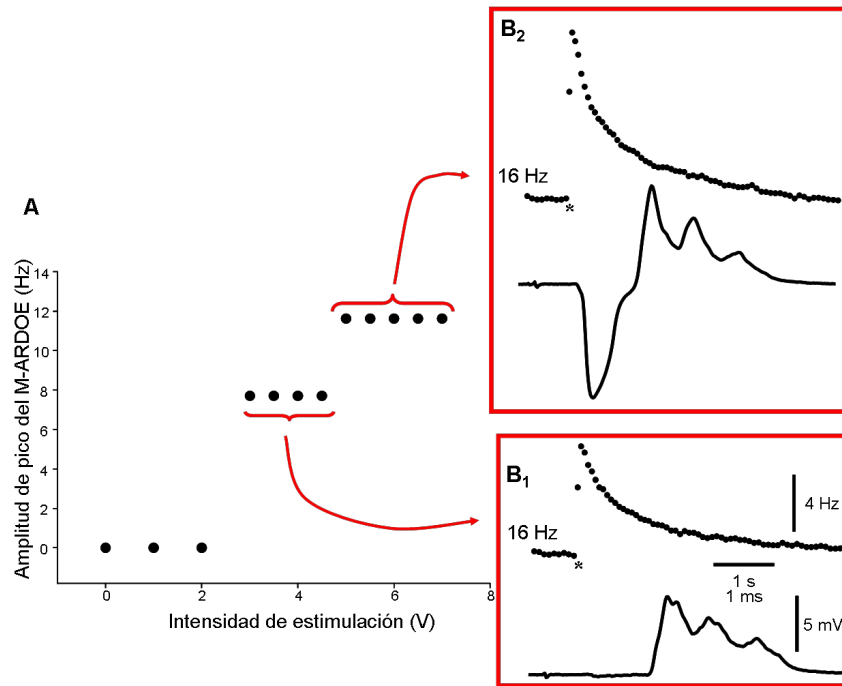


Figura 7: Criterio de correlación. La amplitud de pico del M-ARDOE depende del número de CMs reclutadas por el estímulo espinal (duración 0.01 ms). **A:** Gráfico de amplitud de pico del M-ARDOE en función de la intensidad de estimulación. Nótese que por debajo de 2 V no se produce modulación de la frecuencia de la DOE. Por encima de este valor la amplitud de pico se incrementa en pasos discretos. El primer incremento corresponde a la aparición del M-ARDOE (B_1 trazado superior) y se produce cuando se alcanza el umbral para el reclutamiento de una CM, de acuerdo al registro obtenido en las vecindades del segmento inicial de la CM contralateral. Este registro (B_1 trazado inferior) solo muestra la EHP. El siguiente incremento ocurre cuando se reclutan ambas CM (B_2 , ver M-ARDOE trazado superior) lo que se refleja en el registro electrofisiológico: la típica espiga antidrómica precede a la EHP (B_2 , trazado inferior). Incrementos ulteriores de la intensidad de estimulación no provocan modificaciones del M-ARDOE.

Las evidencias presentadas por el grupo apoyan la hipótesis de que este aumento de la frecuencia de la DOE es el resultado de la activación de la CM y no de otras neuronas eventualmente reclutadas por el estímulo en la médula espinal. El registro extracelular de una de las CM simultáneamente con el de la DOE al tiempo que se estimulaban los axones de las CM a nivel de la columna vertebral reveló que la intensidad de estimulación necesaria para el M-ARDOE presenta el mismo umbral que para el reclutamiento de una de las CM (Fig. 7A y B_1 arriba). Al aumentar la intensidad de estimulación para reclutar ambas CM,

la amplitud del M-ARDOE aumenta (Fig. 7A y B₂ arriba, Falconi y col., 1995). Sin embargo, a mayor intensidad de estimulación, la amplitud del M-ARDOE no se modifica. La forma de onda del potencial de campo registrado en la vecindad de la CM permite distinguir cuál de las dos CM es la reclutada en cada situación (Fig. 7B₁ y B₂ abajo, y ver aspectos metodológicos generales). Estas maniobras evidencian que existe correlación entre la activación de la CM y el M-ARDOE.

En el laboratorio se desarrollaron maniobras experimentales tendientes a determinar el cumplimiento de los criterios de suficiencia y necesidad de la CM como neurona comando para el M-ARDOE. Tanto la estimulación directa de la CM como la ortodrómica provocan una respuesta equivalente a la estimulación antidrómica de la misma (Falconi y col., 1995). Esta maniobra sugiere que es suficiente la actividad de la CM para que se exprese el M-ARDOE.

La estimulación del nervio de la línea lateral (nLL) provoca la respuesta de novedad: un aumento transitorio de la frecuencia de la DOE ante la presentación de un estímulo, que puede ser visual, mecánico, auditivo o eléctrico (Lissmann y Machin, 1958; Szabo y Fessard, 1965). La estimulación del nLL con intensidad supraumbral para la CM provoca una modulación de la frecuencia de la DOE de gran amplitud (Fig. 8A y B). Al inyectar una corriente anódica en las inmediaciones del segmento inicial (SI) de la CM se inhibe la generación del PA, y al estimular el nLL la modulación de frecuencia se reduce drásticamente (Fig. 8C). La resta punto a punto de los cambios de la frecuencia instantánea de la DOE provocados en ausencia y en presencia del PA en la CM (registro en los insertos B y C) revela el componente de la modulación de la DOE aportado exclusivamente por la activación de esta célula (Fig. 8D;

Kunizawa y Borde, resultados no publicados). Por lo tanto así como la CM ha sido postulada como neurona comando del escape motor, esta neurona también lo sería respecto del M-ARDOE al satisfacer razonablemente los criterios de correlación, necesidad y suficiencia.

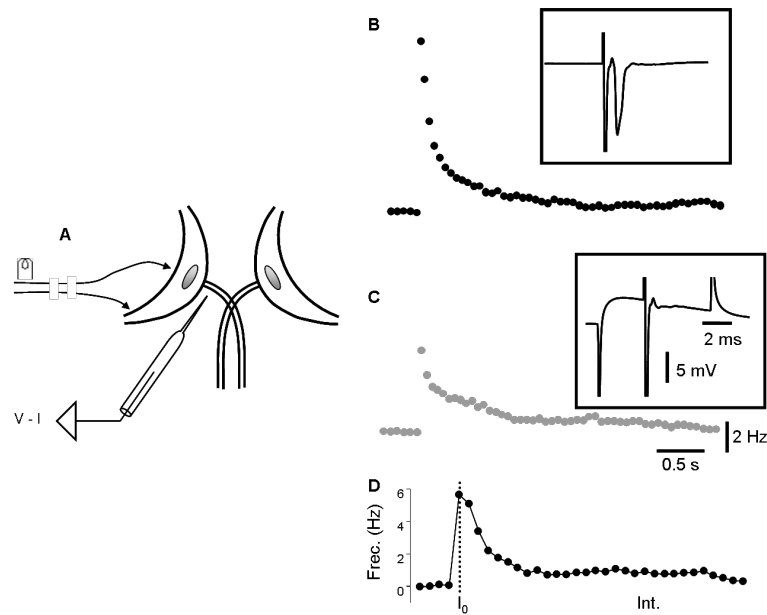


Figura 8: Criterio de necesidad. **A** Esquema de ambas CM y de las aferentes de la rama anterior del nervio de la línea lateral izquierdo (nLL) sobre las que se ha colocado un electrodo de estimulación. Se ilustra un electrodo ubicado en la vecindad del SI del axón utilizado para el registro (V) y/o la inyección de corriente (I). **B:** Gráfico de frecuencia de la DOE en función del tiempo de la respuesta a la estimulación del nLL. La intensidad de estimulación es umbral para la CM registrada (ver el registro extracelular en el inserto). **C:** Respuesta (frecuencia vs tiempo) provocada por el mismo estímulo que en B asociado a la inyección de corriente anódica de ~ 70 nA, suficiente para bloquear la generación del PA en la CM (registro en el inserto). **D:** Gráfico de frecuencia en función del intervalo obtenido mediante la resta punto a punto de la respuestas ilustradas en B y C. I_0 indica el intervalo en el que se aplica el estímulo en el nLL. La respuesta ilustrada en B incluye la respuesta de novedad provocada por el estímulo en el nLL (registro en C) y el M-ARDOE (gráfico en D). La activación de la CM es condición necesaria para la generación del M-ARDOE.

Nuestro grupo también ha determinado que el aumento de frecuencia de la DOE se debe a un potencial postsináptico excitador (EPSP) lento, duradero (500 ms de duración, 1.5 mV de amplitud) restringido a las cMP (Fig. 9A; Falconi y col., 1997; Curti y col., 2006), que depende de la activación de

receptores glutamatergicos de tipo NMDA y metabotrópicos (Fig. 9B; Curti y col., 1999). La latencia promedio entre la estimulación de los axones de las CM y la despolarización de las cMP es de aproximadamente 4.4 ms. Este dato sugiere que existen solo un par de neuronas interpuestas entre la CM y el NEB.

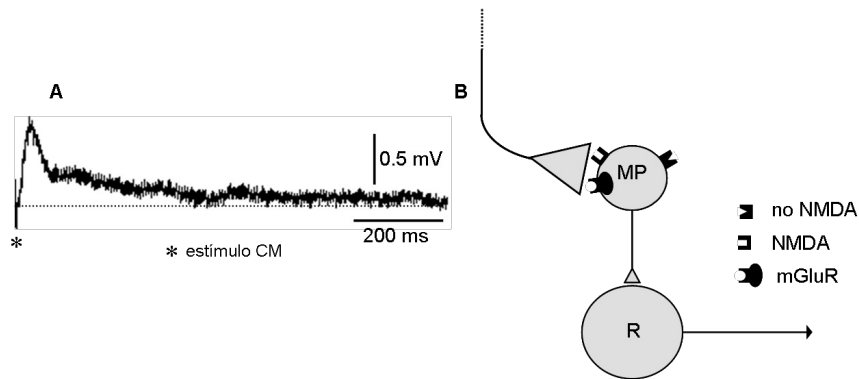


Figura 9: Fenomenología y farmacología del M-ARDOE. **A:** Potencial postsináptico excitador registrado en una cMP provocado por la activación antidrómica de una CM a nivel de la médula espinal (asterisco). La actividad espontánea del NEB fue silenciada utilizando MS-222. La línea punteada representa el potencial de membrana previo a la aplicación del estímulo (-55 mV). **B:** Resumen de los hallazgos del análisis farmacológico *in vivo*. Las cMP en *G. omarorum* presentan receptores glutamatergicos de tipo NMDA, no-NMDA y metabotrópicos (Curti y col., 1999), aunque sólo los receptores de tipo NMDA y metabotrópicos están involucrados en el M-ARDOE (modificado de Borde y col., 2004).

El M-ARDOE revela una estrategia de **ISM de alto nivel en la que un comando motor (un PA en la CM, comando motor para la respuesta de escape) provoca la modulación específica del sistema electrogenerador, parte integral del sistema neural responsable de la ERA.**

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las bases neurales del M-ARDOE, estrategia de ISM perteneciente a la cuarta categoría descrita (ver introducción), pueden ser esquematizadas en los términos ilustrados en la Fig. 10. De acuerdo a la hipótesis manejada por el grupo, entre la CM y el NEB sólo existen un par de neuronas interpuestas: las interneuronas postsinápticas a la CM y las PPs, que proyectan directamente al NEB. En este marco conceptual las PPs juegan un papel central en la organización del M-ARDOE integrando la señal derivada del comando motor para el escape y desencadenando la modulación de la actividad del NEB. En el marco de esta tesis, nuestro objetivo general consistió en el establecimiento de las bases neurales del M-ARDOE, con énfasis en la determinación del papel de las PPs en esta estrategia de ISM.

Nuestra hipótesis establece que, en *G. omarorum*, además de en otros comportamientos electromotores, las PPs están involucradas en la organización del aumento de la frecuencia de muestreo electrosensorial iniciado por la CM, ejemplo de ISM en vertebrados perteneciente a la cuarta categoría.

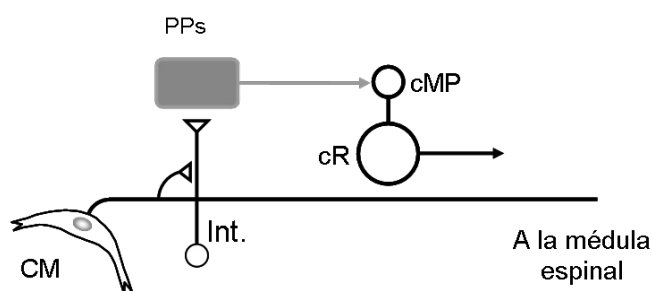


Figura 10: Diagrama que muestra el circuito neural hipotético involucrado en el M-ARDOE. La CM inerva un grupo de interneuronas (Int.) aún no identificadas, que proyectan sobre las PPs. Se ilustran asimismo las células que componen el NEB: cMP y cR. Sólo las primeras son blanco de las PPs involucradas en el M-ARDOE.

El trabajo realizado se enmarca en un objetivo general de nuestro grupo tendiente a la determinación de las bases neurales de una modulación de la descarga de la DOE, expresión de una estrategia de ISM de relativa complejidad en *Gymnotus omarorum*.

La utilización de un modelo comportamental en vertebrados de fácil acceso a las técnicas habituales de laboratorio, ofrece una oportunidad de privilegio para acceder al conocimiento de las bases neurales de la organización del comportamiento y de los procesos complejos de ISM. En *G. omarorum* nos encontramos con una respuesta que surge de la vinculación de dos sistemas vitales para el animal: el sistema de la ERA, principal modalidad sensorial de estos animales, y las CM, comando de la respuesta de escape.

En contraste con el caudal de información referida a las PPs en especies relacionadas, en *G. omarorum* no han sido descritas. Por lo tanto desarrollamos en primera instancia acciones experimentales tendientes a su identificación, basándonos en criterios anatómicos y funcionales. Una vez identificadas, nos abocamos al análisis de su participación en el M-ARDOE. Por lo tanto el trabajo se organizó en tres bloques, cada uno de ellos guiado por un objetivo específico.

Objetivo específico 1.

En primer lugar nos propusimos identificar y topografiar las neuronas que proyectan de forma directa a las cMP del NEB. El cumplimiento de este objetivo nos permitió estimar las coordenadas estereotáxicas de estos grupos neuronales y referirlas a estructuras fácilmente identificables electrofisiológicamente que guiaron el desarrollo de la segunda etapa (Capítulo IV).

Objetivo específico 2.

Este objetivo, presentado en el capítulo V, estuvo dirigido a la obtención de evidencias funcionales que permitieran identificar estas neuronas como neuronas premarcapaso (nPreMP). Las neuronas que proyectan al NEB (evidencias morfológicas) serán consideradas nPreMP en tanto su activación sea capaz de provocar modulaciones de la descarga del NEB de corta latencia.

Objetivo específico 3.

Finalmente y de acuerdo a los resultados obtenidos en el cumplimiento de los objetivos precedentes, en el capítulo VI nos propusimos obtener evidencias que nos permitieran afirmar que estas PPs participan del M-ARDOE, constituyendo el nexo entre la CM (origen del comando motor para el escape) y el sistema neural responsable de la ERA.

CAPÍTULO III: ASPECTOS METODOLÓGICOS GENERALES

Para las distintas series experimentales se utilizaron 55 ejemplares de *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges y col., 2009) de entre 12 y 24 cm de largo obtenidos en la Laguna del Cisne, Maldonado, Uruguay. En previas publicaciones esta especie fue identificada como *Gymnotus carapo*. Los animales fueron localizados en su ambiente natural mediante un amplificador portátil para la detección de descargas eléctricas para luego ser capturados mediante una red sumergida. Se mantuvieron en cautiverio a temperatura ambiente en tanques de 500 litros y alimentados con pequeños gusanos.

Los animales fueron anestesiados utilizando MS-222 (0.3 mg/litro de agua) por perfusión a través de las branquias y colocados en una caja de registro, apoyados sobre una esponja húmeda y sujetos por la cabeza mediante puntas de fijación. Las zonas de contacto con las puntas y las regiones donde se realizó la cirugía se infiltraron con anestésico local (lidocaína HCl al 2%). La DOE fue monitorizada continuamente mediante el registro cabeza-cola utilizando dos electrodos de metal colocados cercanos a la cabeza y cola del pez, conectados a un preamplificador AC (P15, Grass Instruments, EEUU) con ganancia X100. Las señales fueron visualizadas en un osciloscopio y adquiridas en un computador Macintosh CI (Apple Computers, EEUU), utilizando el software Superscope (GW Instruments, EEUU), que permite construir curvas de intervalo y frecuencia instantánea en función del tiempo.

Se removieron los músculos paravertebrales de un lado del pez a una distancia de aproximadamente 80% del largo desde la cabeza, y se colocó un electrodo bipolar de estimulación en contacto con la columna vertebral con el fin de estimular los axones de las CM. Utilizando un estimulador S88 y una SIU

(Grass Instruments, EEUU) se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (0.15-0.3 mA de intensidad y 0.2-0.5 ms de duración) para activar ambos axones de las CM, verificado por la amplitud del M-ARDOE (Fig. 7 B₂; ver Falconi y col., 1995). Esta activación fue confirmada, más tarde en el animal curarizado, durante el registro extracelular de una de las CM, que presenta una secuencia característica de fenómenos eléctricos producidos por la activación de uno o ambos axones de las CM a nivel de la médula espinal (Fig. 7 B₁ y B₂ abajo). Cuando el estímulo antidrómico, presentado a baja frecuencia (~0.1 Hz), recluta la CM contralateral al sitio de registro, la forma de onda del potencial de campo que sigue al artefacto de estimulación es una positividad que corresponde a la EHP (Fig. 7 B₁). La EHP es el potencial de campo que refleja la activación de las neuronas del circuito colateral recurrente (ver más adelante). El PA extracelular de la CM en las inmediaciones del SI puede registrarse como una negatividad de hasta 40 mV. Cuando el estímulo es supraumbral para ambas CM, el PA extracelular es seguido por la EHP, indicando que ambas CM fueron activadas (Fig. 7 B₂; Furshpan y Furukawa, 1962; Faber y Korn, 1978; Borde y col., 1991).

Una vez determinado el umbral para la activación de las CM, los animales fueron inyectados con d-Tubocurarina (1-3 µg/g; im), con la finalidad de evitar el movimiento del animal sin abolir la DOE totalmente, excepto en los experimentos de marcaje retrógrado (ver más adelante). Mediante el uso de una bomba de recirculación, las branquias fueron perfundidas continuamente con agua de la canilla a temperatura ambiente (20-25 °C) y aireada, conteniendo el anestésico MS-222 durante la cirugía.

A través de una craneotomía se expuso la superficie dorsal del tronco cerebral, lo cual permitió el acceso de micropipetas a diferentes estructuras profundas de interés, las cuales se alcanzaron de acuerdo a repere anatómicos predeterminados y aplicando criterios estereotáxicos. Estas micropipetas fueron utilizadas tanto para el registro como para la aplicación de drogas en estructuras del tronco encefálico. Para ello se utilizó un micromanipulador (Sutter Instruments Corp, EEUU), que permite movimientos con precisión en el orden del micrómetro, y un amplificador Axoclamp 2A (Molecular Devices, EEUU) para la obtención del registro eléctrico. La solución contenida en las micropipetas fue en base a NaCl (154 mM; 0.9%) utilizando diferentes compuestos de acuerdo al propósito del experimento (ver más adelante).

Todos los procedimientos realizados durante este trabajo fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República (Exp. N° 071140-001366-09).

CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE LAS PPs DE ACUERDO A CRITERIOS ANATÓMICOS

Durante este estudio y como lo hemos definido previamente en este trabajo, el término premarcapaso (PreMP) fue aplicado a poblaciones específicas de neuronas que proyectan directamente sobre las células del NEB y cuya activación provoca la modulación de la actividad del núcleo y por ende, de la DOE. Por tanto, la primera serie de experimentos fue diseñada para identificar las PPs de acuerdo a criterios morfológicos. Como ya se ha explicitado, trabajos previos indican que dentro del NEB las cMP son el blanco celular exclusivo de las aferentes glutamatérgicas involucradas en el M-ARDOE (Curti y col., 1999; 2006). En el presente trabajo nos centramos en el análisis de las PPs que participan en esta modulación lo que condicionó algunos aspectos metodológicos (ver luego).

e) Metodología

En esta serie experimental, la dosis inyectada de d-Tubocurarina se redujo (0.5-1 $\mu\text{g/g}$) de forma tal que la recuperación post-quirúrgica se realizara en un corto lapso de tiempo, típicamente de 7-9 horas. En 4 animales se realizó una pequeña craneotomía en el sector caudal del cerebelo de forma de tener acceso al NEB. Durante los experimentos de marcaje retrógrado se inyectó WGA-Alexa flúor 488 (wheat germ agglutinin asociada al fluoróforo Alexa 488; Invitrogen, EEUU) disuelto en NaCl mediante presión (100 ms, 30 psi), utilizando un microelectrodo de vidrio (9-12 $\text{M}\Omega$). El WGA es una lectina vegetal que presenta una alta afinidad por los residuos N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) de los azúcares. Una vez unido a estos azúcares en la membrana neuronal, son internalizados y transportados por las

prolongaciones neuronales hacia el soma (Köbbert y col., 2000; Vercelli y col., 2000). Este marcador puede utilizarse tanto para el marcaje retrógrado como anterógrado y presenta la ventaja de que el resultado del marcaje puede ser analizado sin procesar el tejido con técnicas de amplificación de la señal.

La micropipeta para la inyección del marcador se colocó en la vecindad de las cMP (Fig. 11A), utilizando como guía a la forma de onda característica del potencial de campo extracelular en las inmediaciones del NEB (Curti y col., 2006). Cuando se realiza el registro de la descarga espontánea del NEB la forma de onda del potencial de campo presenta dos ondas negativas de distinta amplitud, enganchado en fase y precediendo cada DOE. En *G. omarorum*, la primera negatividad resulta de la descarga sincrónica de las cMP, y es de mayor amplitud que la segunda cuando el registro se obtiene en la vecindad de las cMP (Fig. 11B). Además, en el centro de las cMP se puede observar una lenta negatividad relacionada con el potencial marcapaso que precede a la actividad de las cMP. La segunda negatividad es el resultado de la actividad sincrónica de las cR (Fig. 11B). La inyección del marcador se realizó a nivel de las cMP, utilizando un Picospritzer II (General Valve Corporation, EEUU; 10-30 psi, 20-50 ms). Una vez finalizada la inyección se retiró la pipeta y se selló el orificio utilizando una malla de colágeno (GELFOAM®, Pfizer, EEUU) y acrílico dental. Luego de que los animales recuperaron la actividad motora y fue constatado que respiraban de forma autónoma se mantuvieron con vida durante 2-5 días en peceras individuales.

Finalizado este período se indujo la anestesia con MS-222 disuelto en agua a baja temperatura (4-8 °C), y se realizó una amplia craneotomía para extraer el cerebro para ser sumergido en paraformaldehído al 4% durante una

noche. Luego del correspondiente lavado con buffer fosfato salino (PBS), se lo incluyó en un bloque de agarosa (5% en NaCl 0.9%) y se cortó utilizando un vibrátomo (Vibroslicer, Campden, EEUU). Se obtuvieron cortes seriados de 80 μm de espesor tanto en sentido horizontal como transversal.

Los cortes se montaron en un portaobjetos para ser observados con un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot y fotografiados con una cámara Kodak MDS120 antes y después de contrateñirlos con Rojo Pyronina-Y (3-5 min). El conjugado WGA-Alexa flúor se excita a una longitud de onda de 495 nm y emite a una longitud de onda de 519 nm.

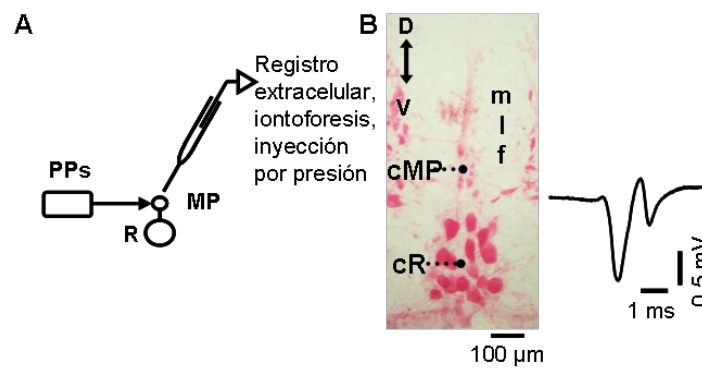


Figura 11: Metodología utilizada para el marcaje retrógrado de PPs. **A:** Esquema del diseño experimental utilizado durante el marcaje retrógrado de las PPs en el que se muestran las cMP y las cR del NEB. También se ilustra la micropipeta utilizada para el registro extracelular así como para la aplicación iontoforética y por presión del marcador. **B:** Microfotografía del NEB (izquierda) mostrando la localización de las cMP y las cR. D y V indican dorsal y ventral respectivamente. La biocitina fue aplicada en la vecindad de las cMP, localización indicada por la presencia de un registro de potencial de campo típico (derecha, ver métodos) (modificada de Comas y Borde, 2010).

En otra serie experimental (8 animales) se utilizó biocitina como marcador retrógrado (2% en KCl, 0.5 M). La biocitina (η -biotynoyl-L-lisina) es muy efectiva tanto para el marcaje retrógrado como anterógrado (Köbbert y col., 2000; Vercelli y col., 2000). Este marcador ha probado ser muy efectivo y sensible, difunde poco desde el sitio de inyección y marca tanto somas como

axones, aunque el marcaje de dendritas es moderado. Una ventaja adicional es que las fibras de pasaje intactas o glía no captan el marcador y los resultados se pueden analizar utilizando microscopía convencional (fotónica).

La biocitina se aplicó por iontoforesis, mediante pulsos de polaridad alternante (2-6 mA, 500 ms, 0.5 Hz durante 30-60 min) usando una PSIU6 (Grass Instruments, EEUU), utilizando microelectrodos de vidrio con una resistencia de entre 5-20 M Ω (Fig. 11A). Una vez finalizada la iontoforesis, se siguió el mismo procedimiento realizado luego de la inyección del WGA: cierre de la craneotomía, sobrevida de 2-3 días y extracción del cerebro para ulterior procesamiento histológico.

Las células marcadas se revelaron utilizando el kit Vectastain ABC System (Vector Laboratories, EEUU), basados en los procedimientos estándar descritos por Horikawa y Armstrong (1988). Para ello, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (30% en PBS), y los cortes se incubaron con un anticuerpo biotinilado con el fin de amplificar la señal. Luego la biotina se reveló utilizando la técnica de diaminobencidina potenciada con níquel durante 7-8 minutos.

Se consideraron como neuronas marcadas aquellas cuyo soma fue inequívocamente marcado, y su conteo fue realizado por más de un observador. La descripción del marcaje en relación a las estructuras del tronco encefálico y diencefalo se basó en el atlas estereotáxico de *Apteronotus leptorhynchus* (Maler y col., 1989). Esta serie experimental nos permitió topografiar las neuronas presumiblemente PreMP en *G. omarorum* de acuerdo a estructuras anatómicas conocidas.

f) **Resultados**

La observación de los cortes obtenidos a partir de los animales inyectados con WGA-Alexa en el microscopio de fluorescencia reveló la existencia de múltiples neuronas fluorescentes dentro y fuera del área de inyección (Fig. 12A). Por ejemplo, las cR dentro del NEB mostraron señal aún cuando el fluoróforo fuera inyectado a nivel de las cMP. La inspección de estos cortes mostró sin embargo ligeras diferencias en la emisión. El marcaje de las cR podría ser interpretado como inespecífico debido a la presencia de un pigmento citoplasmático autofluorescente denominado lipofuscina, que se encuentra en distintos tipos celulares, inclusive las del SNC (Brizzee y col., 1974, Quintana, 2010). El amplio espectro de excitación/emisión de este pigmento citoplasmático se superpone con el de la mayoría de los fluoróforos comúnmente utilizados en el marcaje retrógrado (Corrêa y col., 1980; Partanen y col., 1980; Kalyuzhny y Wessendorf, 1998).

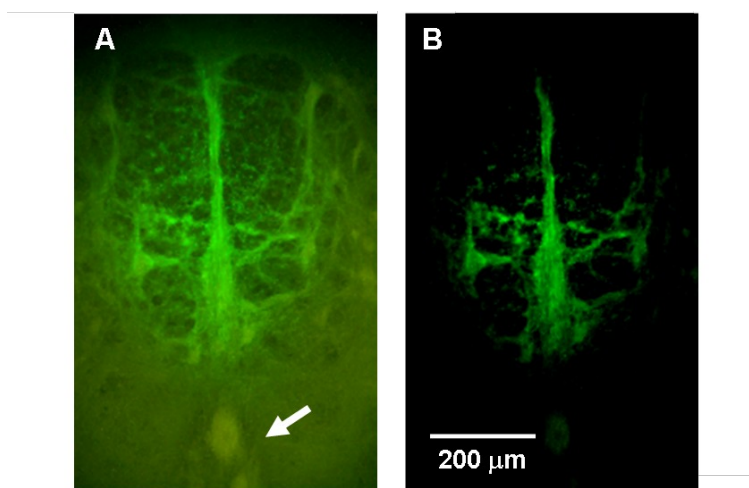


Figura 12: Distribución del WGA-ALEXA flúor a nivel del NEB inyectado en la proximidad de las cMP. **A:** Microfotografía de fluorescencia de un corte transversal del tronco encefálico que incluye principalmente el sector dorsal del NEB y el mf. Aunque con características diferentes se observa fluorescencia dentro y fuera del núcleo. Nótese que las cR también presentan señal (flecha). **B:** Luego de la sustracción digital del marcaje extranuclear, la señal se observa restringida principalmente al sector de las cMP, aunque invade las regiones cercanas del mf.

En las imágenes obtenidas del NEB, se procedió a la sustracción digital del marcaje atribuido a la lipofuscina (ver Fig 12B). Este procedimiento mostró claramente la distribución del WGA-Alexa en el área de inyección. La utilización del mismo procesamiento digital en otras áreas del SNC no permitió detectar neuronas marcadas con este fluoróforo.

Por lo arriba expuesto, esta estrategia experimental fue descartada y los experimentos de marcaje retrógrado se realizaron utilizando biocitina. Este marcador aplicado en el centro del NEB en el eje rostro-caudal se distribuyó casi exclusivamente entre las cMP (Fig. 13), extendiéndose desde el polo rostral hasta el caudal del núcleo sin invadir el sector de las cR, a pesar de la cercanía de ambos tipos celulares.

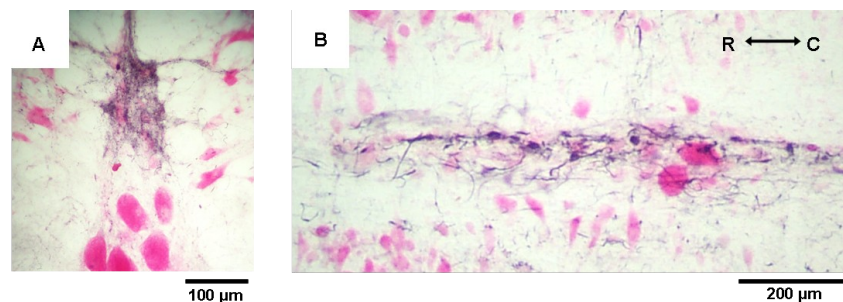


Figura 13: Extensión del área de inyección de biocitina en los experimentos de marcaje retrógrado. Microfotografías de cortes del NEB (80 µm) revelados con el procedimiento estándar (depósitos de biocitina en negro) contrateñidos con rojo Pyronina Y. **A:** Vista parcial (sector dorsal) del NEB en un corte transversal a nivel del centro del núcleo. **B:** Corte horizontal del NEB a nivel de las cMP). El marcador se distribuye exclusivamente a nivel de las cMP. En A dorsal arriba y en B, R y C indican rostral y caudal respectivamente.

La cantidad de neuronas marcadas fue relativamente baja; en promedio se encontraron 33 neuronas por animal, aunque el rango fue variable (7 a 158). La descripción anatómica de las neuronas marcadas en el presente trabajo se refiere a las características generales de los somas neuronales marcados y particularmente a su distribución topográfica en el tronco encefálico. En

aquellos casos en que fue posible se hizo una descripción somera de las características del árbol dendrítico.

En general, las neuronas marcadas se distribuyeron bilateralmente formando parte de, o en íntima relación con, la formación reticular del tronco, conformando una columna de neuronas dispersas que se extiende desde el diencefalo hasta el polo rostral del NEB. Esta distribución peculiar impidió la delimitación de núcleos claros. En consecuencia, para su descripción en el presente trabajo, decidimos agruparlas arbitrariamente en tres regiones: diencefálica, octavo-lateral y bulbo caudal. El nivel diencefálico se seleccionó con fines comparativos en consideración de la descripción del PPN presente en especies relacionadas. Los otros dos niveles, revelando una localización inesperada de probables nPreMP, se seleccionaron por su relación con estructuras conocidas, identificables morfo y electrofisiológicamente (CM y NEB), facilitando su estudio en etapas subsiguientes del trabajo.

A nivel diencefálico se encontraron 82 neuronas en 3 de los animales inyectados (Fig. 14A y B). La región ocupada por estas células se encontró limitada hacia adentro por el núcleo central posterior del tálamo (CP), con quien entran en íntima relación (Fig. 14C y D), y el núcleo periventricular del tubérculo posterior (nTPP), lateralmente por el núcleo subelectrosensorius y el núcleo diffusus lateralis (DFI). En el eje rostro-caudal se extendió alrededor de 800 μm y se encontró a una profundidad aproximada de 3000 μm de la superficie cerebral (rango 2700-3200 μm).

Las células marcadas presentaron cuerpos celulares de forma y diámetro variados. La mayoría de las neuronas (~80%) presentaron somas ovoides pequeños (diámetro mayor promedio de 11.6 μm , sd \pm 3.6 μm), sin

embargo también se observaron algunas células multipolares con somas grandes (diámetro promedio de $19.3 \mu\text{m}$, $\text{sd} \pm 1.0 \mu\text{m}$). Ambos tipos de células aparecieron entremezcladas sin una organización topográfica aparente.

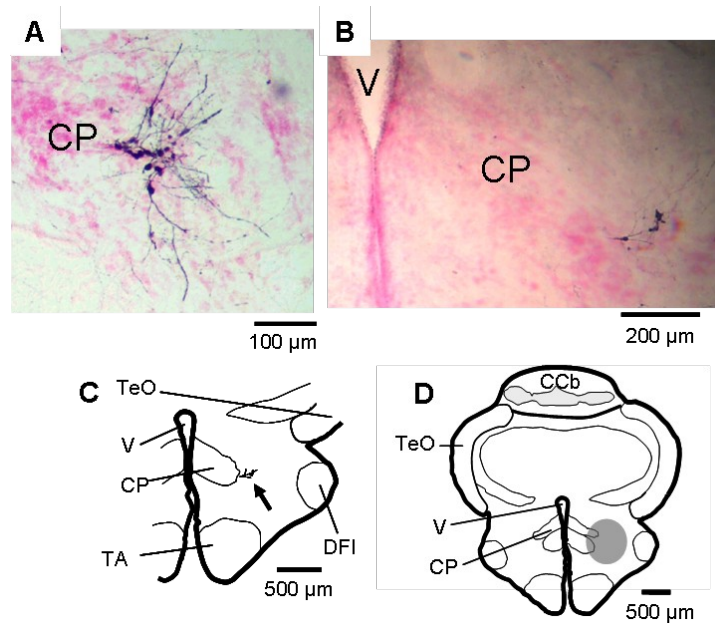


Figura 14: Neuronas marcadas en el diencefalo. **A y B:** Microfotografías de neuronas marcadas en la vecindad del CP. En un corte horizontal (A) es posible observar que los somas neuronales (ovoides y estrellados) próximos al CP emiten múltiples ramificaciones dendríticas que se extienden en sentido rostral y caudo-lateral. En el corte transversal ilustrado en B se observan somas neuronales con prolongaciones en sentido lateral. **C:** Dibujo en cámara clara del corte ilustrado en B indicando la posición de las células marcadas con biocitina (flecha) y su relación con las principales estructuras diencefálicas. **D:** Esquema de un corte representativo a nivel diencefálico ilustrando el área aproximada (área gris) que ocuparon las neuronas marcadas a este nivel en el total de experimentos de marcaje ($n=6$). Se señalan las principales estructuras anatómicas de la región.

La segunda región en la que se encontraron neuronas marcadas (28 células en 5 animales) se localizó en el área octavo-lateral. Las células se observaron en la región lateral y dorsal a los somas de las CM (Fig. 15A y B), en zonas mediales del núcleo octavo-lateral medial (MON). Hacia fuera, el límite del área ocupada por estas células fue el núcleo octavo-lateral magnocelular (MgVIII). Las neuronas se distribuyeron en un área localizada a

una profundidad de 2700-3000 μm desde la superficie cerebral, en una región que se extendió en sentido rostro-caudal por aproximadamente 500 μm .

La mayoría de las células marcadas mostraron somas grandes (diámetro promedio de 17.8 μm , $\text{sd} \pm 3.3 \mu\text{m}$), y árboles dendríticos que se extienden principalmente en dirección ventral y lateral, hacia el MgVIII (Fig. 15C y D).

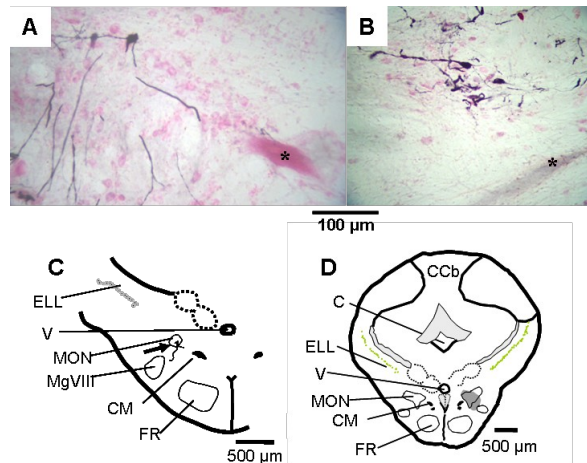


Figura 15: Neuronas marcadas en el área octavo-lateral. **A y B:** Microfotografías de neuronas marcadas en la vecindad de la CM, cuyo soma se identifica claramente (asterisco). En un corte transversal (A) se observan neuronas marcadas con prolongaciones que se extienden principalmente en sentido ventro-lateral. En B (corte horizontal) se observan somas neuronales localizados por delante de la CM. **C:** Dibujo en cámara clara del corte ilustrado en A indicando la localización de las células marcadas retrógradamente (flecha) en íntima relación con el núcleo octavo-lateral medial. **D:** Esquema de un corte representativo del área octavo-lateral ilustrando la superficie aproximada (área gris) que ocuparon las neuronas marcadas en el total de los experimentos de marcaje ($n= 6$). Se señalan las principales estructuras anatómicas de la región.

La mayoría de las neuronas marcadas (90 células en 6 animales) se localizaron a nivel del bulbo caudal. Estas neuronas se encontraron dispersas en columnas bilaterales rostro-caudales, lateral al fascículo longitudinal medial (mlf), en el límite dorsal de la formación reticular (Fig. 16), a una profundidad de aproximadamente 3000 μm (rango 2800-3500 μm) de la superficie cerebral. Los somas encontrados fueron moderadamente elongados (diámetro mayor

promedio de 19.6 μm , $\text{sd} \pm 4.6 \mu\text{m}$) con finas dendritas extendidas en dirección dorsal y lateral (Fig. 16 A y B).

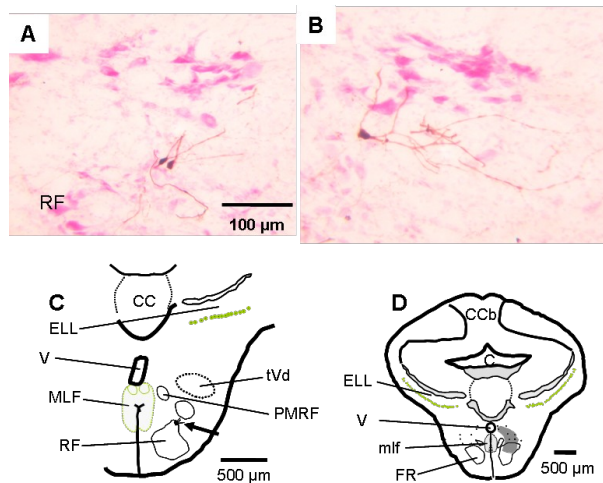


Figura 16: Neuronas marcadas a nivel del bulbo raquídeo caudal. **A y B:** Microfotografías de neuronas marcadas retrógradamente próximas a la formación reticular del bulbo raquídeo caudal. En estos cortes transversales se observan neuronas con somas elongados con dendritas que se extienden en sentido dorsal y lateral. **C:** Dibujo en cámara clara del corte ilustrado en A indicando la posición de las células marcadas con biocitina (flecha) y su relación con la formación reticular. **D:** Esquema de un corte representativo a nivel del bulbo caudal ilustrando el área aproximada (área gris) que ocuparon las neuronas marcadas a este nivel en el total de experimentos de marcaje ($n=6$). Se señalan las principales estructuras anatómicas de la región.

En 3 de los 6 animales fueron observadas pocas neuronas marcadas (en total 18) en la región situada lateral al locus coeruleus y al núcleo subcoeruleus, ventral al núcleo paralemniscal, cerca de los límites dorsales de la formación reticular mesencefálica (Fig. 17A y B).

Los resultados de los experimentos de marcaje retrógrado con biocitina se muestran resumidos en la Fig. 17. En el eje rostro-caudal, las neuronas marcadas se encontraron en columnas bilaterales extendiéndose desde el diencéfalo, en la proximidad del CP del tálamo, hasta el polo rostral del NEB distribuidas de forma no homogénea (Fig. 17). En un corte coronal, la localización de estas neuronas se ilustran como áreas sombreadas en tres secciones transversales representativas: las neuronas marcadas ubicadas en

las inmediaciones del núcleo CP del tálamo (Fig. 14D), las neuronas del área octavo-lateral, en la vecindad de los somas de las CM (Fig. 15D) y en el bulbo caudal (Fig. 16D). Estos últimos dos grupos no están incluidos en ninguna descripción previa de nPreMP en peces gymnotiformes.

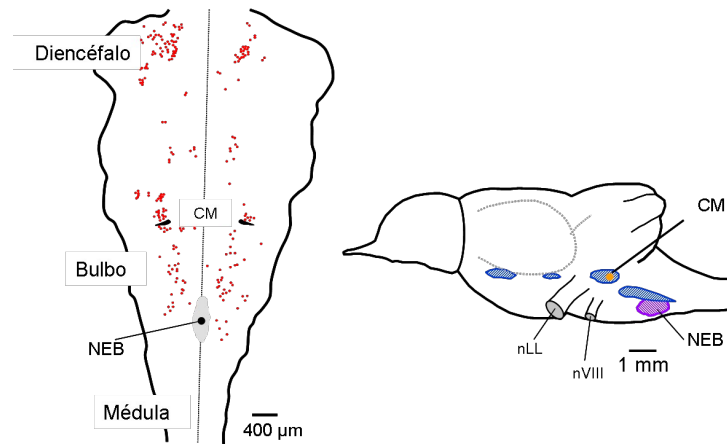


Figura 17: Resumen de la distribución de neuronas marcadas. **Izquierda:** Esquema de un corte horizontal representativo que incluye el diencéfalo, tronco encefálico y el sector rostral de la médula espinal. Se incluyen los somas celulares marcados (puntos rojos) observados en nuestros experimentos de marcaje retrógrado efectuados con éxito (6 de 8 animales). Se ilustran también los somas de las CM (en negro) y el NEB (en gris), estructuras neurales que fueron tomadas como referencia. La línea media está representada por la línea punteada vertical. **Derecha:** Esquema de una vista lateral del cerebro de *G. omarorum* que muestra la distribución de los PPs. Se incluyen también referencias anatómicas.

CAPÍTULO V: IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE nPreMP

En línea con el rigor metodológico que subyace a la definición de PPs adoptada en el presente trabajo y en virtud de la inusual distribución de neuronas marcadas en los experimentos de marcaje retrógrado, desarrollamos acciones experimentales tendientes a obtener evidencias funcionales acerca de la naturaleza PreMP de estas neuronas.

a) Metodología

La mayoría de los experimentos, se diseñaron para activar localmente poblaciones de neuronas en las áreas que mostraron mayor densidad de marcaje.

La activación local de poblaciones neuronales se realizó mediante la aplicación de microvolúmenes de glutamato (Glu). La utilidad de esta técnica se apoya en que existe una amplia distribución de receptores glutamatérgicos en el SNC de gymnotiformes, particularmente en el núcleo electrosensorius y PPs (Maler y Monaghan, 1991; Spiro y col., 1994). Por tanto es razonable suponer que las nPreMP de *G. omarorum* sean sensibles al Glu. Sumado a esto, en otras especies de gymnotiformes el estudio de las PPs ha sido mediante esta técnica (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Keller y col., 1991). La estimulación eléctrica en estructuras profundas del SNC puede provocar el reclutamiento no sólo de las neuronas de interés sino también de las fibras de pasaje en el entorno, por lo tanto este método fue descartado.

Para evaluar la capacidad de iniciar modulaciones de la DOE de estas probables nPreMP se utilizó un inyector por presión Picospritzer II para aplicar microvolúmenes de una solución de Glu (10 mM de ácido L-glutámico en NaCl; Fig. 18). La presión ejercida en cada inyección (10-40 psi, 50-60 ms) fue la

mínima suficiente como para generar una gota de volumen de entre 0.5 y 15 μ l (medido en el aire).

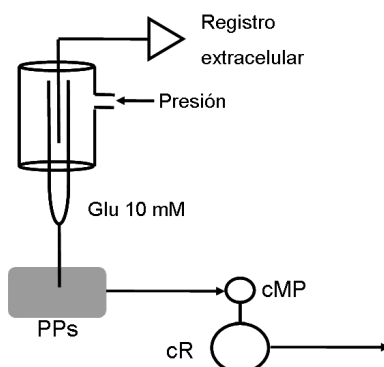


Figura 18: Metodología utilizada para la identificación funcional de las PPs. Se ilustran las estructuras principales del sistema electrogenerador: las PPs y las cMP y cR que integran el NEB. La micropipeta fue utilizada para el registro extracelular y para la aplicación de microvolúmenes de una solución de Glu 10 mM mediante presión.

Las regiones seleccionadas para ensayar la sensibilidad al Glu fueron a nivel del diencefalo, del área octavo-lateral y a nivel de la formación reticular, entre el centro del NEB y 1000 μ m en dirección rostral. A nivel diencefálico, la solución se aplicó en el área comprendida entre 1000 y 1800 μ m caudal a la fisura entre el cerebro anterior y el tectum, y entre 200 y 700 μ m de la línea media. En el sector bulbar estas inyecciones se efectuaron a diferentes distancias de la línea media, en un rango de 400 a 900 μ m. En el eje rostro-caudal las aplicaciones se realizaron en 4 o 5 posiciones cada 500 μ m a partir del centro del NEB. En trabajos previos del grupo se estimó que la difusión del Glu a partir de inyecciones similares afecta la descarga de neuronas hasta una distancia de aproximadamente 200-250 μ m (Curti y col., 1999), con lo cual el área ocupada por neuronas marcadas fue explorada de forma extensiva. En las topografías estudiadas la inyección de un volumen similar de NaCl (154 mM) no provocó cambios evidentes de la frecuencia de la DOE, por lo que las respuestas observadas durante las maniobras propuestas se interpretaron

como específicas a la aplicación de Glu. En cada una de las regiones en las que se ensayó la sensibilidad al Glu se realizaron por lo menos 10 recorridos exploratorios verticales de 1500 μm , inyectando cada 100 μm . La modulación de la DOE provocada por la inyección se consideró evidencia funcional a favor de la naturaleza PreMP de las poblaciones neuronales en estudio en tanto su latencia fue suficientemente breve, i.e.: cuando la inyección afectó específicamente el intervalo en el que se aplicó el Glu. Aún cuando no puede ser medida, la latencia de la modulación de la DOE fue en todos los casos inferior a la duración del intervalo natural. Para cada recorrido vertical exploratorio se construyó un perfil de respuesta a Glu en función de la profundidad.

b) Resultados

La evidencia morfológica obtenida mediante el marcaje retrógrado de neuronas luego de la inyección de biocitina en el NEB de *G. omarorum* sugiere la existencia de distintas poblaciones neuronales que controlan la actividad de este núcleo. Por lo tanto, basándonos en nuestra descripción topográfica de las neuronas marcadas, realizamos inyecciones locales de glutamato para activar estas probables nPreMP diencefálicas, del área octavo-lateral y del bulbo raquídeo caudal.

i) Neuronas diencefálicas

La exploración de la sensibilidad al Glu en la región diencefálica se realizó en 7 animales. En la Fig. 19 se muestra un ejemplo representativo de las respuestas máximas provocadas por la aplicación de Glu en esta región. En un recorrido vertical localizado a 650 μm de la línea media en el diencefalo, la respuesta máxima fue observada a una profundidad de 2600 μm y consistió en

un aumento de la frecuencia de la DOE (7.5 Hz) de corta latencia, cuya duración fue de 3.2 s (Fig. 19A). A 600 μm dorsales de esta localización, la amplitud de la respuesta disminuyó al 37% de la respuesta máxima, mientras que a 200 μm ventrales al punto máximo de respuesta no parece haber neuronas sensibles a Glu (Fig. 19B).

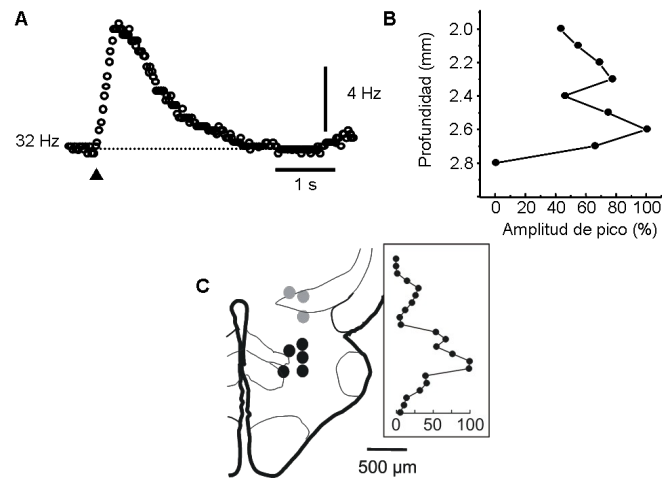


Figura 19: Modulación de la DOE provocada por la aplicación de glutamato a nivel de neuronas del diencefalo. **A:** Gráfico de frecuencia de la DOE en función del tiempo de la respuesta máxima provocada por la inyección de Glu (20 ms, 15 psi) durante un recorrido vertical exploratorio realizado a 650 μm de la línea media. El triángulo indica el momento de aplicación del Glu, y la línea punteada indica la frecuencia control (valor a la izquierda). **B:** Amplitud de pico de las respuestas (normalizadas a la respuesta máxima) obtenidas a lo largo del recorrido vertical exploratorio en la misma localización. **C:** En un corte transversal representativo a nivel del diencefalo se ilustran en círculos negros los sitios de máxima sensibilidad al Glu obtenidos en esta serie experimental. En recorridos verticales exploratorios más extensos (ejemplo en el recuadro) también se detectaron localizaciones más dorsales con sensibilidad a Glu (círculos grises).

Las respuestas máximas se observaron a una profundidad media de 2800 μm (sd $\pm 160 \mu\text{m}$) desde la superficie del cerebro. En todos los casos, Glu provocó aumentos de la frecuencia de la DOE sin modificación aparente de su forma de onda. En la Fig. 19C se representan los sitios de respuesta máxima observados en estos experimentos a nivel del diencefalo en un corte coronal (círculos negros), de acuerdo a sus coordenadas lateral y vertical. Los sitios de

máxima respuesta a Glu y la región de neuronas marcadas observadas en el diencefalo, cerca del CP talámico (ver Fig. 14C) están correlacionados.

En 3 animales, la exploración vertical se realizó a partir de una profundidad de 1500 μm y se extendió hasta las 4000 μm . Durante estos recorridos, existió una zona más dorsal a la arriba descrita en la cual la aplicación de Glu provocó aumentos considerables de la frecuencia de la DOE (Fig.19C recuadro). Esta región fue detectada en un rango de profundidad de entre 1700-2100 μm desde la superficie cerebral (círculos grises en Fig. 19C). Los aumentos de frecuencia provocados por el Glu alcanzaron un 80% del máximo, aunque el curso temporal de ascenso de frecuencia fue más lento. Las respuestas producidas por la aplicación de Glu en esta región se deben a la activación de neuronas ubicadas en la región medial del torus semicircularis ventral (Metzner y Viète, 1996).

ii) **Neuronas del área octavo-lateral**

En la exploración sistemática de la sensibilidad al glutamato en el área octavo-lateral la referencia topográfica fue la CM, que puede ser reconocida fácilmente en un registro electrofisiológico (ver métodos específicos y Furshpan y Furukawa, 1962; Faber y Korn, 1978; Borde y col., 1991). La punta de la pipeta de Glu, también utilizada para el registro extracelular (Fig. 18), fue ubicada en la profundidad del tronco a distancias conocidas del SI de la CM. Un ejemplo de la respuesta al Glu en esta región se muestra en la Fig. 20A, en la cual su aplicación a una distancia de 800 μm lateral a la línea media (350 μm lateral a la CM) produjo un aumento de frecuencia de aproximadamente 8.6 Hz con una duración de 4.9 s a una profundidad de 2900 μm . A lo largo del mismo recorrido, se encontraron neuronas sensibles al Glu, aunque con respuestas

que decrecen gradualmente, hasta 700 μm ventrales al sitio de máxima respuesta, mientras que en sentido dorsal la respuesta desapareció a 300 μm (Fig. 20B).

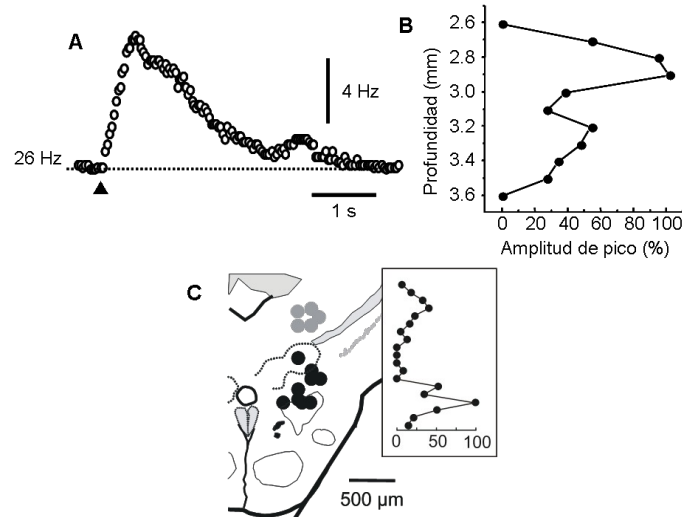


Figura 20: Modulación de la DOE provocada por la aplicación de glutamato a nivel del área octavo-lateral. **A:** Gráfico de frecuencia de la DOE en función del tiempo, ejemplo de respuesta máxima provocada por la aplicación de Glu (20 ms, 15 psi) durante un recorrido vertical exploratorio. El triángulo indica el momento de aplicación del Glu, y la línea punteada indica la frecuencia control, cuyo valor se encuentra a la izquierda. **B:** Amplitud de pico de las respuestas (normalizadas a la respuesta máxima) obtenidas a lo largo del recorrido vertical exploratorio de A. **C:** En un corte transversal representativo a nivel del área octavo-lateral se ilustran los sitios de máxima sensibilidad al Glu (círculos negros). En recorridos verticales más extensos (ejemplo en el recuadro), en el ELL se detectó sensibilidad al Glu (círculos grises).

Las máximas respuestas al Glu fueron observadas a una profundidad media de 2750 μm (sd \pm 420 μm). En el esquema de corte coronal a nivel de las CM de la Fig. 20C, los círculos negros representan los sitios de máxima respuesta al glutamato observados en 16 animales, localizados de acuerdo a las coordenadas lateral y vertical respecto a la CM. El área ocupada por los círculos negros está incluida en la región donde previamente se observaron las neuronas marcadas retrógradamente, en posición lateral y dorsal a los somas de las CM (ver Fig. 15C para comparar).

En 6 animales, durante la exploración de la sensibilidad al Glu en recorridos comenzados a partir de 1500 μm de la superficie se encontraron respuestas sistemáticas a una profundidad de 1500-2200 μm (círculos grises, Fig. 20C). A diferencia de las respuestas en los sitios más ventrales, en esta región el Glu provocó modulaciones de la DOE de menor amplitud (hasta 75% del máximo) y con curso temporal más lento (Fig. 20C recuadro). En esta región dorsal se encuentran las porciones mediales del ELL, estructura que procesa información sensorial (Bell, 1981).

iii) Neuronas del bulbo raquídeo caudal

La exploración de la sensibilidad al Glu en el sector caudal del bulbo raquídeo se realizó en 3 puntos diferentes, separados por 500 μm en sentido antero-posterior, con resultados generales similares. Una vez localizado el centro de las cMP del NEB, referencia electrofisiológica utilizada en este sector, la misma pipeta conteniendo Glu se ubicó a distancias conocidas del NEB en sentido rostral y lateral. En la Fig. 21 se ilustra un ejemplo de los resultados obtenidos durante un recorrido vertical de la pipeta del Glu, realizado a 500 μm de la línea media y aproximadamente a 1000 μm anteriores del NEB. A una profundidad de 2800 μm (Fig. 21A), la aplicación de Glu provocó un aumento de frecuencia de la DOE de corta latencia, alcanzando una amplitud de pico de 7.9 Hz y con una duración de 3.7 s. A lo largo de este recorrido vertical, las respuestas al Glu decrecieron de forma no monotónica tanto en dirección dorsal como ventral respecto a la profundidad de máximo efecto (Fig. 21B). Los sitios de respuesta máxima observados durante la exploración con Glu en el bulbo caudal (6 animales, 36 recorridos verticales) se encontraron a una profundidad media de 2810 μm (sd \pm 90 μm). En un corte coronal

representativo se señalan los sitios que provocaron respuesta máxima durante estos experimentos (círculos negros, Fig. 21C). El área de sensibilidad al Glu en el bulbo caudal se corresponde aproximadamente con la región donde se encontraron las neuronas marcadas retrógradamente (ver Fig. 16C).

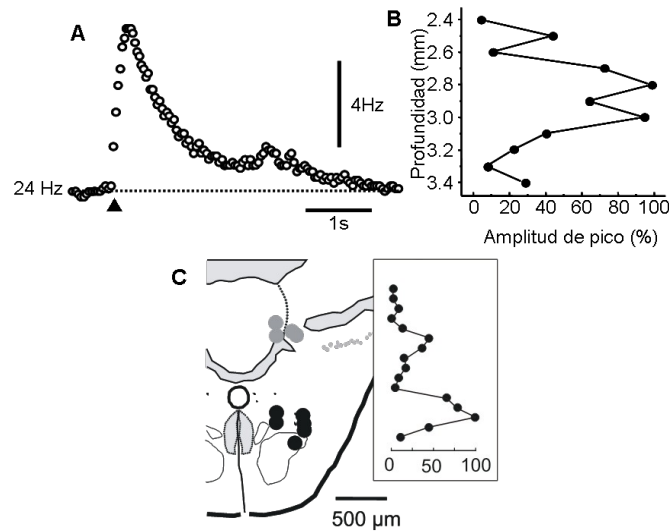


Figura 21: Modulación de la DOE provocada por la aplicación de glutamato a nivel del bulbo caudal. **A:** Gráfico de frecuencia de la DOE en función del tiempo, ejemplo de respuesta máxima provocada por la inyección de Glu (20 ms, 15 psi) durante un recorrido vertical exploratorio a 500 μm de la línea media y 1000 μm del centro del NEB. El triángulo indica el momento de aplicación del Glu, y la línea punteada indica la frecuencia control (valor a la izquierda). **B:** Amplitud de pico de las respuestas al Glu (normalizadas a la respuesta máxima) obtenidas a lo largo del recorrido vertical exploratorio en la misma localización. **C:** En un corte transversal representativo a nivel del bulbo raquídeo caudal se representan los sitios de máxima sensibilidad al Glu (círculos negros) obtenidos durante esta serie experimental. En recorridos verticales exploratorios más extensos (ejemplo en el recuadro) también se detectaron localizaciones más dorsales con sensibilidad a Glu (círculos grises).

Ante la exploración de sectores más dorsales en esta región, se encontró un área adicional de sensibilidad al Glu a una profundidad de 1700-1900 μm (círculos grises, Fig. 21C). En esta región se encuentra el núcleo medialis, que recibe información a través del nervio de la línea lateral.

CAPÍTULO VI: PARTICIPACIÓN DE LAS nPreMP EN EL M-ARDOE

El cumplimiento de los objetivos específicos anteriores nos permitió obtener evidencias acerca de la existencia de PPs en *G. omarorum*. Según nuestra hipótesis las PPs participan en la organización del M-ARDOE, y constituyen la verdadera interfase entre dos sistemas de importancia vital para *G. omarorum*. Por tanto el siguiente objetivo fue obtener evidencias acerca de la participación de las PPs descritas en las secciones anteriores en esta estrategia de ISM.

a) Métodos

Una forma de investigar *in vivo* el papel de las nPreMP en esta modulación incluye el análisis de cambios del M-ARDOE producido por la exclusión total de las PPs del circuito neural involucrado (Fig. 22). Como evidencia adicional, en algunos experimentos se investigó la correlación entre la activación de estas neuronas y el M-ARDOE.

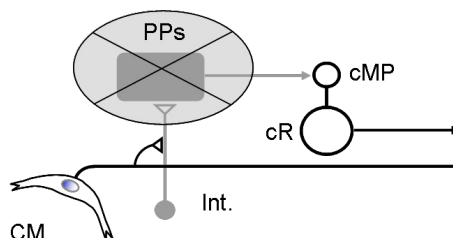


Figura 22: Metodología utilizada para evidenciar la participación de las nPreMP en el M-ARDOE. Se representa el circuito tentativo responsable de esta modulación: la CM y su conexión con el sistema electrogenerador a través de un grupo de interneuronas (Int.). El sombreado y sobretachado de las PPs ilustran su exclusión del circuito y resumen la estrategia experimental utilizada.

La disposición de las nPreMP en *G. omarorum*, ampliamente distribuidas de forma bilateral extendiéndose desde el diencéfalo hasta el bulbo raquídeo caudal impide la utilización de la exclusión total de las PPs como estrategia experimental para demostrar su papel en el M-ARDOE. Esto nos obligó a

evaluar la participación de estas distintas regiones en el M-ARDOE utilizando dos aproximaciones técnicas diferentes: i) la exclusión permanente de las nPreMP rostrales a la CM y ii) la exclusión transitoria de porciones restringidas de PPs (región diencefálica, área octavo-lateral y bulbo caudal).

A los efectos del presente trabajo, la amplitud de pico, la duración total de la respuesta y la constante de tiempo de la recuperación de la frecuencia basal (τ_{dec}) fueron consideradas como variables características del M-ARDOE, que sistemáticamente se provocó con un estímulo espinal supraumbral para ambas CM. Para cada condición experimental, las variables características del M-ARDOE de la situación control (M-ARDOE previo a la maniobra experimental) se compararon con las obtenidas luego de la maniobra experimental. Como en la mayoría de los casos fue contrastada la hipótesis nula entre la condición control y la condición inducida por los agentes bloqueantes en el animal, se utilizó el test de t de Student pareado de dos colas para determinar diferencias estadísticamente significativas, utilizando un α de 0.05.

De manera complementaria, en experimentos seleccionados, se realizaron registros unitarios en el área de las PPs de la actividad provocada por la activación de la CM (ver luego).

i) Bloqueo irreversible de nPreMP

Mediante una hoja de bisturí se realizó una sección transversal completa del cerebro del pez a la altura del límite caudal del tectum, a una distancia de entre 500 y 1000 μm en dirección rostral a la localización de las CM (Fig. 23A).

En general, la frecuencia de la DOE aumentó de forma transitoria inmediatamente luego de la sección entre 7 y 10 Hz por encima de la

frecuencia basal, retornando a los valores control luego de 2 minutos. Habitualmente, la frecuencia se mantuvo estable por el resto del experimento (hasta 90 minutos).

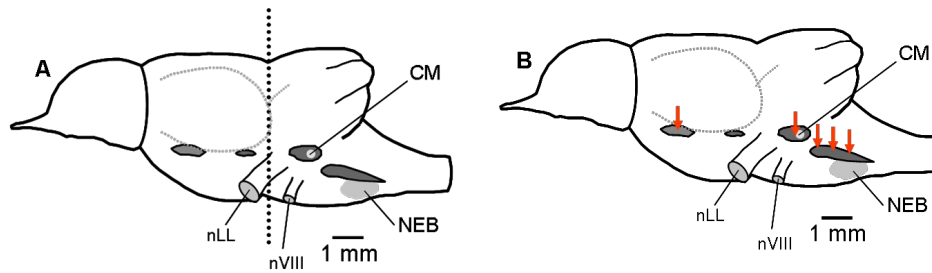


Figura 23: Métodos de inactivación. Dibujo esquemático de una vista lateral del cerebro de *G. omarorum*. En el esquema se incluye como referencia la localización aproximada de la CM y el NEB y de la entrada del nLL y el nVIII. Las áreas oscuras representan las PPs. **A:** La línea punteada vertical indica el nivel al cual se seccionó el tronco encefálico durante el análisis de la función de las nPreMP diencefálicas en el M-ARDOE. **B:** Las flechas indican la localización aproximada de la inyección de antagonistas glutamatergicos.

ii) Bloqueo reversible de nPreMP

La estrategia experimental diseñada con el fin de inactivar reversiblemente las nPreMP incluyó la inyección por presión de una solución conteniendo antagonistas para receptores glutamatergicos de tipo NMDA y no-NMDA (ácido (\pm)2-amino-5-fosfonopentanoico: AP5 500 μ M, y 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona complejo HBC: CNQX 500 μ M; en NaCl 0.9%). Al igual que en las nPreMP de *Brachyhyppopomus* y *Apteronotus* (Kawasaki y col., 1988; Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Maler y Monaghan, 1991), las evidencias obtenidas durante los experimentos realizados durante este trabajo indican que las nPreMP presentan receptores para glutamato. En consecuencia, la exclusión del circuito de un grupo de nPreMP utilizando la aplicación de antagonistas glutamatergicos en topografías seleccionadas debería provocar modificaciones específicas del M-ARDOE.

Se inyectaron microvolúmenes (100 μm de diámetro medido en el aire) utilizando un Picospritzer II (30 psi, 50-300 ms) en sectores restringidos de nPreMP, seleccionados de acuerdo a la densidad de neuronas marcadas y a los perfiles de las respuestas a la aplicación local de Glu en el diencéfalo, el área octavo-lateral y el bulbo raquídeo caudal (Fig. 23B). En algunos experimentos, en primera instancia se procedió a la detección del sitio de respuesta máxima a Glu para aplicar los antagonistas en la misma localización. En general las aplicaciones fueron unilaterales salvo excepciones en que se realizaron bilateralmente.

Para estos experimentos el M-ARDOE se provocó con estímulos únicos repetidos a baja frecuencia (cada 3 minutos) evaluando las modificaciones de las variables características provocadas por una única inyección de antagonistas.

Para descartar la posibilidad de que la reducción del M-ARDOE fuera consecuencia del bloqueo de la sinapsis glutamatérgica nPreMP-cMP en el NEB, se realizaron experimentos en los cuales se ensayó la sensibilidad de las cMP al Glu durante el bloqueo de las nPreMP. Para ello, antes y durante el efecto de los antagonistas glutamatérgicos, inyectados en una posición a 1000 μm rostrales al NEB, se aplicó Glu en el centro de las cMP mediante presión (10-20 psi, 50-100 ms).

b) **Resultados**

En promedio (n=43), el M-ARDOE control presentó una amplitud de pico de 9.7 Hz (sd \pm 4.4 Hz), una duración total de 2.9 s (sd \pm 1.3) y un τ_{dec} de 0.67 s (sd \pm 0.40 s).

i) **Inactivación permanente de las nPreMP diencefálicas**

De acuerdo al circuito neural tentativo que organiza el M-ARDOE (ver Fig. 10), la contribución de las PPs diencefálicas debería ser eliminada ante la sección transversal completa del tronco encefálico a la altura del límite caudal del tectum (ver esquema en Fig. 23A). Para probar esta hipótesis se provocó el M-ARDOE antes y después de la sección del tronco en 9 animales.

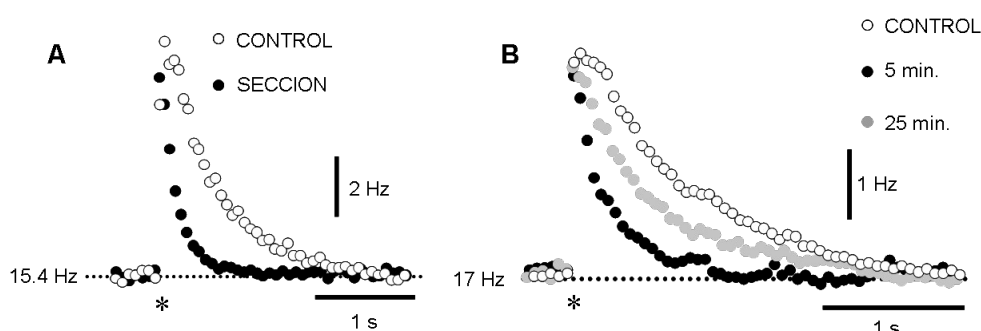


Figura 24: Efectos de la exclusión de las nPreMP diencefálicas sobre el M-ARDOE. Se muestran los gráficos de frecuencia de la DOE en función del tiempo. **A:** M-ARDOEs antes (círculos blancos, CONTROL) y 3 minutos después de la sección total del tronco encefálico a nivel del límite caudal del tectum (círculos negros, SECCIÓN). **B:** M-ARDOEs antes (círculos blancos, CONTROL), a los 5 minutos (círculos negros) y 25 minutos (círculos grises) de la aplicación de antagonistas glutamatérgicos en las nPreMP diencefálicas. El asterisco indica el momento de estimulación de las CM; la línea punteada indica la frecuencia basal, cuyo valor se encuentra a la izquierda.

Las modificaciones del M-ARDOE se evaluaron luego de la recuperación completa de la frecuencia basal de la DOE. Tal como se ilustra en el ejemplo de la Fig. 24A, la amplitud de pico del M-ARDOE se redujo al 91.4% del control (de 7.7 Hz a 6.8 Hz) debido a la sección del tronco. En contraste con la leve modificación de la amplitud, la duración de la respuesta disminuyó de 2.3 s a 0.97 s, con una reducción del τ_{dec} al 36.6% del control. Estos cambios persistieron durante el resto del experimento (esto es, 90 minutos).

ii) Inactivación transitoria de las nPreMP

- nPreMP diencefálicas.

En estos experimentos se obtuvieron resultados similares a los observados durante las maniobras de exclusión permanente, aunque mediante la aplicación local de una solución de CNQX-AP5 (11 inyecciones, 7 animales). Como se muestra en el ejemplo de la Fig. 24B, luego de la aplicación bilateral de antagonistas glutamatérgicos (100 ms, 30 psi) en la región diencefálica, la τ_{dec} del M-ARDOE disminuyó al 33.4% del control, mientras que la amplitud de pico mostró una reducción al 91.6% del control. Estos efectos se revirtieron lentamente, y el M-ARDOE recuperó sus parámetros control luego de aproximadamente 75 minutos. En general, la recuperación del M-ARDOE control luego del bloqueo se revirtió en un rango de 50 a 90 minutos.

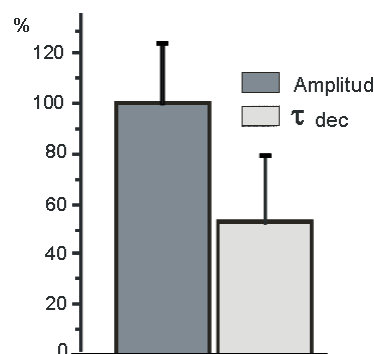


Figura 25: El reclutamiento de las nPreMP diencefálicas determina la duración del M-ARDOE.

Resumen del resultado (media \pm sd, n=20) del efecto del bloqueo de las nPreMP diencefálicas sobre la amplitud del M-ARDOE (barra gris oscura) y la τ_{dec} (barra gris claro) graficados como porcentaje de sus respectivos valores control.

El resumen de los resultados obtenidos tanto mediante los experimentos de sección como de inyección de AP5-CNQX en las inmediaciones de las nPreMP diencefálicas se muestran en la Fig. 25 (n=20). El bloqueo de las nPreMP diencefálicas produjo una reducción marcada de la duración del M-

ARDOE, con una disminución significativa del τ_{dec} a un valor promedio del 52.1% (sd \pm 28.1%; p=0.0013) del control, con efectos menores sobre su amplitud de pico (99.1 del control \pm 25.1%; p=0.4).

- Inactivación de las nPreMP bulbares

La exclusión de las nPreMP diencefálicas del circuito hipotético que organiza el M-ARDOE sugiere la participación de otro grupo de neuronas caudales al sitio de sección. En consecuencia se diseñaron maniobras experimentales dirigidas a determinar si las nPreMP bulbares pertenecen a este grupo. Debido a su distribución dispersa a lo largo de una extensa área entre el NEB y la vecindad de las CM, el rol de las nPreMP del bulbo raquídeo en el M-ARDOE fue investigado mediante la aplicación local de microvolúmenes de antagonistas en el área octavo-lateral y en dos regiones discretas localizadas a distancias conocidas del NEB (500 y 1000 μ m rostrales), a 500-600 μ m de la línea media.

Mediante este procedimiento, de un total de 29 inyecciones (7 animales), se observaron cambios mínimos en el M-ARDOE sólo en 4 oportunidades (13.8%). Estas modificaciones implicaron una reducción de la amplitud de pico a 92,2% del control (sd \pm 9.3%, p=0.003) sin modificación de la duración total ni la τ_{dec} . Estos resultados podrían indicar que en la mayoría de los casos la aplicación local de bloqueantes haya impedido el reclutamiento de nPreMP no involucradas en el M-ARDOE. Alternativamente la ausencia de efectos evidentes en la mayoría de los casos podría indicar que, aún perteneciendo al circuito responsable del M-ARDOE, el número de neuronas afectadas por la inyección haya sido insuficiente para provocar cambios en la modulación.

Considerando que la activación de los circuitos asociados a las CM posee un elevado factor de seguridad para la transmisión por tratarse de vías redundantes con contactos sinápticos de elevada eficacia (Faber y col., 1989), desarrollamos acciones experimentales basadas en la segunda hipótesis interpretativa. Así, diseñamos protocolos de activación de la CM tendientes a reducir el factor de seguridad de estos circuitos, incluyendo el reclutamiento de las nPreMP, y ensayar el efecto de los antagonistas en estas condiciones.

La activación de los circuitos de salida de la CM se reduce por estimulación repetitiva de la CM (Faber y col., 1989; Waldeck y col., 2000; Curti y col., 2006). En efecto, tanto el M-ARDOE como la EHP, potencial de campo que refleja la activación de las neuronas del circuito colateral recurrente, desaparecen por estimulación repetitiva de la CM (9 Hz) durante 5 s. A los efectos de provocar la reducción controlada y rápidamente reversible de la excitabilidad en los circuitos asociados a la CM, se diseñó un protocolo de estímulos pareados (condicionante-prueba). Como se ilustra en la Fig. 26 (panel superior) un intervalo de 8 s es capaz de provocar estos efectos. Así, el protocolo provoca un incremento de la latencia de la EHP (al 108.3%, $sd \pm 4.1\%$, $p=0.145$) y la disminución de su amplitud, particularmente del 3^{er} pico (al 77.9%, $sd \pm 5.7\%$, $p=0.038$). Como ha sido caracterizado, durante la activación de la CM a baja frecuencia (~ 0.1 Hz), la EHP presenta 2 o 3 picos de amplitud decreciente que resultan de la descarga de una salva de PAs, sincrónica en la población de neuronas PHP del circuito inhibitor colateral recurrente (Faber y Korn, 1978; Borde y col., 1991; Hatta y Korn, 1998). La salva de PAs (usualmente un triplete) constituye la respuesta neuronal al EPSP supraumbral desencadenado por la CM en estas células.

En nuestra situación experimental, el estímulo pareado provoca la reducción de la amplitud del EPSP y en consecuencia la disminución del número de PAs de la salva. Aún cuando es esperable que se haya producido una reducción similar en la eficacia del reclutamiento de las nPreMP, esta no alcanzaría a expresarse en una modificación del M-ARDOE, a juzgar por la similitud de las respuestas provocadas por el estímulo condicionante y el prueba (Fig. 26 panel inferior) que no mostraron diferencias significativas en sus variables características (amplitud de pico y τ_{dec} , $p=0.297$ y $p=0.357$ respectivamente). Intervalos menores invariablemente afectaron tanto la EHP como el M-ARDOE (no mostrado).

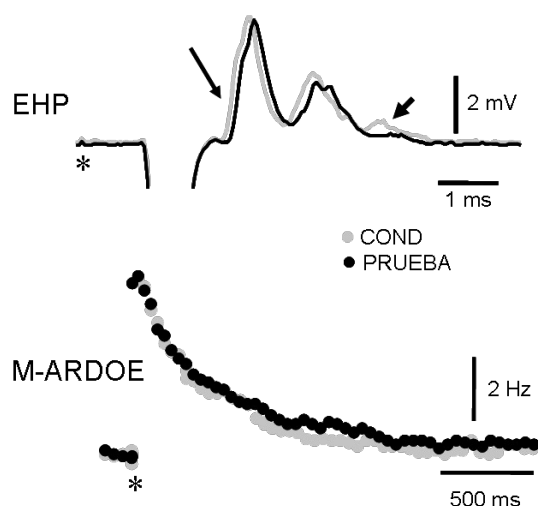


Figura 26: Activación de las CM por estímulos pareados y el M-ARDOE correspondiente. La activación antidrómica de la CM mediante estímulos pareados (intervalo de 8s) no modifica el M-ARDOE, sin embargo reduce la eficacia sináptica de los circuitos asociados a la CM. **Arriba:** Registros superpuestos del potencial de campo (EHP) en la vecindad del SI de la CM en respuesta al estímulo condicionante (trazado gris, COND) y al estímulo prueba (trazado negro, PRUEBA) de un par. Nótese que la activación por estímulos pareados de la CM provocó un aumento en la latencia (flecha larga) y una reducción de la amplitud de los componentes tardíos positivos (flecha corta) del potencial de campo provocado. Las espigas antidrómicas de la CM (~8 mV) fueron cortadas. El asterisco indica el momento de activación de los axones de las CM. **Abajo:** M-ARDOE provocado por el mismo par de estímulos (círculos grises, COND; círculos negros, PRUEBA).

La participación de las nPreMP bulbares en el M-ARDOE se analizó nuevamente evaluando los efectos de la inyección local de antagonistas sobre el M-ARDOE provocado por el estímulo prueba de cada par. Al reducir la eficacia en el reclutamiento de las nPreMP con este protocolo, era esperable que la aplicación local de antagonistas pudiera afectar a un número mayor de nPreMP y provocar modificaciones evidentes del M-ARDOE.

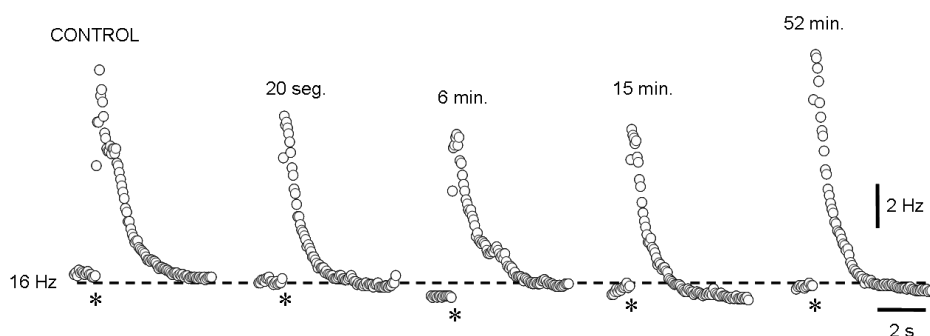


Figura 27: Eliminación de las nPreMP del área octavo-lateral y bulbo caudal. Gráficos de frecuencia de la DOE en función del tiempo de los M-ARDOEs obtenidos previo (CONTROL) y luego de la aplicación bilateral de antagonistas glutamatérgicos (intervalos indicados sobre cada gráfico) mediante presión (25 psi, 300 ms) en las nPreMP bulbares. El asterisco indica el momento de activación de las CM, la línea punteada indica la frecuencia basal, cuyo valor se encuentra a la izquierda.

En esta situación, el efecto de los antagonistas glutamatérgicos sobre el M-ARDOE fue efectivo en 43 de las 48 inyecciones realizadas (89.6%). En la Fig. 27 se muestra un ejemplo ilustrativo de los cambios observados en el M-ARDOE. En este ejemplo, la inyección de bloqueantes glutamatérgicos se realizó bilateralmente a 1000 μm del NEB y produjo una reducción transitoria de la amplitud de pico del M-ARDOE al 77% del control (6 minutos después de la inyección), efecto que revirtió a los 52 minutos.

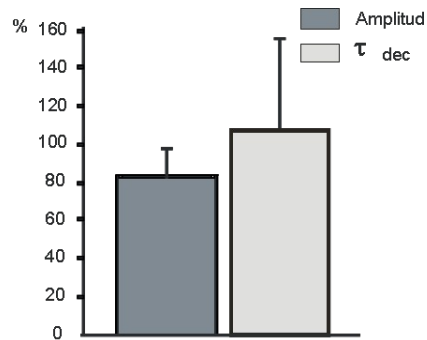


Figura 28: La amplitud del M-ARDOE es el resultado de la activación de las nPreMP bulbares. Resumen del resultado (media \pm sd) del efecto del bloqueo de las nPreMP bulbares sobre la amplitud (barra gris oscura) y la τ_{dec} (barra gris clara) del M-ARDOE provocado por el estímulo prueba de cada par, graficado como el porcentaje de sus respectivos valores control.

El resumen de los resultados (21 animales, 43 inyecciones) se muestra en la Fig. 28. En promedio, la amplitud de pico del M-ARDOE se redujo al 80.2% (sd \pm 15.1, $p < 0.0001$) del control, efecto que se observó luego de un intervalo promedio de 11 minutos (rango 5-16 minutos) con una recuperación en 98.5 minutos (rango 40-170 minutos). Aunque la reducción de la amplitud de pico del M-ARDOE fue en general acompañado de una disminución en la duración total, la τ_{dec} no fue afectada por el bloqueo de las nPreMP bulbares (106.4%, sd \pm 47.8%, $p = 0.58$).

Para descartar que la reducción del M-ARDOE resultara del bloqueo de la sinapsis glutamatérgica nPreMP-cMP, en las regiones más cercanas al NEB se inyectó Glu en las inmediaciones de las cMP al tiempo que se aplicaron los antagonistas a 1000 μm rostrales al NEB. El Glu en las cMP provocó un aumento de la frecuencia de la DOE que no fue afectada por las inyecciones de antagonistas glutamatérgicos en las nPreMP del bulbo caudal. En la Fig. 29 se muestra que la respuesta de las cMP al Glu no se modificó ($n = 3$) mientras que se observó una reducción transitoria de la amplitud de pico del M-ARDOE ante la inyección de bloqueantes glutamatérgicos.

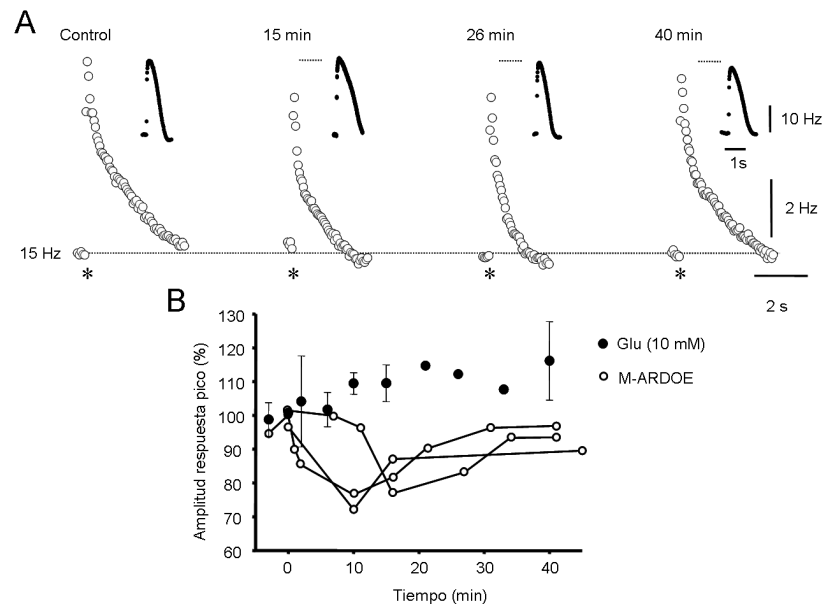


Figura 29: Demostración de la especificidad del bloqueo de las nPreMP bulbares. **A:** M-ARDOEs provocados por el estímulo prueba del par obtenidos antes (CONTROL) y luego de la inyección unilateral de antagonistas glutamatérgicos (intervalos indicados sobre cada gráfico) por presión (20 psi, 150 ms). La inyección de bloqueantes se realizó en las vecindades de las nPreMP bulbares, a una distancia de 1000 μm , anterior al NEB. En el inserto se muestra el aumento de frecuencia de la DOE provocado por la aplicación de Glu en el NEB. El Glu fue aplicado por presión (10 psi, 20 ms) en la vecindad de las cMP. La amplitud control de las respuestas al Glu está indicada por un segmento de línea punteada. El asterisco muestra el momento de la estimulación de la CM y la línea punteada muestra la frecuencia de la DOE basal, indicada por su valor a la izquierda. **B:** Gráfico de la amplitud de pico del M-ARDOE en función del tiempo (círculos blancos) y la amplitud de la respuesta al Glu (círculos negros) obtenidos antes y a continuación de la aplicación de antagonistas glutamatérgicos, inyectados en el tiempo=0 (n=3).

iii) Registro de unidades

Los experimentos previos indican que las PPs tanto diencefálicas como bulbares son *necesarias* para la organización del M-ARDOE. La *correlación* de la actividad de las nPreMP con la ocurrencia de esta modulación desencadenada por la activación de la CM, constituiría una evidencia funcional adicional en el mismo sentido. Para ello, en algunos experimentos (n=3), se utilizó un microelectrodo de vidrio (NaCl 3M, 35 M Ω) a los efectos de realizar el registro unitario extracelular de las nPreMP durante la activación de la CM a

baja frecuencia. Esta exploración se realizó en la región de las nPreMP diencefálicas y del área octavo-lateral.

En estos experimentos se registraron varias neuronas con actividad espontánea no correlacionada con el estímulo utilizado y fueron por tanto descartadas. Únicamente se detectaron 3 neuronas con actividad provocada por la activación de la CM. Los ejemplos ilustrados en la Fig. 30 corresponden a dos neuronas registradas en el área octavo-lateral en un mismo animal. El ejemplo incluido en la parte A pone de manifiesto la correlación existente entre el brote de PAs en la nPreMP provocado por la activación de la CM y la modulación de la DOE. Tanto la actividad provocada como el M-ARDOE se abolen incrementando la frecuencia de estimulación a 10 Hz (no mostrado). Como la descarga de estas células (brote de PAs) también se correlaciona con la activación de la CM y dada la topografía del área de registro (300 μ m lateral al SI de la CM), la actividad unitaria podría corresponder a la de las células PHP (Korn y Faber, 1975). Para descartar esta posibilidad, en el mismo experimento se registró la EHP a los efectos de analizar su correlación temporal con el brote de PAs de la actividad unitaria. Como se muestra en la Fig. 30B el intervalo entre el pico del PA antidrómico de la CM y el primer pico de la EHP es del orden de 1 ms mientras que el primer PA del brote ocurre alrededor de 1 ms después.

La latencia del brote de PAs registrado en las nPreMP (desde el PA en la CM) en nuestros experimentos (2.04 ms) es coherente con la estimada según el circuito hipotético que organiza esta modulación. En efecto, en Falconi y col. (1997) la latencia entre el PA en la CM y el inicio de la acción sináptica en las cMP se estimó en 3.4 ms. La activación de las nPreMP aproximadamente 1

ms antes del inicio de la acción sináptica tomaría en cuenta el tiempo de conducción en los axones de estas neuronas (0.5 ms; Heiligenberg y col., 1981) y el retardo sináptico en la transmisión nPreMP-cMP.

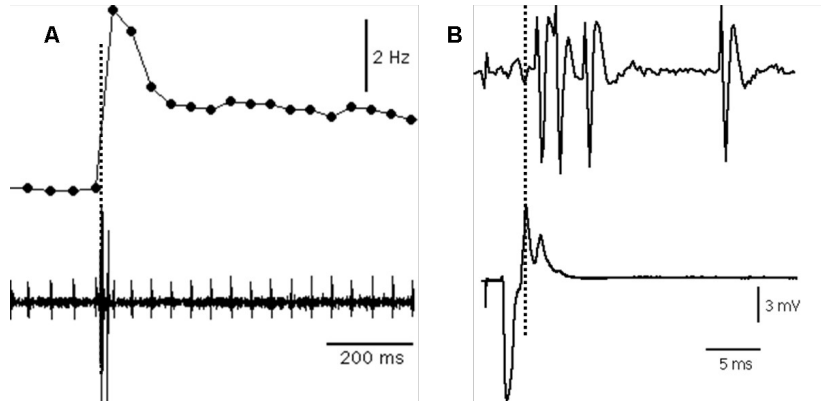


Figura 30: Registro de unidades en el área octavo-lateral. **A:** M-ARDOE provocado por estimulación espinal (panel superior) y registro extracelular obtenido con un microelectrodo localizado en el área octavo-lateral durante la modulación de frecuencia (panel inferior). En el registro extracelular el estímulo espinal provoca un brote de PAs en la unidad registrada que ocurre durante la fase de ascenso de la frecuencia de la DOE (ver línea punteada). La señal rítmica de baja amplitud corresponde al artefacto de la DOE. **B:** Registro unitario (trazado superior) de otra neurona en la misma región y registro de campo en las vecindades del SI del axón de la CM en respuesta a estímulos espinales de similares características (trazado inferior). El intervalo de tiempo entre la EHP y el brote de PAs (ver línea punteada) indica que, aún cuando ambos eventos puedan resultar de la activación de la CM, la actividad unitaria no corresponde a la descarga de una célula PHP, normalmente encontradas en la zona de registro.

La actividad en salvas de las nPreMP fue propuesta por nuestro grupo como un mecanismo de multiplicación temporal (Curti y col., 1999), ya que un solo PA en la CM genera una modulación de la DOE cuya duración excede ampliamente la de la señal que la provoca. Nuestro grupo ha propuesto que el curso temporal prolongado del M-ARDOE es el resultado de la combinación de la activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y metabotrópicos por una parte y la descarga repetitiva de PPs glutamatérgicos por otra (Curti y col., 1999). Esta última generaría en la sinapsis nPreMP-cMP una concentración de

Glu lo suficientemente alta como para activar los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Batchelor y col., 1994).

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las PPs, que controlan la descarga del NEB, son la interfase entre el sistema de escape y el componente electrogenerador de la ERA. En este sentido estas estructuras constituyen una pieza fundamental del sustrato neural de la modulación central de un sistema sensorial por un comando motor, estrategia de ISM de alto nivel. La combinación de técnicas de marcaje retrógrado con inyecciones de glutamato en regiones con grupos de neuronas marcadas mostró que en esta especie, las nPreMP se encuentran dispersas en dos columnas que se extienden desde el diencéfalo hasta el polo rostral del NEB aunque es posible considerar dos agrupamientos bilaterales principales: uno a nivel del diencéfalo en relación con el núcleo CP del tálamo, otro en el área octavo-lateral y un sector en el bulbo raquídeo caudal en el que las nPreMP se encuentran relativamente mas dispersas en el eje céfalo caudal. Este hallazgo contrasta con las características de las PPs en otros gymnotiformes. El bloqueo de regiones discretas de nPreMP durante el M-ARDOE indica que estas neuronas se encuentran funcionalmente segregadas de forma tal que el agrupamiento neuronal diencefálico contribuye específicamente a establecer la duración del M-ARDOE mientras que su amplitud de pico depende del reclutamiento de las PPs bulbares. La correlación temporal entre las consecuencias motoras (respuesta de escape) y sensoriales (el M-ARDOE) de la activación de la CM sugiere que una colateral interna del comando motor de escape originado en la CM está involucrada en la regulación de la secuencia motora durante el escape.

En la discusión general de este trabajo se abordarán: i) la peculiaridad de la distribución de PPs en esta especie, ii) su papel en el M-ARDOE, y finalmente, iii) la implicancia funcional de la modulación del sistema de la ERA por un comando motor de escape.

a) PPs en *G. omarorum*

Nuestros datos aportan a la descripción de las PPs en *G. omarorum* en base a criterios morfológicos y funcionales. Estas estructuras no eran conocidas hasta el momento en esta especie, en contraste con la cantidad de información relevante respecto de estructuras similares en otros gymnotiformes. En otras especies, las PPs han sido agrupadas en dos regiones bilaterales localizadas en el diencéfalo y mesencéfalo, descritos como núcleos premarcapaso diencefálico (PPn) y sublemniscal (sPPn), respectivamente (Heiligenberg y col., 1981; Kawasaki y col., 1988; Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Keller y col., 1990; Keller y col., 1991; Kennedy y Heiligenberg, 1994).

En *G. omarorum*, el depósito de biocitina en el centro de las cMP del NEB reveló que las neuronas marcadas se distribuyeron de manera no uniforme en columnas bilaterales rostro-caudales que se extienden desde el diencéfalo hasta el bulbo caudal (Fig. 17). Estas tienden a agruparse a nivel del diencéfalo y en el área octavo-lateral. Aunque más dispersas, un tercer conjunto de neuronas marcadas se detectó a nivel del bulbo caudal, entre las CM y el polo rostral del NEB. Un grupo adicional, aunque con un menor número de neuronas fue encontrado en algunos casos en las inmediaciones del locus coeruleus. Esta distribución difiere sustancialmente de las descripciones de

PPs en especies relacionadas. En este sentido los agrupamientos en el área octavo-lateral y bulbo caudal constituyen hallazgos originales.

Pese a lo inusual de este hallazgo varias líneas de evidencia descartan el marcaje inespecífico de estas poblaciones celulares y sugieren su naturaleza premarcapaso (PreMP). En primer lugar, aún cuando las neuronas marcadas se encuentran relativamente próximas al sitio de inyección del marcador retrógrado, tanto las modulaciones de la DOE provocadas por su activación como los efectos derivados de su inactivación (ver más adelante), sugieren fuertemente su carácter de PreMP. En segundo lugar el hecho de que el área efectiva de inyección del marcador a nivel del NEB se haya circunscrito específicamente al sector dorsal del núcleo en la vecindad de las cMP (ver p.ej.: Fig. 13) aleja la posibilidad de marcaje inespecífico. Experimentos de marcaje en especies relacionadas en los que el área efectiva de inyección rebasó sistemáticamente los límites del NEB no revelan la existencia de agrupamientos neuronales similares, aún cuando es esperable el marcaje de estructuras no relacionadas directamente con el control de la actividad de este núcleo (Keller y col., 1990; Zupanc y Heiligenberg, 1992; Wong, 1997). El elevado número de neuronas marcadas en estos experimentos (ver p.ej. fig. 9 de Wong, 1997) es coherente con las cantidades de marcador utilizado.

Cabe mencionar sin embargo que en *Gymnarchus niloticus* se ha reportado que el marcaje retrógrado desde el NEB reveló agrupamientos similares a nivel del bulbo caudal (Kawasaki y col., 2003). Presumiblemente la ausencia de evidencias funcionales acerca de la naturaleza PreMP de estas neuronas haya sido la causa de su exclusión en las descripciones de las PPs en publicaciones posteriores del autor.

La posibilidad de cierto grado de marcaje inespecífico, sin embargo, no puede ser totalmente descartada dado que la lesión de fibras de pasaje durante el descenso de la micropipeta conteniendo la biocitina puede ocasionar la captación del marcador por estas fibras eventualmente pertenecientes a estructuras no relacionadas con el control de la descarga del NEB (Vercelli y col., 2000).

Es probable que el grupo de neuronas marcadas en el diencefalo corresponda al PPn de varios peces gymnotiformes (Heiligenberg y col., 1981; Kawasaki y col., 1988; Keller y col., 1991; Kennedy y Heiligenberg, 1994). En *G. omarorum* las neuronas diencefálicas se encuentran próximas al CP talámico en una topografía similar a la descrita. Sin embargo no fuimos capaces de detectar la regionalización observada en otros géneros, encontrando ambos tipos celulares entremezclados. Esta peculiaridad probablemente este en la base del reducido repertorio electromotor que caracteriza a esta especie (ver luego).

Otro hallazgo que distingue a la PPs en *G. omarorum* de las descritas en especies relacionadas se refiere a la ausencia aparente del sPPn. A diferencia de lo encontrado en otros gymnotiformes, nuestros datos refieren a un grupo inconstante de neuronas en la vecindad del locus coeruleus en situación comparativamente más caudal que el sPPn. Su papel funcional se desconoce y no ha sido indagado en este trabajo.

Cabe mencionar que nuestros resultados de marcaje retrógrado pueden reflejar un sesgo metodológico debido a que sistemáticamente el marcador se aplicó específicamente a nivel de las cMP. En estas condiciones, la optimización de la técnica de marcaje para describir las PPs involucradas en el

M-ARDOE (ver Capítulo de objetivos) pudo haber impedido la detección de nPreMP para las que las cR constituyen sus células blanco (PPnC y sPPn). La existencia de este tipo de de PPs en *G. omarorum*, sin embargo es poco probable visto que estos peces no presentan receptores glutamatérgicos en las cR (Curti y col., 1999), ni comportamientos electromotores compatibles con la activación de estos (Black-Cleworth, 1970, ver sin embargo cita de R. Perrone mas abajo). Pese a esto, una descripción exhaustiva de las PPs en *G. omarorum* debería incluir la aplicación de biocitina en ambos sectores del NEB.

De acuerdo al criterio de identificación de PPs adoptado en nuestro trabajo, la naturaleza PreMP de las neuronas marcadas se apoyó asimismo en evidencias funcionales derivadas de los experimentos de activación local por glutamato. En estos experimentos, la inyección local de Glu en las regiones con neuronas marcadas produjo aumentos transitorios de corta latencia de la frecuencia de la DOE (Figs. 19, 20 y 21). A diferencia de lo observado en especies relacionadas utilizando abordajes similares, en ningún caso se observaron modulaciones de la DOE tales como interrupciones súbitas y chirps (ver revisión de Lorenzo y col., 2001). Estas modulaciones han sido reportadas en otras especies de gymnotiformes en el curso de experimentos similares (Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Spiro y col., 1994) e involucran la activación de receptores glutamatérgicos en las cR. En línea con los argumentos manejados más arriba (Black-Cleworth, 1970; Curti y col., 1999), no sorprende la imposibilidad de provocar modulaciones de la DOE compatibles con la activación directa de cR en estos experimentos. Sin embargo, la observación reciente de modulaciones de la DOE durante el comportamiento agonístico

similares a los chirps en *G. omarorum* (R. Perrone, comunicación personal) obligan al análisis mas detallado de las PPs en esta especie.

La ausencia de respuestas a la activación farmacológica de las nPreMP compatibles con el reclutamiento de PPs GABAérgicas como las descritas en otras especies (Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Kennedy y Heiligenberg, 1991) no es esperable en virtud de las evidencias que indican la inervación GABAérgica del NEB. En efecto, la aplicación de muscimol (100 μ M) en el NEB *in vitro* provoca el enlentecimiento de la frecuencia de descarga y finalmente el cese de su actividad espontánea (Comas y Borde, 2008) indicando la presencia de receptores GABA_A en las cMP. Mas aún, la aplicación de GABA en las inmediaciones del NEB *in vivo*, provoca apagados breves precedidos por un enlentecimiento de la descarga (resultados no publicados y D. Lorenzo, comunicación personal). Pese a estas evidencias la presencia y distribución de nPreMP GABAérgicas no ha sido aún demostrada. En nuestros experimentos, la ausencia de respuestas a la aplicación local de Glu compatibles con la activación de este tipo de nPreMP podría deberse al menos a que las células inhibitoras estuvieran fuera del área de exploración con Glu. Sin embargo esta eventualidad es improbable si asumimos que en *G. omarorum* estas se distribuyen como en otras especies de gymnotiformes: las nPreMP GABAérgicas se ubican en el PPn, conformando un subnúcleo (PPnI, Kawasaki y Heiligenberg, 1990). Alternativamente, la activación de una población mixta de nPreMP excitadoras e inhibitoras entremezcladas podría resultar en un aumento neto de la frecuencia de la DOE como el observado en nuestros experimentos. Este tipo de arreglo neuronal ha sido descrito en *Hypopomus* (Kennedy y Heiligenberg, 1994). En cualquier caso, experimentos de doble

marcaje, combinando el marcaje retrógrado con técnicas inmunocitoquímicas para la identificación de los neurotransmisores rápidos más comunes (Glu y GABA), contribuirían significativamente a la dilucidación de la organización de los PPs en esta especie.

b) ***Las nPreMP como nexo entre el sistema electrosensorial y los circuitos relacionados a la CM***

Las PPs han sido descritas como la interfase neural entre los sistemas sensoriales y el componente electrogénico del sistema de la ERA, siendo responsables de la organización de las modulaciones de la DOE provocadas por estímulos sensoriales (Heiligenberg y col., 1981; Kawasaki y col., 1988; Keller y col., 1990; Metzner, 1999; Giassi y col., 2007). Sin embargo, mediante las técnicas de marcaje de vías (ver por ejemplo Wong, 1997 y revisión de Zupanc, 2002) también se ha revelado que una amplia variedad de estructuras centrales no relacionadas con los sistemas sensoriales proyectan sobre las PPs. Consecuentemente, las PPs podrían también integrar entradas procedentes de áreas no relacionadas con el procesamiento sensorial para promover modulaciones específicas de la DOE. Evidencias electrofisiológicas indican además que, en respuesta a ciertas influencias de origen central, las PPs podrían organizar modulaciones específicas de la DOE involucradas en señales de electrocomunicación, desplegadas durante el cortejo o encuentros de tipo agonístico con individuos de la misma especie (Wong, 2000; Silva y col., 2008). En el presente trabajo nosotros demostramos que, además de su papel en la organización de modulaciones de la DOE provocadas por entradas sensoriales, en los peces gymnotiformes, las PPs también participan en la organización del M-ARDOE, una modulación del componente electrogénico del

sistema electrosensorial disparado por una señal neural que se origina en la CM. Durante el M-ARDOE las nPreMP serían reclutadas por un grupo de interneuronas interpuestas entre la CM y estas estructuras. La distancia a las que se encuentran las nPreMP ($>300 \mu\text{m}$) de los axones de las CM conjuntamente con las características de las colaterales axónicas de estas células (“short collateral processes” en Trujillo-Cenóz y Bertolotto, 1990) similares a las observadas en otros teleósteos (Funch y col., 1984; Ritter y col., 2001) descartan el contacto directo de la CM con las nPreMP. Mas aún, la latencia de las acciones sinápticas sobre las cMP iniciadas por la activación de las CM (Falconi y col., 1997) y las características del potencial de campo provocado por las CM en las vecindades del NEB (Curti y col., 2006), sugieren la participación de este tipo de interneuronas en el circuito responsable del M-ARDOE (Int. en Fig. 31B). Estas células no han sido identificadas hasta el momento, pero posiblemente sean similares a las NRC descritas en el pez dorado.

Los resultados obtenidos en los experimentos de lesión y bloqueo transitorio (Figs. 25 y 28) indican que las PPs involucradas en el M-ARDOE están funcionalmente segregadas. Mientras que las PPs diencefálicas son responsables del curso temporal del M-ARDOE, su amplitud de pico depende de la activación de nPreMP más caudales. En la Fig. 31A se representa una estimación de la contribución relativa de estos dos sectores de las PPs. La resta punto a punto del M-ARDOE control (gráfico superior) y de la respuesta remanente luego de la sección a nivel del tectum (gráfico del medio), revela el aporte de los sectores más cefálicos (gráfico inferior). La contribución de las PPs bulbares representada por el remanente luego de la sección, da cuenta de

un componente relativamente breve y fundamentalmente responsable del aumento abrupto de la frecuencia y del pico de la respuesta control. En contraste, el componente dependiente de las PPs diencefálicas es más lento, más duradero y es más relevante durante la fase tardía del M-ARDOE.

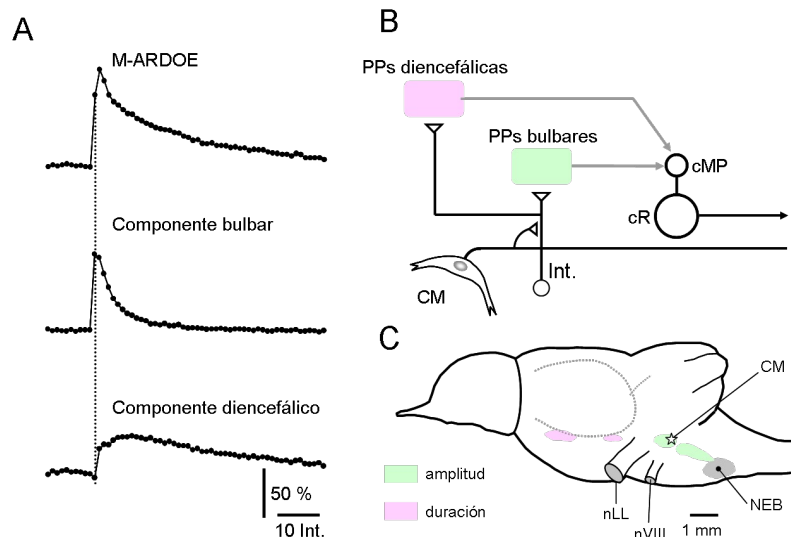


Figura 31: Las PPs diencefálicas y bulbares están segregadas funcionalmente. **A:** Gráficos de frecuencia de la DOE en función del intervalo (normalizados) provocados por estimulación espinal, ilustrando un M-ARDOE (gráfico superior), la respuesta remanente (componente bulbar, gráfico del medio) luego de una sección completa del tronco encefálico en el límite caudal del tectum y el resultado de la resta punto a punto de estas dos respuestas (componente diencefálico, gráfico inferior). Explicación en el texto. La línea punteada vertical, incluida para facilitar la comparación entre gráficos, indica el primer intervalo de la respuesta control. **B:** Diagrama del circuito neural propuesto involucrado en el M-ARDOE. La CM recluta masivamente a las PPs a través de un grupo de interneuronas (Int.), que proyectan sobre las cMP del NEB. El rol funcional de las PPs diencefálicas y bulbares en la organización del M-ARDOE se exhibe con distinto patrón de colores (clave incluida en C, izquierda abajo). **C:** Dibujo esquemático de una vista lateral del cerebro de *G. omarorum* que ilustra la distribución y especialización funcional de las PPs involucradas en el M-ARDOE. En el esquema se agregaron detalles anatómicos para referencia.

En otros gymnotiformes, el reclutamiento específico, según el contexto comportamental, de PPs funcionalmente especializadas parece constituir un principio general de organización de las redes de PreMP (Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Kennedy y Heiligenberg, 1994; también ver Caputi y col., 2005). Nuestros datos indican, sin embargo, que el comando motor originado

en la CM resulta en la activación concurrente de PPs con diversa especialización funcional (Fig. 31B y C). Este patrón de reclutamiento masivo podría reflejar una característica funcional general de los circuitos dependientes de la CM (Eaton y col., 2001; Korn y Faber, 2005). La activación de la CM en el pez dorado provoca el escape motor interrumpiendo la ejecución del patrón motor de nado. El patrón motor de escape impone un reclutamiento muscular masivo por sobre la activación secuencial y coordinada de grupos musculares discretos (Svoboda y Fetcho, 1996).

c) ***El M-ARDOE: una modulación de un sistema sensorial activo por un comando motor***

Clásicamente, la caracterización de las DC tanto en vertebrados como en invertebrados ha sido centrada en el análisis de las vías neurales involucradas en la modulación de las estructuras de procesamiento sensorial provocada por colaterales internas de señales de comando motor (Poulet y Hedwig, 2006; Craspe y Sommer, 2008).

En los últimos años (Wilson y Moss, 2004; Friedman y col., 2006) se han reportado otras estrategias de ISM de alto nivel que subyacen a la modulación de sistemas sensoriales activos por colaterales de comandos motores de origen central, llevando a cambios adaptativos de muestreo sensorial durante determinados contextos comportamentales (Nelson y MacIver, 2006). Por ejemplo, los murciélagos utilizan la ecolocalización para la navegación y captura de presas. Mediante este sistema sensorial actualizan la información espacial eco a eco, con una frecuencia de 10 a 20 Hz (Grinnell, 1995; Moss y Sinha, 2003). Se ha observado que en ciertos murciélagos, las fases tardías del despliegue del comportamiento de captura de presas están acompañadas

por un aumento de la frecuencia de emisión de las señales para la ecolocalización. Este aumento podría facilitar el control fino de su comportamiento de vuelo previo al contacto con su presa (Wilson y Moss, 2004). Similares modulaciones adaptativas del sistema de ecolocalización han sido descritos en delfines (Au, 1993). Otros ejemplos de sistemas sensoriales activos modulados por comandos de origen motor se han reportado en roedores. El “whisking”, modelo de tacto activo dependiente del sistema de vibrisas que fuera referido en la sección de introducción, y el olfateo presentan modulaciones adaptativas durante la exploración. La mayoría de los mamíferos alteran su comportamiento de olfateo cuando se les presenta un olor novedoso. La frecuencia de olfateo en roedores realizando tareas guiadas por el olor presenta brotes de alta frecuencia (4-10 Hz). Como el desempeño en la discriminación de olores se correlaciona con la frecuencia de muestreo olfativo y la concentración del olor, se ha postulado que el incremento de la frecuencia del olfateo facilita la identificación del olor (Kepecs y col., 2007).

Aún cuando la fenomenología de estas modulaciones adaptativas comienza a develarse, se desconocen sus mecanismos neurales y su eventual significado funcional permanece en el terreno del debate.

En este trabajo, hemos avanzado en la descripción del sustrato neural de una estrategia similar de ISM en *G. omarorum* que involucra la modulación del sistema de la ERA por un comando motor. De acuerdo con lo propuesto en los trabajos previos del grupo (Falconi y col., 1995, 1997; Curti y col., 1999, 2006), nuestros datos apoyan que durante el escape motor provocado por la activación de las CM, existe un aumento del muestreo electrosensorial, resultado de la modulación del componente electrogénico del sistema

electrosensorial activo por la señal neural derivada de la CM. Las bases neurales de esta modulación involucran la activación de las neuronas especializadas del tronco encefálico (PPs) por la CM a través de un grupo de interneuronas (Fig. 32A).

El circuito propuesto implica una correlación temporal precisa entre dos consecuencias funcionales de la activación de la CM: el M-ARDOE y el escape motor (Fig. 32B) y permite profundizar en el probable significado funcional de esta modulación. Como ya hemos mencionado, la respuesta de escape consiste en dos fases sucesivas: la primera evasiva altamente estereotipada, que se ejecuta en aproximadamente 30 ms, dando paso a la segunda fase, propulsiva, resultado de la activación de una población de células retículoespinales similares a la CM que integran el SREE. Varios parámetros del acto motor de escape, incluyendo la trayectoria, resultan de la integración de información sensorial multimodal adquirida presumiblemente al final de la fase I. Es posible entonces que el M-ARDOE tenga por finalidad proveer al SREE de un mapa electrosensorial actualizado, que contribuya a la determinación de las claves cinemáticas de la fase II de la respuesta de escape. Para que esto sea posible: i) el SREE debe ser capaz de integrar información electrorreceptiva y ii) debe existir una estricta correlación temporal entre el incremento del muestreo electrorreceptivo y el acto motor de escape.

Evidencias obtenidas en *Eigenmannia* durante el estudio de la respuesta de escape en presencia de obstáculos eléctricos así como la descripción electrofisiológica de aferencias electrorreceptivas en neuronas del SREE sugieren que la información electrosensorial puede contribuir significativamente a la selección de la trayectoria de escape (Canfield y Rose, 1993). Esto sugiere

que en los peces eléctricos, teleósteos en los que la electrorrecepción constituye la principal modalidad sensorial, el SREE recibe un aflujo importante de información electrosensorial significativa para el control motor.

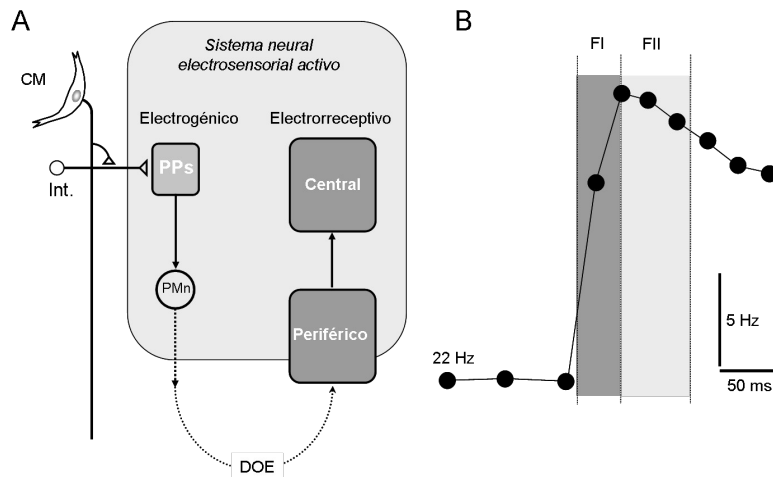


Figura 32: Bases neurales del M-ARDOE y su posible significado funcional. **A:** Diagrama de la vía neural que conecta la CM y el sistema de la ERA. Para simplificar, el sistema está representado por bloques conectados por flechas, ilustrando las PPs y el NEB como partes del componente electrogénico, las estructuras centrales y periféricas del componente electrorreceptivo, y una vía reaferente de la DOE, uniendo ambos componentes en la periferia. La CM modula el componente electrogénico del sistema de la ERA a través de un grupo de interneuronas (Int.) que inervan las PPs. **B:** Esquema en el que se muestra la correlación temporal entre el M-ARDOE y las dos fases de la respuesta de escape en teleósteos. Se grafica la frecuencia de la DOE en función del tiempo de un M-ARDOE representativo y se señalan sobre el gráfico, el inicio y la finalización aproximados de los componente de la respuesta de escape de acuerdo a Eaton y col., 2001. La fase I (FI, región oscura) de la respuesta comienza aproximadamente 12 ms después de la activación de la CM y se continúa con la fase II (FII, región clara). Nótese que el comienzo de la FII coincide con el pico del M-ARDOE.

Como se refería más arriba, el circuito propuesto, paucicelular y altamente eficaz, asegura la estricta correlación del incremento de la información electrosensorial y el acto motor de escape. Según emerge del esquema de la Fig. 32B, el pico del M-ARDOE tiende a ocurrir hacia el final de la fase I inmediatamente antes del inicio de la fase propulsiva del escape (fase II). De esta forma el incremento del muestreo electrosensorial que ocurre en el pico del M-ARDOE aseguraría la provisión de claves electrosensoriales del

entorno a ser procesadas por el SREE en la selección de la trayectoria de escape.

Finalizada la fase II (~100 ms después del estímulo) y producido el desplazamiento del animal como consecuencia de la respuesta evasiva, la frecuencia de la DOE permanece todavía sustancialmente elevada, permitiendo que el sistema electrosensorial sea capaz de reconstruir rápidamente el mapa electrosensorial de acuerdo a las características físicas de su nuevo entorno.

Tradicionalmente, las DC han sido involucradas en estrategias de ISM relacionadas con modulaciones del procesamiento sensorial durante la actividad motora. Recientemente, Poulet y Hedwig (2007) han recomendado la utilización del término DC en su sentido más amplio y abarcador, incluyendo a toda señal neural que se genera en centros motores y que no es directamente utilizada para generar la actividad motora en curso. En este marco conceptual, la señal neural originada en la CM que provoca la modulación del componente electrogenerador de la ERA podría ser considerada un tipo de DC. Esta DC, por vía de la modulación de un sistema sensorial activo, contribuiría a la selección de la trayectoria de escape incrementando la eficiencia de esta respuesta vital para el pez. Crapse y Sommer (2008) proponen una categorización funcional de las DCs (de bajo y de alto nivel) basados en las consecuencias de estas señales en el proceso global de ISM. Así, mientras que las DC de bajo nivel se asocian preferentemente al control del influjo de información sensorial, las DCs de alto nivel participan tanto del control del procesamiento de la información sensorial así como en la secuenciación de la actividad motora. El M-ARDOE en podría constituir la expresión de una DC perteneciente a esta última categoría.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestro trabajo contribuye a esclarecer las bases neurales de una estrategia de ISM en un modelo de vertebrados caracterizado por la modulación de un sistema sensorial activo por un comando motor. En *G. omarorum* esta modulación representa un aumento de la capacidad de muestreo del entorno del pez durante comportamientos motores iniciados por la activación de la CM que podrían proveer de información electrosensorial crucial para la selección adecuada de una trayectoria de escape.

En este trabajo hacemos la primera descripción de las PPs presentes en el pez *G. omarorum* con proyección sobre las cMP del NEB. En esta especie las PPs están representadas por neuronas en íntima relación con la formación reticular del tronco y se extienden desde el diencefalo hasta el polo rostral del NEB.

Estas estructuras están involucradas en el M-ARDOE y se encuentran funcionalmente segregadas. En tanto que las nPreMP diencefálicas contribuyen fundamentalmente a establecer la duración de esta modulación, las neuronas bulbares son responsables de la amplitud de pico.

La realización de experimentos *in vivo* durante los cuales se analice el desempeño motor de animales en nado libre a los que se les presentan diferentes obstáculos durante la respuesta de escape podría complementar nuestro estudio. En efecto, experimentos similares a los realizados por Canfield y Rose (1993), en los que a un animal se le presentan obstáculos eléctricos antes y durante el pico del M-ARDOE aportarían datos acerca del significado funcional de esta modulación. Si el M-ARDOE sirve efectivamente a la selección de la trayectoria de escape, un pez podrá eludir obstáculos, incluidos

los eléctricos, de manera más eficiente que uno con el M-ARDOE permanentemente bloqueada, utilizando por ejemplo la inyección de toxina botulínica en las cMP del NEB.

Sería de interés además realizar maniobras tendientes a confirmar que las CMs y otras neuronas del SREE reciben aferentes electrorreceptivas en *G. omarorum*. Aún cuando hemos presentado evidencias indirectas en este sentido (Fig. 8), la aplicación de un marcador anterógrado en el nLL que permita determinar sus células blanco aportaría pruebas con respecto a este punto.

Como se menciona más arriba, aún resta realizar el marcaje de las PPs por inyección masiva de un marcador retrógrado a nivel del NEB que incluya a las cR, lo que permitiría hacer una descripción completa de estas estructuras presentes en *G. omarorum*. Asimismo, experimentos en los que se detecten proteínas de expresión temprana, como el *c-fos*, aportarían pruebas adicionales acerca del reclutamiento masivo de las PPs en esta especie.

Además, el marcaje retrógrado de nPreMP combinado con técnicas inmunocitoquímicas para la detección del neurotransmisor GABA completaría este estudio.

REFERENCIAS

- Au WWL (1993) *The Sonar of Dolphins*. Au WWL ed. Springer-Verlag, New York
- Auerbach AA, Bennett MVL (1969) Chemically mediated transmission at a giant fiber synapse in the central nervous system of a vertebrate. *J Gen Physiol* 53: 183-210
- Barrio LC, Caputi A, Crispino L, Buño W (1991) Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. *Comp Biochem Physiol* 100A: 555-562
- Batchelor AM, Madge DJ, Garthwaite J (1994) Synaptic activation of metabotropic glutamate receptors in the parallel fibre-Purkinje cell pathway in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 63:911-915
- Bell CC (1981) An efference copy which is modified by reafferent input. *Science* 214: 450-453
- Bell CC (1982) Properties of a modifiable efference copy in an electric fish. *J Neurophysiol* 47:1043-1056
- Bell CC (1989) Sensory coding and corollary discharge effects in mormyrid electric fish. *J Exp Biol* 146: 229-253
- Bell CC (1990) Mormyromast electroreceptor organs and their afferent fibers in mormyrid fish. III. Physiological differences between two morphological types of fibers. *J Neurophysiol* 63: 319-332
- Bell CC, Bodznick D, Montgomery J, Bastian J (1997a) The generation and subtraction of sensory expectations within cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol Suppl.* 50: 17-31
- Bell CC, Caputi A, Grant K (1997b) Physiology and plasticity of morphologically identified cells in the Mormyrid electrosensory lobe. *J Neurosci* 17: 6409-6423
- Bell CC, Grant K, Serrier J (1992) Corollary discharge effects and sensory processing in the mormyrid electrosensory lobe. I. Field potentials and cellular activity in associated structures. *J Neurophysiol* 68: 843-858
- Bennett MVL, Steinbach AB (1969) Influence of electric organ control system on electrosensory afferent pathways in mormyrids. En: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Llinas R, ed. American Medical Association, Chicago, pp 207-214
- Black-Cleworth PA (1970) The role of electrical discharge in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo*. *Anim Behav Monogr* 3: 1-77
- Borde M, Curti S, Comas V, Rivero C (2004) Central modulation of a sensory system by a motor command. One intention with two results. *Rev Neurol* 38: 253-260
- Borde M, Pereda AE, Morales FR (1991) Electrophysiological characteristics of the Mauthner cell of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Brain Res* 567: 145-148
- Brecht M, Grinevich V, Jin TE, Margrie T, Osten P (2006) Cellular mechanisms of motor control in the vibrissal system. *Pflugers Arch* 453:269-281
- Brizze KR, Ordy JM, Kaack B (1974) Early appearance and regional differences in intraneuronal and extraneuronal lipofuscin accumulation with age in the brain of a nonhuman primate (*Macaca mulatta*). *J Gerontol* 29: 366-381
- Bullock T, Hamstra RJ, Schiech H (1972) The jamming avoidance response of high frequency electric fish. I. General features. *J Comp Physiol* 77: 1-22
- Bullock TH, Heiligenberg W (1986) *Electroreception*. John Wiley and Sons, New York
- Canfield JG, Rose GJ (1993) Electrosensory modulation of escape responses. *J Comp Physiol A* 173: 463-474
- Caputi AA (1999) Aprendiendo neurobiología con los peces eléctricos. *Actas de Fisiología* 5: 109-157
- Caputi AA (2004) Contributions of electric fish to the understanding sensory processing by reafferent systems. *J Physiol Paris* 98: 81-97
- Caputi AA, Carlson B, Macadar O (2005) Electric organs and their control. En: *Electroreception*. Bullock TH, Hopkins CD, Popper A, Fay R, eds. Springer, New York, pp 410-451
- Charpier S, Behrends JC, Chang YT, Sur C, Korn H (1994) Synchronous bursting in a subset of interneurons inhibitory to the goldfish Mauthner cell: synaptic mediation and plasticity. *J Neurophysiol* 72: 531-41
- Cole KJ, Gracco VL, Abbs JH (1984) Autogenic and nonautogenic sensorimotor actions in the control of multiarticulate hand movements. *Exp Brain Res* 56: 582-585
- Comas V, Borde M (2008) Bases neurales de la modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Estudio *in vitro* del control sináptico de un núcleo marcapaso. I Congreso IBRO-LARC de Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica. 1-4 de setiembre, Búzios, Brasil.
- Corrêa FM, Innis RB, Rouot B, Pasternak GW, Snyder SH (1980) Fluorescent probes of alpha- and beta-adrenergic and opiate receptors: biochemical and histochemical evaluation. *Neurosci Lett* 16: 47-53
- Crapse TB, Sommer MA (2008) Corollary discharge across the animal kingdom. *Nat Rev Neurosci* 9: 587-600
- Cullen KE (2004) Sensory signals during active versus passive movement. *Curr Opin Neurobiol* 14: 698-706
- Curti S, Comas V, Rivero C, Borde M (2006) Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience* 140: 491-504
- Curti S, Falconi A, Morales FR, Borde M (1999) Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *J Neurosci* 19: 9133-9140
- DiDomenico R, Nissanov J, Eaton RC (1988) Lateralization and adaptation of a continuously variable behavior following lesions of a reticulospinal command neuron. *Brain Res* 473: 15-28
- Domenici P, Blake RW (1991) The kinematics and performance of the escape response in the angelfish (*Pterophyllum eimekei*). *J Exp Biol* 156: 187-205
- Eaton RC, Bombardieri RA, Meyer DL (1977) The Mauthner-initiated startle response in teleost fish. *J Exp Biol* 66: 65-81
- Eaton RC, DiDomenico R, Nissanov J (1988) Flexible body dynamics of the goldfish C-start: implications for reticulospinal command mechanisms. *J Neurosci* 8: 2758-2768
- Eaton RC, DiDomenico R, Nissanov J (1991) Role of the Mauthner cell in sensorimotor integration by the brain stem escape network. *Brain Behav Evol* 37: 272-85
- Eaton RC, Lavender WA, Wieland CM (1981) Identification of Mauthner-initiated response patterns in goldfish: evidence from simultaneous cinematography and electrophysiology. *J Comp Physiol A* 144: 521-531
- Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the hindbrain escape network of fish. *Prog Neurobiol* 63: 467-485
- Faber DS, Fetcho JR, Korn H (1989) Neuronal networks underlying the escape response in goldfish. *Ann N Y Acad Sci* 563: 11-33
- Faber DS, Korn H (1978) Electrophysiology of the Mauthner cell: basic properties, synaptic mechanisms, and associated networks. En: *Neurobiology of the Mauthner Cell*. Faber DS, Korn H, eds. Raven, New York, pp 47-131
- Falconi A, Borde M, Hernandez-Cruz A, Morales FR (1995) Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 176: 679-689
- Falconi A, Lorenzo D, Curti S, Morales FR, Borde M (1997) Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 181: 143-151
- Friedman WA, Jones LM, Cramer NP, Kwegyir-Afful EE, Zeigler HP, Keller A (2006) Anticipatory activity of motor cortex in relation to rhythmic whisking. *J Neurophysiol* 95: 1274-1277
- Funch PG, Wood MR, Faber DS (1984) Localization of active sites along the myelinated goldfish Mauthner axon: morphological and pharmacological evidence for saltatory conduction. *J Neurosci* 4: 2397-2409
- Furshpan EJ, Furukawa TJ (1962) Intracellular and extracellular responses of the several regions of the Mauthner cell of the goldfish. *Neurophysiol* 25: 732-71
- Furukawa TJ, Furshpan EJ (1963) Two inhibitory mechanisms in the Mauthner neurons of goldfish. *J Neurophysiol* 26: 140-176
- Gahtan E, Sankrithi N, Campos JB, O'Malley DM (2002) Evidence for a widespread brain stem escape network in larval zebrafish. *J Neurophysiol* 87:608-614
- Giassi AC, Corrêa SA, Hoffmann A (2007) Fiber connections of the diencephalic nucleus tuberis anterior in the weakly electric fish, *Gymnotus cf. carapo*: an in vivo tract-tracing study. *J Comp Neurol* 503: 655-667
- Grinnell AD (1995) Hearing in Bats: An Overview. En: *Hearing in Bats*. Popper AN, Fay RR, eds. Springer Verlag, New York, pp 1-36
- Hackett JT, Cochran SL, Greenfield LJ Jr (1989) Quantal transmission at Mauthner axon target synapses in the goldfish brainstem. *Neuroscience* 32:49-64
- Hackett JT, Faber DS (1983) Mauthner axon networks mediating supraspinal components of the startle response in the goldfish. *Neuroscience* 8: 317-331

- Hatta K, Korn H (1998) Physiological properties of the Mauthner system in the adult zebrafish. *J Comp Neurol* 395:493-509
- Heiligenberg W (1986) Jamming avoidance responses: model systems for neuroethology. En: *Electroreception*. Bullock TH, Heiligenberg W, eds. Wiley, New York, pp 613-644
- Heiligenberg W (1991) *Neural Nets in Electric Fish*. Cambridge MIT Press, London
- Heiligenberg W, Bastian J (1980) The control of Eigenmannia's pacemaker by distributed evaluation of electroreceptive afferences. *J Comp Physiol A* 136:113-133
- Heiligenberg W, Finger T, Matsubara J, Carr C (1981) Input to the medullary pacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia* (Sternopygidae, gymnotiformes). *Brain Res* 211: 418-423
- Highstein SM, Bennett MVL (1975) Fatigue and recovery of transmission at the Mauthner fiber-giant fiber synapse of the hatchetfish. *Brain Res* 98: 229-242
- Hopkins CD, Heiligenberg WF (1978) Evolutionary designs for electric signals and electroreceptors in gymnotoid fishes of Surinam. *Behav Ecol and Sociobiol* 3:113-134
- Hopkins CD, Westby GW (1986) Time domain processing of electric organ discharge waveforms by pulse-type electric fish. *Brain Behav Evol* 29:77-104
- Horikawa K, Armstrong WE (1988) A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25: 1-11
- Kalyuzhny AE, Wessendorf MW (1998) Relationship of mu- and delta-opioid receptors to GABAergic neurons in the central nervous system, including antinociceptive brainstem circuits. *J Comp Neurol* 392: 528-547
- Kawasaki M (2001) Premotor mechanisms for pacemaker control in *Gymnarchus niloticus*. Neurobiology of electrosensory organisms, Satellite meeting to 6th International Congress of Neuroethology. 27-29 de julio, Bonn, Alemania.
- Kawasaki M, Heiligenberg W (1989) Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish, *Hypopomus*. *J Comp Physiol A* 165: 731-741
- Kawasaki M, Heiligenberg W (1990) Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *J Neurosci* 10: 3896-3904
- Kawasaki M, Maler L, Rose GJ, Heiligenberg W (1988) Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. *J Comp Neurol* 276: 113-131
- Keller CH, Kawasaki M, Heiligenberg W (1991) The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *J Comp Physiol A* 169: 441-450
- Keller CH, Maler L, Heiligenberg W (1990) Structural and functional organization of a diencephalic sensory-motor interface in the gymnotiform fish, *Eigenmannia*. *J Comp Neurol* 293: 347-376
- Kennedy G, Heiligenberg W (1994) Ultrastructural evidence of GABA-ergic inhibition and glutamatergic excitation in the pacemaker nucleus of the gymnotiform electric fish, *Hypopomus*. *J Comp Physiol A* 174: 267-280
- Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF (2007) Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats. *J Neurophysiol* 98:205-213
- Kleinfeld D, Ahissar E, Diamond ME (2006) Active sensation: insights from the rodent vibrissa sensorimotor system. *Curr Opin Neurobiol* 16: 435-444
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327-351
- Korn H, Faber DS (1975) An electrically mediated inhibition in goldfish medulla. *J Neurophysiol* 38: 452-471
- Korn H, Faber DS (2005) The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making? *Neuron* 47: 13-28
- Kupfermann I, Weiss KR (1978) The command neuron concept. *Behav Brain Sci* 1: 3-39
- Lee RKK, Eaton RC, Zottoli SJ (1993) Segmental arrangement of reticulospinal neurons in the goldfish hindbrain. *J Comp Neurol* 327: 1-18
- Lissman HW, Machin KE (1958) The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *J Exp Biol* 35: 451-486
- Lissmann HW (1958) On the function and evolution of electric organs in fish. *J Exp Biol* 35: 156-191
- Lorenzo D, Silva AC, Borde M, Macadar O (2001) Electrogeneration in South American weakly electric fish. En: *Sensory biology of jawed fishes: new insights*. Kapoor BG, Hara TJ, eds. Oxford & IBH Publishing, New Delhi, pp 121-159
- Macadar O, Sierra F, Silva A (2000) Los peces eléctricos. <http://iibce.edu.uy/uas/peces/index.html>
- Maler L, Monaghan D (1991) The distribution of excitatory amino acid binding sites in the brain of an electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Chem Neuroanat* 4:39-61
- Maler L, Sas E, Johnston S, Ellis W (1991) An atlas of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J Chem Neuroanat* 4: 1-38
- Marsden CD, Merton PA, Morton HB (1981) Human postural responses. *Brain* 104: 513-534
- Marsden CD, Rothwell JC, Day BL (1985) The use of peripheral feedback in the control of movement. En: *The motor system in neurobiology*. Evars EV, Wise SP, Bousfield D, eds. Elsevier Biomedical Press, New York, pp 215-222
- Matthews PBC (1964) Muscle spindles and their motor control. *Physiol Rev* 44: 219-288
- McCloskey DJ (1981) Corollary discharges: motor commands and perception. En: *Handbook of Physiology. Nervous system II*. Brookhart JM, Mountcastle VB, Brooks VB, Geiger SR, eds. American Physiological Society, Maryland, pp 1415-1477
- Metzner W (1993) The jamming avoidance response in Eigenmannia is controlled by two separate motor pathways. *J Neurosci* 13:1862-1878
- Metzner W (1999) Neural circuitry for communication and jamming avoidance in gymnotiform electric fish. *J Exp Biol* 202: 1365-1375
- Metzner W, Viète S (1996) The neuronal basis of Communications and orientation in the weakly electric fish, Eigenmannia. II. Electrolocation and avoidance of jamming by neighboring conspecifics. *Naturwissenschaften* 83:71-77
- Moss CF, Sinha SR (2003) Neurobiology of echolocation in bats. *Curr Op Neurobiol* 13: 751-758
- Mott FW, Sherrington CS (1895) Experiments upon the influence of sensory nerves upon movement and nutrition of limbs. *Proc R Soc London* 57: 481-488
- Nelson ME, MacIver MA (2006) Sensory acquisition in active sensing systems. *J Comp Physiol A* 192: 573-586
- Nissanov J, Eaton RC, DiDomenico R (1990) The motor output of the Mauthner cell, a reticulospinal command neuron. *Brain Res* 517: 88-98
- Partanen M, Santer RM, Hervonen A (1980) The effect of ageing on the histochemically demonstrable catecholamines in the hypogastric (main pelvic) ganglion of the rat. *Histochem J* 12: 527-535
- Poulet JF, Hedwig B (2006) The cellular basis of a corollary discharge. *Science* 27: 518-522
- Poulet JF, Hedwig B (2007) New insights into corollary discharges mediated by identified neural pathways. *Trends Neurosci* 30: 14-21
- Quintana L (2010) Dimorfismo sexual y plasticidad estacional de un núcleo central que controla la producción de señales sociales. Tesis de Doctorado, PEDECIBA
- Richer-de-Forges M, Crampton WGR, Albert JS (2009) A new species of Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* 3: 538-544
- Ritter DA, Bhatt DH, Fetcho JR (2001) In vivo imaging of zebrafish reveals differences in the spinal networks for escape and swimming movements. *J Neurosci* 21: 8956-8965
- Santana UJ, Roque-da-Silva AC, Duarte TT, Corrêa SA (2001) Interference with the GABAergic system in the dorsolateral telencephalon and modulation of the electric organ discharge frequency in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 187: 925-933
- Sawtell NB, Williams A, Bell CC (2005) From sparks to spikes: information processing in the electrosensory systems of fish. *Curr Opin Neurobiol* 15: 437-443
- Sherrington CS (1961) *The Integrative Action of the Nervous System*. New York: Reprinted by Yale University Press 1961 (paperback)
- Silva A, Quintana L, Perrone R, Sierra F (2008) Sexual and seasonal plasticity in the emission of social electric signals. Behavioral approach and neural bases. *J Physiol Paris* 102: 272-278
- Sperry RW (1950) Neural basis of the spontaneous optokinetic response. *J Comp Physiol Psychol* 43: 482-489
- Spiro JE, Brose N, Heinemann SF, Heiligenberg W (1994) Immunolocalization of NMDA receptors in the central nervous system of weakly electric fish: functional implications for the modulation of a neuronal oscillator. *J Neurosci* 14:6289-6299
- Svoboda KR, Fetcho JR (1996) Interactions between the neural networks for escape and swimming in goldfish. *J Neurosci* 16: 843-852

- Szabo T, Fessard A (1965) Le fonctionnement des électrorécepteurs étudiés chez les Mormyres. *J Physiol Paris* 57: 343-360
- Teuber HL (1960) Perception. En: *Handbook of Physiology. Neurophysiology*, vol III. Magoun HW, ed. Am Physiol Soc, Washington DC, pp 1595-1668
- Trujillo-Cenoz O, Bertolotto C (1990) Mauthner cells in the medulla of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Experientia* 46: 441-443
- Tytell ED, Lauder GV (2008) Hydrodynamics of the escape response in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *J Exp Biol* 211: 3359-3369
- Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A (2000) Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 51: 11-28
- von Holst E, Mittelstaedt H (1950) The reafference principle. Interactions between the central nervous system and the periphery. *Naturwissenschaften* 37: 464-476. En: *Selected papers of Erich von Holst: The behavioural physiology of animals and man*. London: Methuen. Vol. 1., 1973.
- Waldeck RF, Pereda A, Faber DS (2000) Properties and plasticity of paired-pulse depression at a central synapse. *J Neurosci* 20: 5312-5320
- Weiss SA, Zottoli SJ, Do SC, Faber DS, Preuss T (2006) Correlation of C-start behaviors with neural activity recorded from the hindbrain in free-swimming goldfish (*Carassius auratus*). *J Exp Biol* 209: 4788-4801
- Wiersma CAG, Ikeda K (1964) Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Comp Biochem and Physiol* 12: 509-525
- Wilson WW, Moss CF (2004) Sensory-motor behavior of free-flying FM bats during target capture. En: *Advances in the study of echolocation in bats and dolphins*. Thomas JA, Moss CF, Vater M, eds. Chicago University Press, Chicago, pp 22-27
- Wong CJ (1997) Afferent and efferent connections of the diencephalic prepacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*: interactions between the electromotor system and the neuroendocrine axis. *J Comp Neurol* 383: 18-41
- Wong CJ (2000) Electrical stimulation of the preoptic area in *Eigenmannia*: evoked interruptions in the electric organ discharge. *J Comp Physiol A* 186: 81-93
- Zipser B, Bennett MVL (1976) Interaction of electrosensory and electromotor signals in lateral line lobe of a mormyrid fish. *J Neurophysiol* 39: 713-721
- Zottoli SJ (1977) Correlation of the startle reflex and Mauthner cell auditory responses in unrestrained goldfish. *J Exp Biol* 66: 243-254
- Zottoli SJ, Newman BC, Rieff HI, Winters DC (1999) Decrease in occurrence of fast startle responses after selective Mauthner cell ablation in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Physiol A* 184: 207-218
- Zupanc GK (2002) From oscillators to modulators: behavioral and neural control of modulations of the electric organ discharge in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Physiol Paris* 96: 459-472
- Zupanc GK, Heiligenberg W (1992) The structure of the diencephalic prepacemaker nucleus revisited: light microscopic and ultrastructural studies. *J Comp Neurol* 323:558-569