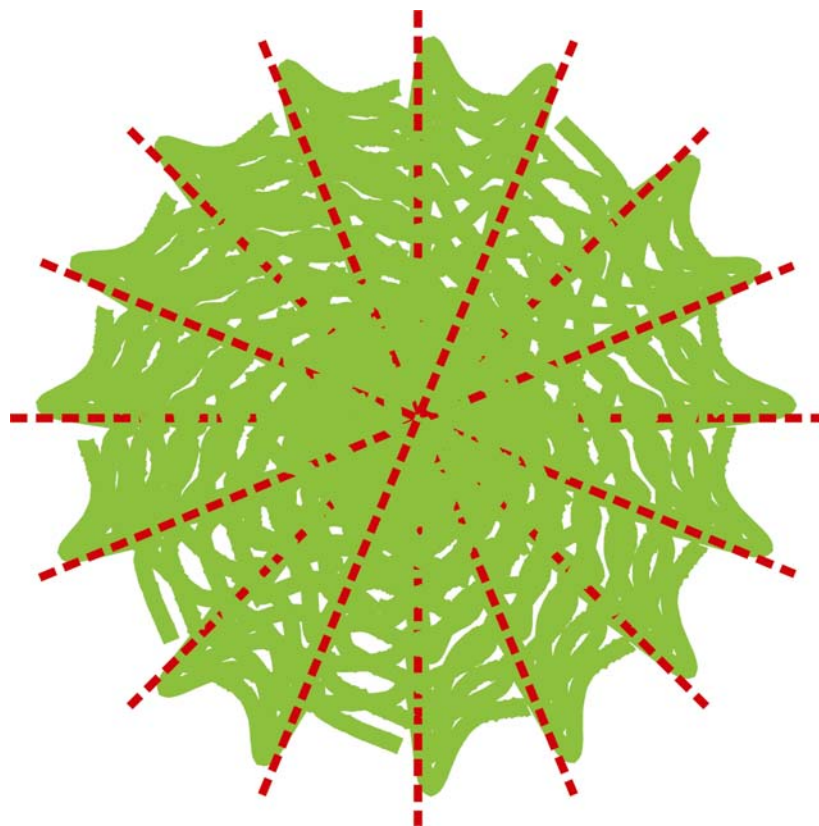


TESIS DE DOCTORADO

Felipe Sierra

**El órgano eléctrico de *Gymnotus*:
Mecanismos iónicos responsables de
su descarga.**



Orientador: Omar Macadar

TRIBUNAL

Presidente: Ruben Budelli

Vocales: Ángel Caputi, Gonzalo Pizarro

PEDECIBA – CIENCIAS BIOLÓGICAS – NEUROCIENCIAS

2007

A Virginia, Santiago, Mariana

*From the pain come the dream
From the dream come the vision
From the vision come the people
From the people come the power
From this power come the change*

*Peter Gabriel
(Fourteen Black Paintings)*

*It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives.
It is the one that is the most adaptable to change.*

Charles Darwin

Agradecimientos

A Omar Macadar quien ha orientado esta tesis y mi trabajo desde tiempos inmemoriales.

A Washington Buño que ha sido una orientación extra desde la distancia.

A todos aquellos que han pasado por el laboratorio y han contribuido a la realización de los experimentos que se muestran ahora, principalmente a Virginia Comas.

A Anabel Fernández que gentilmente cedió su experiencia y su tiempo para la obtención de los datos de inmunohistoquímica.

A José Roberto Sotelo Silveira que también ofreció su ayuda para los estudios de PCR que finalmente no se muestran pero que están sobrevolando el trabajo. También a Aldo Calliari que fue el "culpable" de que esos datos no se muestren.

A Fabiana Blanco que trabajó en los experimentos de campo eléctrico del electrocito.

A mis compañeros de "pescadito" del Departamento de Neurofisiología del IIBCE: Ana Silva, Laura Quintana, Daniel Lorenzo, Rossana Perrone, Carolina Lescano y otra gente más joven que se sigue acercando.

A los demás compañeros con los que comparto la rutina diaria y la San Remo.

A todos aquellos que se dedican a La Ciencia y la sufren día a día...

*Where is the wisdom we have lost in knowledge?
Where is the knowledge we have lost in information?*

TS Eliot (1888-1965)

Índice

Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Summary.....	9
Capítulo I. Los Órganos Eléctricos.....	10
Introducción.....	10
I.1.- Variedad de OEs.....	10
I.1.1.- Órganos eléctricos de elasmobranquios.....	11
I.1.2.- Órganos eléctricos de teleósteos.....	12
I.1.2.1.- <i>Astroscopus</i>	12
I.1.2.2.- <i>Malapterurus</i>	12
I.1.2.3.- Mormyriiformes.....	12
I.1.2.4.- Gymnotiformes.....	13
I.1.2.4.1.- <i>Electrophorus</i>	13
I.1.2.4.2.- <i>Sternopygus</i>	14
I.1.2.4.3.- <i>Brachyhypopomus</i>	17
Capítulo II. El OE de <i>Gymnotus</i> y su control.....	20
II.1.- Control neural del OE de <i>Gymnotus</i>	20
II.2.- El OE de <i>Gymnotus</i>	24
Capítulo III. La diversidad de canales iónicos voltaje-dependientes.....	28
III.1.- Canales de Na ⁺ voltaje-dependientes.....	28
III.2.- Canales de K ⁺ voltaje-dependientes.....	29
III.3.- Canales de Ca ²⁺ voltaje-dependientes.....	33
III.4.- Canales de Cl ⁻ voltaje-dependientes.....	34
Capítulo IV. Hipótesis y objetivos.....	36
Capítulo V. Métodos: El preparado de OE aislado de <i>Gymnotus</i>	38
Capítulo VI. Las conductancias dependientes de Na ⁺ en los electrocitos.....	42
VI.1.- Características generales de la electrofisiología de los electrocitos.....	42
VI.2.- El bloqueo de conductancias de K ⁺ pone de manifiesto la presencia de dos tipos de potenciales plateau.....	44
VI.3.- La fijación de voltaje mostró tres tipos de corrientes dependientes de Na ⁺	49
VI.4.- Los canales de Na ⁺ no están homogéneamente distribuidos en la membrana de los electrocitos.....	52
VI.5.- Posible importancia funcional de las conductancias dependientes de Na ⁺	52
Capítulo VII. Las conductancias dependientes de K ⁺ en los electrocitos.....	54
VII.1. Rol de las conductancias de K ⁺ en la forma del PA y en la descarga repetitiva.....	54
VII.2. Corrientes de K ⁺ activadas por depolarización.....	56
VII.3. Interacción de las conductancias activadas por depolarización.....	59
VII.4. Respuestas hiperpolarizantes (RHs) y las corrientes que las explican.....	61
VII.5. Posible rol funcional de las conductancias dependientes de K ⁺	64
Capítulo VIII. El campo eléctrico de un electrocito.....	66
VIII.1. Características del campo eléctrico generado por un electrocito.....	66
VIII.2. Evidencias de interacciones efápticas entre electrocitos.....	68
Capítulo IX. Conclusiones y Perspectivas.....	70
Bibliografía.....	74
Anexo A.....	81
Anexo B.....	93

Abreviaturas

4-AP: 4 Aminopiridina	nPMPs: Núcleo pre-marcapasos
ACh: Acetilcolina	sublemniscal
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4- propiónico	OE: Órgano eléctrico
DOE: Descarga del órgano eléctrico	PA: Potencial de acción
DPA: Duración del potencial de acción	PB: Buffer fosfato
DTX: Dendrotoxina	PMP: Pre-Marcapasos
EMN: Electromotoneurona	PSP: Potencial post-sináptico
FEM: Fuerza electromotriz	R: Relé
FTX: "funnel spider toxin"	RH: Respuesta hiperpolarizante
HBE: Haz bulbo-espinal	R_{in} : Resistencia de entrada
H-Plateau: Plateau de alto umbral	RR: Rectificador "retardado"
I_A : Corriente de potasio transitoria	RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa – Transcripción inversa
I_b : Corriente de fondo o "de pérdida"	S8%Cl: Solución con bajo cloruro
IC_{50} : Concentración al 50%	SLKCa: Solución libre de potasio y calcio
IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable"	SLKNaCa: Solución libre de potasio, sodio y calcio
I_K : Corriente de potasio rectificador "retardado"	SLNaCa: Solución libre de sodio y calcio
I_{NaPH} : Corriente de sodio persistente de alto umbral	SNC: Sistema nervioso central
I_{NaPL} : Corriente de sodio persistente de bajo umbral	SNP: Sistema nervioso periférico
I_{NaT} : Corriente de sodio transitoria	TEA: Tetraetilamonio
IR: Rectificador de entrada	τ_h : Constante de tiempo de la inactivación
I-V: Corriente-Voltaje	τ_n : Constante de tiempo de la activación (canales de potasio)
L-Plateau: Plateau de bajo umbral	TTX: Tetrodotoxina
MP: Marcapasos	V_{50} : Voltaje al 50%
NCB: Núcleo de comando bulbar	VC: Velocidad de Conducción
NEA: Nervio electromotor anterior	V_h : Potencial de mantenimiento
NEP: Nervio electromotor posterior	V-I: Voltaje-corriente
NMDA: N-Metil, D-Aspartato	V_m : Potencial de membrana
nPMPd: Núcleo pre-marcapasos diencefálico	ω -Aga-IVA: ω -Agatoxina
	ω -CgTX: ω -Conotoxina

Resumen

El órgano eléctrico (OE) es el efector del sistema electromotor en los peces eléctricos. La descarga de este órgano (DOE) constituye una señal importante para la vida de estos animales tanto como parte de un sistema sensorial activo como por tratarse de una señal de comunicación con sus congéneres. Cada especie tiene una DOE característica determinada por las propiedades de su OE.

El OE de *Gymnotus* presenta ciertas características propias muchas de las cuales ya han sido descritas. Este trabajo describe las corrientes iónicas responsables de las propiedades electrofisiológicas de las células que conforman el OE: los electrocitos. Para eso utilizamos el preparado de la porción caudal del OE aislado *in vitro*.

Confirmamos que las propiedades electrofisiológicas de los electrocitos de *Gymnotus* difieren de las propiedades de otros electrocitos de Gymnotiformes bien estudiados tales como *Electrophorus* y *Sternopygus*. Los electrocitos de *Gymnotus* presentan descarga repetitiva, potenciales tipo plateau y respuestas hiperpolarizantes. Estas características implican la presencia de mecanismos iónicos en sus membranas más complejas que las descritas para esas otras especies.

La fase de ascenso del potencial de acción (PA) depende de una corriente de Na^+ voltaje-dependiente transitoria (I_{NaT} : V_{50} de activación -38.84 mV; V_{50} de inactivación -75.28 mV) similar a la ya descrita para otras especies y células. Los potenciales plateau, de dos tipos: de bajo umbral y baja amplitud (L-plateau; V_m promedio de -35.97±8.39 mV) y de alto umbral y mayor amplitud (H-plateau; V_m promedio de 54.26±10.72 mV) son producto de la activación de sendas corrientes de Na^+ voltaje-dependientes persistentes. Existe una corriente persistente de bajo umbral (I_{NaPL} : V_{50} de activación -65.7 mV) y otra de alto umbral (I_{NaPH} : V_{50} de activación 12.8 mV). Las corrientes de Na^+ registradas son sensibles a concentraciones nanomolares de TTX.

Experimentos de inmunohistoquímica nos permitieron ver que los canales de Na^+ voltaje-dependientes se ubican principalmente en las caras caudales y rostrales de los

electrocitos de la porción caudal del OE. En las caras caudales innervadas, se pueden observar cúmulos de canales, posiblemente vinculados con las terminales sinápticas sobre ellas.

Esta distribución desigual puede ser que ocurra con todas las corrientes voltaje-dependientes en estas células ya que pudimos describir el campo eléctrico alrededor de un electrocito y vimos que las principales fuentes y sumideros de corriente de estas células se encuentran en estas dos caras.

Demostramos que la descarga repetitiva depende de la presencia de corrientes de K^+ voltaje-dependientes. A diferencia de lo que ocurre en otras especies se encontraron dos tipos de corrientes de K^+ voltaje-dependientes. Está presente un rectificador retardado (I_K) y una corriente transitoria (I_A). Ambas tienen similar dependencia de voltaje (V_{50} = -12.24±3.96 mV; V_{50} = -19.46±1.12 mV, respectivamente). La I_A es la principal responsable de la rápida repolarización del PA. Ambos tipos presentan diferente sensibilidad a los bloqueantes de canales de K^+ , el componente transitorio es el más sensible a la 4-AP.

Confirmamos la presencia de respuestas hiperpolarizantes (RHs) en estos electrocitos y describimos el mecanismo por el cual se generan. Las RHs son el resultado de un patrón de inactivación y activación de dos tipos de corrientes rectificadoras de entrada (I_{R1} e I_{R2}) que operan en un rango de voltaje muy negativo y que determinan estas respuestas en forma de PA invertido que ocurren con un umbral muy negativo (-214.5±26.4 mV) lo que nos hace dudar de su importancia funcional.

Estos datos nos permiten plantear un modelo cualitativo del funcionamiento de un electrocito y plantearnos diferentes hipótesis de como deberán actuar diferentes factores que actúan modificando la DOE por acción a nivel del OE caudal.

Las perspectivas que se abren a partir de este trabajo son, justamente, el estudio del efecto de las hormonas esteroideas y la temperatura sobre las propiedades de membrana descritas usando este preparado como modelo experimental.

Summary

The electric organ (EO) is the effector of the electromotor system of the electric fish. The electric organ discharge (EOD) is an important signal for the life of these animals, as a part of an active sensorial system and also as a communication signal with their conspecifics. Each species has a characteristic EOD determined by its EO properties.

The EO of *Gymnotus* has certain characteristics that have been described so far. This work describes the ionic currents responsible of the electrophysiological properties of the cell that form the EO: the electrocytes. We used the isolated caudal portion of the EO, *in vitro* preparation in this study.

We confirmed that the electrophysiological properties of the electrocytes of *Gymnotus* differ from those of other well studied Gymnotiformes such as *Electrophorus* and *Sternopygus*. The electrocytes of *Gymnotus* have repetitive firing, plateau potentials and hyperpolarizing responses. These characteristics imply the presence of more complex ionic mechanisms on their membranes than those described for the other species.

The rising phase of the action potential (AP) depended on a transient, voltage-dependent Na^+ current (I_{NaT} : Activation $V_{50} = -38.84$ mV; Inactivation $V_{50} = -75.28$ mV) similar to that described for other species and cells. Two plateau potentials were described: a low threshold, low amplitude plateau (L-plateau; Average $V_m = -35.97 \pm 8.39$ mV) and, a high threshold, high amplitude one (H-plateau; Average $V_m = 54.26 \pm 10.72$ mV). Two persistent, voltage-dependent Na^+ currents are responsible of these plateaus: a low threshold (I_{NaPL} : Activation $V_{50} = -65.7$ mV) current and, a high threshold (I_{NaPH} : Activation $V_{50} = 12.8$ mV) one. The described Na^+ currents were all sensitive to nanomolar concentrations of TTX.

Immunohistochemistry allowed us to observe that the voltage-dependent Na^+

channels are mainly located at the rostral and caudal faces of the electrocytes in the caudal portion of the EO. On the caudal, innervated faces it can be observed high concentration spots of Na^+ channels, probably related to the synaptic terminals.

As we observed that the main current sources and sinks are located on these faces, it is possible that the same inhomogeneous distribution occurs with the other types of voltage-dependent channels.

We showed that the repetitive firing depends on the presence of voltage-dependent K^+ currents. In *Gymnotus* we found two types of voltage-dependent K^+ currents: a delayed rectifier (I_K) and a transient (I_A) current with similar voltage dependence ($V_{50} = -12.24 \pm 3.96$ mV; $V_{50} = -19.46 \pm 1.12$ mV, respectively). I_A is the major responsible of the fast repolarization of the AP. The two K^+ current components showed different sensitivity to K^+ channel blockers being the I_A the most sensitive to 4-AP.

We confirmed the presence of hyperpolarizing responses (HRs) in these electrocytes and described their generation mechanism. The HRs are the result of the successive inactivation and activation of two types of inward rectifiers (IR1 and IR2) which operated in a very negative range of V_m . The HRs are inverted AP-like responses that occur with a very negative threshold (-214.5 ± 26.4 mV) and, probably with no functional significance.

The whole data allowed us to make a qualitative model of the functioning of a caudal electrocyte and to speculate with different hypothesis about the effect of diverse factors that alter the EOD acting on the caudal EO.

Our work opens perspectives for the study of the effects of steroid hormones and temperature, on the described membrane properties, using this experimental model.

Capítulo I. Los Órganos Eléctricos.

The electric organs offer (...) [a] serious difficulty [considering the evolution theory]; for they occur in only about a dozen fishes, of which several are widely remote in their affinities. Generally when the same organ appears in several members of the same class, especially if in members having very different habits of life, we may attribute its presence to inheritance from a common ancestor; and its absence in some of the members to its loss through disuse or natural selection. But if the electric organs had been inherited from one ancient progenitor thus provided, we might have expected that all electric fishes would have been specially related to each other. Nor does geology at all lead to the belief that formerly most fishes had electric organs, which most of their modified descendants have lost.

Charles Darwin. *The Origin of Species*

Introducción.

La capacidad de generar electricidad por parte de los peces parece haber evolucionado en varias oportunidades. Eso determina que existan distintos tipos de peces eléctricos en diferentes grupos, tanto de Chondrichthyes como de Osteichthyes. En casi¹ todos los casos la aparición de un órgano eléctrico (OE) en ciertos peces parece haber evolucionado luego de la evolución de sistemas sensoriales capaces de detectar campos eléctricos (electrorrecepción). La electrorrecepción está muy extendida en todos los Chondrichthyes lo que hace suponer que era una característica presente en los vertebrados ancestrales (Bass 1986). La descarga del OE (DOE) en general forma parte de un sistema de electrorrecepción activa. En algunas especies la DOE parece haber evolucionado además como una herramienta de defensa y/o ataque. Se pueden clasificar los peces eléctricos de acuerdo a distintos aspectos del tipo de DOE (Fig. I-1). Los peces que utilizan la DOE como herramienta de defensa suelen tener descargas de mayor voltaje (5 a 600 V) que los peces que utilizan la DOE exclusivamente como parte de un sistema de electrorrecepción activa. Esto permite clasificar a los peces eléctricos en peces de descarga fuerte o de descarga débil, respectivamente (Fig. I-1). Dentro de los peces de descarga débil se pueden distinguir peces de "pulso" y peces de "onda" (Fig. I-1). Esta clasificación tiene que ver con la relación entre la duración de la DOE y el intervalo entre las mismas. En los peces de pulso la DOE es breve respecto al intervalo entre ellas mientras que en los peces de onda la duración de la DOE y el intervalo entre ellas

es muy similar determinando que el aspecto de la descarga sea sinusoidal.

Los peces eléctricos de descarga débil de agua dulce han evolucionado por separado en América (Gymnotiformes) y en África (Mormyriiformes). Los sistemas electrogénicos de estos dos grupos son diferentes pero tienen un esquema general común con un núcleo de comando ubicado en el tronco encefálico, electromotoneuronas espinales (EMNs) y OEs formados por células con un origen común con el músculo esquelético: los electrocitos. Más abajo describiremos en mayor detalle, y a modo de ejemplo, las características del sistema electrogénico de la especie en la cual hemos trabajado para obtener los resultados que se presentan en este trabajo. Las propiedades de membrana de los electrocitos de *Gymnotus carapo*² son el principal objeto de estudio de este trabajo.

I.1.- Variedad de OEs.

La DOE de los peces eléctricos de débil descarga es una señal identificatoria de la especie, en el sentido de que cada especie tiene un sistema para generarla que es particular. Los registros de la DOE, habitualmente hechos entre los extremos del animal nos permiten una aproximación a los mecanismos y son utilizados por los investigadores como signo del funcionamiento del sistema electromotor. Como ya dijimos esta señal forma parte de un sistema electrorreceptor activo pero también

¹ En el caso de *Astroscopus* no existe un sistema de electrorrecepción.

² La mayoría de la bibliografía citada y los trabajos publicados por el grupo en Uruguay refieren a *Gymnotus carapo*, sin embargo una reciente revisión de Albert y Crampton (2005) se refiere a la especie con la que trabajamos como *Gymnotus inaequilabiatus*. Por otro lado la determinación de la especie de *Gymnotus* que se encuentra en Uruguay está en estudio por parte de estos investigadores. Se trataría de una nueva especie y se está proponiendo la denominación de *Gymnotus omari* como homenaje a los Dres. Omar Macadar y Omar Trujillo-Cenóz que comenzaron con la investigación en ésta especie en nuestro país. En este trabajo se le seguirá llamando *Gymnotus carapo* ya que todavía no está formalmente hecho el cambio de denominación.

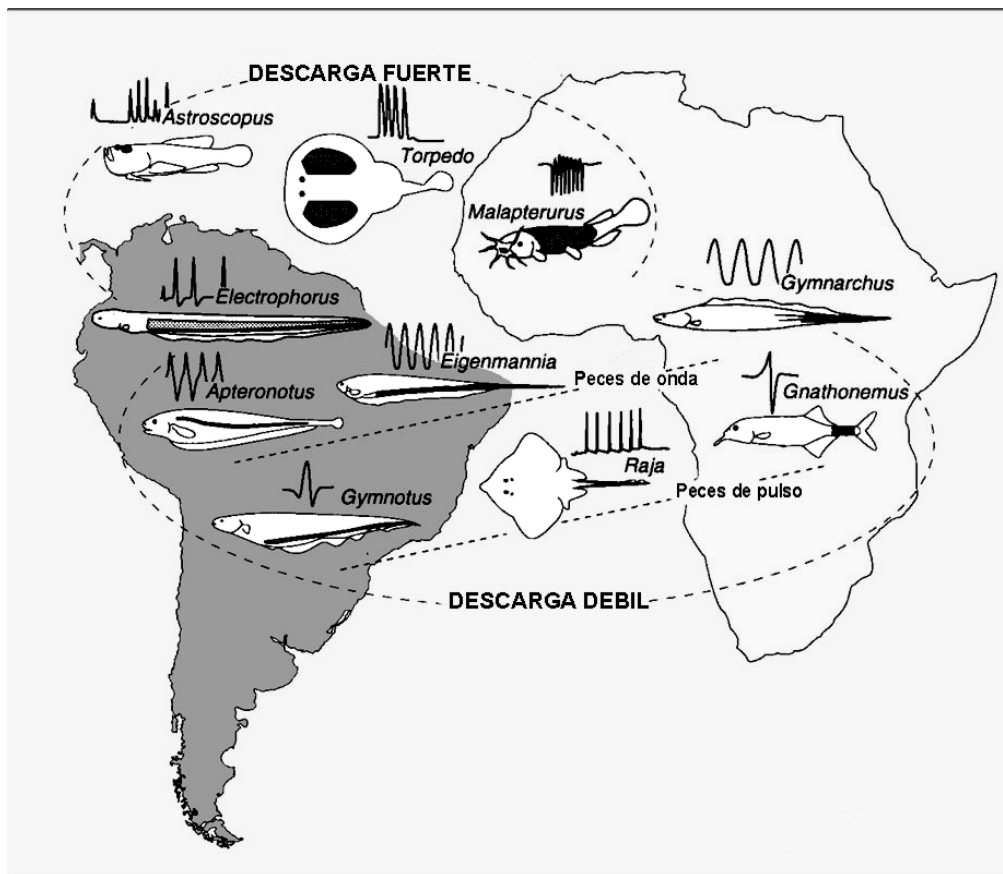


Figura I-1. Variedad de peces eléctricos. Los peces eléctricos se pueden clasificar, de acuerdo a la intensidad y a la forma de onda de la DOE. (Modificada de Moller 1995).

se ha demostrado en algunos casos que puede ser una señal de comunicación entre individuos de la misma especie. Existen tantos tipos de OEs como especies de peces eléctricos hay. Sin embargo puede decirse que en su inmensa mayoría³ estos OEs tienen en común el estar constituidos por células derivadas de tejido muscular: los electrocitos. Vamos a mostrar aquí un repaso de las características de los OEs de las especies mejor estudiadas. Trataremos de señalar aquí como las propiedades morfológicas (patrón de inervación y estructura celular de los electrocitos) y electrofisiológicas (propiedades pasivas y activas de las membranas involucradas) determinan la forma de onda característica de la DOE en cada especie. No debe descartarse que las propiedades de los tejidos que rodean a los electrocitos dentro y fuera del OE también influyan en la forma de onda de la DOE pero no vamos a profundizar en ello.

I.1.1.- Órganos eléctricos de elasmobranquios.

El género más conocido de rayas eléctricas es *Torpedo*. Cada OE de *Torpedo nobiliana* tiene forma de riñón, se ubica a ambos lados de la cabeza y está formado por unos 500-1000 columnas groseramente circulares dispuestas dorso-ventralmente donde se ubican como pilas de monedas los electrocitos. Cada columna contiene unos 1000 electrocitos que tienen una altura de 10-30 μm y un diámetro igual al de las columnas (pueden llegar a 5-7 mm en un *Torpedo* de ~ 1 m). Cada electrocito está inervado en su superficie ventral por unos 5-7 axones provenientes del bulbo. La DOE de *Torpedo* es un pulso monofásico, positivo dorsalmente, de unos 50 V (registrados en el aire) y de una duración cercana a los 5 ms (Bennett 1971).

La cara activa de los electrocitos de *Torpedo* es su cara ventral inervada. La respuesta de los electrocitos es un potencial post-sináptico (PSP) que puede llegar a los 90 mV que puede presentar incluso "overshoot" (Bennett 1971).

³ En el caso de las especies de la familia Aptereronotidae el OE es de origen neural.

En las rayas eléctricas que no son del género *Torpedo*, de descarga débil, los OEs se encuentran a ambos lados de la cola. Los electrocitos de estas especies se ubican antero-posteriormente y están inervados en sus caras anteriores (Bennett 1971). La DOE es monofásica, cabeza-negativa y alcanza un voltaje de aproximadamente 1 V fuera del agua. Estas especies tienen dos tipos de electrocitos: en forma de copa y en forma de disco. Las propiedades de estos dos tipos son algo diferentes. Los electrocitos en disco son similares a los ya descritos en *Torpedo*. En cambio los electrocitos en copa presentan una "rectificación retardada". Esta rectificación sería debida a una conductancia al Cl^- y estaría ubicada en la cara no inervada de los electrocitos. Provoca un acortamiento del PSP y se propone que la caída de la resistencia de membrana que provoca su activación facilita la circulación de corriente alrededor de los electrocitos (Bennett 1971).

1.1.2.- Órganos eléctricos de teleósteos.

Los órganos eléctricos han evolucionado al menos cuatro veces entre los peces teleósteos. Como ya dijimos en tres de estas veces parecen haber evolucionado en grupos donde ya estaba presente la electrorrecepción.

1.1.2.1.- *Astroscopus*

El OE de *Astroscopus* está ubicado inmediatamente por debajo de los ojos. De hecho deriva de los músculos extraoculares (Bennett 1971). La DOE de *Astroscopus* es de entre 5-50 V de amplitud (variable en un mismo individuo) y de unos 5 ms de duración, de polaridad negativa dorsalmente (Bennett 1971; Moller 1995). El OE consiste de 150-200 capas de electrocitos ubicados en el plano horizontal del cuerpo del pez (Bass 1986). Cada capa contiene alrededor de 4 electrocitos grandes (≈ 5 mm) cuyas caras dorsales son lisas y reciben la inervación, mientras que sus caras ventrales no reciben inervación y presentan pliegues. Solo la cara dorsal de los electrocitos es activa durante la DOE. La respuesta de estas caras es un PSP con una forma de onda similar a la DOE. La membrana de la cara inervada se comporta linealmente y no responde a estímulos directos (Bennett 1971). La cara no inervada es de muy baja resistencia y tampoco parece tener conductancias activas (Bennett 1971).

1.1.2.2.- *Malapterurus*

El OE de *Malapterurus* deriva de los músculos pectorales y rodea casi todo el cuerpo del pez. La DOE puede alcanzar hasta unos 350 V de amplitud y consiste en un pulso cabeza-negativo de 1-2 ms de duración. Los electrocitos tienen forma de hoja de lirio acuático de ≈ 1 mm de diámetro y 20-40 μm de espesor. De sus caras caudales se forma un pedúnculo en cuya punta la célula recibe la inervación. La inervación en la cara caudal y el hecho de que la DOE fuera cabeza-negativa confundieron a los investigadores durante años ya que contradecía la regla de Pacini según la cual la cara inervada genera una negatividad en el exterior. Se vio que en el pedúnculo se produce una breve despolarización cuya consecuencia es una pequeña onda cabeza-positiva y la cara rostral produce un PA que es responsable de la principal fase de la DOE (Bennett 1971).

1.1.2.3.- Mormyriiformes.

En los mormíridos el OE está inmediatamente por delante de la aleta caudal. Está compuesto de cuatro columnas de electrocitos (dos a cada lado de la línea media), 70-100 por columna ubicadas en serie (Bass 1986). Cada electrocito tiene caras rostrales y caudales orientadas perpendicularmente al eje longitudinal del cuerpo. El espesor de cada electrocito es de 10-50 μm y su diámetro es de unas 50 veces su espesor (Bass 1986). alguna de las caras de los electrocitos, usualmente la cara caudal, da lugar a evaginaciones digitiformes que se fusionan para formar un pedúnculo (Bass 1986). Este pedúnculo recibe la inervación proveniente de los axones electromotores. En algunas especies existen varios sistemas de pedúnculos (Hasta 10 en *Mormyrus*).

El diseño geométrico de los electrocitos de mormíridos es complicado y varía de especie a especie (Bass 1986). Hay dos patrones básicos de electrocitos referidos como "penetrantes" y "no penetrantes" dependiendo de las características de los pedúnculos (Fig. I-2). En el caso de los "no penetrantes" el pedúnculo emerge directamente de las caras caudales y está inervado en una zona restringida. En muchas especies el pedúnculo penetra literalmente el cuerpo del electrocito y emerge en la cara opuesta a la de su origen, que habitualmente es la caudal, y entonces es inervada del lado rostral (Bass 1986). La diversidad de las

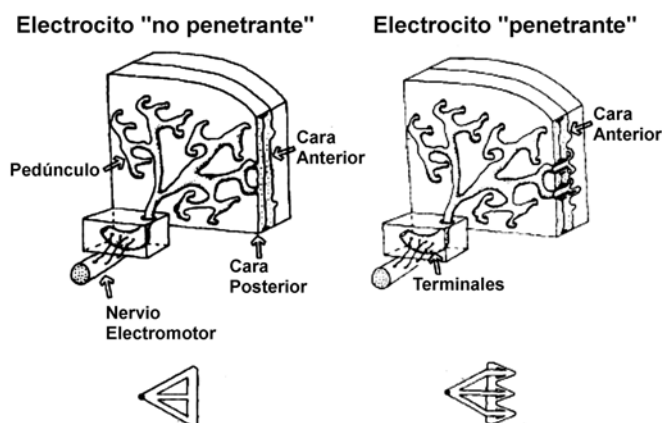


Figura 1-2. Electrocitos de mormíridos. Existen dos tipos de estructura básica de electrocitos en los mormíridos. Los pedúnculos sobre los que reciben la inervación pueden ser "no penetrantes" (izquierda) o "penetrantes". Los esquemas de abajo muestran la estructura de cada uno de los tipos. A partir de estas estructuras existen diferentes variantes (ver texto). Modificada de Bass 1986a.

formas de onda (polaridad de fases, duración y amplitud) de las DOE en los mormíridos está determinada por la geometría y la complejidad de los pedúnculos (Moller 1995).

La forma de onda de la DOE, en cada especie, puede ser predicha por la actividad de un electrocito. La actividad de un electrocito registrada extracelularmente reproduce exactamente la forma de onda de la DOE de esa especie (Bass 1986b). Todas las especies estudiadas (provenientes de Gabón) con pedúnculos no penetrantes tienen una onda bifásica con la primera onda cabeza-positiva (Bass 1986a). En cambio los electrocitos con pedúnculos penetrantes determinan que las especies que los tienen presenten ondas más complejas. De acuerdo a Bass (1986a) se pueden describir seis patrones distintos de morfología de los electrocitos y formas de onda en estas especies. La complejidad en la forma de los electrocitos explica en la mayoría de los casos el número y sucesión de fases de la DOE pero no aclara las diferencias en las duraciones en las distintas especies. Posiblemente estas diferencias estén determinadas por los mecanismos iónicos con distintas cinéticas de las corrientes. A pesar de que en mormíridos no existe un estudio sistemático de las propiedades electrofisiológicas de los electrocitos se ha visto que el OE de *Gnathonemus* expresa un solo tipo de canales de Na^+ (Zakon et al 2006).

Gymnarchus niloticus es una especie de mormyriiforme separada de la familia de los mormíridos. Desde el punto de vista morfológico es bastante diferente al resto y además se diferencia por ser una especie de onda. Su OE también presenta importantes diferencias con respecto a los otros peces

eléctricos africanos de débil descarga. El OE consiste en 4 columnas de electrocitos que se extienden desde la punta de la cola hacia adelante a distancias variables (Bennett 1971). Los electrocitos son cilindros aplanados con inervación en su cara caudal. La cara inervada genera una "espiga ordinaria" cuando es estimulada sinápticamente o por la aplicación de corriente (Bennett 1971). La cara rostral no inervada tiene alta capacidad y alta resistencia y es inexcitable (Bennett 1971). Las espigas de la cara caudal cargan la capacidad de la membrana rostral, en los intervalos esta capacidad se descarga generando una corriente en el otro sentido, eso explica que la descarga de *Gymnarchus* sea bifásica, con una fase cabeza-positiva provocada por el PA de las caras caudales y una pequeña fase cabeza-negativa provocada por la descarga del "condensador" de las caras rostrales (Bennett 1971).

1.1.2.4.- Gymnotiformes.

Haremos hincapié en aquellas especies que por ser especies cercanas y por ser las que mejor han sido estudiadas desde el punto de vista electrofisiológico nos permitan hacer una aproximación a los mecanismos celulares responsables de la DOE en *Gymnotus*.

1.1.2.4.1.- Electrophorus.

De acuerdo a la descripción de Keynes y Martins-Ferreira (1953) el tejido eléctrico en *Electrophorus electricus* ocupa los 4/5 posteriores del pez y se divide en tres partes: el órgano principal, el órgano de Hunter y el órgano de Sachs. Los electrocitos

se encuentran empaquetados en columnas paralelas a la columna vertebral. Tienen forma de cinta con un espesor de 0.1 mm (antero-posterior), un ancho de 1 mm (dorso-ventral) y un largo de 10 a 30 mm (Keynes y Martins-Ferreira 1953). Están inervados por las caras caudales, las que presentan un cierto número de papilas cortas donde termina la inervación. Las caras rostrales presentan una enorme cantidad de papilas y canalículos que aumentan enormemente la superficie de la membrana (Fig. I-3A, esquema inferior). La inervación es colinérgica nicotínica (Altamirano et al 1955b, Altamirano 1956).

De acuerdo a Bennett (1971) la activación de la cara inervada lleva a una "inusual secuencia de cambios de conductancia". Altamirano et al (1955a) describen que existen dos tipos de membrana en los electrocitos de *Electrophorus*: una membrana eléctricamente excitable y una membrana "no eléctricamente excitable". La última está dada por la membrana sináptica que responde al neurotransmisor. La membrana eléctricamente excitable "desarrolla una respuesta graduada local y una espiga todo o nada propagada". Estos dos tipos de respuestas observadas serían dependientes de conductancias de Na^+ (Altamirano et al 1955a). En un trabajo posterior en solitario Altamirano (1955) describe dos tipos de respuestas en la membrana inervada de los electrocitos: un PSP y un potencial "todo o nada" que puede ser generado tanto por estimulación del nervio como directamente (Fig. I-3, A). En este trabajo además se estima la resistencia de membrana promedio de los electrocitos en $6.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$. En este trabajo se concluye que existe un aumento de la resistencia luego del PA a prácticamente el doble ($12.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$) del valor de reposo. Este aumento de la resistencia de membrana parece ser también un fenómeno con umbral y puede verse que la membrana de los electrocitos puede cambiar de un estado de mayor resistencia a otro de menor resistencia (Fig. I-3, B). Por otro lado, por considerar que existe un aumento de la resistencia en la fase final del potencial de acción (PA) se dice que no parece haber una corriente de K^+ en estos electrocitos. Se muestra también que cuando se pasa corriente hiperpolarizante existe una respuesta a corrientes de gran intensidad en las que el potencial de membrana no alcanza valores estables (Fig. I-3, B).

Nakamura et al (1965) describen experimentos de fijación de voltaje en electrocitos de *Electrophorus*. Ellos confirman que el PA es debido a la activación de una corriente de entrada de Na^+ . Se registra en fijación de corriente "respuestas de inactivación depolarizantes" (Fig. I-3, C) que serían debidas a la inactivación de corrientes de K^+ y que explicarían el aumento de la resistencia que ocurre luego del PA ya descrito en los trabajos de Altamirano (Altamirano et al 1955a, Altamirano 1955 y Altamirano y Coates 1957).

En toda esta serie de trabajos se concluye que no existe rectificador "retardado"⁴ de K^+ y que la repolarización del PA es debida a la inactivación de la corriente de Na^+ . Sin embargo, Shenkel y Sigworth (1991) utilizando la técnica de "patch clamp" encontraron en algunos experimentos, además de la presencia de corriente transitoria de Na^+ , corrientes de salida con las características de un rectificador "retardado" (Fig. I-3, D). Por otro lado, un canal de tipo Kv1.1 fue clonado a partir de ADN de OE de *Electrophorus* por Thornhill et al (2003). Cuando este canal fue expresado en células de ovario de mamífero se comportó como un rectificador retardado (Fig. I-3, E; Thornhill et al 2003).

En resumen, los electrocitos de *Electrophorus* son inervados en sus caras caudales por terminales colinérgicas nicotínicas y esas mismas caras presentan una corriente importante de Na^+ y un rectificador retardado cuyos canales presentan baja densidad.

I.1.2.4.2.- *Sternopygus*

Es un Gymnotiforme con DOE de tipo onda. El OE está formado por electrocitos alargados de 1 a 2 mm de largo ordenados en 5 ó 6 hileras longitudinales. Existe poco

⁴ El término "retardado" del rectificador se refiere a la traducción del término "delayed" usado por Hodgkin y Huxley en sus trabajos de 1952. En ese caso su activación está retardada respecto a la de la corriente de entrada de Na^+ . La denominación es extensiva a todas aquellas corrientes de salida de K^+ que presentan características cinéticas similares a las descritas en el axón gigante de calamar (activación con trayectoria sigmoidea y ausencia de inactivación o inactivación muy lenta). En este trabajo se va a utilizar esa denominación en ese sentido y, principalmente, para diferenciar este tipo de corrientes de las corrientes de K^+ de salida que presentan una cinética caracterizada por una inactivación rápida (de tipo A).

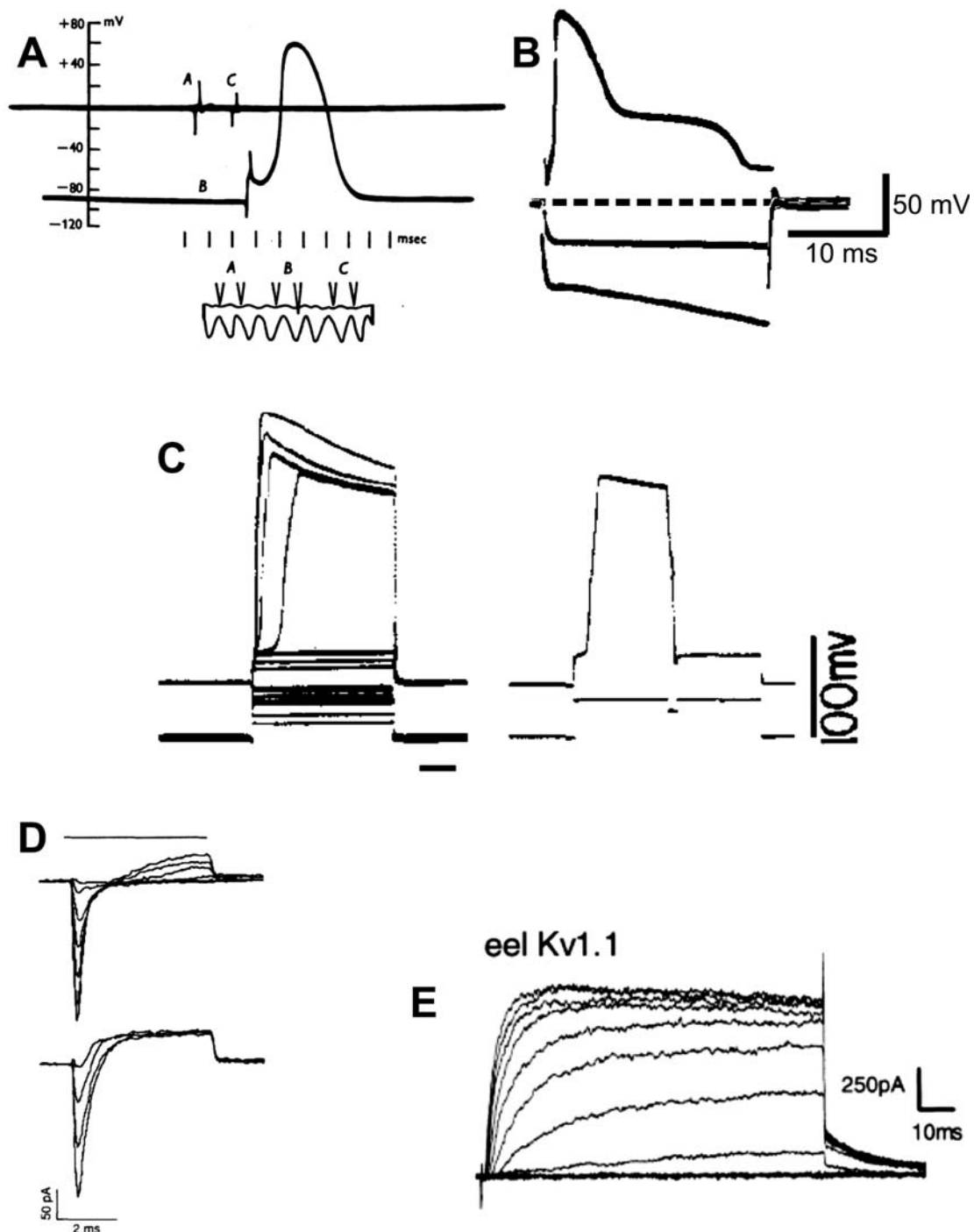


Figura I-3. Propiedades de los electrocitos de *Electrophorus*. **A)** PA de electrocito registrado en su cara caudal (inervada) generado por un pulso breve (Tomado de Keynes y Martins-Ferreira 1953). **B)** Respuestas (3) a pulsos de larga duración (22.5 ms) de distintas intensidades (6.7, -9 y -18 mA/cm²). Nótese que la respuesta al pulso depolarizante, además del PA, muestra una respuesta sostenida (plateau) antes de volver a un nivel más bajo de potencial de membrana. En los pulsos hiperpolarizantes se observa que el de baja intensidad genera una respuesta que tiende a ser estable (aunque no lo es del todo) mientras que la de mayor intensidad muestra un marcado incremento de la caída de voltaje a lo largo del pulso (modificada de Altamirano 1955). **C)** Respuestas depolarizantes tipo plateau. Obsérvese el claro umbral de las respuestas y como los pulsos de mayor intensidad disminuyen el retardo de comienzo de la respuesta (izquierda). A la derecha se observa como el plateau puede ser "cortado" por un pulso hiperpolarizante breve (derecha). Véase que la vuelta al nivel de potencial de membrana menor presenta un cambio en la pendiente (modificada de Nakamura et al 1965). **D)** Corrientes registradas con fijación de voltaje (patch clamp) que muestra la presencia de una corriente de entrada transitoria de Na⁺ y un rectificador retardado en las membranas caudales de los electrocitos (tomada de Shenkel y Sigworth 1991). **E)** Corrientes de salida registradas en células de ovario de hámster chino que fueron transfectadas con el gen de canales Kv1.1 clonados a partir de ARNm de OE de *Electrophorus* (tomada de Thornhill et al 2003).

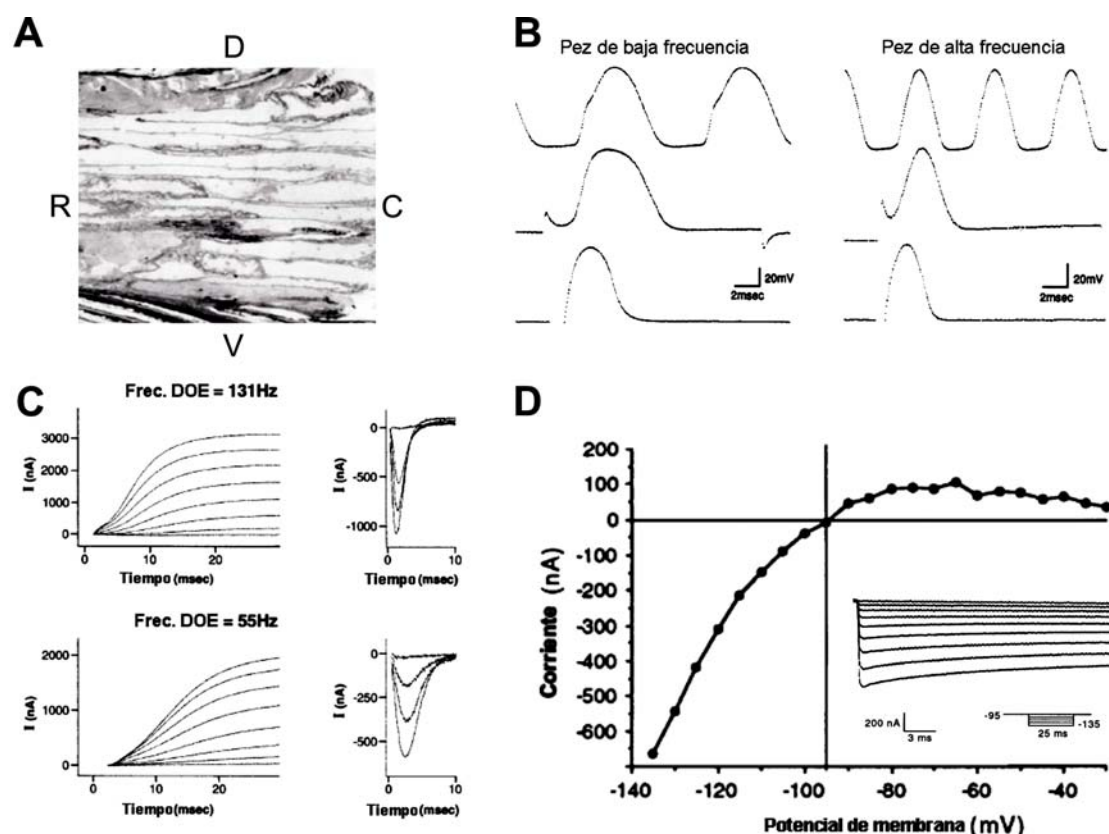


Figura I-4. El OE de *Sternopygus*. A) OE teñido con osmio al 1%. Nótese lo alargado de los electrocitos en sentido rostro-caudal y el escaso espacio que dejan entre ellos. R: rostral; C: caudal; D: dorsal; V: ventral (modificado de Schwartz et al 1975). B) PAs de electrocitos de peces de diferente frecuencia. Arriba: DOE. Medio: PAs "largos" provocados por pulsos intracelulares depolarizantes de larga duración (16-20 ms). Abajo: PAs "cortos" provocados por pulsos cortos (modificado de Mills y Zakon 1991). C) Corrientes activadas por depolarización en distintos electrocitos provenientes de peces con diferente frecuencia de DOE. Izquierda: rectificadores retardados. Derecha: corrientes de Na^+ . Nótese que la cinética de estas corrientes varía en cada caso en que los electrocitos con frecuencias de DOE altas tienen cinéticas de activación más rápidas (modificada de McAnelly y Zakon 2000). D) Curva I-V de la corriente pico del rectificador de entrada registrado a voltajes hiperpolarizantes. Nótese la rápida cinética de activación y la inactivación que se va haciendo más evidente con valores de voltaje más negativos (inset). (Modificada de Ferrari y Zakon 1993).

espacio extracelular entre los electrocitos de *Sternopygus* (Fig. I-4, A). Los electrocitos están inervados en su cara caudal que es también la cara eléctricamente activa. La DOE de forma sinusoidal está dada por la generación de PAs en las caras caudales, separados por intervalos de una duración similar a la de éstos. Eso determina que deba haber una correlación entre la duración del PA y la frecuencia de la DOE determinada en el núcleo de comando bulbar (NCB). Existe dimorfismo sexual en la DOE de esta especie dado por la frecuencia de la onda (mayor en las hembras).

Los electrocitos de *Sternopygus* tienen un potencial de membrana de -76 ± 8 mV (Mills y Zakon, 1991). La mayoría de los PAs registrados en estos electrocitos no alcanzan el valor de 0 mV (Mills y Zakon, 1991). La duración de los PAs fue de 4.4 a 10.6 ms y está correlacionada con la duración del pulso de la DOE (Fig. I-4, B; Mills y Zakon, 1991). Es interesante que en este

trabajo Mills y Zakon (1991) notan que si bien en los PAs de mayor duración aumentan los tiempos de ascenso y descenso, es este último el que aumenta más. Esto los lleva a proponer que es la fase de descenso la que determina principalmente la duración del PA y que sería la corriente de K^+ , responsable de la repolarización de la espiga, la que es más probablemente blanco de la acción de la testosterona (Mills y Zakon, 1991).

El grupo de Zakon ha descrito 3 tipos de canales voltaje-dependientes en los electrocitos de *Sternopygus*. De acuerdo al trabajo de Ferrari y Zakon (1993) los PAs dependen fundamentalmente de la activación de una corriente de Na^+ transitoria clásica, sensible a la tetrodotoxina (TTX). En este trabajo se describe un rectificador retardado que se encuentra en aproximadamente un 25% de los electrocitos estudiados y, teniendo en cuenta esto, proponen que este tipo de corriente no aporta mucho a la repolarización del PA (Ferrari y Zakon, 1993).

Sin embargo en el trabajo de McAnelly y Zakon (2000) se considera fundamental la covariación de la cinética de activación de esta corriente con la frecuencia de la DOE y con las cinéticas de activación e inactivación de la corriente de Na^+ para determinar la duración del PA adecuada para la frecuencia de la DOE en cada individuo de la especie (Fig. I-4, C).

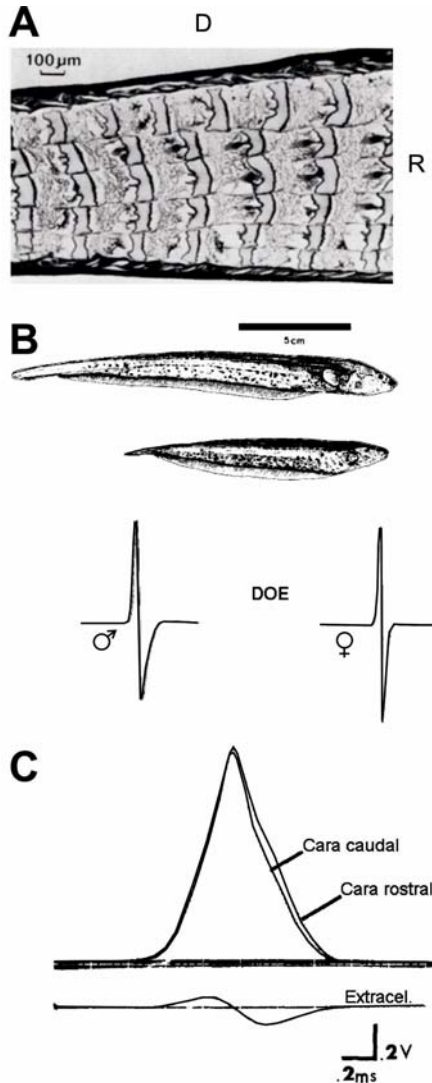


Figura I-5. OE de *Brachyhypopomus*. A) Corte longitudinal de OE de *B. occidentalis* hembra. Los electrocitos se ubican en 5-6 tubos de tejido conjuntivo y presentan un pedúnculo caudal (a la izquierda) donde reciben la inervación. B) *Brachyhypopomus* presenta un claro dimorfismo sexual que se manifiesta a nivel del tamaño de los peces (mayor tamaño el macho, arriba), de la forma de las porciones caudales y de la forma de la DOE. C) Existen diferencias en los PAs de las caras caudales y rostrales. Las corrientes que circulan extracelularmente a cada electrocito tienen una forma bifásica similar a la DOE (Modificadas de Hagedorn y Carr 1985).

Por otro lado también existe un rectificador de entrada sensible al Ba^{2+} y al Cs^+ en los electrocitos de *Sternopygus* (Ferrari y Zakon, 1993). Este rectificador tiene una activación muy rápida y a valores muy negativos presenta una progresiva inactivación (Fig. I-4, D).

En resumen, los electrocitos de *Sternopygus* son inervados en sus caras caudales y esas mismas caras presentan una corriente importante de Na^+ y un rectificador retardado que estaría presente en al menos algunos electrocitos. Además presenta un rectificador de entrada que se activa por hiperpolarización.

Más recientemente se ha profundizado en el conocimiento de la naturaleza molecular de los canales de esta especie (Lopreato et al 2001; Zakon et al 2006) pero eso será tratado con más detalle en el capítulo III.

I.1.2.4.3.- *Brachyhypopomus*

Es un gymnotiforme de pulso. En este género la DOE puede tener 1, 2 o 3 fases dependiendo de las especies (Albert y Crampton, 2005). Las especies más estudiadas son de DOE bifásica. El OE se ubica ventralmente desde atrás de los opérculos hasta la punta de la cola. Los electrocitos se encuentran ubicados en tubos longitudinales de tejido conjuntivo y generalmente en registro entre los tubos. Están inervados en sus caras caudales y las sinapsis ocurren sobre unos pedúnculos que presentan dichas caras (Fig. I-5, A). Es interesante que en varias especies de este género exista dimorfismo sexual que se manifiesta en la morfología externa del animal y en la forma de onda de la DOE (Fig. I-5, B). En el caso de la DOE generalmente se observa que el macho presenta una segunda onda negativa de mayor duración (Fig. I-5, B).

Hagedorn y Carr (1985) estudiaron la electrofisiología de los electrocitos en la especie *Brachyhypopomus occidentalis*. La cara caudal inervada genera un PA, las corrientes de este PA salen por las caras rostrales, la depolarizan y generan un nuevo PA en estas caras (Fig. I-5, C). Eso hace que cada electrocito produzca un potencial externo bifásico similar a la DOE de la especie (Fig. I-5, C). Sin embargo no profundizaron en los mecanismos iónicos de la descarga de estas células y se concentraron en analizar las

diferencias entre electrocitos de machos y hembras.

Bennett y Grundfest (1966) describen en electrocitos de este género respuestas por inactivación de K^+ , tanto por depolarización (similares a las descritas en *Electrophorus* por el propio grupo de Grundfest, determinando potenciales "plateau") como por hiperpolarización. Los experimentos con fijación de voltaje en electrocitos de *Brachyhypopomus* muestran una zona de pendiente negativa en la relación corriente-voltaje (I-V) a valores hiperpolarizantes que ellos interpretan como inactivación de canales de K^+ .

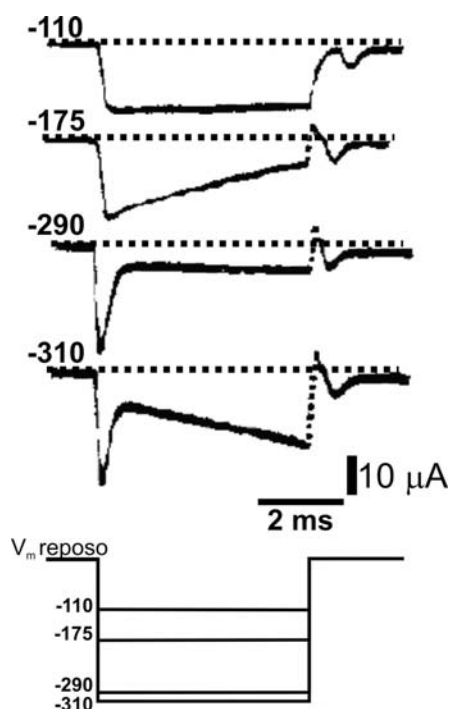


Figura I-6. Corrientes generadas por hiperpolarización en *Brachyhypopomus*. Corrientes registradas con fijación de voltaje a diferentes voltajes respecto al potencial de reposo (los números sobre cada registro representan los mV de comando respecto al V_m de reposo que no fue especificado en el trabajo original). A voltajes "bajos" se observa una corriente de entrada de apertura muy rápida y una leve inactivación. Con valores de voltaje mayores se observa un aumento de la velocidad de inactivación. A voltajes aún mayores se observa también una corriente "resurgente" de entrada. Al final de cada salto de voltaje se observa una corriente de entrada transitoria probablemente debida a la corriente de Na^+ activada al "rebote" de la hiperpolarización y a una muy buena fijación del voltaje (modificada de Bennett y Grundfest 1966).

En fijación de voltaje a potenciales de membrana hiperpolarizantes respecto al valor de reposo se puede observar una corriente de entrada (Fig. I-6). Esta corriente de entrada es lineal hasta cierto nivel y presenta inactivación dependiente del tiempo a medida que se aumenta la hiperpolarización (Fig. I-6). Aun a mayores potenciales negativos se abre una corriente de entrada más tardía (Fig. I-6). Dadas las características de como se activan estas corrientes a relación I-V de la corriente medida al final del comando presenta una pendiente negativa (Bennett y Grundfest 1966).

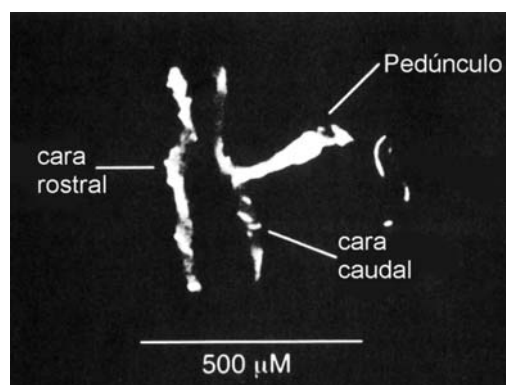


Figura I-7. Expresión de canales de Na^+ en electrocitos de *Brachyhypopomus*. Electrocyto de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* hembra marcado con un anticuerpo para canal de Na^+ voltaje-dependiente. La marca clara que representa la fluorescencia secundaria muestra que el canal de Na^+ se localiza en las caras activas del electrocyto, el pedúnculo y el axón de la EMN que inerva el electrocyto (marcas a la derecha) (Modificada de Stoddard, 2006).

Existen evidencias recientes (Stoddard 2006) de que los electrocitos de *Brachyhypopomus* expresan canales de Na^+ en las caras rostrales y caudales y también en el pedúnculo caudal (Fig. I-7). Es interesante destacar que estos resultados muestran que este tipo de canales no se expresan en las caras laterales (Fig. I-7).

En resumen, *Brachyhypopomus* genera PAs en sus caras caudales y rostrales por su inervación caudal gracias a la presencia de canales de Na^+ que se expresan exclusivamente en esas caras. Además presenta algún tipo de rectificador de entrada activado por hiperpolarización que provoca un comportamiento atípico.

Capítulo II. El OE de *Gymnotus* y su control.

II.1.- Control neural del OE de *Gymnotus*.

La DOE de *Gymnotus carapo* es más compleja que la de las especies de Gymnotiformes hasta ahora comentadas. Consiste en un pulso trifásico con cuatro componentes diferentes. El primer componente es una onda lenta y de baja amplitud (V1) negativo en registros cabeza-cola. A continuación se puede registrar una onda también negativa pero con componentes más rápidos y de mayor amplitud (V2). La onda principal de la DOE de *Gymnotus* es V3 que consiste en una onda rápida y positiva, que es seguida por una última onda negativa (V4). Como veremos en detalle más adelante estas ondas son el resultado de la activación sucesiva de las caras activas de los electrocitos que se ubican a lo largo de todo el OE. Las ondas negativas responden a la activación de caras rostrales mientras que V3 responde a la activación sincronizada de las caras caudales de todo el OE. Antes de profundizar en los antecedentes referidos a la anatomía y la fisiología del OE de *Gymnotus* vamos a resumir las características del sistema electromotor que queda jerárquicamente por encima del OE.

El punto inicial para describir el sistema electromotor podría ser el núcleo de comando bulbar (NCB). Este núcleo tiene dos tipos neuronales: unas neuronas marcapasos (MP) y unas neuronas relé (R). Las neuronas MP son pequeñas ($<30\ \mu\text{m}$ de diámetro promedio en el soma) se ubican dorsalmente en este núcleo y envían sus dendritas apicales dorsalmente hacia el rafe bulbar (Trujillo-Cenóz et al 1993; Curti et al 2006; Fig. II-1A, derecha). Las dendritas laterales se ramifican cerca del soma de origen y también en otras regiones del tronco encefálico (Trujillo-Cenóz et al 1993). El axón hace un bucle lateral antes de ramificarse y terminar conectándose con neuronas pequeñas ubicadas cercanas a las neuronas MP y sobre las neuronas R (Trujillo-Cenóz et al 1993). Desde el punto de vista electrofisiológico se caracterizan por tener una descarga espontánea temporalmente ligada a la DOE y por un

potencial depolarizante (marcapasos) que precede a los PAs (Fig. II-1A, izquierda). Ventralmente en el núcleo se encuentran unas 78-90 neuronas R. Son de mayor diámetro ($>60\ \mu\text{m}$ de diámetro promedio en el soma) y tienen un extenso árbol dendrítico que rodea a las neuronas R vecinas (Curti et al 2006; Fig. II-1B, derecha). Su axón es ostensible y se dirige en dirección dorso-lateral para luego girar en dirección caudal hacia la médula espinal (Trujillo-Cenóz et al 1993). Descargan PAs de acción con una relación fija respecto a la DOE pero a diferencia de las neuronas MP estos surgen abruptamente de la línea de base (Curti et al 2006; Fig. II-1B, izquierda). La actividad sincrónica de estas neuronas permite registrar una actividad de campo extracelular que a nivel dorsal muestra dos picos negativos. Estos picos se corresponden temporalmente con la fase de ascenso de los PAs de las neuronas MP y R, respectivamente (Curti et al 2006). El pico correspondiente a las neuronas MP precede unos 3.5 ms a cada DOE. Ambos picos están separados por <1 ms en promedio (Fig. II-1,C).

Este NCB es el determinante de la frecuencia de la DOE, que tiene un valor basal de entre 40-60 Hz y sufre modificaciones vinculadas con distintos factores ambientales, estímulos externos o estados conductuales. Algunos factores ambientales, tales como la temperatura, pueden estar influyendo directamente sobre las neuronas MP modificando su frecuencia de descarga. Los estímulos externos y los estados conductuales determinan cambios transitorios de la frecuencia de la DOE que son ejercidos a través de estructuras "pre-marcapasos" (PMP) que pueden estar excitando o inhibiendo a las neuronas del NCB. Algunos datos sugieren que existe un tono excitatorio sobre el NCB que sería modulado por la serotonina (Capurro et al 1994). El análisis electrofisiológico, farmacológico y morfológico de algunas conductas permite hacerse una idea del origen y de las modalidades sinápticas de las entradas que recibe el NCB. En particular se ha descrito en *Gymnotus* una respuesta vinculada con la activación de la célula de

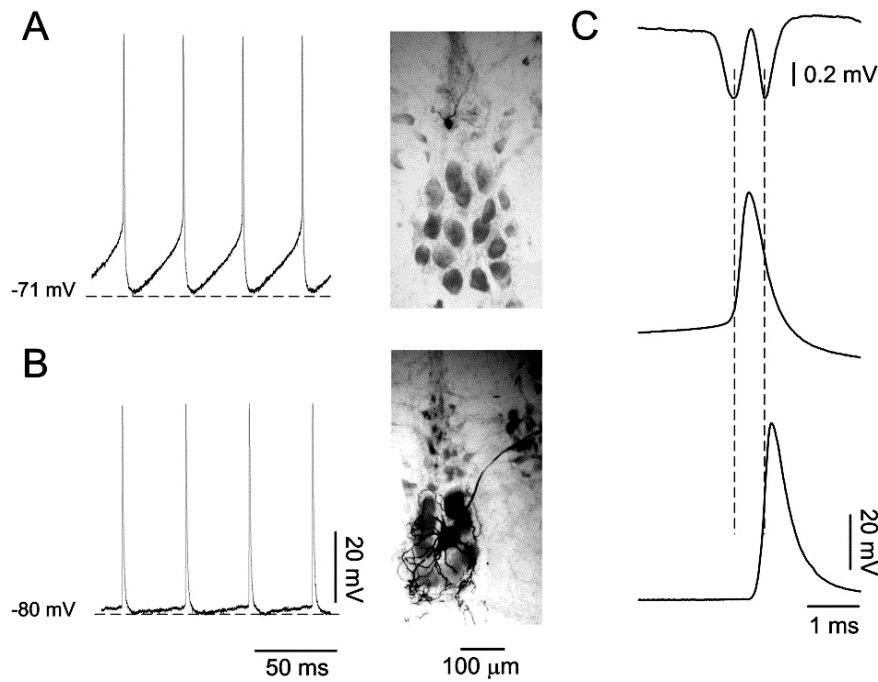


Figura II-1. El Núcleo de Comando Bulbar de *Gymnotus*. **A)** A la izquierda se muestra un registro intracelular característico de la descarga espontánea de una nMP. A la derecha la misma neurona marcada con biocitina. Nótese la ubicación dorsal en el NCB. **B)** A la izquierda la descarga espontánea típica de una nR registrada intracelularmente. A la derecha la misma nR llenada con biocitina. Nótese el mayor tamaño de estas neuronas respecto a las nMP y el árbol dendrítico ampliamente distribuido en la parte ventral del NCB donde se encuentran las otras nR. Se puede observar el axón de esta neurona saliendo en dirección dorso-lateral antes de ubicarse en el HBE. **C)** Relación temporal entre los picos del registro de campo extracelular a nivel de la región dorsal del NCB y la descarga de los dos tipos neuronales (tomada de Curti et al 2006).

Mauthner. Ésta consiste en un aumento rápido de la frecuencia de la DOE (ARDOE) que puede ser provocado por un PA en la célula de Mauthner por estimulación antidrómica, inyección de corriente intracelular o estimulación del par craneal VIII (Falconi et al 1995). Esta respuesta podría facilitar la capacidad de electrorrecepción durante la respuesta de escape mediada por la célula de Mauthner (Falconi et al 1995).

Se han descrito dos estructuras PMP en otras especies de Gymnotiformes: un núcleo PMP diencefálico (nPMPd) y un núcleo PMP sublemniscal (nPMPs) (Heiligenberg et al 1981; Kawasaki y Heiligenberg 1990; Keller et al 1991). En *Gymnotus* se ha encontrado un nPMPd de características similares al descrito en otros Gymnotiformes (Comas et al 2005). Además se han encontrado neuronas dispersas a lo largo de la formación reticulada bulbo-protuberancial que podrían ser el homólogo del nPMPs (Comas et al 2005). Por otro lado hay evidencias, a través de la aplicación de glutamato sobre el NCB de la existencia de receptores glutamatérgicos (Curti et al 1999). Los efectos del glutamato son máximos cuando el glutamato y sus

agonistas son aplicados sobre el soma de las neuronas MP y el tipo de receptores que responden es del tipo AMPA, NMDA y metabotrópicos (Curti et al 1999). A diferencia de lo que ocurre en *Brachyhyopomus* donde la aplicación de glutamato sobre las neuronas R desencadena cambios notorios en la frecuencia y en la forma de onda de la DOE (Kawasaki y Heiligenberg 1990; Spiro 1997; Quintana et al 2002) en *Gymnotus* no se encontraron respuestas sobre las neuronas R (Curti et al 1999). Los dos tipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos no estarían colocalizados en las mismas sinapsis lo que implica que la acción de los receptores NMDA no es dependiente de la presencia de los AMPA como ocurre en otras sinapsis (Curti et al 2006).

Los axones de las neuronas R forman la principal salida del NCB a través de un haz bulbo-espinal (HBE) que se ubica dorsalmente en la médula espinal (Lorenzo et al 1990). A partir de este punto la organización del sistema electromotor (y el sistema electrogénico) está dedicada a obtener la mayor sincronización en la descarga de elementos que se encuentran distribuidos a lo

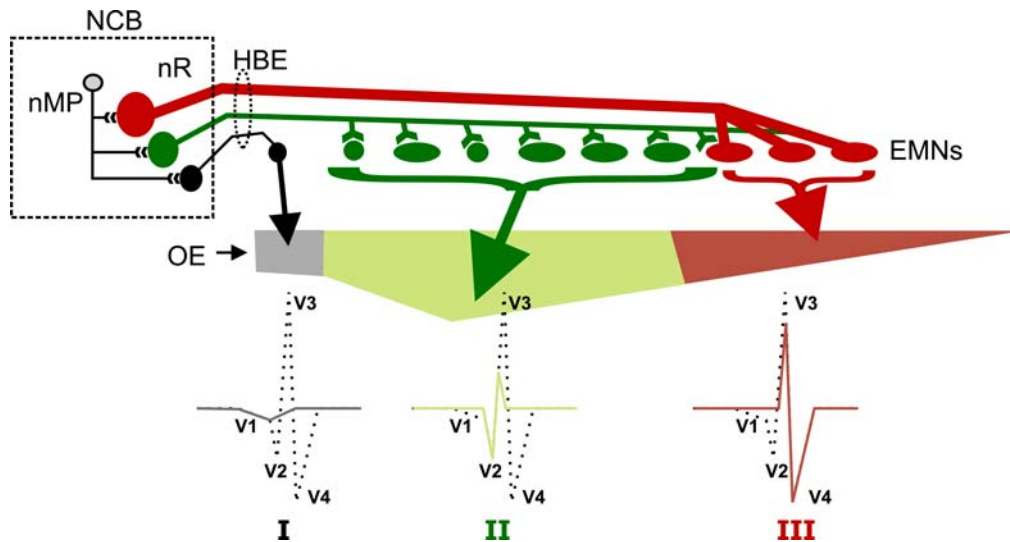


Figura II-2. Organización del sistema electromotor en *Gymnotus*. Esquema que representa los 3 subsistemas electromotores (R-EMN) que controlan la DOE. En negro y gris se representa el R-EMN-I que inerva las caras ventrales de los electrocitos abdominales y es responsable de V1. En verde se representa el R-EMN-II que controla la porción intermedia del OE y es responsable de V2 y de la alta sincronización de V3 en esta región. En rojo se representa el R-EMN-III que controla la porción más caudal del OE y es responsable de la mayor parte de V3, V4 y de la FEM generada por el OE. Para una explicación más detallada ver el texto.

largo del cuerpo del animal. La velocidad de propagación de la activación a lo largo del OE es en promedio de unos 400 m/s (Caputi et al 1993). Esta velocidad no puede corresponder a la velocidad de conducción (VC) de fibras nerviosas en el sistema sino que responde a diferentes mecanismos de sincronización a nivel central y periférico, más aún si se considera que la velocidad de propagación de la DOE no es homogénea y en algunas porciones centrales debería ser de aproximadamente 1000 m/s. Es interesante que la VC de las fibras del HBE es variable en un rango muy amplio de entre 10.7 y 91.6 m/s, valores que podrían ser en realidad una subestimación del valor real debido a la forma en que fueron calculados (Lorenzo et al 1990). Los valores más bajos de VC sólo se encontraron en las porciones proximales (más rostrales) de la médula espinal mientras que los valores altos constituían la mayor proporción de las VC encontradas en las porciones más distales (Lorenzo et al 1990). Esta distribución de las fibras de diferente VC estaría indicando la existencia de mecanismos a nivel de la distribución topográfica en la médula que facilitan la sincronización de la generación de la DOE a lo largo del cuerpo del animal (Lorenzo et al 1990). Esta distribución de las VC se corresponde con la existencia de una distribución diferencial de los diámetros en las fibras del HBE que muestran que las de menor diámetro representan una mayor proporción en los

sectores más proximales de la médula (Silva 1990). Los axones de las neuronas R hacen sinapsis con las electromotoneuronas (EMNs) que son las salidas del sistema nervioso central hacia el OE. Existen 3 tipos de neuronas R de acuerdo a la distribución de las EMNs que inervan y, por lo tanto, del resultado de su activación a nivel del OE (Lorenzo et al 1993). Un primer tipo (10% de las registradas) hace contacto con EMNs proximales y activa solamente electrocitos de la porción abdominal del OE (Lorenzo et al 1993). Un segundo tipo (40% de las registradas) tiene una distribución muy amplia y hace contacto con EMNs todo a lo largo de la médula activando electrocitos de todas las porciones del OE (Lorenzo et al 1993). El tercer tipo, que constituye el 50% de las neuronas R registradas, hace contacto solamente con EMNs caudales que inervan al 30% más caudal del OE (Lorenzo et al 1993). Aparentemente el segundo grupo tendría una función vinculada con la sincronización de la DOE a lo largo de todo el OE mientras que los otros grupos tendrían que ver más con las particularidades de la DOE característica de la especie (grupo I) y con la generación de la FEM (grupo III) (ver más adelante). Las terminales de las células R hacen sinapsis mixtas sobre las dendritas de las EMNs formando "díadas" donde una terminal de neurona R hace contacto con dendritas de dos EMNs (Trujillo-Cenóz et al 1986). Estos contactos de tipo eléctrico proveen de un

mecanismo más que facilita la sincronización de la descarga de grupos de EMNs. Existen mecanismos complejos de convergencia y divergencia en la médula espinal que favorecen la sincronización de la descarga. Por ejemplo, al mismo tiempo que un 40% de las neuronas R divergen para inervar EMNs a lo largo de toda la médula, sobre el 10% caudal del OE convergen EMNs que se encuentran ubicadas entre el 50-80% del cuerpo del pez y, en general, un segmento de 5% de OE está representado por EMNs que ocupan un 20% de longitud del pez (Lorenzo et al 1993, Caputi y Trujillo-Cenóz 1994). En una extensión de médula espinal que ocupa entre el 12% y el 80% de la longitud del pez hay dos tipos de EMNs de acuerdo a su tamaño y al destino de su inervación (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994). Las EMNs pequeñas (25-40 μm) y redondeadas se distribuyen en sectores anteriores de la médula e inervan caras rostrales de electrocitos doblemente inervados (ver más adelante) mientras que las EMNs grandes (45-60 μm) y ovaladas se encuentran en sectores intermedios y caudales de la médula e inervan las caras caudales de los electrocitos todo a lo largo del OE (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994). En los sectores más rostrales (primeros 7 segmentos medulares; 12-20% de longitud del pez) existe un grupo bien delimitado de EMNs pequeñas que inervan exclusivamente las caras rostrales de los electrocitos de la porción abdominal del OE responsables de la V1 de la DOE (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994; Trujillo-Cenóz et al 1984). Este grupo de EMNs posiblemente reciba inervación del grupo I de neuronas R descritas por Lorenzo et al 1993 y que representa también a las fibras de menor VC que se observan en el 20% proximal de la médula (Lorenzo et al 1990). Existiría, por lo tanto, un subsistema electromotor destinado exclusivamente para la generación de V1, lo que estaría indicando la importancia de esta onda como identificadora de la especie. Los axones de las neuronas R de VC intermedia que se distribuyen en proporción casi constante hasta el 60% del pez proporcionarían la inervación de los dos tipos de EMNs que se distribuyen todo a lo largo de la médula y se manifestarían como el tipo II de neuronas R de Lorenzo et al 1993. Por último, los axones de las neuronas R de mayor VC (probablemente la mayoría de las del grupo III de Lorenzo et al 1993) estarían destinados exclusivamente a las EMNs grandes y más

caudales que son responsables de la activación de los numerosos electrocitos de las porciones más caudales del pez y que generan la mayor parte de la FEM de la DOE. En resumen, existirían 3 subsistemas R-EMN (Fig. II-2) con funciones diferentes: a) un subsistema I (R-EMN-I) -para usar la nomenclatura de Lorenzo et al 1993- de baja VC pero con una distribución anatómica compacta y con EMNs pequeñas que garantizarían, por el principio de tamaño de Henneman (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994), su rápida activación y que sería responsable de la onda temprana V1 característica de la especie; b) un subsistema II (R-EMN-II) con VC intermedias, distribuido en las porciones intermedias de la médula y que a través de las EMNs pequeñas (más rostrales y con tiempo de activación más rápido) sería responsable de V2 y, a través de las EMNs grandes, de la V3 muy sincrónica de las porciones rostrales e intermedias y c) un subsistema III (R-EMN-III) de alta VC destinado a EMNs grandes de las porciones caudales y cuya función principal sería aportar la mayor parte de la FEM de la DOE al inervar a la gran población de electrocitos caudales inervados en sus caras caudales. Hay que tener en cuenta que si bien el tamaño de las EMNs puede determinar el tiempo de activación desde la llegada del comando R, también el tamaño de los somas está en relación directa con el diámetro de los axones y por lo tanto con la VC. Eso puede indicar que el retardo en la activación en las EMNs grandes respecto a las pequeñas se puede ver compensado por la mayor VC en los axones de salida de las EMNs grandes.

Hay que tener en cuenta que en los tiempos que están involucrados en estos sistemas también juegan los "caminos" a través de los cuales llega la inervación desde las EMNs al OE. El R-EMN-I sería un sistema de baja VC pero con poco retardo de activación y camino "corto" de llegada a través de los primeros nervios segmentarios. Esto garantiza la anticipación de V1 respecto a las otras ondas de la DOE. El R-EMN-II por un lado genera una rápida activación temprana de EMNs pequeñas que van por caminos directos a las caras rostrales de los electrocitos de la porción intermedia del OE generando V2 y por otro lado, por caminos más largos, llega a las caras caudales de los electrocitos abdominales y, gracias a la divergencia de las neuronas R sobre las EMNs y al acople eléctrico entre grupos de EMNs se

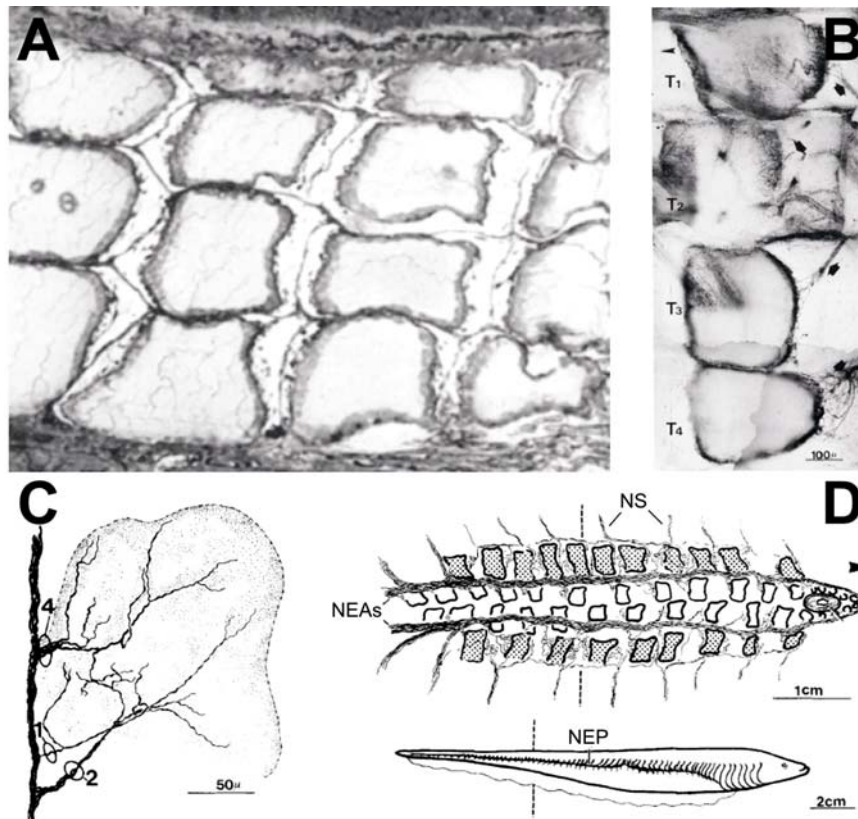


Figura 11-3. Anatomía del OE de *Gymnotus*. A) Corte longitudinal del OEc de *Gymnotus*. Nótese que cada electrocito se encuentra encerrado en un tubo de tejido conjuntivo y dentro de cada tubo los electrocitos están separados por tabiques (modificada de Schwartz et al 1975). B) Electrocitos del OEi. Nótese que los electrocitos del tubo más dorsal (T1) tienen innervación en ambas caras. La flecha indica la dirección rostral (modificada de Trujillo-Cenóz y Echagüe 1998). C) Innervación sobre la cara caudal de un electrocito abdominal en dibujo de cámara lúcida. Cada electrocito recibe terminales de varias fibras (7 en este caso) (tomada de Trujillo-Cenóz y Echagüe 1998). D) Estructura del OEa y esquema de los dos nervios electromotores (modificada de Trujillo-Cenóz y Echagüe 1998).

logra una alta sincronización de la V3 en estas porciones intermedias del OE. Por último el R-EMN-III es una vía directa y de alta VC destinada a las porciones caudales, donde sólo hay electrocitos innervados en sus caras caudales, y es responsable de la mayor parte de la FEM de la DOE a través de la generación de V3 y V4 caudales.

De esa manera la salida del NCB que ocurre sincrónicamente a partir de un punto pero que debe distribuirse en una gran distancia (un OE distribuido a lo largo de casi todo el cuerpo del pez) logra al final generar un evento muy sincronizado. A estos mecanismos que responden a una organización a nivel del sistema nervioso central hay que agregarle algunos mecanismos neurales periféricos y a otros mecanismos que se dan directamente en el OE como lo sugerían Albe-Fessard y Martins Ferreira (1953) en *Electrophorus* y también fueron sugeridos por los datos de Caputi et al (1993) en *Gymnotus* y que serán objeto de discusión más adelante.

11.2.- El OE de *Gymnotus*.

El OE de *Gymnotus* tiene una cierta complejidad en su organización e innervación que tiene relación con la relativa complejidad de la forma de onda de la DOE característica de la especie. De acuerdo a los trabajos llevados adelante en la década de los '80 por los grupos liderados por Trujillo-Cenóz y Macadar en los que se hizo una descripción detallada de las propiedades morfológicas, electrofisiológicas y biofísicas del OE, se puede decir que el OE de *Gymnotus* tiene 3 porciones: una porción abdominal (OEa), una porción intermedia (OEi) y una porción caudal (OEc) (Trujillo-Cenóz et al 1984; Macadar et al 1989; Caputi et al 1989; Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989; Caputi et al 1993). Se podría agregar que cada una de estas porciones guarda cierta relación con los subsistemas R-EMN considerados en la sección anterior.

Antes de analizar eso debemos señalar algunas características generales de la anatomía del OE, de las características de

la innervación de las EMNs sobre los electrocitos y de las propiedades electrofisiológicas de los electrocitos que constituyen antecedentes de este trabajo.

Los electrocitos del OEi y del OEc son células cilíndricas con caras relativamente suaves, sin invaginaciones marcadas o pedúnculos como se puede ver en otras especies (Schwartz et al 1975; Fig. II-3A y B). Se ubican en 4 tubos a cada lado de la línea media delimitados por tejido conjuntivo (Schwartz et al 1975; Fig. II-3A y B). Dependiendo de las regiones del OE los electrocitos de cada tubo están separados entre sí a una distancia variable y en ese espacio se puede observar tabiques de tejido conjuntivo (Schwartz et al 1975; Fig. II-3A). El tejido conjuntivo que forma los tubos es de alta resistencia eléctrica mientras que los tabiques no ejercen una gran resistencia a la circulación de corriente (Bennett y Grundfest 1959). Estos elementos parecen favorecer la circulación de corriente en sentido longitudinal (Bennett y Grundfest 1959). La diferencia entre el OEi y el OEc es que el primero tiene electrocitos con innervación doble, en las caras rostrales y caudales, en el tubo más dorsal (Fig. II-3B). Este tipo de organización de los electrocitos se observa por detrás de la cavidad visceral. La innervación, tanto de las caras rostrales del tubo dorsal como de las caras caudales de todos los electrocitos, proviene del nervio electromotor posterior (NEP) que se forma a partir del segmento XXVII de la médula (Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989; Fig. II-3D, abajo).

El OEa es diferente en cuanto al número y a las características de los electrocitos y también a su innervación. En esta porción el OE se ubica ventralmente en la pared abdominal y tiene 2 tubos a cada lado de la línea media (Trujillo-Cenóz et al 1984). El tubo externo está compuesto de electrocitos muy grandes con innervación doble mientras que el tubo interno tiene electrocitos con innervación simple caudal. Las caras caudales de todos los electrocitos del OEa son innervadas por axones que llegan a través del nervio electromotor anterior (NEA). El NEA se forma a partir de axones que se desprenden de los nervios espinales segmentarios a partir de los segmentos VIII a XXIV que viajan hacia atrás y forman este nervio recurrente (Trujillo-Cenóz et al 1984; Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989). Las caras rostrales de los electrocitos laterales son innervadas por fibras que llegan a través de los

nervios espinales segmentarios de los primeros XXIV segmentos (Trujillo-Cenóz et al 1984). Cada cara, sea rostral o caudal recibe terminales provenientes de entre 7 y 11 axones de EMNs (Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989; Fig. II-3C). No existen diferencias ultraestructurales apreciables entre las caras rostrales y caudales innervadas (Schwartz et al 1975; Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989).

No ocurre lo mismo cuando se estudian las propiedades electrofisiológicas de las caras rostrales y caudales de los electrocitos doblemente innervados del OEa. Cuando se registra *in vivo* en forma espontánea un electrocito doblemente innervado se observa que descarga PAs precedidos de un notorio prepotencial con aspecto de PSP que es el resultado de la activación de las caras rostrales (Lorenzo et al 1988; Fig. II-4D). La activación espontánea de la innervación de las caras caudales produce un PA que se observa incluso luego de haber seccionado la innervación de las caras rostrales (Lorenzo et al 1988; Fig. II-4D). Esto muestra que la innervación anterior no tiene un rol en la generación del PA a través de la suma témporo-espacial de PSPs sino que su papel es determinar la onda V1 de la DOE (Trujillo-Cenóz et al 1984; Lorenzo et al 1988; Macadar et al 1989). La estimulación supramáxima de los nervios segmentarios que envían axones a un electrocito de este tipo no es capaz de provocar un PA (Macadar et al 1989; Sierra 1991; Fig. II-4E). La aplicación de 4-aminopiridina (4-AP) en el OEa *in vitro* aumenta la amplitud del PSP generado por estos nervios hasta ser capaz de provocar la descarga de un PA, sin embargo el estudio de las corrientes extracelulares demuestra que ese PA es generado en las caras caudales (Sierra 1991). Las caras rostrales, sin embargo, son capaces de generar PAs pero solamente por el "salto" del PA que se genera en la cara caudal (Macadar et al 1989; Sierra 1991).

Gran parte del conocimiento de la electrofisiología de los electrocitos proviene del estudio del OEi y del OEc. El trabajo de Bennett y Grundfest (1959) hizo el aporte pionero a la comprensión del funcionamiento del OE de *Gymnotus* y a continuación destacamos sus principales hallazgos. Los electrocitos registrados *in vivo* utilizando "Ringer *Electrophorus*" tienen un potencial de membrana en reposo de alrededor de -85 mV. La estimulación subumbral con pulsos

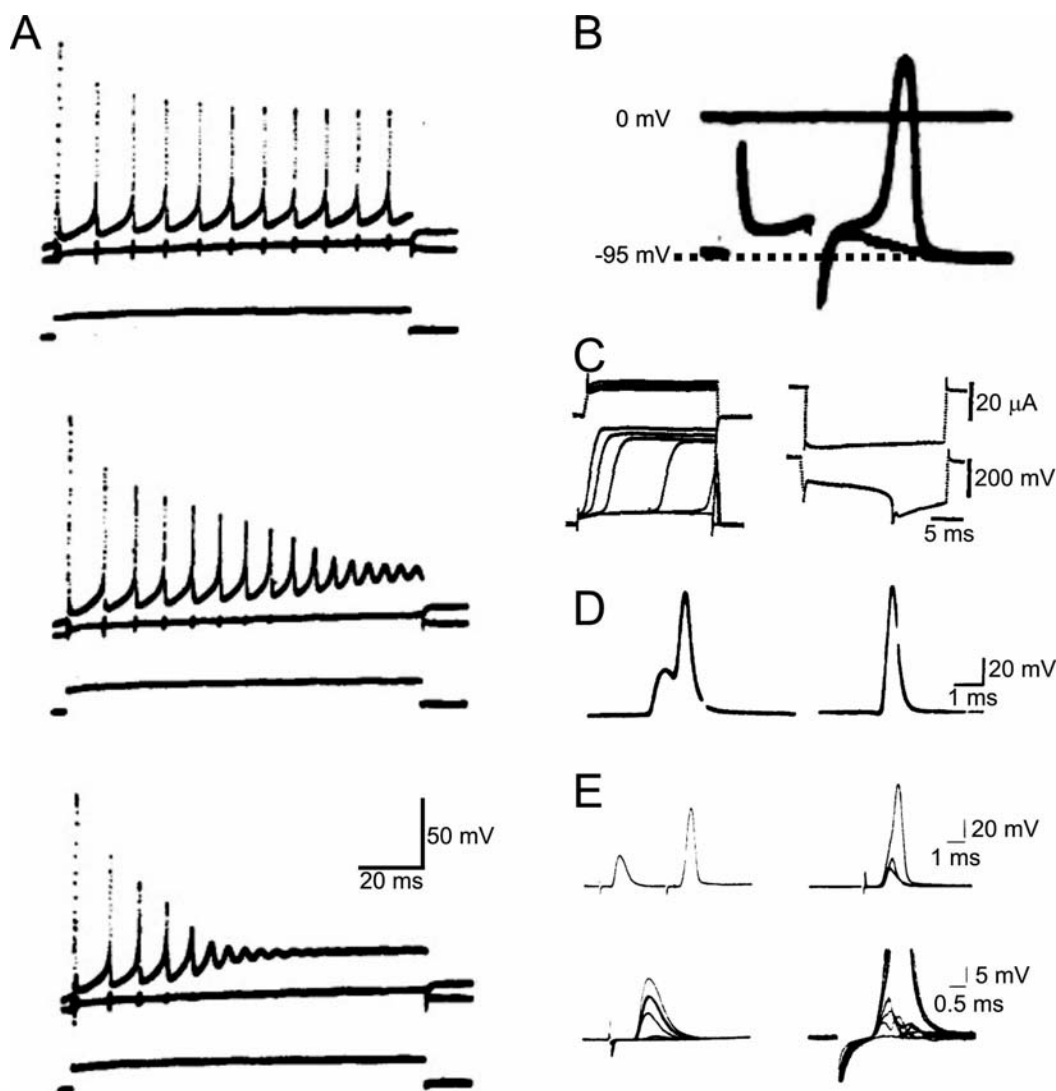


Figura II-4. Electrofisiología del OE de *Gymnotus*. A) Descargas de un electrocito registradas *in vivo*. De arriba a abajo se muestran las respuestas a depolarizaciones largas. Nótese la descarga repetitiva en el primer registro y el aspecto de oscilación atenuada del último registro (modificada de Bennett y Grundfest 1959). B) Superposición de dos registros de electrocitos estimulados con pulsos cortos. En la respuesta a un pulso subumbral se puede apreciar que hay una respuesta local (modificada de Bennett y Grundfest 1959). C) A la izquierda respuesta a pulsos depolarizantes de intensidad creciente (arriba) en un electrocito inmerso en una solución conteniendo KCl 50 mM. Se observan los plateaus "todo o nada" generados que van disminuyendo su retardo a medida que aumenta la intensidad del estímulo. A la derecha se observa una "respuesta hiperpolarizante" provocada por un pulso hiperpolarizante de gran intensidad (modificada de Bennett y Grundfest 1966). D) Descarga espontánea de un electrocito del OEa antes (izquierda) y después (derecha) de cortarle la inervación de la cara rostral. Nótese que el PSP generado en la cara anterior no es necesario para la generación del PA (tomada de Lorenzo et al 1988). E) Registros en electrocitos del OEa *in vitro*. Arriba a la izquierda respuestas sucesivas a la estimulación supramáximas del NS y el NEA. Nótese que la estimulación del NS sólo genera PSP. Arriba a la izquierda se muestran tres registros superpuestos en que se observan PSPs generados por la estimulación de cada uno de los nervios separadamente y el PA que se obtiene por la estimulación simultánea de ellos. Esto sugiere que estos PSPs pueden sumarse temporal y espacialmente en estas condiciones experimentales pero no lo hacen en condiciones naturales. Abajo se muestran registros superpuestos de la respuesta a distintas intensidades de estimulación de los nervios (izquierda, NS; derecha NEA). Nótese que los PSPs son obtenidos por la suma de pasos discretos que representan la activación de las distintas fibras que inervan cada electrocito (tomada de Macadar et al 1989).

breves muestra una respuesta local sobre la cual se monta el PA cuando se supera el umbral (Fig. II-4B). Los PAs tienen una amplitud de 125-150 mV y una duración total de 0.7 ms. Los registros extracelulares

simultáneos mostraron que los PAs se generan en ambas caras. La cara inervada (fuera ésta caudal o rostral) es la que muestra menor umbral para la descarga y luego el PA salta a la otra cara. Los

electrocitos pueden seguir una frecuencia de hasta 150/s descargando PAs. La depolarización con pulsos de corriente intracelular largos provoca descarga repetitiva a diferencia de lo visto en otros Gymnotiformes (Fig. II-4A). Apenas superado el umbral el aspecto de esta descarga más que una descarga repetitiva se parece más a una respuesta oscilatoria atenuada (Fig. II-4A). Bennett y Grundfest (1966) describen también algunos datos más de electrocitos de *Gymnotus* con fijación de corriente y voltaje en preparados *in vitro* (Fig. II-4C). Describen plateaus provocados por depolarización que interpretan como debidos a la inactivación de corrientes de K^+ como los descritos en *Electrophorus* (Nakamura et al 1965) y *Brachyhypopomus* (Bennett y Grundfest 1966; Fig. II-4C, izquierda). También describen respuestas hiperpolarizantes en electrocitos de *Gymnotus* (Fig. II-4C, derecha). En este trabajo se utilizan tres especies diferentes y se analizan los datos como si todos los electrocitos se comportaran de la misma forma por lo que es muy difícil separar las conclusiones obtenidas en una especie u otra. Solamente se discrimina el origen de los datos en las figuras. Todos los resultados que corresponden a *Gymnotus* son

de fijación de corriente (Fig. II-4C). Como discutiremos al final de nuestro trabajo algunos de los datos de fijación de voltaje que se muestran en este trabajo son similares a los nuestros en *Gymnotus*.

Al igual que la sinapsis neuromuscular y que en otros peces eléctricos las sinapsis neuroelectrocíticas de *Gymnotus* son de tipo colinérgicas nicotínicas (Bennett y Grundfest 1959; Sierra 1991; Sierra et al 1995). La membrana de los electrocitos es depolarizada por la aplicación de acetilcolina (Bennett y Grundfest 1959; Sierra et al 1995). La aplicación de fisostigmina provocó un aumento de la amplitud ($\approx 10\%$) y de la duración ($\approx 40\%$) del PSP provocado por la estimulación de los nervios segmentarios en el OEa y un aumento no cuantificado de ambos parámetros del PSP generado por la estimulación del NEA (Sierra 1991). La d-tubocurarina a concentraciones de 10^{-6} M bloqueó totalmente el PSP de cara rostral en los electrocitos doblemente innervados del OEa (Sierra 1991). Se pudo ver que el Ca^{2+} es importante para la liberación de la ACh en estas sinapsis y que los canales de Ca^{2+} presinápticos que determinan la liberación del neurotransmisor en estas sinapsis es del tipo N (Sierra et al 1995).

Capítulo III. La diversidad de canales iónicos voltaje-dependientes.

En 1952 Hodgkin y Huxley culminaban una serie de trabajos pioneros en el análisis del potencial de acción. En el último trabajo de la serie ellos discuten los resultados de los cuatro trabajos anteriores, formalizan los resultados matemáticamente y muestran que pueden explicar la conducción y la excitación en forma cuantitativa. En la primera parte, donde discuten los resultados y aclaran que es a pesar de que "...al presente el grosor y composición de la membrana excitable son desconocidos", adelantan lo que serán las principales características de los canales iónicos sin nombrarlos como tales.

En este trabajo dicen:

- "El primer punto que emerge [de nuestros experimentos] es que los cambios de permeabilidad parecen depender del potencial de membrana y no de la corriente de membrana"

- "La dependencia de g_{Na} y g_K del potencial de membrana sugiere que los cambios de permeabilidad provienen del efecto del campo eléctrico sobre la distribución u orientación de moléculas con una carga o momento dipolar."

- "...el movimiento del sodio depende de la distribución de partículas cargadas que no actúan como transportadores en el sentido usual sino que permiten al sodio pasar a través de la membrana cuando ellas ocupan un lugar particular en la membrana."

- "... [se puede] atribuir la declinación de la conductancia de sodio [inactivación] al movimiento relativamente lento de otra partícula que bloquea el flujo de iones sodio cuando alcanza cierta posición en la membrana."

- "... [todo esto] se aplica igualmente al mecanismo subyacente al cambio de permeabilidad al potasio (...) uno debe suponer que hay un sistema completamente separado que difiere (...) en los siguientes aspectos: 1) las moléculas que se activan tienen una afinidad por el potasio pero no por el sodio; 2) ellas se mueven más lentamente; 3) ellas no son bloqueadas o inactivadas."

- "Los detalles del mecanismo no serán determinados por algún tiempo, pero

parece difícil escapar a la conclusión de que los cambios de permeabilidad iónica dependen del movimiento de algún componente de la membrana que se comporte como si tuviera una gran carga o momento dipolar. Si tal componente existe es necesario suponer que su densidad es relativamente baja y que un número de iones sodio cruzan la membrana en un único punto activo"

El trabajo de Hodgkin y Huxley (1952a, 1952b, 1952c, 1952d) fue realizado en el axón gigante de calamar. Tuvieron la suerte de que en esta estructura existieran dos únicos tipos de canales principales, lo que simplificó bastante el análisis. El desarrollo de la electrofisiología, la farmacología y la biología molecular en las décadas siguientes mostraron, sin embargo, que en la mayoría de las estructuras excitables las cosas no son tan simples y que existe una enorme diversidad de canales que explica la gran diversidad de comportamientos electrofisiológicos que presentan las neuronas, las fibras musculares y otro tipo de células excitables en un mismo individuo así como la gran diversidad encontrada en las distintas especies.

Sin embargo, las características principales y esenciales de los canales iónicos voltaje-dependientes se mantienen en todas las células y especies, indicando que la diversidad actual de los canales es producto de la evolución de los genes que codifican estas moléculas a partir de uno o varios genes que se han ido duplicando y fusionando a lo largo del tiempo y de la evolución.

III.1.- Canales de Na^+ voltaje-dependientes.

Históricamente, y hasta hace pocos años, los canales de Na^+ fueron considerados por: a) tener poca variedad y b) ser los responsables de la fase de ascenso rápida del PA y de la conducción del mismo en los axones. Los avances recientes en la biología molecular y en la electrofisiología combinada con microscopía han permitido determinar que existe cierta diversidad de canales de Na^+

y que cumplen con funciones más variadas de las que se creía.

El primer canal de Na^+ clonado fue el de *Electrophorus* por Noda et al en 1984. En los mamíferos se han descrito nueve tipos diferentes de canales de Na^+ voltaje-dependientes que pertenecen todos a una misma familia molecular que se denomina Na_v1 . Cada una de estas proteínas se expresa en forma característica en distintos tejidos y en distintas etapas del desarrollo. A su vez los canales presentan sutiles variaciones en sus propiedades electrofisiológicas y diferentes sensibilidades a toxinas que afectan su conductancia. Los tipos $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$ se expresan abundantemente en el sistema nervioso central (SNC) (Goldin 2001). Todos estos tipos son inhibidos por concentraciones nanomolares de TTX (Goldin 2001). $\text{Na}_v1.6$ es el tipo de canal que se expresa más abundantemente en el SNC de adultos (Goldin 2001). Los tipos $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$ se expresan primariamente en el sistema nervioso periférico (SNP) (Goldin 2001). $\text{Na}_v1.8$ es muy resistente a TTX con una IC_{50} de más de 50 μM (Goldin 2001). $\text{Na}_v1.9$ también es resistente a TTX pero con una IC_{50} de 1 μM (Goldin 2001).

Las variedades $\text{Na}_v1.4$ y $\text{Na}_v1.5$ se expresan en tejido muscular de mamíferos. $\text{Na}_v1.4$ se expresa en el músculo esquelético adulto. $\text{Na}_v1.5$ se expresa en el músculo cardíaco adulto y en músculo esquelético en etapas tempranas del desarrollo o durante la denervación del mismo (Goldin 2001).

En teleósteos se han estudiado los genes de canales de Na^+ en varias especies. El estudio más completo es el llevado a cabo por el grupo de Zakon y colaboradores en *Sternopygus* y otras especies (Lopreato et al 2001; Zakon et al 2006; Novak et al 2006). En el trabajo de Lopreato et al (2001) se describen en *Sternopygus* 6 tipos de canales de Na^+ . Actualmente se han descrito 8 tipos de canales de Na^+ en teleósteos (Novak et al 2006). El trabajo de estos autores parece indicar que la duplicación de genes en peces y en tetrápodos se dio en forma diferente. Eso parece haber determinado que las homologías entre genes de teleósteos y mamíferos sean complejas. Sin embargo, la expresión de los distintos tipos de canales parece haberse conservado de tal manera que los canales se siguen expresando en forma diferente en los distintos tejidos. Los canales de Na^+ correspondientes a $\text{Na}_v1.4$ y $\text{Na}_v1.5$ de mamíferos tendrían dos homólogos

cada uno en los teleósteos ($\text{Na}_v1.4a$, $\text{Na}_v1.4b$ y $\text{Na}_v1.5La$, $\text{Na}_v1.5Lb$; respectivamente). Todos ellos estaban presentes en tejidos neurales y musculares (Novak et al 2006). Los canales $\text{Na}_v1.4a$ y $\text{Na}_v1.4b$ son los únicos que se expresan en el músculo esquelético de pez cebra adulto (Novak et al 2006). En músculo cardíaco, por otro lado, se expresan $\text{Na}_v1.5La$, $\text{Na}_v1.5Lb$ y $\text{Na}_v1.4b$. Es interesante ver que en el OE de Gymnotiformes se expresan también $\text{Na}_v1.4a$ y $\text{Na}_v1.4b$ pero al mismo tiempo $\text{Na}_v1.4a$ no se expresa en el músculo esquelético en esas especies. En Gymnotiformes, por lo tanto, hay dos canales de Na^+ que tienen expresión demostrada en el OE. Sin embargo, no queda claro si en los estudios recientes (Novak et al 2006; Zakon et al 2006) se estudió la expresión específica de los canales de tipo $\text{Na}_v1.5La$ y $\text{Na}_v1.5Lb$ en el OE de Gymnotiformes que puedan abrir la posibilidad de que puedan verse más de dos tipos de corrientes de Na^+ en los electrocitos. Por otro lado se han visto mutaciones en *Brachyhyppopomus* en sitios de la molécula del canal de Na^+ vinculados con la inactivación del canal (Zakon et al 2006). Es posible que estas mutaciones tengan importancia en las especies de DOE de pulso breve.

III.2.- Canales de K^+ voltaje-dependientes.

Quizás en los canales donde se expresa mejor la gran diversidad de los mismos es en los de K^+ . Dado que el potencial de equilibrio del K^+ es negativo, cercano o igual al potencial de reposo, estos canales tienen un rol de estabilizar el V_m y en consecuencia de disminuir la excitabilidad. Esto implica que los canales de K^+ son los principales "responsables del potencial de reposo, mantienen a los PAs cortos, terminan con períodos de intensa actividad, marcan los intervalos inter-espigas durante la descarga repetitiva y generalmente bajan la efectividad de las entradas excitatorias sobre la célula en la que están abiertos" (Hille 2001). "Cuantos más tipos de canales hay en una célula más difícil es distinguir electrofisiológicamente sus contribuciones individuales" (Hille 2001). "El clonado y los proyectos de genoma han revelado más de 80 genes relacionados con subunidades de canales selectivos al K^+ " (Hille 2001). Hay varios tipos que incluyen canales voltaje-dependientes, Ca^{2+} -dependientes, rectificadores de entrada, de "pérdida" y Na^+ -dependientes (Coetzee et al 1999). Los canales voltaje-dependientes (K_v)

están representados por 40 genes en los mamíferos agrupados en 12 familias de proteínas (Gutman et al 2005). Las primeras 4 familias (K_v1 , K_v2 , K_v3 y K_v4) están relacionadas a los canales descritos en *Drosophila* de tipo *Shaker*, *Shab*, *Shaw* y *Shal*, respectivamente (Gutman et al 2005). En cada una de estas familias existen canales con características cinéticas de rectificador retardado y de corriente de tipo A. Las familias K_v5 , K_v6 , K_v8 y K_v9 no expresan canales funcionales por si mismos sino que forman heterotetrámeros con miembros de la familia K_v2 aumentando la diversidad funcional de esa familia.

Aparte de la diversidad aportada por la gran diversidad de moléculas de canales de K^+ codificadas en el genoma la diversidad funcional de canales de K^+ puede estar aun más aumentada por mecanismo tales como: a) la heterotetramerización dentro de la misma familia (K_v1 , K_v7 y K_v10 lo hacen) o con miembros de diferentes familias (K_v2 con las ya mencionadas arriba); b) la unión a proteínas asociadas que incluyen varios tipos de subunidades β y que pueden modificar sus propiedades; c) "Splicing" alternativo que se ha visto que existe en varias familias (K_v3 , K_v4 , K_v6 , K_v7 , K_v9 , K_v10 y K_v11); d) modificaciones post-translacionales como puede ser la fosforilación.

Otro grupo de canales selectivos al K^+ es el de canales "calcio-dependientes" (K_{Ca}). Lo integran 5 familias de proteínas de las cuales K_{Ca1} es, además de ser sensible al Ca^{2+} , sensible al voltaje.

Actualmente se acepta la existencia de 7 subfamilias de canales selectivos al K^+ de la familia de los rectificadores de entrada (K_{ir}) (Kubo et al 2005). Bernard Katz en 1949 ya había descrito lo que él llamó un rectificador anómalo (rectificador de entrada) en la membrana del músculo esquelético (Katz, 1949). Los canales del tipo K_{ir} tienen tres propiedades funcionales inusuales: a) se abren por hiperpolarización, b) el voltaje al que se abren depende de la $[K^+]$ extracelular y c) parte de su rectificación parece ser instantánea ocurriendo en menos de 1 ms y una fracción adicional puede desarrollarse exponencialmente con constantes de tiempo variables de milisegundos a 0.5 s (Hille 2001).

El concepto de corrientes de "pérdida" introducido por Hodgkin y Huxley en 1952 que se refiere a conductancias independientes del V_m se ha visto que son

debidas a un tipo particular de canales selectivos al K^+ con características moleculares únicas (K_{2p}). En mamíferos se describen 15 canales diferentes de este tipo (Goldstein et al 2005). Se halló que estos canales pueden estar bajo control de diferentes factores (entre ellos la temperatura) y de esa forma esos factores son capaces de alterar el V_m y la excitabilidad de las células.

Es difícil encadenar los datos provenientes de la electrofisiología con los de la biología molecular y los de expresión de canales en los tejidos nativos, sobre todo cuando son múltiples los canales que se expresan en un tejido. En el intento de hacerlo, la principal aproximación es el clonado y expresión de canales aislados en sistemas heterólogos. Este tipo de abordaje, sin embargo, no permite garantizar que los canales expresados se comporten de la misma forma en los tejidos nativos que en los heterólogos; particularmente por la diversa posibilidad de modificación de la función de los canales por los diferentes mecanismos considerados más arriba. De ahí que haya que ser cuidadoso al analizar los datos obtenidos de esta forma, tanto en lo que tiene que ver con la cinética de las corrientes y la dependencia del voltaje como con la sensibilidad a distintos bloqueantes.

En esta sección analizaremos fundamentalmente los canales de K^+ voltaje-dependientes que se sabe que se expresan en el músculo esquelético (por su relación con el OE) y en los OEs de otras especies ya que son estos tipos los que más probablemente se expresen en el OE de *Gymnotus*. Para ello elaboramos la Tabla I con información obtenida de Coetzee et al (1999), Abbott et al. (2001), Few y Zakon (2003), Thornhill et al. (2003), Gutman et al. (2005), Kubo et al. (2005) y Goldstein et al. (2005). En ella se puede ver el tipo de canal de acuerdo a la actual nomenclatura seguido de algunos datos que se conocen por la expresión de estas unidades en sistemas heterólogos. Las corrientes que se registran pueden ser del tipo rectificador retardado (RR en Tabla I), de tipo A, Ca^{2+} -dependientes, rectificadores de entrada (IR en Tabla I), etc. Además en la Tabla I se indican valores que tienen que ver con la dependencia del voltaje (" V_{50} activ.") y la cinética (τ_n y τ_h) y la sensibilidad a diferentes bloqueantes (4-AP, TEA, DTX y Ba^{2+}) a través del valor IC_{50} .

Tabla I.Canales selectivos al K⁺ que se expresan en músculo esquelético y en OE.

Canal	Corriente	V ₅₀ activ. (mV)	τ_n (ms)	τ_h (ms)	4-AP (IC ₅₀)	TEA (IC ₅₀)	DTX (IC ₅₀)	Ba ²⁺ (IC ₅₀)	Comentarios
K _v 1.1	RR	-32	5	11000	290 μ M	0.3 mM	20 nM	-	Se expresa en OE de <i>Electrophorus</i> y <i>Sternopygus</i> .
K _v 1.2	RR	5-27	6	-	590 μ M	560 mM	17 nM	-	Se expresa en OE de <i>Sternopygus</i> . No se ha determinado expresión en músculo de mamífero.
K _v 1.4	A	-22	-	47	13 μ M	>100 mM	-	-	
K _v 1.7	RR	-8	6	-	150 μ M	150 mM	-	-	
K _v 2.1	RR	12	-	-	18 mM	-	-	30 mM	
K _v 3.1	RR	16	2	630	29 μ M	0.2 mM	-	-	
K _v 3.4	A	3.4	-	15.9	-	0.3 mM	-	-	
K _v 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	
K _v 6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	
K _v 7.5	RR (M)	30	-	-	-	>30 mM	-	-	
K _v 9.3	-	-	-	-	-	-	-	-	
K _v 10.1	RR	-	-	-	-	-	-	-	
K _{Ca} 1.1	Ca ²⁺ y V dep.	-	-	-	-	0.14 mM	-	-	
K _{Ca} 2.2	Ca ²⁺ dep.	-	-	-	-	-	-	-	Bloqueada por apamina
K _{Ca} 2.3	Ca ²⁺ dep.	-	-	-	-	-	-	-	Bloqueada por apamina
K _{ir} 1.1	IR	-	-	-	-	-	-	si	Determinado en músculo por RT-PCR
K _{ir} 2.1	IR	-	-	-	-	-	-	si	IK ₁ en músculo cardíaco
K _{ir} 2.2	IR	-	-	-	-	-	-	0.5 a 2 μ M	IK ₁ en músculo cardíaco
K _{ir} 3.4	I _{GIRK}	-	-	-	si	si	-	si	Activado por proteína G. Hay poca expresión en músculo.
K _{ir} 6.2	I _{K(ATP)}	-	-	-	-	-	-	-	Sensible al ATP
K _{ir} 7.1	IR	<-130	-	-	10 mM	>10 mM	-	1 mM	Activación instantánea sin inactivación. Sensible a altas dosis de Cs ⁺ (IC ₅₀ ~30 mM)
K _{2P} 6.1	"pérdida" (?)	-	-	-	-	-	-	100 μ M	Se expresa en músculo de rata. Activación instantánea. Inactivación a voltajes depolarizantes.

De acuerdo a la revisión de Gutman et al (2005) se expresan 3 canales de la familia K_v1 en músculo esquelético de mamíferos. $K_v1.1$ es un rectificador retardado sensible a 4-AP, TEA y DTX. Este mismo tipo de canales se expresan en OE de *Electrophorus* con características similares (Thornhill et al 2003; ver Fig. I-3E). También Few y Zakon (2003) describen la expresión de este tipo de canales en el OE de *Sternopygus*. $K_v1.2$ no está descrito como un tipo de canal que se exprese en músculo esquelético de mamífero pero Few y Zakon (2003) lo encontraron en dos variantes en OE de *Sternopygus*. En mamíferos se comporta como un rectificador retardado con una activación a voltajes corridos hacia la derecha (V_{50} entre 5 y 27 mV), sensible a bajas dosis de 4-AP y DTX pero muy poco sensible a TEA ($IC_{50} = 560$ mM) (Gutman et al 2005). $K_v1.4$ se expresa en músculo esquelético y se comporta como una corriente de tipo A con una constante de tiempo de inactivación (τ_n) de 47 ms (Gutman et al 2005). Es muy sensible a 4-AP y poco sensible al TEA ($IC_{50} > 100$ mM) pero no está determinado si es sensible a la DTX según Gutman et al (2005) mientras que según Coetzee et al (1999) sí es sensible con una $IC_{50} > 500$ nM. Por último, en músculo también se expresa $K_v1.7$ que se comporta como un rectificador retardado sensible a 4-AP y poco sensible a TEA ($IC_{50} = 150$ mM) (Gutman et al 2005). Hay que recordar que todos los canales de esta familia son capaces de formar heterotetramerización, por lo que las posibilidades de variaciones de las corrientes determinadas por este tipo de canales podrán ser muy diferentes de acuerdo a la forma en que se combinen las distintas subunidades en cada célula.

El único canal de la familia K_v2 que se ha determinado en músculo esquelético es $K_v2.1$ (Gutman et al 2005). Se comporta como un rectificador retardado con una activación corrida hacia la derecha ($V_{50} = 12$ mV). Es poco sensible a 4-AP, es bloqueada por el TEA intracelular y también es sensible al Ba^{2+} en altas dosis ($EC_{50} = 30$ mM). Few y Zakon (2000) observaron la expresión de un tipo de canal de esta familia en OE de *Sternopygus*. Los canales de esta familia son capaces de formar heterotetrámeros con miembros de otras familias y ser modificadas sus propiedades por éstos. En músculo esquelético se expresan algunos tipos de estas subunidades "modificadoras" de canales ($K_v5.1$, $K_v6.1$ y $K_v9.3$) que podrían estar

aumentando la diversidad de los canales de tipo K_v2 en este tipo de células (Gutman et al 2005).

También se describe la expresión de $K_v3.1$ y $K_v3.4$ en músculo esquelético (Gutman et al 2005); estos tipos de canales transfectados en células de ovario de hámster presentan características de rectificador retardado y tipo A, respectivamente. $K_v3.1$ es sensible a bajas dosis de 4-AP y TEA y tiene una IC_{50} de 16 mV según Gutman et al (2005). $K_v3.4$ también es sensible a ambos bloqueantes de acuerdo con Coetzee et al (1999) pero no es sensible a 4-AP según Gutman et al (2005). Ambos tienen una dependencia de voltaje corrida hacia la derecha jugando un rol importante en la rápida repolarización del potencial de acción y permitiendo la descarga a alta frecuencia (Rudy & McBain, 2001). El canal $K_v3.4$ se sospecha que juega un rol importante en la forma del PA pero no en la determinación del potencial de reposo o en el aumento del umbral, debido a su activación a potenciales supraumbrales para el PA (Abbott et al 2001). Su asociación con otra proteína (MiRP2) determina que en el músculo este tipo de canales no provoque una post-hiperpolarización pero que permita al mismo tiempo la recuperación de los canales de Na^+ de su inactivación. De esta forma los canales $K_v3.4$ provocan una rápida repolarización del PA sin provocar disminuciones prolongadas de la excitabilidad (Abbott et al 2001). En experimentos con fijación dinámica de voltaje se puede ver que las corrientes de tipo K_v3 se activan durante la fase de repolarización del PA determinando su duración y se deactivan rápidamente después del mismo (Rudy y McBain 2001). Por estas razones este tipo de canales no estarían involucrados en el umbral del PA ni tampoco en la determinación del período refractario (Rudy y McBain 2001). De acuerdo con Few y Zakon (2000) también se expresan algún tipo de canales K_v3 y K_v4 en el OE de *Sternopygus*. No hay ningún canal de la familia K_v4 que se haya demostrado su expresión en músculo esquelético de mamífero.

Por último, $K_v7.3$ se expresa en músculo; se trata de un rectificador retardado de activación muy lenta con baja sensibilidad al TEA.

En músculo esquelético se expresan tres tipos de canales de K^+-Ca^{2+} -dependientes: $K_{Ca1.1}$, $K_{Ca2.2}$ y $K_{Ca2.3}$ de los cuales el primero es también voltaje-dependiente y los otros dos son bloqueados

por la apamina (Wei et al 2005). No se han descrito este tipo de canales en OE.

Se determinó la expresión de 6 tipos de unidades de canales de la familia K_{ir} . $K_{ir}1.1$ se determinó por RT-PCR pero se desconoce su rol en el músculo, se sabe que cumple roles de regulación del K^+ en el riñón (Kubo et al 2005). $K_{ir}2.1$ y $K_{ir}2.2$ son dos tipos de subunidades que se unen para formar la corriente I_{K1} de las fibras cardíacas la cual contribuye a determinar el potencial de reposo y la duración del PA en estas fibras (Kubo et al 2005). Todos estos canales son bloqueados por Ba^{2+} . $K_{ir}7.1$ es un rectificador de entrada que se activa instantáneamente a potenciales por debajo de -130 mV y que es sensible a altas dosis de 4-AP y TEA. Por otro lado tiene una IC_{50} bastante alta para el Ba^{2+} y aún mayor para el Cs^+ (1 mM y 30 mM, respectivamente) (Kubo et al 2005). Los otros canales de tipo K_{ir} que se expresan en músculo esquelético de mamíferos ($K_{ir}3.4$ y $K_{ir}6.2$) determinan corrientes que son sensibles a proteína G y a ATP, respectivamente (Kubo et al 2005).

Finalmente, se ha determinado la expresión en músculo de rata de un canal de la familia de "2 poros" ($K_{2p}6.1$) que seguramente sea responsable de la corriente de pérdida en esas células (Goldstein et al 2005). Este canal tiene la particularidad de ser sensible a Ba^{2+} (Goldstein et al 2005).

III.3.- Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Los canales de Ca^{2+} median la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la depolarización y, como consecuencia, regulan procesos intracelulares tales como la contracción, la secreción, la neurotransmisión y la expresión de genes en diferentes tipos celulares (Catterall et al 2005). Su actividad es esencial para el acople entre la actividad eléctrica en la superficie y eventos fisiológicos que ocurren dentro de las células (Catterall et al 2005). Los canales de Ca^{2+} son proteínas complejas formadas por 4 ó 5 subunidades distintas codificadas por múltiples genes (Catterall et al 2005). La subunidad α_1 es la que incluye el poro, el sensor de voltaje, el aparato de compuerta y sitios de unión para diferentes ligandos, drogas y toxinas (Catterall et al 2005). Las otras subunidades auxiliares modulan las propiedades del canal pero la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los canales de Ca^{2+} está dada por la existencia de múltiples tipos de

subunidades α_1 (Catterall et al 2005). Existen 10 tipos de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes agrupados en 3 familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 (Catterall et al 2005). Los canales de tipo Ca_v1 se corresponde con las corrientes de tipo L, de alto umbral de activación y larga duración que son bloqueadas por dihidropiridinas (Catterall et al 2005). Ca_v3 se corresponde con las corrientes de tipo T de bajo umbral y activación relativamente rápida y que no tienen bloqueantes específicos conocidos (Catterall et al 2005). Ca_v2 incluye a los canales que determinan los demás tipos diferentes de corrientes (N, P/Q, R, etc.) que son bloqueadas por toxinas polipeptídicas (Catterall et al 2005).

En el músculo esquelético se expresan principalmente los canales de tipo $Ca_v1.1$ (Catterall et al 2005). Estos canales también conocidos como receptores de dihidropiridina se encuentran en los túbulos de las fibras musculares y son fundamentales en el acoplamiento excitación-contracción (Flucher y Franzini-Armstrong 1996). Su activación por la depolarización de los túbulos constituye el primer paso que lleva a la liberación del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Flucher y Franzini-Armstrong 1996). Si bien los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L son muy importantes para la fisiología del músculo, no se han descrito corrientes de calcio en electrocitos de *Gymnotiformes*.

En *Gymnotus* existen evidencias farmacológicas indirectas de que los canales de calcio no participarían en forma importante en la determinación del PA (Sierra et al., 1995). En este trabajo nuestro se demuestra que los canales presinápticos de Ca^{2+} son del tipo N. Se usaron varios bloqueantes específicos de canales de Ca^{2+} para estudiar el efecto sobre la transmisión sináptica neuroelectrocítica. Las toxinas de la araña *Agelenopsis aperta* "funnel spider toxin" (FTX) y ω -Agatoxina (ω -Aga-IVA) así como la ω -Conotoxina (ω -CgTX) y la nifedipina no fueron capaces de alterar en forma notoria la respuesta directa de los electrocitos caudales de *Gymnotus* a pulsos depolarizantes (Fig. III-1). Es claro que la nifedipina, que es bloqueante específico de los canales de tipo L, que son los que se expresan en el músculo esquelético, no afecta al PA generado directamente por inyección de corriente depolarizante en los electrocitos

caudales de *Gymnotus* (Fig. III-1A, NIFEDIPINA).

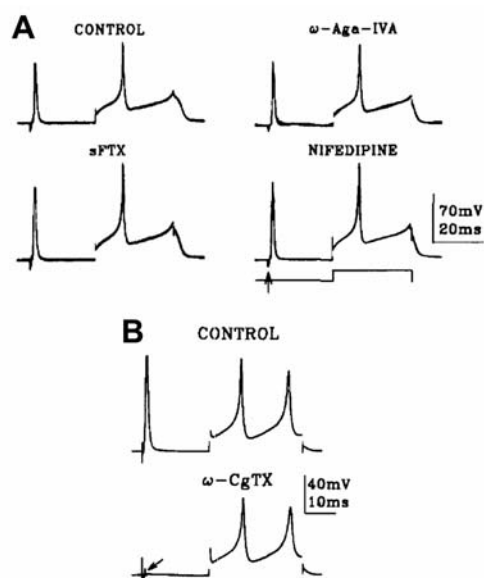


Figura III-1. Efecto de bloqueantes de canales de Ca^{2+} sobre electrocitos de *Gymnotus*. Diferentes bloqueantes de canales de Ca^{2+} no afectaron la respuesta directa de los electrocitos a la depolarización. **A)** FTX, ω -agatoxina y nifedipina no provocaron efectos ni sobre la transmisión sináptica ni sobre la respuesta a la depolarización del electrocito. **B)** La aplicación de ω -conotoxina en el medio extracelular produce un bloqueo total de la transmisión sináptica y sin embargo no altera la respuesta de PAs del electrocito registrado. (Modificada de Sierra et al., 1995)

III.4.- Canales de Cl^- voltaje-dependientes.

Los canales de Cl^- que se expresan en la membrana plasmática pueden ser importantes en la regulación de la homeostasis iónica y el volumen celulares, el transporte transepitelial y la excitabilidad. Se describen nueve tipos de canales de Cl^- (CLC) en los mamíferos (Jentsch et al 2002). La

familia de CLC se divide en 3 grupos de los cuales el primero, que incluye a CLC-1 (que se expresa casi exclusivamente en músculo esquelético) y CLC-2, está representado por canales que se expresan en la membrana plasmática (Jentsch et al 2002). El canal de tipo CLC-1 contribuye en un 70-80% de la conductancia de membrana en reposo del músculo esquelético, otorgándole su estabilidad eléctrica (Jentsch et al 2002). Expresado en sistemas heterólogos CLC-1 se activa por depolarización y presenta una rectificación de entrada cerrándose con potenciales positivos (Jentsch et al 2002). El canal CLC-2 se expresa en forma ubicua y se trata de un canal de Cl^- que se abre por hiperpolarización y otro tipo de estímulos (Jentsch et al 2002). Se activa lentamente por hiperpolarización y no satura su activación a -180 mV y su voltaje de activación varía dependiendo del sistema en que se exprese (Jentsch et al 2002). Se bloquea en forma inespecífica con Cd^{2+} . Estos dos canales presentes en mamíferos pertenecen al mismo grupo que el CLC-0, descrito en el OE de *Torpedo* (Jentsch et al 2002). Como ya vimos este canal le otorga una alta conductancia en reposo a los electrocitos de *Torpedo* facilitando la circulación de corriente a través de la cara no innervada. Si bien en *Sternopygus* no se ha registrado la presencia de corrientes de Cl^- , la eliminación del Cl^- extracelular en el preparado de OE permite reducir la conductancia de membrana y facilitar de esa manera la fijación de voltaje (Ferrari & Zakon, 1993); lo que constituye una evidencia indirecta de la presencia de este tipo de canales en Gymnotiformes.

Capítulo IV. Hipótesis y objetivos.

Los datos dispersos obtenidos a partir de los trabajos de Bennett y Grundfest (1959; 1966) y de trabajos nuestros anteriores (Sierra 1991; Sierra et al 1995) sugieren que las corrientes iónicas voltaje-dependientes descritas en otras especies no son suficientes para explicar el perfil electrofisiológico de los electrocitos de *Gymnotus*.

Nuestra hipótesis es que los electrocitos de *Gymnotus* contienen un repertorio de corrientes iónicas más amplio que el que se describe para otras especies.

El objetivo general de este trabajo fue completar la descripción de las propiedades electrofisiológicas de los elementos que componen el OE de *Gymnotus*. La descripción completa del sistema electromotor, de la especie cuyo sistema electromotor es el mejor estudiado entre los peces eléctricos (Albert y Crampton 2005), nos brinda una herramienta para estudiar los mecanismos que expliquen los cambios que se producen en la DOE de los Gymnotiformes cuando son sometidos a diferentes variables ambientales o fisiológicas. Este trabajo, entonces, intenta ser un paso esencial que abra el camino al estudio de los mecanismos celulares responsables del efecto de la temperatura (a corto y a largo plazo), de las hormonas (en particular aquellas que regulan la reproducción en estos peces) y de otros factores ambientales y comportamentales que afectan al sistema de electrorrecepción activa.

A priori no habría razones para suponer que una célula cuya función es la de generar un PA simple cada vez que recibe una entrada sináptica necesita una complejidad mayor que la descrita para las otras especies. De hecho son los experimentos en los que se usan pulsos depolarizantes de larga duración los que nos hacen pensar que algo más complejo ocurre en la membrana de estas células. Por otro lado el análisis de la DOE de esta especie muestra que se requieren fenómenos a nivel de los electrocitos que ocurran con mayor velocidad. El hecho de que la DOE presente varias fases de diferente polaridad implica, además, que estos fenómenos rápidos (la activación sucesiva de las caras opuestas) no ocurran simultáneamente para que no se

cancele mutuamente la circulación de corriente generada por cada cara activa.

Otro aspecto de la fisiología del OE es que éste obtiene su mayor eficiencia permitiendo la circulación de la mayor intensidad de corriente en sentido longitudinal y para eso es conveniente que las resistencias ubicadas en serie a lo largo del mismo no sean muy altas. Al mismo tiempo las membranas que se "abren" a esa circulación longitudinal son aquellas que deben activarse para la generación de las corrientes.

Probablemente eso es lo que hace que se observe en este tipo de células, al menos en varias especies, una alta conductancia de reposo. Esta alta conductancia de reposo estaría atentando contra la eficacia de estas células para depolarizarse ante la entrada sináptica o ante la circulación pasiva de corrientes generadas en otras caras. Esto es necesario para que se alcance el nivel de V_m que permita la activación de las corrientes depolarizantes que determinan la fase de ascenso del PA. Debiera, entonces, haber mecanismos muy precisos que hagan que estas membranas sean eléctricamente "transparentes" para determinados valores de V_m , pero que en otras circunstancias permitan que se produzcan cambios importantes en su V_m .

No parece fácil tampoco comprender como se logra un equilibrio en este sistema cuando las caras responsables de la actividad eléctrica están ubicadas en forma opuesta. Eso implica que cuando la circulación de altas corrientes en el OE se hace en un sentido unas caras están sometidas a corrientes depolarizantes mientras que las otras lo están siendo a corrientes hiperpolarizantes. ¿Cómo será el V_m de la célula en esas condiciones? Los registros de electrocitos *in vivo* bajo la influencia de su control neural natural no han mostrado cosas que se aparten de lo normal en otras células excitables (Lorenzo et al 1988; Macadar et al 1989), sin embargo el acceso al interior de esas células implica que se está alterando las condiciones eléctricas del OE al eliminar los tejidos que lo rodean y que podrían jugar un rol muy importante en "canalizar" las corrientes sin pérdidas laterales.

Un primer paso es determinar cuáles son las corrientes iónicas voltaje-dependientes presentes en la membrana de estas células y determinar las cinéticas y cómo es esa dependencia al voltaje. Ese fue el principal objetivo de este trabajo. Esta caracterización nos permitirá discutir un modelo, en esta instancia cualitativo, que sea compatible con las características que suponemos debe tener el sistema.

Nos propusimos los siguientes objetivos específicos referentes a las propiedades del OE de *Gymnotus*.

1. Buscar diferentes tipos de corrientes iónicas con técnicas de fijación de corriente y de voltaje con estrategias clásicas, electrofisiológicas y farmacológicas, para aislarlas. Caracterizar estas corrientes desde el punto de vista de su dependencia del voltaje y de sus cinéticas y ver como participan en y determinan las respuestas de los electrocitos.

2. Partiendo de la base de que los electrocitos tienen una muy baja resistencia de membrana en reposo buscar si existe algún mecanismo que asegure o "facilite" la depolarización. Debemos analizar si existe algún tipo de conductancia que "amplifique" la depolarización cuando ésta es iniciada a partir de la entrada sináptica o de otra fuente de corriente depolarizante. Si bien la cantidad de neurotransmisor liberado por parte de las terminales de las electromotoneuronas parece ser suficiente para provocar potenciales sinápticos que alcanzan el nivel de disparo de los electrocitos, no debe descartarse la posibilidad de que los potenciales sinápticos sean "ayudados" por la activación de alguna corriente de entrada de bajo umbral o por el cierre de un rectificador de entrada abierto en el reposo.

3. Buscar si existen mecanismos que determinen que los fenómenos en cada membrana ocurran en tiempos especialmente breves permitiendo que la corriente neta que circula en el OE se haga en los tiempos correctos sin bloquearse mutuamente.

4. Trataremos de ver si los mecanismos encontrados presentan alguna distribución particular en la membrana de estas células.

5. Analizaremos si las corrientes que circulan en el OE son capaces, al menos cualitativamente, de favorecer a los

mecanismos de sincronización periféricos. Es interesante la cuestión de si los electrocitos funcionan como unidades independientes que suman sus efectos o si hay efectos de campo en los caudales la actividad de un electrocito pueda estar influyendo sobre la de los electrocitos vecinos. A su vez esta influencia debe hacerse en la forma adecuada para que contribuya con la sincronización de la descarga de electrocitos que ocurre durante la DOE. No hay que descartar que la liberación de neurotransmisor, además de producirse por la llegada de PAs generados en la médula espinal, sea facilitada por efecto de las corrientes de acción generadas por los electrocitos vecinos actuando sobre los botones sinápticos mismos. No debemos olvidarnos que los tejidos no electromotores que forman parte del OE, o que lo rodean, también pueden formar parte del sistema electrogénico (Caputi et al 2005).

6. Discutiremos un modelo cualitativo del funcionamiento del OE basándonos en los datos obtenidos.

7. Finalmente, discutiremos si algunos de los mecanismos iónicos, ensamblados en ese modelo primario pueden ser el blanco de los efectos ya descritos por otros autores sobre la DOE; lo que nos pondrá en camino al siguiente paso en nuestra investigación.

Como parte de la hipótesis hay que considerar que los tipos de corrientes que uno espera encontrar en los electrocitos, además de tener alguna relación con las ya descritas para otras especies de Gymnotiformes, deben ser parte de un repertorio de corrientes que pueden estar también presentes en las fibras de músculo esquelético o en las células precursoras de éstas en el desarrollo. Usando un repertorio de canales que se expresan en fibras musculares estas células deben expresar unas corrientes que permitan explicar las características propias y específicas que contribuyan a la generación de la DOE propia. Porque, como ya vimos, los distintos tipos de canales tienen un cierto perfil de expresión y no es aleatorio ni inespecífico el sitio de expresión de los canales.

Los datos obtenidos de este estudio podrán ser usados, entonces, para realizar un modelo realista del funcionamiento de los electrocitos como unidad y del OE como un todo.

Capítulo V. Métodos: El preparado de OE aislado de *Gymnotus*.

Los peces usados en este trabajo, del género *Gymnotus* (de 10 a 15 cm) fueron colectados en la Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay y se colocaron luego en acuarios individuales en una habitación con temperatura controlada (20-21°C). Bajo anestesia por inmersión en agua a 4°C se inmovilizó a los animales y se les cortó con un bisturí 1.5-2.0 cm del extremo caudal del pez. Bajo Ringer Control (ver más abajo) se disecó el OE mediante la remoción de la piel, la columna vertebral y los músculos. El OE aislado se clavó en una cámara de registro de unos 2 ml cuyo fondo contenía Sylgard en la cual se colocaron diferentes soluciones de Ringer (ver más abajo, Tabla II) a temperatura ambiente (22-24°C). Después de la cirugía, y una vez recuperados de la anestesia, los peces retornaron a sus acuarios y las porciones caudales eventualmente regeneraron. Los peces con colas regeneradas nunca fueron usados nuevamente en estos experimentos. Los experimentos están de acuerdo con la guía de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento.

Los electrocitos fueron empalados con dos micropipetas llenadas con KCl 3 M ($< 10 \text{ M}\Omega$) y se conectaron a un amplificador Axoclamp-2B. Las ganancias de las cabezas del amplificador fueron $\times 1$ y $\times 10$ para los electrodos de voltaje y corriente, respectivamente. Los electrodos fueron aislados uno del otro con un blindaje conectado a tierra. La tierra del baño fue un alambre de plata clorada que se insertó en un puente de agar al 3% conteniendo KCl 3M. Las respuestas eléctricas, los comandos de voltaje y los pulsos de corriente fueron continuamente monitorizados en un osciloscopio digital.

Se hicieron registros de fijación de corriente partiendo del potencial de membrana (V_m) en reposo y se pasaron pulsos depolarizantes e hiperpolarizantes de corriente de hasta 1000 nA. Cuando los pulsos de corriente de 800 nA no fueron suficientes para provocar un PA en condiciones control los electrocitos se

descartaron. En algunos experimentos se aplicaron pulsos breves y de baja intensidad (25 ms, 50 nA) durante las respuestas provocadas por pulsos depolarizantes grandes para calcular la resistencia de entrada (R_{in}) de las células durante esas respuestas. En otros experimentos se provocaron PSPs por estimulación eléctrica del nervio electromotor posterior (NEP) (Trujillo-Cenóz y Echagüe 1989) a través de un electrodo de succión.

Se obtuvieron registros de fijación de voltaje con dos electrodos a -80 mV de potencial de mantenimiento (V_h) y se realizaron comandos de voltaje depolarizantes crecientes (desde -70 a 80 mV). Para aislar las corrientes "no inactivantes" se pasaron comandos de voltaje depolarizante de 350 ms a -40 mV (prepulsos) que inactivaron la corriente transitoria de Na^+ antes de otro comando de 350 ms con valores variables desde -80 a 70 mV. Las corrientes medidas al final de estos segundos pulsos se midieron y se usaron para construir las relaciones corriente-voltaje (I-V). También se usaron rampas de voltaje lentamente creciente (se tomaba 7.4 s para ir desde -80 a 70 mV) como comando de voltaje para inactivar la corriente transitoria de Na^+ y activar aisladamente los componentes persistentes.

En los comandos de voltaje utilizados para obtener los datos utilizados el tiempo requerido para alcanzar el valor estable fue de < 0.5 ms y no hubieron variaciones del voltaje durante el tiempo total del pulso. Los registros que no cumplieran con estos requisitos eran descartados para el análisis cuantitativo de los datos. Sólo se consiguió un control del voltaje aceptable en los electrocitos pequeños (no mayores de $250 \mu\text{m}$ de lado). En *Gymnotus* los electrocitos caudales son células cuboides o cilíndricas con unas dimensiones promedio de $200 \times 200 \mu\text{m}$. Asumiendo una célula cilíndrica con un diámetro de $200 \mu\text{m}$ y una longitud también de $200 \mu\text{m}$ con una resistividad de membrana de $37.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (basada en el valor promedio de R_{in}) y una resistividad axial de $25 \Omega \cdot \text{cm}$ (basado en las medidas del axón gigante de calamar hechas por Cole en 1975) se estimó una constante de espacio de 870

TABLA II.
Principales soluciones utilizadas

	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	HEPES	Colina-Cl	CsCl	TEA	4-AP	NaMS	K-acetato
CONTROL	130	5	4.5	1.5	10	--	--	--	--		
SLKCa	130	--	--	6	10	--	5	25	1		
SLNaCa	--	5	--	6	10	130	--	--	--		
SLKNaCa	--	--	--	6	10	130	5	25	1		
S8 % Cl	--	--	4.5	1.5	10	--	--	--	--	130	5

μm . Ya que el electrodo de inyección de corriente se coloca cerca del centro del electrocito la distancia máxima a las membranas activas fue de unas 100 μm ; la caída estimada del voltaje de comando en esas distancias debería ser solamente del 11%. Si usáramos un valor de resistividad axial mayor, como es de esperar que tenga un animal de agua dulce, por ejemplo 250 $\Omega\cdot\text{cm}$ que es el valor que usan Doiron et al (2001) para realizar cálculos en un pez eléctrico, la estimación de la constante de espacio nos daría una caída del potencial aún menor. Por otro lado, el cálculo realizado fue considerando nuestro cilindro como infinito, en un cilindro finito la caída de potencial en función de la distancia es aún menor (Rall 1959). De todas maneras, en estas condiciones nuestros bordes se encuentran en un valor mucho menor a los de la constante de espacio donde la disminución respecto a un cilindro infinito no es muy diferente. Sin embargo no se deben descartar errores en la fijación espacial del voltaje ya que las estimaciones no toman en cuenta que la membrana de los electrocitos no es homogénea y que las conductancias voltaje-dependientes no se encuentran distribuidas uniformemente sobre esa membrana haciendo, entonces, difícil la estimación de los errores en la fijación de voltaje. Además, aunque comparado con otros electrocitos los de *Gymnotus* tienen pocas invaginaciones que resultan en poco aumento de la superficie (Schwartz et al 1975), las resistencias en serie externas e internas presentes pueden introducir también errores en el voltaje. Por lo tanto, las conclusiones obtenidas a partir de los datos cualitativos de este trabajo pueden considerarse claras e informativas. Debe tenerse cuidado a la hora de considerar los datos cuantitativos surgidos de las medidas de corriente de membrana.

Registros de fijación de voltaje con dos electrodos en solución control fueron imposibles dado el pobre control de voltaje

causado por las grandes conductancias de membrana en reposo. Control de voltaje suficiente se consiguió en SLKCa. Sin embargo, aún en esas condiciones más favorables la presencia de no linealidades a diferentes voltajes no nos permitió realizar el clásico protocolo de substracción de las corrientes lineales de pérdida y capacitivas requerido para aislar las corrientes voltaje-dependientes. Por lo tanto se presentan datos de experimentos hechos en SLKCa y sin la substracción de las corrientes de pérdida.

En algunos experimentos de fijación de voltaje ($n=2$) el NaCl fue sustituido por metansulfato de sodio para eliminar las conductancias de Cl^- y ver si mejoraba el control de voltaje pero, a diferencia de lo observado por Ferrari y Zakon (1993), no se notaron diferencias de las respuestas obtenidas en estas condiciones respecto a las obtenidas con NaCl; por lo tanto no se utilizó esta sustitución para los experimentos de fijación de voltaje.

Para aislar los distintos tipos de conductancias se utilizaron diferentes soluciones en la cámara de registro. Se usó una solución Control que es una solución basada originalmente en el Ringer *Electrophorus* usado por Bennett y Grundfest (1959). Sin embargo esa solución era hiperosmótica y provocaba un deterioro temprano del preparado *in vitro*. Sobre esa solución Control se hicieron modificaciones para trabajar con las conductancias de Na^+ por un lado y con las conductancias de K^+ por el otro (Tabla II). En el primer caso se usó una solución libre de K^+ y Ca^{2+} (SLKCa). Esa solución originalmente contuvo 3 mM de CsCl, para facilitar la preparación decidimos sustituir todo el KCl por CsCl y usamos, por lo tanto, CsCl 5 mM en sustitución del KCl. Para aislar las de K^+ se usó la solución libre de Na^+ y Ca^{2+} (SLNaCa). En algunos experimentos se usó una solución libre de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (SLKNaCa). Las toxinas (TTX y DTX) fueron agregadas a estas distintas soluciones a

diferentes concentraciones que se especifican en cada caso, en los capítulos de resultados. El Ba^{2+} y el Cd^{2+} también fueron agregados a las distintas soluciones.

En el mismo preparado de OE aislado se agregó una tercera pipeta llena con NaCl 3 M colocada en un micromanipulador hidráulico de tres ejes ortogonales. Este electrodo fue conectado a un amplificador AC registrándose el voltaje respecto a un electrodo de referencia alejado del preparado. Se diseñó una grilla de puntos separados $50\text{ }\mu\text{m}$ de distancia a partir del centro

aproximado del electrocito estimulado (por electrodos intracelulares o por estímulo del nervio), registrando $500\text{ }\mu\text{m}$ hacia delante, $500\text{ }\mu\text{m}$ hacia atrás y $250\text{ }\mu\text{m}$ hacia un lado obteniendo 100 puntos de medida de voltaje en el espacio que rodea al electrocito.

Los datos se colectaron, digitizaron y fueron analizados con el paquete de software pCLAMP 5. En los capítulos de resultados los datos se expresan como la media $\pm$ el desvío standard.

Capítulo VI. Las conductancias dependientes de Na^+ en los electrocitos.

Nothing produces such odd results as trying to get even. -Franklin P. Jones (1853-1935)

VI.1.- Características generales de la electrofisiología de los electrocitos.

El V_m promedio de los electrocitos fue de -80.1 ± 13.0 mV ($n=85$). Este valor es algo mayor al descrito para *Sternopygus* (Mills y Zakon, 1991) y un poco menor que el que describían en *Gymnotus in vivo* Bennett y Grundfest (1959) usando Ringer *Electrophorus*.

La R_{in} promedio calculada a partir del ajuste de las relaciones V-I obtenidas con pulsos hiperpolarizantes fue de 65.4 ± 54.0 k Ω ($n=29$). Como vimos en el capítulo anterior si tomamos un electrocito cilíndrico con un diámetro de 200 μm y una longitud de 200 μm la resistividad de la membrana sería de 37.7 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Este valor está un orden de magnitud por encima del estimado para *Electrophorus* (Altamirano, 1955) y un orden de magnitud por debajo del estimado por Ferrari y Zakon (1993) en *Sternopygus*. Estos valores de resistencia de membrana están de todas formas entre los de rango más bajo de las membranas biológicas ($10\text{-}10^6$ $\Omega \cdot \text{cm}^2$; Hille, 2001).

Un hecho distintivo de los electrocitos de *Gymnotus* fue la descarga repetitiva provocada por pulsos depolarizantes prolongados (125 ms) de corriente (Fig. VI-1A). Los pulsos apenas supraumbrales provocaron descargas repetitivas con poca caída de la amplitud de los PAs (Fig. VI-1A; 400 nA), mientras que los pulsos de mayor intensidad generaron PAs con amplitudes decrecientes con un perfil de oscilación atenuada seguida de una depolarización sostenida que duraba todo lo que duraba el pulso depolarizante (Fig. VI-1A; 500 y 550 nA). El número y amplitud de los PAs disminuyó con la intensidad de la corriente (Fig. VI-1A). Sin embargo la amplitud pico del PA inicial no cambió con la intensidad del pulso (90.1 ± 15.1 mV; $n=30$).

Estos resultados de fijación de corriente *in vitro* confirman la descarga repetitiva de los electrocitos de *Gymnotus* descrita *in vivo* por Bennett y Grundfest

(1959). Sin embargo contrastan con la electrofisiología de los electrocitos de especies de Gymnotiformes relacionadas como *Electrophorus electricus* y *Sternopygus macrurus* que disparan un único PA cuando son depolarizados (Nakamura et al. 1965; Ferrari y Zakon 1993). Sin embargo, McAnelly et al (2003) describen una conducta similar en electrocitos de *Sternopygus* después del tratamiento con AMPc.

La descarga repetitiva requiere de la activación de suficiente corriente de salida que repolarice al electrocito, remueva la inactivación de la corriente transitoria de Na^+ y como resultado deberá haber suficientes canales de Na^+ disponibles (deinactivados) para generar el siguiente PA. Estos resultados sugieren que, en condiciones control, hay corrientes de K^+ voltaje-dependientes que efectivamente repolarizan al electrocito, deinactivan la corriente transitoria de Na^+ y así permiten la activación subsiguiente y la descarga repetitiva.

Con pulsos de corriente mayores se observó una disminución gradual de los picos de depolarización y repolarización de los PAs determinando oscilaciones atenuadas. El perfil de repolarización complejo y gradual (conectado por líneas grises en la Fig. VI-1A; 500 y 550 nA) termina en una depolarización persistente que sugiere la activación de un plateau. Hubo sólo variaciones menores en el valor del V_m al final de este plateau independientemente de la intensidad del pulso. En promedio el valor alcanzado por el plateau en solución Control fue de -56.8 ± 10.2 mV ($n=30$). La activación del plateau puede explicar la disminución de la amplitud de las espigas causada por la inactivación voltaje-dependiente de la conductancia de Na^+ transitoria que media los PAs. La inactivación de la corriente transitoria disminuiría la amplitud pico del PA llevando a una reducida activación de las corrientes de K^+ voltaje-dependientes. En estas condiciones se produce una respuesta oscilatoria atenuada. Esta oscilación termina en un plateau cuando la corriente de Na^+ transitoria se inactiva

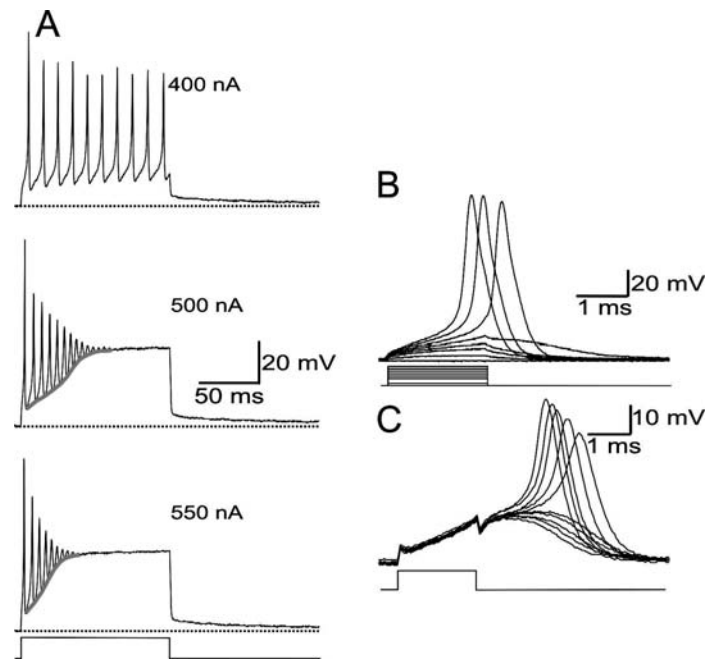


Figura VI-1. Potenciales de acción. A) Descarga repetitiva provocada por pulsos de corriente depolarizantes de intensidades crecientes de 400, 500 y 550 nA. La forma del pulso de estimulación se muestra abajo como en las otras figuras. Las repolarizaciones pico están unidas por líneas grises continuas en los registros marcados con 500 y 550 nA. B) Respuestas provocadas por pulsos depolarizantes de 2.5 ms de intensidad creciente. C) Diferentes respuestas provocadas por pulsos de la misma intensidad umbral (2.5 ms; 750 nA).

totalmente y la corriente de salida de K^+ es insuficiente para repolarizar el electrocito. Una vez que se alcanza el umbral para el plateau la amplitud está solo levemente modificada por mayores aumentos en la intensidad de la estimulación porque se ha alcanzado un máximo en la activación de la una eventual corriente persistente.

Pulsos de corriente breves (2 ms) de diferentes intensidades provocaron una variedad de respuestas (Fig. VI-1B). Los pulsos de baja intensidad indujeron respuestas del tipo pasivo similares a las de un circuito RC. Los pulsos de mayor intensidad provocaron respuestas que decaían más lentamente y que podrían no ajustarse a una exponencial simple. Por encima de un umbral de depolarización se provocaron PAs (Fig. VI-1B). Pulsos de corriente idénticos en el valor umbral de intensidad dispararon dos tipos de respuestas "activas": a) depolarizaciones lentas y pequeñas, probablemente de tipo electroónicas, y b) PAs (Fig. VI-1C). La duración y amplitud de ambos tipos de respuestas fue variable. Además se encontró una relación inversa entre la amplitud pico y la duración del PA (Fig. VI-1C). El posible rol de las corrientes de K^+ será tratado en el capítulo siguiente. Sin embargo podemos adelantar aquí que la importancia de las conductancias

de K^+ fue revelada por el hallazgo de que los pulsos de corriente breves y de baja intensidad provocaron PAs de diferente amplitud, la cual a su vez estaba negativamente correlacionada con la DPA sugiriendo que hay una corriente de salida de K^+ voltaje-dependiente controlando la repolarización y la DPA.

La estimulación sináptica provocó diferentes respuestas intracelulares (Fig. VI-2, trazos superiores): a) PSPs pequeños, b) PSPs que podían ser seguidos por respuestas más lentas de diferentes amplitudes y duraciones y c) PSPs seguidos de PAs. El registro extracelular simultáneo cercano a la cara rostral del electrocito (Fig. VI-2, trazos inferiores) muestra que estos diferentes tipos de respuestas tienen diferentes consecuencias en el voltaje generado fuera. Si las negatividades representan respuestas activas sobre la cara que se registra podemos ver que ocurren fenómenos activos en los casos de la Fig. VI-2 B, C y D. En el caso D corresponde a la activación de un PA que se ha generado antes en la cara caudal y ha saltado a la cara rostral. Sin embargo en B y C no hay PA y se observan fenómenos activos sobre esa membrana. En todos los casos los PSPs son los fenómenos que primero se observan y que siempre se ven como una positividad, es decir que se están generando

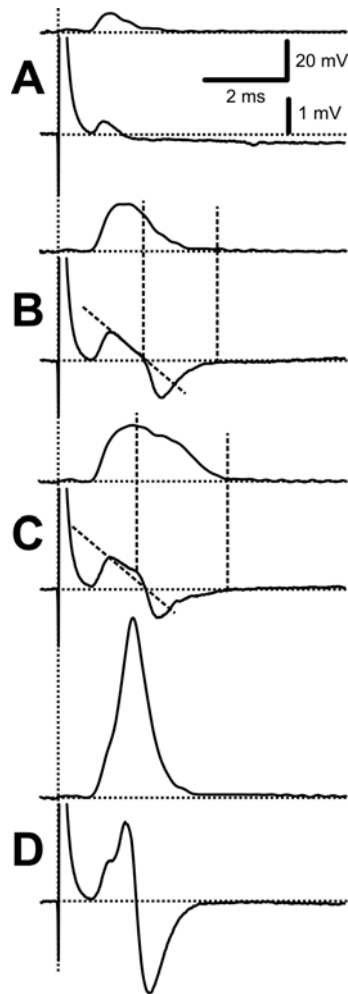


Figura VI-2. Respuestas a la estimulación sináptica. Se muestra el potencial de membrana registrado con un electrodo intracelular (arriba) y los registros extracelulares simultáneos con un electrodo ubicado cercano a la cara rostral de un electrocito. Todas las respuestas fueron provocadas por una estimulación del NEP de la misma intensidad. **A)** Un PSP se registra como una respuesta monofásica de polaridad positividad en la cara anterior. **B)** Un PSP de mayor amplitud y duración provoca una respuesta bifásica con una notoria negatividad registrada en la cara rostral lo que estaría indicando algún tipo de respuesta activa en esa cara. Las líneas punteadas verticales indican el inicio y el final de la negatividad en el registro extracelular. La línea en diagonal se indica la pendiente del descenso de la corriente después del pico de la corriente positiva. **C)** Lo mismo que en B pero se observa que la fase de repolarización del PSP tiene una forma compleja. Las líneas verticales señalan lo mismo que en B. Aquí se puede ver que la negatividad registrada en la cara rostral se corresponde con los componentes más tardíos dado que se corresponde con la duración final del PSP. El inicio de la negatividad no parece corresponderse, sin embargo, con el inicio de las respuestas activas que se ven el PSP. Aquí se puede ver que la pendiente de descenso de la corriente positiva es menor que en B lo que podría estar indicando que también hay respuestas activas en la cara caudal. **D)** Estimulo supraumbral que genera un PA. El registro extracelular muestra una primera onda positiva que representa el PSP sobre la que se monta la generación del PA en la cara caudal y luego la negatividad debida a la activación de la cara rostral.

en la cara caudal, como es de esperarse teniendo en cuenta la innervación descrita. En este caso se puede pensar que montados sobre los PSPs hay respuestas activas, de bajo umbral que se están generando tanto en las caras caudales (ver cambio de pendiente en el descenso de la positividad en Fig. VI-2 B y C) como en las caras rostrales (negatividad en Fig. VI-2 B y C). Parece ser, por lo menos en el caso del electrocito del ejemplo, que luego del PSP, que estaría representado por las fases de ascenso iniciales en los registros intra- y extracelulares, ocurren respuestas activas en ambas membranas, las más tempranas en las caras caudales innervadas y las más tardías en las caras rostrales. Es posible que este tipo de respuestas contribuyan a "amplificar" el efecto depolarizante de los PSPs y en algunos casos lo puedan estar haciendo incluso sobre las caras opuestas al sitio de generación del PSP.

VI.2.- El bloqueo de conductancias de K^+ pone de manifiesto la presencia de dos tipos de potenciales plateau.

Para investigar la contribución de conductancias de Na^+ voltaje-dependientes en las respuestas provocadas por depolarización se usó una solución en la cual el Ca^{2+} fue sustituido por Mg^{2+} o Co^{2+} y el K^+ fue sustituido con Cs^+ . Además se agregaron en la solución de la cámara de registro los bloqueantes de canales de K^+ 4-AP (1 mM) y TEA (25 mM) a la que llamamos "Solución Libre de K^+ y Ca^{2+} " (SLKCa; Tabla II). En estas condiciones los pulsos depolarizantes provocaron potenciales plateau con un curso y perfil temporales que recuerdan la depolarización máxima observada durante las oscilaciones atenuadas que se observan en condiciones control (compare la línea gris de la Fig. VI-3A con el plateau de la Fig. VI-3B en el mismo electrocito). La intensidad del pulso fue reducida para que coincidieran aproximadamente la amplitud del plateau en la SLKCa y la amplitud en el Ringer control. La necesidad de reducir la intensidad del pulso indica que la R_{in} aumentó en la SLKCa (ver más abajo). En esas condiciones el V_m fue de -92.4 ± 11.2 mV ($n=21$). Se reveló la presencia de una rectificación de entrada por la asimetría en la respuesta a pulsos depolarizantes e hiperpolarizantes de

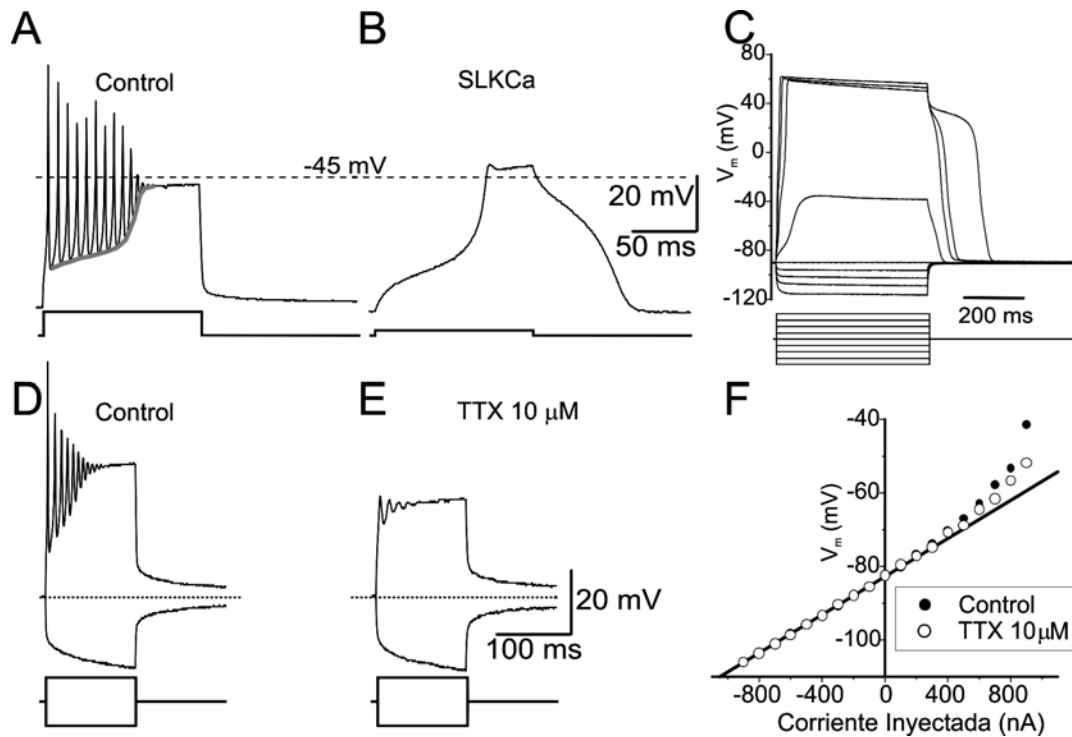


Figura VI-3. Potenciales plateau. **A)** Respuesta provocada por un pulso depolarizante de 125 ms y 550 nA. Las repolarizaciones pico están conectadas por una línea gris continua. **B)** Respuesta provocada en el mismo electrocito en SLKCa; la intensidad del pulso es de 50 nA para ajustar la amplitud del plateau a la respuesta en A. Nótese que el perfil de la respuesta se ajusta a la línea continua de la respuesta de A. **C)** Serie de respuestas provocadas por pulso hiper- y depolarizantes en SLKCa. Nótese la rectificación de entrada y los L- y H-plateaus. **D)** Respuestas provocadas por pulsos hiper- y depolarizantes de la misma intensidad en solución Control. **E)** Lo mismo que en D pero en presencia de 10 μM de TTX. Nótese que los PAs y los plateaus fueron reducidos pero, como era de esperarse, la respuesta a la hiperpolarización no fue afectada por la TTX. **F)** Relaciones V-I de experimentos como los de D y E; los valores de voltaje fueron medidos al final de los pulsos. La TTX redujo marcadamente la rectificación. El ajuste lineal fue calculado con las respuestas hiperpolarizantes en solución Control.

intensidad idénticas en la SLKCa (Fig. VI-3C). Los pulsos hiperpolarizantes provocaron trayectorias del V_m con inicio y final exponenciales indicando una conducta de membrana de circuito RC (Fig. VI-3C). La pendiente de la relación V-I lineal obtenida con pulsos hiperpolarizantes mostró una R_m de $95.4 \pm 43.7 \text{ k}\Omega$ ($n=22$). Este valor es mayor al calculado en condiciones control (ver más arriba), indicando la contribución importante de conductancias mediadas por K^+ en la conducta pasiva normal de membrana (ver Capítulo VII). Altas concentraciones de TTX (10 μM) indujeron una reducción en la amplitud tanto de los PAs como de las respuestas plateau sin modificar las respuestas provocadas por hiperpolarización (Fig. VI-3D, E). La rectificación fue reducida pero no totalmente abolida por efecto de la TTX (Fig. VI-3F). Estos resultados sugieren la presencia de conductancias de Na^+ con componentes sensibles y componentes no sensibles a TTX. Estos resultados se discuten en la sección VI.3.

Los pulsos depolarizantes de baja intensidad pueden provocar respuestas pasivas lineales (Fig. VI-4A; 50 nA). Sin embargo, por encima de un umbral de intensidad los pulsos depolarizantes provocaron respuestas que alcanzaban el plateau a través de trayectorias tipo sigmoideo (Fig. VI-4A; 100 nA). Se pueden provocar una variedad de respuestas duraderas usando, tanto pulsos depolarizantes largos (Fig. VI-4A) como cortos (Fig. VI-4B). En particular las respuestas plateau exhiben dos rangos diferentes de amplitud dependiendo de la intensidad de los pulsos (Fig. VI-4A, B). Hay un plateau de bajo umbral y baja amplitud (L-plateau) y un plateau de alto umbral y alta amplitud (H-plateau) que alcanza valores de V_m positivos y que puede durar incluso varios cientos de milisegundos, más allá de la duración del pulso de estimulación (p. ej. >1 s cuando se aplicó un pulso de 10 ms; Fig. VI-4C). El L-plateau alcanza un V_m promedio de $-35.97 \pm 8.39 \text{ mV}$ ($n=12$) mientras que el H-plateau alcanza un V_m promedio de

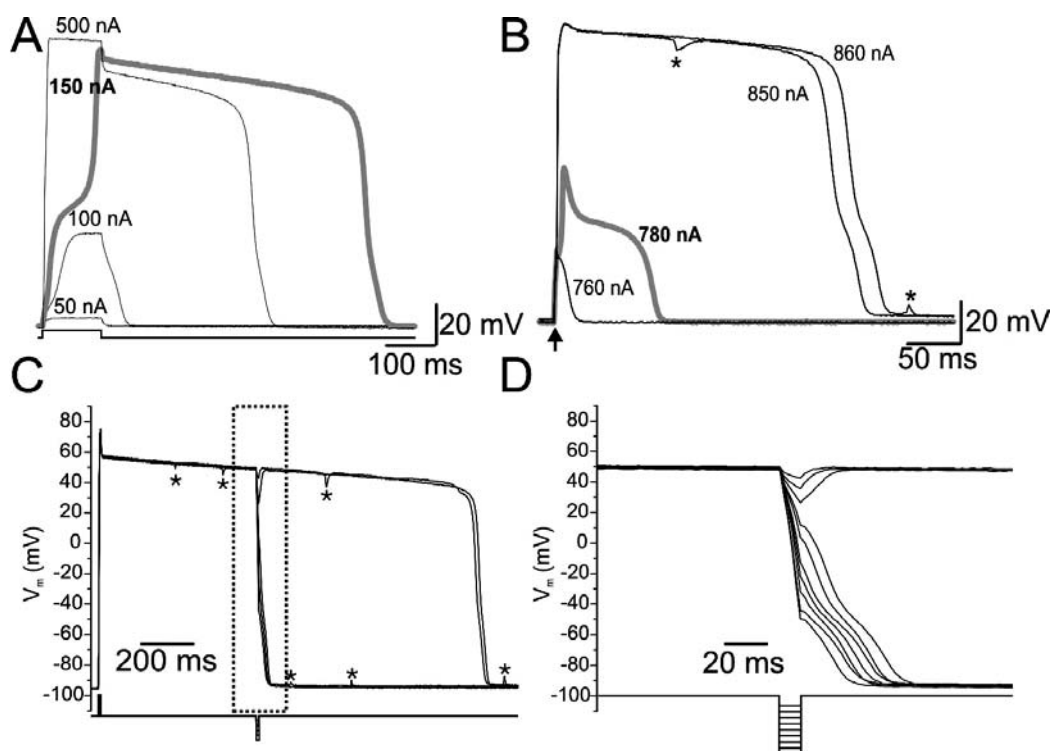


Figura VI-4. Potenciales plateau en SLKCa. **A)** Respuestas provocadas por pulsos de corriente depolarizante de diferente intensidad (como se indica) en SLKCa. El pulso de 50 nA genera una respuesta pasiva del tipo circuito RC. El pulso de 100 nA provoca un plateau de baja amplitud y bajo umbral (L-plateau). El pulso de 500 nA genera un plateau de amplitud y umbral altos (H-plateau). La respuesta provocada por el pulso de 150 nA (trazo gris) muestra la transición desde el L-plateau al H-plateau. **B)** Respuestas provocadas por pulsos depolarizantes de 4 ms y de intensidad diferente (como se indica). Se genera una respuesta local con 760 nA. Nótese un PA y un L-plateau con 780 nA (trazo gris). Los pulsos de 850 y 860 nA generan H-plateaus de la misma amplitud y apenas diferente duración. Los asteriscos indican la ocurrencia de PSPs "espontáneos" inducidos por el tratamiento con 4-AP. **C)** Superposición de cinco H-plateaus generados por pulsos depolarizantes de 10 ms y 800 nA y respuestas inducidas por pulsos hiperpolarizantes breves (10 ms) de diferentes intensidad aplicados 600 ms después de los primeros. Los pulsos hiperpolarizantes de mayor intensidad (300-500 nA) terminaron al H-plateau. Los asteriscos marcan lo mismo que en B. **D)** Detalle (representado por el recuadro punteado en C) de las respuestas provocadas por los pulsos hiperpolarizantes sobre el H-plateau.

54.26 ± 10.72 mV ($n=12$); cerca, por lo tanto, del posible potencial de equilibrio del Na^+ .

Pulsos largos de intensidad intermedias pueden provocar L-plateaus con una "joroba" en la trayectoria depolarizante seguida de una depolarización rápida (¿PA?) y un H-plateau que dura más que el pulso depolarizante (trazo gris en Fig. VI-4A). La joroba estaría indicando que, al menos en algunos electrocitos, el L-plateau tiene un umbral más bajo que el PA y que el H-plateau ocurre por encima del V_m alcanzado por el L-plateau montándose sobre éste. (Fig. VI-4A; 150 nA). Esta separación no siempre es clara ya que los umbrales para el L-plateau y el PA suelen ser muy cercanos y no siempre es posible ver en forma separada los dos tipos de plateau. El L-plateau se observó ocasionalmente aislado cuando su amplitud estuvo por debajo del umbral para el PA (trazo gris en Fig. VI-4B). A nivel del potencial de reposo se pueden ver PSPs "espontáneos" depolarizantes y con una

polaridad invertida cuando coinciden con los H-plateaus (asteriscos; Fig. VI-4B, C). Estos PSPs "espontáneos" probablemente fueron producidos por PAs disparados en los axones electromotores por la excitabilidad aumentada por el efecto de la 4-AP. Las hiperpolarizaciones provocadas por PSPs invertidos pueden ser capaces de terminar un H-plateau. Este efecto de la hiperpolarización se puede ver usando pulsos breves hiperpolarizantes de intensidad creciente (Fig. VI-4C, D). Las trayectorias hiperpolarizantes (repolarizantes) al final de los plateaus muestran un perfil complejo con dos diferentes pendientes sigmoideas separadas como un "doble tobogán" con tres puntos de inflexión (Fig. VI-4D). La separación entre los dos toboganes (el punto de inflexión intermedio) ocurre usualmente a los valores de V_m alcanzados por el L-plateau (Fig. VI-4B, 850 y 860 nA y VI-4D) sugiriendo de nuevo que el H-plateau se monta sobre el L-plateau y marcando la separación de estos dos

fenómenos que no siempre pueden observarse durante la depolarización por lo señalado anteriormente.

Los plateaus cumplen con los criterios principales propuestos por Russell y Hartline (1982) para definirlos: a) estas excursiones grandes del V_m son mayores que las que pueden ser explicadas por entradas sinápticas. b) La respuesta de membrana es mayor en la dirección depolarizante cuando se comparan las respuestas depolarizantes e hiperpolarizantes (Fig. VI-3C). c) pulsos breves depolarizantes disparan depolarizaciones prolongadas (Fig. VI-4A-C). d) El plateau es terminado abruptamente por entradas hiperpolarizantes (Fig. VI-4C, D). e) Hay trayectorias "acelerantes" del V_m en respuesta a la corriente inyectada, tanto en la dirección depolarizante como en la hiperpolarizante (Fig. VI-4A-D). f) Tanto el disparo como la terminación presentan un nivel umbral (Fig. VI-4A-D).

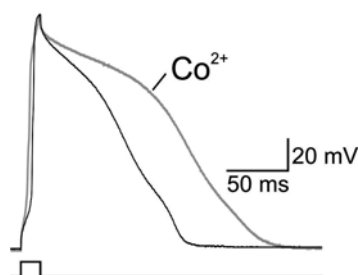


Figura VI-5. Efecto del Co^{2+} sobre los plateaus. Plateaus generados por pulsos de 10 ms en una solución libre de K^+ y después de la sustitución del Ca^{2+} por Co^{2+} (trazo gris).

Se provocaron respuestas plateau idénticas en esencia cuando el Ca^{2+} fue sustituido por Co^{2+} (Fig. VI-5). Esto fue una indicación de que este tipo de respuesta no fue debida a iones Na^+ permeando a través de canales de Ca^{2+} (Almers y Palade 1981; Hille 2001). Este resultado, junto con los anteriores, indican que los plateaus y los PAS son mediados por conductancias persistentes y transitorias, respectivamente, sin la contribución de conductancias de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Para continuar con el análisis de los mecanismos celulares que explican las respuestas de voltaje de los electrocitos comparamos las relaciones V-I medidas al final de depolarizaciones sostenidas en solución control (círculos llenos, Fig. VI-6A), en SLKCa (círculos vacíos, Fig. VI-6A) y cuando las corrientes dependientes de Na^+

fueron removidas mediante la SLKNaCa (triángulos, Fig. VI-6A). La relación V-I en solución control revela dos regiones de relativa estabilidad (donde el V_m cambia menos con la intensidad de la corriente inyectada) separadas por una transición aguda. La región de amplitud baja corresponde a las respuestas lineales pasivas provocada por pulsos de baja intensidad; la región de amplitud mayor está asociada con los plateaus generados por pulsos de alta intensidad y la transición corresponde al umbral de los plateaus (círculos llenos, Fig. VI-6A). La relación V-I en la SLKCa muestra varias pendientes con tres regiones de relativa estabilidad. Una región inicial cercana a los -80 mV corresponde a las respuestas lineales pasivas provocadas por pulsos depolarizantes de baja intensidad como en las condiciones control. La región intermedia entre -30 y 0 mV está asociada con el L-plateau y una tercera región entre 70 y 80 mV corresponde a los H-plateaus (círculos vacíos, Fig. VI-6A). Las transiciones bruscas cerca de -70 y -10 mV corresponden a los umbrales de los L-plateaus y los H-plateaus, respectivamente (Fig. VI-6A). Finalmente, la relación V-I en la SLKNaCa mostró una relación lineal única con una pendiente promedio menor (triángulos, Fig. VI-6A), sugiriendo que tanto las respuestas control como en SLKCa eran debidas a conductancias dependientes de Na^+ .

En un intento de diferenciar entre los dos mecanismos candidatos para la generación de los plateaus (cierre de una corriente de salida previamente abierta o apertura de una corriente de entrada) comparamos el efecto de pulsos hiperpolarizantes relativamente cortos (25 ms) en el tiempo que corresponde a la ocurrencia de los plateaus en las condiciones de SLKCa y SLKNaCa. La duración de los pulsos fue la requerida para alcanzar un valor estable en esas condiciones. Se estimó la resistencia por la amplitud de las deflexiones hiperpolarizantes de voltaje provocadas por esos pulsos aplicados a una baja intensidad fija (50 nA; Fig. VI-6B). En SLKCa se observan valores gradualmente crecientes de resistencia (siempre por encima de 50 k Ω) a intensidades de corriente bajas (Fig. VI-6C, círculos vacíos por debajo de 150 nA de corriente inyectada). Los valores de resistencia correspondientes a la ocurrencia de los L-plateaus fueron mucho mayores alcanzando valores de ~400 k Ω (Fig. VI-6C,

círculos vacíos entre 150 y 300 nA). Por otro lado, hubo una repentina caída en la resistencia, a valores por debajo de los

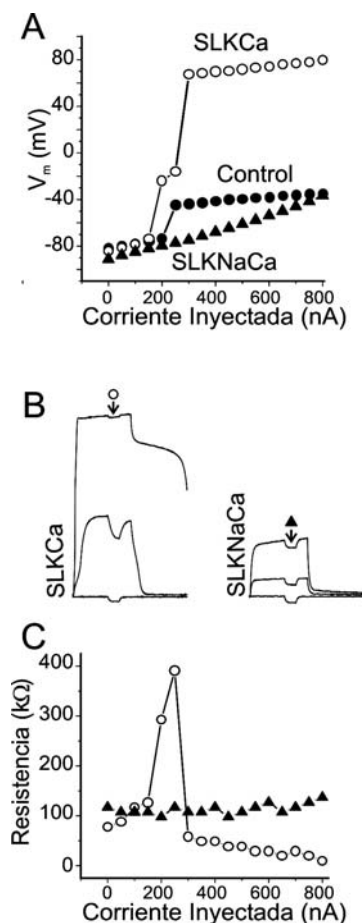


Figura VI-6. Relaciones V-I y R_{in} en Control, SLKCa y SLKNaCa. **A)** Relaciones V-I en Control (círculos llenos), SLKCa (círculos vacíos) y SLKNaCa (triángulos). Se tomaron los valores al final de pulsos depolarizantes de intensidad creciente. Nótese las dos regiones de relativa estabilidad (dónde el V_m varía menos en función de la intensidad del pulso) en la solución Control que corresponden a la conducta pasiva y al plateau que sigue a los PAS y la transición brusca entre las dos que corresponde al umbral del plateau. En SLKCa hay tres regiones de estabilidad que corresponden a la respuesta pasiva y a los dos diferentes plateaus descritos. Cuando se remueve el Na^+ los valores son menores y la relación tiende a ser lineal (triángulos). **B)** Ejemplos representativos de las respuestas obtenidas en SLKCa (izquierda) y en SLKNaCa (derecha) que se usaron para estimar la resistencia. La R_{in} se calculó a partir de respuestas generadas por pulsos hiperpolarizantes de prueba breves (25 ms, 50 nA) que se presentaron durante respuestas estables provocadas por pulsos depolarizantes de 125 ms de intensidad creciente. **C)** Gráficas de la R_{in} en función de la corriente de los pulsos de 125 ms en SLKCa (círculos) y en SLKNaCa (triángulos). Nótese el gran aumento de la resistencia durante el L-plateau (200 y 250 nA) y el retorno a valores de baja resistencia durante el H-plateau. Con la remoción del Na^+ la resistencia fue más baja y su valor prácticamente no varió.

observados con respuestas subumbrales ($<50 k\Omega$), durante la ocurrencia de los H-plateaus (Fig. VI-6C, círculos vacíos desde 300 nA). Cuando el Na^+ fue removido del medio la resistencia mostró muy poca variación y los valores fueron menores (cerca de 100 $k\Omega$) que durante el L-plateau (Fig. VI-6C, triángulos).

Ambos plateaus así como los cambios en la resistencia que los acompañan fueron abolidos cuando el Na^+ fue removido de la solución extracelular. Hubo, sin embargo, diferencias importantes entre ambos tipos de plateaus: a) el umbral fue siempre menor para el L-plateau, b) los voltajes en los cuales se estabilizan fueron diferentes y c) la resistencia aparente aumentó durante el L-plateau mientras que disminuyó durante el H-plateau. El L-plateau podría deberse tanto a la activación de una corriente de entrada (Na^+) o a la deactivación de una corriente de salida (K^+) activa en reposo. Bennett y Grundfest (1966) también describen plateaus en electrocitos cuando la concentración extracelular de K^+ fue aumentada para depolarizar y abolir la descarga de electrocitos de *Gymnotus*. Estos plateaus también fueron acompañados por un aumento de la resistencia y fueron interpretados como siendo mediados por la deactivación de una conductancia de K^+ de reposo que es reactivada durante la repolarización del plateau. Sin embargo, en nuestros experimentos, el aumento de la resistencia durante los L-plateaus desaparece cuando el Na^+ es removido de la solución extracelular.

Por otro lado, para explicar que el L-plateau resulte de la activación de una corriente de entrada de Na^+ debemos aceptar que el aumento de la resistencia es sólo aparente. En ese caso los pulsos de prueba aplicados durante el L-plateau pueden provocar una hiperpolarización mayor de la esperada al provocar una deactivación rápida y parcial de la corriente persistente de Na^+ responsable de este plateau. Algo similar a lo que se observa cuando se pasan pulsos hiperpolarizantes sobre el H-plateau que se muestra en la Fig. VI-4D (ver el efecto del tercer pulso). En ese caso se observa que el efecto se escapa de la linealidad debido a que existe un cierre parcial de la corriente del plateau que se manifiesta totalmente cuando se alcanza el umbral para la terminación, con el cuarto pulso (Fig. VI-4D). Es posible que en el caso del L-plateau el umbral para la

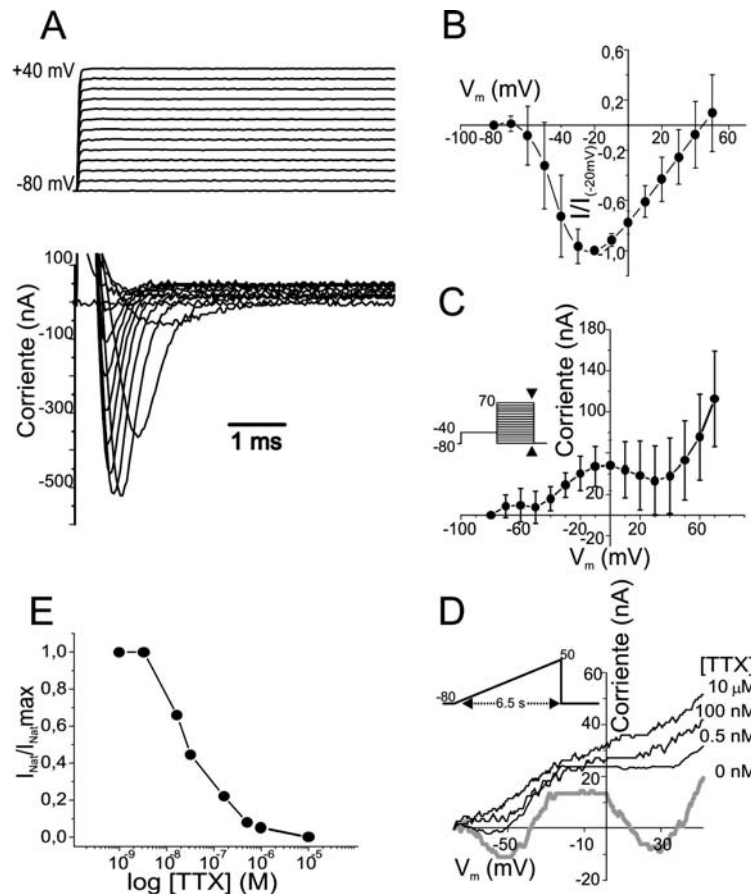


Figura VI-7. Corrientes de Na⁺ en SLKCa. **A)** Ejemplo de corrientes transitorias de Na⁺ (I_{Na}) activadas por comandos depolarizantes entre -80 y +40 mV (ver arriba). Las corrientes capacitivas y "de pérdida" no fueron sustraídas. **B)** Relación I-V promedio calculada con los valores pico tomados de experimentos como los de A ($n=13$). Los valores están normalizados respecto a la corriente máxima medida a -20 mV. **C)** Relación I-V promedio ($n=14$) calculada tomando la amplitud de la corriente al final de comandos de voltaje de 350 ms. Un prepulso de 350 ms depolarizante a -40 mV inactivó las corrientes transitorias (ver esquema del protocolo utilizado en el inset). **D)** Relaciones I-V representativas de corrientes provocadas por comandos en forma de rampa lenta depolarizante (ver el inserto) en condiciones control (marcada como 0 nM) y con concentraciones crecientes de TTX (de 0.5 nM a 10 μ M). **E)** Curva dosis-respuesta normalizada del efecto de la TTX sobre I_{Na} pico en SLKCa en un experimento representativo. La IC_{50} calculada para ese experimento fue de 32.9 nM.

activación y la desactivación estén muy próximos y los pequeños pulsos hiperpolarizantes siempre estén desactivando parte de la corriente que los genera y nos estén provocando una caída de voltaje que no es debida a la resistencia de membrana sino a la terminación parcial del L-plateau.

VI.3.- La fijación de voltaje mostró tres tipos de corrientes dependientes de Na⁺.

La aplicación de comandos de voltaje depolarizantes breves (6 ms) mostraron la clásica corriente de entrada de Na⁺ transitoria de activación e inactivación rápidas en todos los electrocitos (Fig. VI-7A). En la mayoría de los experimentos las corrientes de entrada tuvieron su pico a -20 mV ($n=13$); estos caso fueron usados para construir la relación I-V

promedio. La curva muestra la típica forma de N de la corriente transitoria de Na⁺ con un umbral a los -80 mV, un pico máximo de corriente (685 ± 448 nA) a -20 mV y un potencial de inversión aparente apenas por encima de los 40 mV (Fig. VI-7B). El valor de corriente máxima y el potencial de inversión parecen ser una subestimación ya que corrientes de pérdida de salida están contribuyendo a la relación I-V y sobretodo a grandes depolarizaciones. Además, pueden haber corrientes persistentes de entrada que podrían estar contribuyendo también a ese perfil I-V (ver más abajo).

Para analizar las corrientes persistentes, no inactivantes, de Na⁺, aplicamos dos tipos de protocolos de comando de voltaje que provocan la inactivación previa de la corriente transitoria (ver Capítulo IV). Un protocolo consistente en

prepulso-pulso depolarizantes se usó para inactivar la corriente transitoria y las relaciones I-V se construyeron a partir de la medida de las corrientes persistentes que permanecieran al final del pulso (Fig. VI-7C). También se aplicaron rampas depolarizantes lentas como comando de voltaje que inactivan las corrientes transitorias mientras activan las persistentes (Fig. VI-7D). Las regiones de pendientes negativas podrían indicar tanto la activación de corrientes de entrada voltaje-dependientes o la deactivación de corrientes de salida como por ejemplo podría ser un rectificador de entrada de K^+ que se abra por hiperpolarización y se cierre con valor levemente por encima del potencial de reposo (ver capítulos I y VII). La primera región de conductancia negativa fue menor y no claramente evidente en la relación I-V promedio por el agregado de la corriente positiva de la corriente de pérdida. Sin embargo, fue evidente en algunos experimentos individuales en los que hubo picos de corriente neta de entrada a valores cercanos a -50 y 30 mV y regiones de pendiente negativa de la conductancia entre -80 y -50 mV y entre 0 y 40 mV, respectivamente (Fig. VI-7C y el trazo gris en la Fig. VI-7D).

Los valores de V_m a los cuales las dos corrientes de entrada tuvieron sus picos coinciden con las dos regiones de estabilidad observadas en las relaciones V-I observadas en fijación de corriente y que correspondían con los L-plateau y H-plateau. El H-plateau va acompañado por un gran aumento de la conductancia, por lo tanto la región de corriente de entrada entre -10 y 40 mV es probablemente debida a la activación de una corriente persistente de Na^+ voltaje-dependiente a la que llamaremos I_{NaPH} .

La corriente de entrada transitoria fue totalmente bloqueada por bajas dosis de TTX (Fig. VI-7E) con una IC_{50} promedio de 1.56 ± 1.24 nM ($n=9$), que es comparable a los valores de sensibilidad a TTX de los canales de mamíferos de tipo $Na_v1.4$ (Goldin 2001). Las corrientes persistentes inducidas por rampas de voltaje también fueron sensibles a la aplicación de TTX (Fig. VI-7D). Para la corriente de alto umbral la IC_{50} promedio fue 5.90 ± 5.07 nM ($n=6$) y, por lo tanto, del mismo orden de magnitud que la de la corriente transitoria. Estos datos sugieren que tanto la corriente transitoria como las persistentes en los electrocitos de *Gymnotus* tienen similar sensibilidad a la TTX. Sin embargo, ciertas no linealidades en la

relación I-V de las corrientes persistentes que incluyen deflexiones de entrada no se abolieron completamente en presencia de 10 μ M de TTX (Fig. VI-7D) sugiriendo que un componente de las corrientes persistentes de Na^+ es TTX- resistente (ver también en el resultado de la Fig. VI-3F).

La corriente de Na^+ transitoria en electrocitos de *Gymnotus* y *Electrophorus* (Nakamura et al. 1965) muestra similar dependencia de voltaje. Sin embargo, la dependencia de voltaje en ambos casos está corrida hacia valores más negativos respecto a la corriente transitoria de Na^+ de electrocitos de *Sternopygus* (Ferrari y Zakon 1993). Las diferencias podrían ser causadas por la gran corriente de pérdida que estaría contribuyendo, particularmente en potenciales más positivos induciendo una subestimación del potencial de inversión en nuestros experimentos. De hecho el V_m alcanzado por el H-plateau fue más positivo y sugiere un potencial de equilibrio para el Na^+ cercano a los 54 mV.

La pequeña resistencia que acompaña al H-plateau su ausencia en SLKNaCa sugieren que la activación I_{NaPH} media el H-plateau. Si bien no podemos descartar otro tipo de cambios de conductancia como explicación del L-plateau creemos que éste se debe a la activación de una corriente de Na^+ de bajo umbral a la que llamaremos I_{NaPL} . Esta corriente también sería responsable de los fenómenos de bajo umbral que hemos observado acompañando los pulsos de corta duración y los PSPs.

Por lo tanto, tres corrientes dependientes de Na^+ están presentes en los electrocitos de *Gymnotus*. Sin embargo, fue imposible separar completamente estas tres corrientes por sensibilidad diferencial a la TTX. La resistencia a la TTX de algún componente de corriente persistente en fijación de voltaje y de parte del PA y los plateaus en los experimentos de fijación de corriente ante concentraciones altas de 10 μ M pueden estar indicando la presencia de un componente TTX-resistente o de un tipo de canal sensible a extremadamente altas concentraciones de TTX como los del tipo $Na_v1.5$ reportados en mamíferos (Goldin 2001).

Se determinaron las propiedades de activación e inactivación de I_{NaT} . Se utilizó el valor aproximado de cruce por la absisa en la gráfica I-V de los promedios (Fig. VI-7B) de unos 45 mV. Después se midió la relación

entre la corriente pico a cada V_m y la fuerza electromotriz (estimada como la diferencia entre ese potencial y el potencial de equilibrio del Na^+). Esta relación que estima la conductancia fue normalizada a los valores máximos y se ajustó con la ecuación de Boltzmann (Fig. VI-8A). De acuerdo a este ajuste la V_{50} de la activación de I_{NaT} fue de -38.84 mV.

La inactivación se determinó midiendo la amplitud de las corrientes provocadas por depolarización luego de períodos de preconditionamiento. Se hicieron saltos de voltaje de 20 ms entre -110 a -40 mV partiendo del potencial de mantenimiento de -80 mV. Estos prepulsos fueron seguidos por pulsos de 4 ms a un V_m de 0 mV que generaba una corriente de entrada cercana a los valores máximos (Fig. VI-8A, recuadro). Se graficaron los valores promedio temporal ($n=8$) del pico de la corriente de entrada, normalizados por su valor máximo, respecto al valor de V_m de los prepulsos (Fig. VI-8A, círculos vacíos) y se ajustaron los valores a una función de Boltzmann. El valor estimado de V_{50} de la inactivación fue de -75.28 mV. Nótese que los valores de inactivación no llegan a cero. La asíntota del ajuste tiene un valor de ~ 0.08 lo que nos podría estar indicando que en promedio la corriente no inactivante en un V_m de 0 mV es cercana al 8% de la corriente de entrada total activada a ese valor de voltaje.

La dependencia de voltaje, considerando las V_{50} de la activación y de la inactivación, es prácticamente idéntica a la estimada para el músculo esquelético de rata (Ruff 1999; ~ -35 mV y ~ -75 mV, respectivamente). Sin embargo cuando se compara con los valores encontrados en la corriente de Na^+ de otros electrocitos se ve que en *Sternopygus* los valores están corridos hacia la derecha (~ -17 mV⁵ y ~ -50 mV, respectivamente; Ferrari y Zakon 1993). Por otro lado en el caso de *Electrophorus* la inactivación está corrida hacia la izquierda (~ -93 mV) y la activación está muy corrida hacia la derecha (~ 3 mV) de tal manera que las curvas casi no se superponen (Shenkel y Sigworth 1991). Hay que tener en cuenta que los valores de I_{NaT} a voltajes más cercanos al V_m de reposo pueden ser en realidad medidas de la I_{NaPL} , lo que podría significar que la

activación de I_{NaT} debería estar más corrida a la derecha si este fuera el caso.

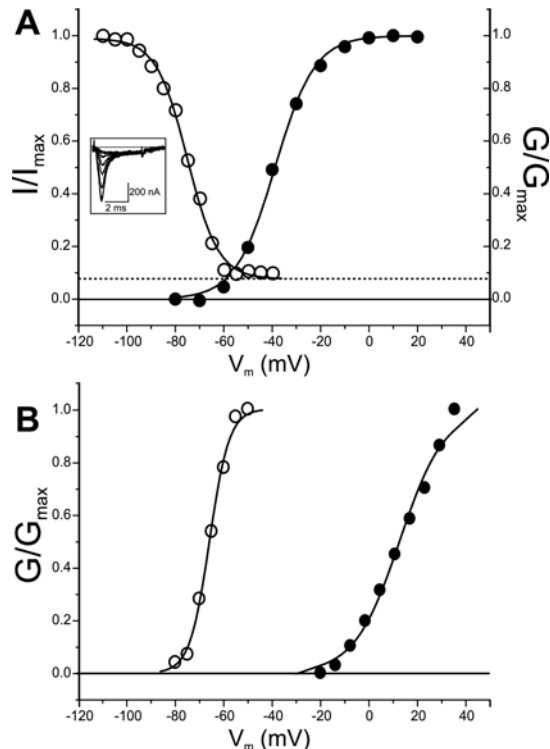


Figura VI-8. Dependencia del voltaje de las corrientes de Na^+ . A) Curvas de activación (círculos llenos) e inactivación (círculos vacíos) de I_{NaT} . La curva de activación fue construida calculando la conductancia a partir de los valores promedios ($n=13$) de I_{Na} que se muestran en la Fig. VI-7B y ajustándolos a la conductancia máxima. La línea continua corresponde al ajuste de los valores a una ecuación de Boltzmann. La curva de inactivación representa los valores promedio ($n=8$) corriente pico normalizados con el máximo después de prepulsos de voltaje variable. Nótese que la corriente no llega a valores de 0 (línea punteada) sugiriendo la existencia de componentes no inactivantes. B) Curvas de activación de I_{NaPL} (círculos vacíos) e I_{NaPH} (círculos llenos). Se representan valores de conductancia calculados a partir de la corriente medida en el experimento de la Fig. VI-7D tomando algunos valores de las corrientes respectivas. Las curvas representan ajustes de los valores igual que en A.

Se analizaron también las características de activación de las corrientes persistentes. Se tomaron los datos de las corrientes obtenidas con rampas de la Fig. VI-7D en condiciones de 0 nM de TTX. Los valores para construir la curva correspondiente a I_{NaPH} fueron obtenidos restando a la corriente total los valores de un componente lineal estimado que uniría los valores máximos de I_{NaPL} con el valor de E_{Na} (~ 45 mV) para este caso. Teniendo en cuenta las salvedades debidas a la asunción de que esa extrapolación de datos fuera correcta, en la Fig. VI-8B

⁵ Este valor fue estimado por mí analizando los datos de la curva I-V presentada en la Fig. 2B de Ferrari y Zakon (1993).

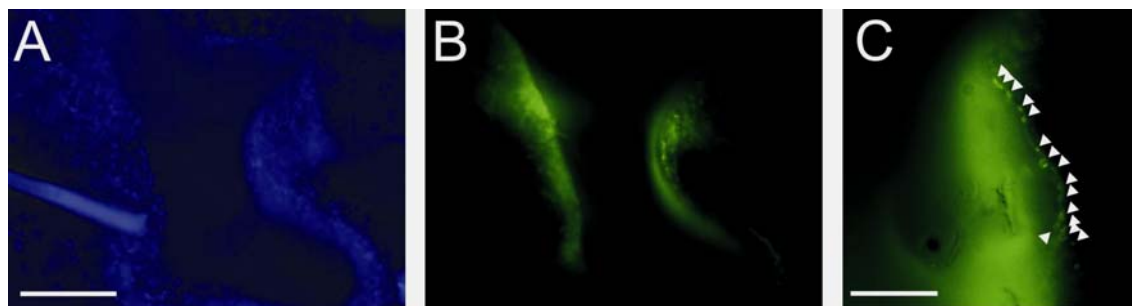


Figura VI-9. Inmunohistoquímica de canales de Na^+ en electrocitos. **A)** Electrocito de OEc donde se observan los núcleos marcados con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en azul (la barra representa $100\ \mu\text{m}$ y es válida también para B). **B)** El mismo electrocito mostrando el anticuerpo contra canales de Na^+ (en verde). **C)** Detalle de la cara caudal de otro electrocito las puntas de flecha señalan cúmulos de marcación más intensa (calibración $100\ \mu\text{m}$).

se muestran las curvas de activación. Se puede observar que I_{NaPL} se activa a valores muy negativos y que a un V_m de -50 ya ha alcanzado un 100% de la activación. Esta conductancia tiene una V_{50} de -65.7 mV. Por otro lado I_{NaPH} tendría un umbral cercano a los -30 mV y su V_{50} está, de acuerdo a nuestras estimaciones, en los 12.8 mV.

VI.4.- Los canales de Na^+ no están homogéneamente distribuidos en la membrana de los electrocitos.

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para estudiar la distribución de canales de Na^+ en los electrocitos de *Gymnotus*. Como ya se vio, los canales de Na^+ en los electrocitos de *Brachyhypopomus* se distribuyen exclusivamente en las caras caudales y rostrales y en el pedúnculo caudal (Stoddard 2006). Era de esperarse que algo similar ocurriera en *Gymnotus*. Estos resultados fueron posibles gracias a la amable colaboración de Anabel Fernández del Depto. de Neuroanatomía Comparada del IIBCE.

Para esto los peces fueron tratados de la misma forma que para obtener el preparado de OE aislado y las colas fueron fijadas en paraformol al 4% durante una noche. Las porciones caudales fueron encastradas en gelatina-albúmina y se realizaron cortes mediante un vibrátomo (Leica) de $80\ \mu\text{m}$ de espesor en sentido parasagital. Los cortes fueron lavados en buffer fosfato (PB) con un pH de 7.2 durante varias horas. Se realizó un bloqueo con albúmina bovina al 0.5% durante una hora. Se incubaron los cortes con el anticuerpo Anti-Pan Na_v . Este presenta un epítipo conservado en vertebrados y con una alta homología con los canales de Na^+ de

moluscos e insectos (Alomone Labs). Se usó una dilución de 1:200 en PB con Tritón al 0.3% durante una noche a 4°C . Se realizaron varios lavados en PB durante una hora y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo unido a fluoresceína en una dilución de 1:200 (Chemicon) por 2 horas en la oscuridad y agitando. Los cortes fueron montados en Vectashield "mounting medium" (VECTOR) para fluorescencia y observados en un microscopio de epifluorescencia (Olympus Bx 61) y fotografiados con cámara Olympus DP70.

Se pudo observar que hay un mayor marcado en las caras rostrales y caudales que en las caras laterales (Fig. VI-9) al igual a lo visto en *Brachyhypopomus* (Stoddard 2006) y a lo que ya había sido sugerido por varios autores desde hace años respecto a que las caras "activas" eran esas caras y no las laterales (ver Bennett 1971). Observando en detalle la cara caudal inervada se puede ver que hay un marcado de los anticuerpos en cúmulos (Fig. VI-9, recuadro). Es posible que estos cúmulos estén vinculados con las terminales sinápticas de las EMNs pero eso debería analizarse en experimentos de doble marcado con marcadores que muestren también dichas terminales.

VI.5.- Posible importancia funcional de las conductancias dependientes de Na^+ .

El control del V_m y la excitabilidad son de primera importancia en una membrana que descarga incesantemente PAs a frecuencias de cerca de 25 Hz con picos de hasta 60 Hz (Barrio et al. 1994; Falconi et al. 1995). En la especie cercanamente relacionada *Brachyhypopomus pinnicaudatus* el cortejo de los machos genera aumentos transitorios y rápidos de frecuencia

acompañados por una disminución de la amplitud de la DOE ("chirps"). Aunque nunca observamos "chirps" en nuestra muestra de *Gymnotus* (probablemente juveniles), la disminución en la amplitud inducida por la descarga repetitiva y relacionada con el L-plateau en un electrocito podría estar en la base de la caída de la amplitud durante los "chirps".

A nivel del OE, además de la sincronización de la generación del PA en varios electrocitos independientes que componen la DOE, el sistema debe asegurar un alto factor de seguridad resistente a una variedad de cambios ambientales y fisiológicos. La transmisión sináptica debe generar en forma confiable PAs en una célula con muy baja R_{in} de reposo y una muy corta constante de tiempo, inervada por 6-9 neuronas electromotoras provenientes de varios niveles de la médula espinal. Para servir ese propósito el efecto depolarizante de los PSPs está favorecido por una marcada rectificación de entrada que genera los L-plateaus. Este efecto debe favorecer también la suma temporal y la sincronización de diferentes electrocitos. Es interesante que cuando se activa el H-plateau (y presumiblemente ocurriría en el pico del PA) la resistencia de membrana cae por debajo aún de los valores de reposo aumentando

efectivamente la corriente que fluye a través de la membrana de los electrocitos. Esta propiedad funcional puede ser extremadamente importante dado que la producción de una DOE efectiva requiere la generación concomitante de cambio de voltaje y caída de la resistencia de entrada.

En los electrocitos de *Sternopygus* el cambio en la duración del AP es llevada a cabo por cambios coordinados en las cinéticas de las corrientes de Na^+ y K^+ (Zakon 1998; McAnelly y Zakon 2000). La forma de onda de *Gymnotus carapo* es afectada por la temperatura y la influencia hormonal, principalmente actuando sobre la amplitud y la duración de la onda V4. Esta onda es generada por la activación simultánea de las caras rostrales no inervadas de los electrocitos caudales (Macadar et al 1989). Un aumento en la amplitud y la duración de V4 puede involucrar un aumento en la amplitud y duración de los PAs generados por esas caras de los electrocitos. Una disminución en la corriente de K^+ involucrada en la repolarización rápida del PA en *Gymnotus* puede ser suficiente para cambiar tanto la amplitud como la duración del PA, permitiendo que la corriente de Na^+ persistente de alto umbral sea activada. Este podría ser un mecanismo subyacente al efecto de la temperatura y las hormonas.

Capítulo VII. Las conductancias dependientes de K^+ en los electrocitos.

VII.1. Rol de las conductancias de K^+ en la forma del PA y en la descarga repetitiva.

La duración del PA (DPA) provocado por pulsos depolarizantes cortos medida a la mitad de la amplitud promedio, en fijación de corriente y en condiciones control, fue de 0.57 ± 0.16 ms ($n=20$). Para probar si había conductancias mediadas por K^+ involucradas en la forma de onda del PA bloqueamos los canales de K^+ con la aplicación extracelular de 4-AP (1 mM) y TEA (25 mM) (Fig. VII-1A). Hubo un efecto notorio y estadísticamente significativo de la 4-AP aumentando la DPA (Fig. VII-1B) a 3.38 ± 0.68 ms ($p < 0.01$, $n=9$). En contraste el efecto del TEA sobre la DPA (0.70 ± 0.09 ms; $p > 0.05$, $n=5$) no fue significativo aún cuando los resultados control y bajo la aplicación de TEA fueron analizados usando el test pareado de Wilcoxon en cada electrocito ($z=1.75$; $p=0.08$; $n=5$). Además

ambos bloqueantes previnieron la descarga repetitiva que como ya vimos es típica de las respuestas provocadas por pulsos depolarizantes de larga duración en Ringer control. Bajo TEA y 4-AP los electrocitos disparan un PA seguido por una depolarización prolongada tipo plateau (Fig. VII-1C). Sin embargo hubo diferencia en el efecto de ambas drogas ya que aunque el retardo de los PAs se acortó por TEA y 4-AP fue mayor el efecto del TEA. Más aún, la repolarización del PA mostró oscilaciones bajo TEA que estuvieron ausentes con 4-AP y el plateau fue mayor después de la 4-AP que del TEA (Fig. VII-1C). Estos resultados son consistentes con el involucramiento de conductancias mediadas por K^+ en la repolarización del PA y en la génesis de la descarga repetitiva. Además los resultados sugieren un papel más influyente en la repolarización del PA a corrientes sensibles a 4-AP que sensibles a TEA.

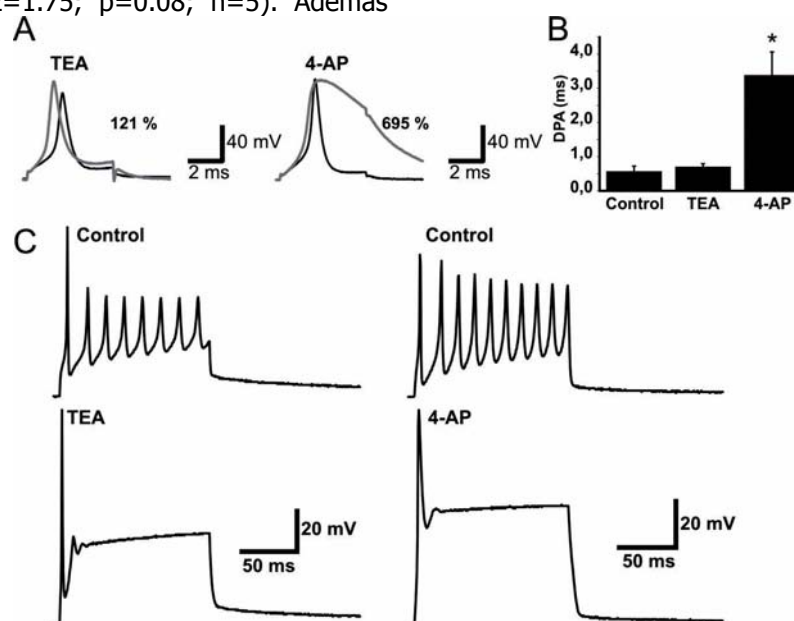


Figura VII-1. Efectos de bloqueantes de canales de K^+ sobre la forma del PA. A) Registros representativos que muestran que la 4-AP (1mM) aumenta claramente la DPA medida a la mitad de su amplitud. En los ejemplos mostrados la 4-AP indujo un gran aumento de la DPA al 695% del control mientras que el TEA solo aumentó la DPA a 121% del control. B) Datos resumidos que muestran que la 4-AP aumenta significativamente la DPA al 593% del control ($p < 0.01$; $n=9$) mientras que no hubo aumento significativo con el TEA ($p > 0.05$; $n=5$). C) Tanto el TEA como la 4-AP previnieron de la descarga repetitiva; las depolarizaciones prolongadas provocaron un PA simple seguido de un plateau que fue mayor cuando se usó 4-AP.

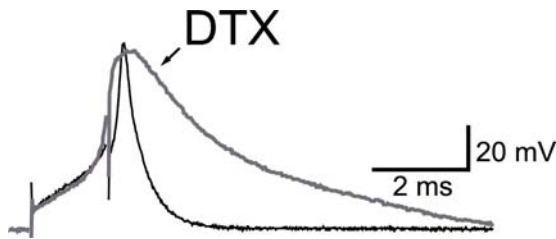


Figura VII-2. Efecto de la DTX sobre la DPA. La aplicación de DTX (0.5 μ M) provocó un aumento de la DPA similar al observado con la aplicación de 4-AP.

La DTX (0.5 μ M), al igual que la 4-AP, provocó un aumento de la DPA (Fig. VII-2). Esto podría indicar que la conductancia responsable de la repolarización del PA es debida a canales de los tipos $K_v1.1$ o $K_v1.2$ (ver Tabla I, Capítulo III)

El mayor efecto del TEA extracelular sobre las propiedades intrínsecas fue un marcado aumento en la R_{in} (Fig. VII-3) estimada como la pendiente de los ajustes a una recta a la relación V-I calculada con las respuestas provocadas por pulsos hiperpolarizantes (Fig. VII-3A). La R_{in} control fue de 21.2 ± 1.1 k Ω y

aumentó a 35.8 ± 1.1 k Ω bajo efecto del TEA en el electrocito de la Fig. VII-3A. Como ya vimos el valor promedio de R_{in} en todos los electrocitos considerados fue de 65.4 ± 54.0 k Ω ($n=29$) en condiciones control y de 131.3 ± 87.7 k Ω ($p<0.01$; $n=11$) bajo efecto del TEA. Nótese también el salto de voltaje en la relación V-I para pulsos depolarizantes (a 100 nA) que es la consecuencia del plateau (Fig. VII-3A). Una respuesta de tipo plateau fue generada también en condiciones control pero con mayor intensidad de corriente (>700 nA) como se puede ver en el salto de depolarización en la relación V-I calculada en estas condiciones (Fig. VII-3A). Con bloqueo de las conductancias de K^+ por 4-AP el plateau pudo ser disparado a más bajas intensidades (Fig. VII-3B). Por otro lado la R_{in} no fue modificada en forma significativa por la 4-AP (Fig. VII-3B, C) como se puede ver en las relaciones V-I, en control y con 4-AP, perfectamente superpuestas en la dirección

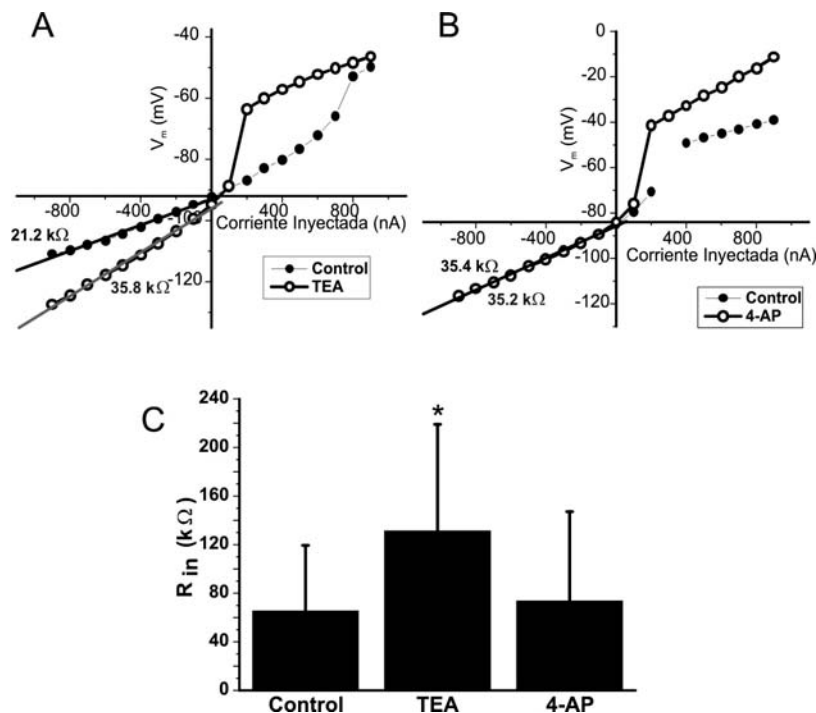


Figura VII-3. Modificaciones de la R_{in} inducidas por los bloqueantes de canales de K^+ . **A)** Curvas V-I en condiciones control y en presencia de TEA. El TEA aumentó la pendiente de la relación V-I en la dirección hiperpolarizante. La R_{in} correspondiente estimada por ajuste lineal fue de 21.2 y 35.8 k Ω en control y con TEA, respectivamente. Hubo saltos en todas las relaciones V-I para los pulsos depolarizantes debido a los plateau de Na^+ . El TEA disminuyó el umbral para el plateau sin modificar su amplitud. **B)** Lo mismo que en A pero con 4-AP. Las pendientes en ambas relaciones en la dirección hiperpolarizante fueron esencialmente idénticas (R_{in} fue 35.4 y 35.2 k Ω ; control y 4-AP respectivamente). El salto en la dirección depolarizante fue mayor con 4-AP que en condiciones control. **C)** Resumen de datos que muestran los efectos del TEA (aumento significativo de 101%; $p<0.01$; $n=11$) y 4-AP (aumento no significativo de 12%; $p>0.05$; $n=14$) sobre la R_{in} .

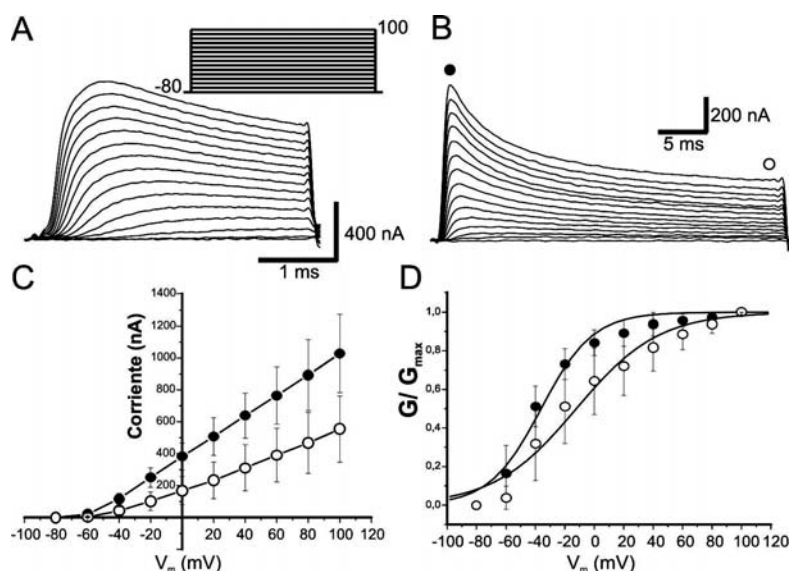


Figura VII-4. Corrientes de salida activadas por voltajes depolarizantes. A) Familia de corrientes típicas provocada por comandos depolarizantes desde -80 a 100 mV. B) Lo mismo que en A pero con pulsos más prolongados. C) Curvas I-V de corrientes promedio ($n=6$) tomadas en el pico (I_A , círculos llenos) y 30 ms después del comienzo del comando (I_K , círculos vacíos). D) Curvas de activación tomadas a partir de los mismos datos de C considerando un potencial de equilibrio del K^+ de -80 mV. La V_{50} para I_A fue de -19.46 ± 1.12 mV y para I_K de -12.24 ± 3.96 mV. Las líneas continuas representan el ajuste con el formalismo de Boltzmann.

hiperpolarizante (Fig. VII-3B). Al igual que la 4-AP la DTX no tuvo un efecto significativo sobre la R_{in} (no se muestra). La 4-AP aumentó la amplitud del plateau sin modificar su umbral (Fig. VII-3B). Estos resultados tomados juntos son consistentes con la existencia de una corriente mediada por K^+ , inhibida por TEA que participa en la determinación la R_{in} de la célula pero que contribuye escasamente en la repolarización del PA. En contraste los efectos de la 4-AP sugieren que bloquea una conductancia de K^+ que es de importancia clave en la repolarización de la célula después del PA.

VII.2. Corrientes de K^+ activadas por depolarización.

Se llevaron a cabo experimentos de fijación de voltaje en SLNaCa para aislar las conductancias mediadas por K^+ . En estas condiciones los comandos de voltaje depolarizantes activaron corrientes de salida que aumentaron gradualmente con la depolarización y mostraron un componente inicial transitorio y una corriente persistente (Fig. VII-4A, B). Ambos componentes mostraron una relación I-V lineal por encima de los -40 mV siendo más empinada la pendiente del componente transitorio de la corriente (Fig. VII-4C). Las curvas de activación mostraron que ambas corrientes tienen similares umbrales levemente por

encima de -60 mV (Fig. VII-4D) pero la corriente transitoria de tipo A (I_A) tiene una dependencia de voltaje más empinada y con un valor de V_{50} más negativo (-19.46 ± 1.12 mV) que el componente persistente I_K ($V_{50} = -12.24 \pm 3.96$ mV); Estos valores fueron significativamente diferentes estimados con el test pareado de Wilcoxon ($z=2.201$; $p=0.028$; $n=6$).

Ya que las cinéticas de la corriente transitoria sugieren un comportamiento de tipo I_A (Storm, 1987; Brown et al., 1990) aplicamos protocolos de comando de voltaje diseñados para analizar la inactivación voltaje-dependiente que es típica de este tipo de corrientes. Los protocolos con prepulsos hiperpolarizantes y depolarizantes seguidos de un pulso de prueba (Fig. VII-5) confirmaron que el componente inicial transitorio tiene inactivación voltaje-dependiente consistente con una I_A (Fig. VII-5A). La I_A puede ser aislada por resta de la corriente total ($I_A - I_K$) provocada por un pulso de -80 a -10 mV a partir de la I_K remanente después de un prepulso a 70 mV que inactiva completamente a I_A (Fig. VII-5B). En contraste la corriente de salida medida a retardos de 30 ms no fue afectada por los prepulsos (Fig. VII-5C). El componente no inactivante (I_K), que permanece después de la completa inactivación de I_A fue de $\sim 40\%$ de la

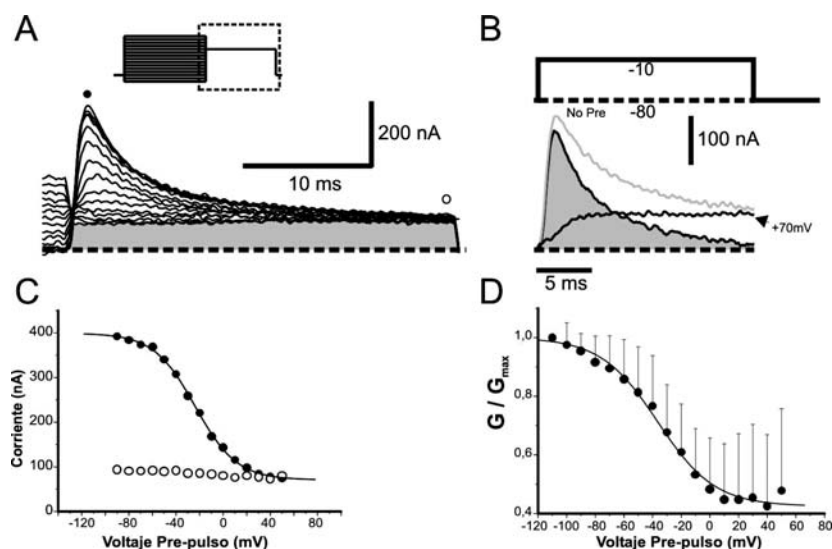


Figura VII-5. Inactivación voltaje-dependiente de I_A . **A)** Corrientes activadas por un comando a 0 mV después de prepulsos desde -90 a 50 mV (ver protocolo arriba). La corriente de salida inicial transitoria provocada por el comando disminuyó en función de la depolarización del prepulso (es decir que se inactivó). La corriente de salida remanente después de la inactivación completa del componente transitorio I_A (sombreado) corresponde a I_K . **B)** Corrientes activadas tanto en ausencia de prepulso y después de un prepulso a +70 mV. El área sombreada corresponde a I_A obtenida por la resta de ambas corrientes ($I_K + I_A$) - $I_K = I_A$. El protocolo de comandos de voltaje se muestra arriba. **C)** Gráfica del pico de I_A (círculos llenos) como función del voltaje del prepulso y la corriente estable I_K medida 30 ms después del inicio del comando (círculos vacíos). Datos tomados de A. La línea continua representa el ajuste de los datos de I_A a la ecuación de Boltzmann. **D)** Curva de inactivación promedio ($n=5$) medida como en C. Nótese que el valor final de conductancia es $\approx 40\%$ del valor máximo.

corriente de salida total (Fig. VII-5D). El porcentaje de I_K remanente después de la inactivación completa con prepulsos >0 mV mostraron una dispersión importante siendo muy diferentes en diferentes células con valores que variaron entre 18.5 y 74.4% de la corriente de salida máxima. Esta dispersión podría ser causada por la proporción variable de ambos tipos de conductancias en distintos electrocitos (Fig. VII-5D); sin embargo no se puede descartar la contribución de errores en el control espacial del voltaje.

Los efectos de TEA y 4-AP en fijación de corriente sugieren que estas drogas inhiben diferentes conductancias de K^+ (Fig. VII-1-3). Por lo tanto analizamos los efectos del TEA (25 mM) y 4-AP (1 mM) sobre I_A e I_K . Ambas corrientes fueron inhibidas en forma similar por el TEA como muestra la reducción similar en las pendientes de las relaciones I-V correspondientes (Fig. VII-6A-C). Sin embargo el TEA no modificó la pendiente o la V_{50} de las curvas de activación correspondientes (no se muestra). En contraste la 4-AP inhibió marcadamente a la I_A y redujo a la I_K en un grado similar al TEA (Fig. VII-6D-F). Estos resultados son consistentes con la acción más potente de la 4-AP que el TEA sobre la repolarización del PA en que la I_A , más rápida y transitoria y

que tiene una dependencia del voltaje más marcada que I_K ; por esas propiedades I_A es activada durante el PA favoreciendo su rápida repolarización.

Los resultados son consistentes con que sea la I_A sensible a 4-AP la principal corriente de K^+ que controla la repolarización rápida del PA. La I_A en los electrocitos de *Gymnotus* tiene una dependencia de voltaje corrida hacia la derecha respecto a otras corrientes de ese tipo observadas en otras células excitables. Este corrimiento hacia valores positivos de la dependencia de voltaje y las características cinéticas de activación e inactivación de la I_A en los electrocitos de *Gymnotus* son consistentes con canales del tipo $K_v3.4$. Este tipo de canales son abundantes en el músculo esquelético donde juegan un rol importante en la repolarización del PA (Vullhorst et al., 1998; Rudy et al. 1999). Además, los canales del tipo K_v3 permiten la descarga de alta frecuencia que caracteriza a varios tipos de células excitables reduciendo el número de canales de Na^+ activados durante el PA (Rudy y McBain, 2001). Por otro lado I_A en los electrocitos de *Gymnotus* está pobremente bloqueada con 25 mM de TEA mientras que los canales de tipo K_v3 son sensibles a bajas dosis de 4-AP y TEA (Coetzee et al., 1999). Esta inconsistencia en

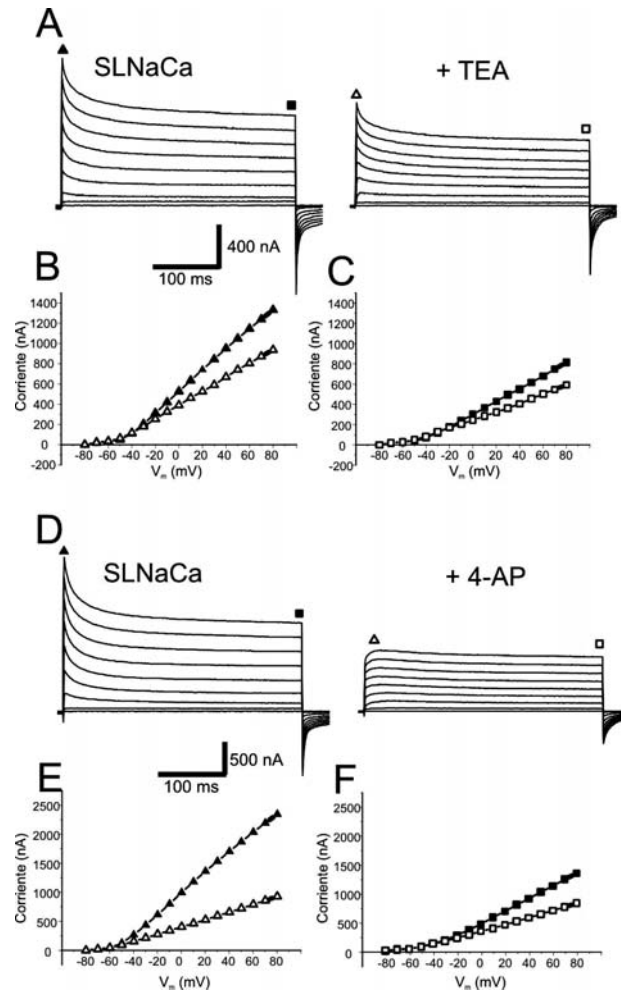


Figura VII-6. Efectos del TEA y la 4-AP sobre las corrientes de salida. A) Familia de corrientes en SLNaCa y con el agregado de TEA. **B)** Relaciones I-V del pico de I_A en SLNaCa (triángulos llenos) y con TEA (triángulos vacíos). **C)** Curvas I-V de I_K en SLNaCa (cuadrados llenos) y con TEA (cuadrados vacíos). **D-F)** Lo mismo que A-C pero mostrando los efectos de 4-AP sobre las corrientes de salida. Nótese el gran efecto de la 4-AP sobre I_A en E.

el perfil farmacológico y la similitud en la V_{50} de la I_A de *Gymnotus* con la del canal $K_{v1.1}$ de *Electrophorus* (-19.47 ± 1.12 mV y -22.8 ± 0.7 mV, respectivamente) estudiada por Thornhill et al (2003) abre la posibilidad de que I_A sea debida a otro tipo de canal diferente de $K_{v3.4}$ y podría ser debido al canal $K_{v1.1}$ descrito en otros Gymnotiformes (Few y Zakon, 2003; Thornhill et al., 2003) pero con distinta cinética ya que este tipo de canales se comporta como un rectificador retardado con cinética de inactivación más lenta. La cuestión de la naturaleza molecular de estos canales y de los responsables de I_K permanece abierta (ver más abajo).

La DPA en *Gymnotus* es extremadamente breve (0.57 ± 0.16 ms), un valor remarcable si se tiene en cuenta que nuestros registros son hechos a temperatura ambiente ($20-22^\circ\text{C}$). I_A juega un rol importante en la repolarización del PA y en

reducir la DPA dado la V_{50} relativamente positiva de ~ -19 mV y la cinética rápida típica de esta corriente en electrocitos de *Gymnotus*. El valor de V_{50} es una indicación del V_m al cual I_A ejerce su efecto repolarizante más fuerte y coincide con la fase depolarizante del PA antes de que éste alcance su pico. Esto podría explicar lo breve y pequeños que son los PAs de los electrocitos de *Gymnotus* en relación con los de otras especies (Nakamura et al., 1965).

La DOE en *Gymnotus* es trifásica y las dos últimas ondas son el resultado de la activación secuencial de las caras caudales y rostrales de los electrocitos caudales (Macadar 1993). Por lo tanto las DPA largas podrían causar resta de las corrientes extracelulares opuestas y simultáneas que se generan en las caras opuestas de los electrocitos cancelando, por lo tanto, la suma de corrientes a lo largo del OE. En el caso de

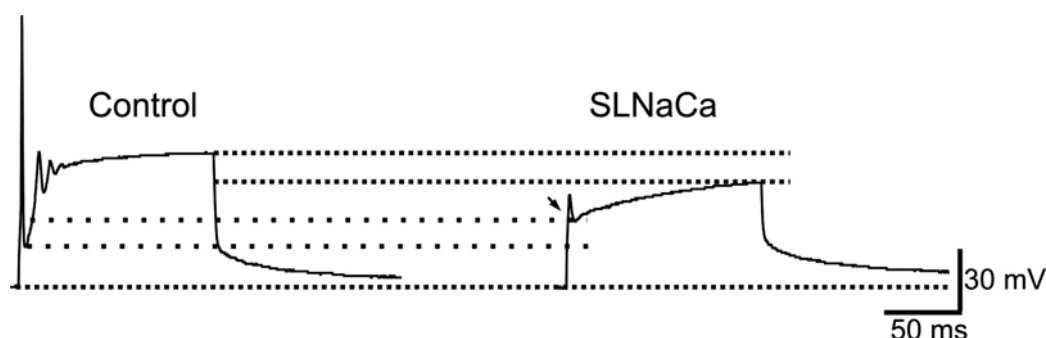


Figura VII-7. Respuesta “remanente” sin Na^+ ni Ca^{2+} . A la izquierda la respuesta a un pulso de corriente depolarizante (125 ms; 1000 nA) en condiciones control. Obsérvese la respuesta típica: el PA inicial, la oscilación atenuada y el plateau. A la derecha la respuesta a un pulso idéntico en SLNaCa. Nótese que la depolarización final (plateau) disminuyó como lo indican las dos líneas punteadas finas. A su vez también disminuye el valor de la repolarización máxima alcanzada (línea punteada gruesa). La flecha indica la respuesta “remanente” en forma de pequeña espiga.

los electrocitos de *Gymnotus*, los PAs breves pueden ser una garantía para esa suma. Consistente con lo anterior, se ha descrito I_K (en ausencia de I_A) en especies relacionadas con DOE monofásicas (Nakamura et al., 1965; Shenkel y Sigworth, 1991; Ferrari y Zakon, 1993; McAnelly y Zakon, 2000; Thornhill et al., 2003) y por lo tanto, I_A es un factor clave en la generación de PAs breves y de la DOE multifásica de *Gymnotus*. Si esto es cierto I_A debería estar presente en otros Gymnotiformes con DOEs multifásicas, una posibilidad que queda por investigar. I_A también podría jugar un rol en el acortamiento del período refractario que permite las descargas de alta frecuencia que podrían alcanzar eventualmente hasta 200 Hz (Bennett 1971). La especie relacionada *Brachyhyopomus pinnicaudatus* tiene una DOE bifásica y breve y es capaz de generar trenes de alta frecuencia de hasta 600 Hz conocidos como “chirps” (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; R. Perrone, comunicación personal). Los chirps requieren tanto de PAs breves como de período refractario corto lo cual podría ser permitido gracias a I_A . No se puede descartar que *Gymnotus* tenga ese tipo de señales de comunicación que no han sido descritas hasta ahora.

La DPA es un determinante importante de la forma de onda de la DOE por lo tanto un cambio en la duración (por modulación de la dependencia del voltaje) o del número de canales de I_A expresados podría ser el mecanismo por el cual las hormonas esteroideas median los cambios en la duración que ocurren en los diferentes componentes de la DOE de *Gymnotus* y de *Brachyhyopomus* (Hagedorn y Carr, 1985; Ardanaz et al., 2001).

Vimos que el TEA no afectó la repolarización del PA en la misma medida que la 4-AP y no hubo un bloqueo específico claro de las corrientes activadas por depolarización. Además el TEA extracelular solo bloqueó parcialmente a la I_A y a I_K . Sin embargo TEA aumentó la R_{in} sugiriendo que inhibe a una corriente de K^+ activa en el reposo. En contraste 4-AP inhibió a la I_A pero tuvo un efecto mucho menor sobre I_K .

La presencia de I_K en los electrocitos de Gymnotiformes fue descrita previamente (Shenkel y Sigworth, 1991; Ferrari y Zakon, 1993). Este tipo de corrientes es mediada en los electrocitos por canales de K^+ de la familia K_v1 (Few y Zakon, 2003; Thornhill et al., 2003) y lo mismo podría suceder en *Gymnotus*. En los electrocitos bien estudiados de *Sternopygus* esta corriente juega un rol de modulación de la DPA inducida por esteroides (McAnelly y Zakon, 2000; Few y Zakon 2003).

VII.3. Interacción de las conductancias activadas por depolarización.

Como ya vimos en el Capítulo VI el efecto de la TTX a altas concentraciones bloquea el PA de los electrocitos. Sin embargo en esas condiciones siempre se observa una respuesta remanente, como si la TTX no fuera suficiente como para bloquear todos los canales de Na^+ (Fig. VI-3E). En I SLNaCa también es posible ver que se observa una respuesta remanente (Fig. VII-7, flecha). En esas condiciones también se ve una disminución de la caída de voltaje provocada por la depolarización, es decir la pérdida de los plateaus de Na^+ . Por lo tanto, es difícil sostener que la respuesta remanente como debida al Ca^{2+} .

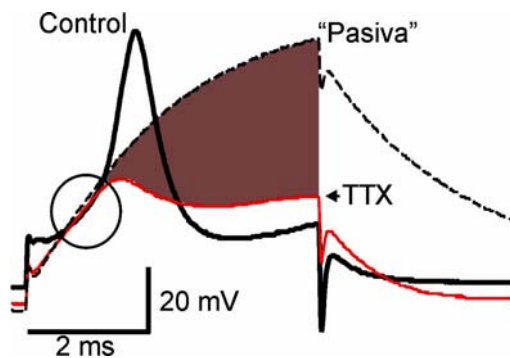


Figura VII-8. Rol de las conductancias de K^+ en la respuesta "remanente". Superposición de las respuestas a un pulso de corriente depolarizante breve (5 ms) en condiciones Control (trazo continuo negro), con el agregado de TTX (trazo rojo) y con TTX en SLKCa (trazo punteado). El círculo marca la zona de superposición en las tres condiciones, después de esa zona el V_m cambiará de trayectoria dependiendo de las conductancias que entren en juego. En las condiciones Control las conductancias de Na^+ determinan la descarga del PA. Cuando se bloquean estas conductancias con TTX el V_m tiende a hiperpolarizarse por la activación de conductancias de K^+ . Cuando se bloquean todas las conductancias voltaje-dependientes (TTX + SLKCa, indicada como "pasiva") el comportamiento del V_m sigue una trayectoria típica de un circuito RC. El área sombreada representa la hiperpolarización debida a las conductancias de K^+ .

En el experimento de la Fig. VII-8 se muestra como el bloqueo de las corrientes de Na^+ con TTX deja una respuesta a los pulsos depolarizantes cortos. En estas condiciones, la utilización de SLKCa, en presencia de TTX, nos ayuda a explicar el mecanismo de esta respuesta "depolarizante". El efecto de esta

solución no es una caída de la respuesta depolarizante sino, por el contrario, una mayor depolarización. Esto nos sugiere que, en condiciones control, la depolarización del pulso por las propiedades pasivas alcanza el nivel de disparo para el PA. No parece lógico que exista una conductancia de K^+ que dificulte la llegada al nivel de disparo. Sin embargo todo parece indicar que es importante lograr una alta conductancia de membrana en todo momento, aún a costa de dificultar la llegada del V_m al nivel de disparo del PA. La fase de ascenso del mismo se debe a la activación de I_{Na} . La fase de repolarización se debe a las corrientes de K^+ (principalmente a I_A , como ya vimos). El bloqueo de I_{Na} previene la depolarización del PA y esa depolarización menor, a su vez, hace menos efectiva la repolarización por corrientes de K^+ . Eso se aprecia por el hecho de que, en tiempos que corresponderían a la repolarización del PA el valor de V_m alcanzado bajo TTX es menos negativo, más alejado del potencial de equilibrio del K^+ .

En las condiciones finales estamos viendo lo que realmente sería una respuesta pasiva, la respuesta obtenida con TTX resulta ser de la depolarización pasiva en un momento (ver que los potenciales se superponen en parte del trayecto, círculo en Fig. VII-8) seguida por un efecto creciente de las corrientes de K^+ que tienden a hiperpolarizar la célula, alejándola de la trayectoria pasiva y acercándola al potencial

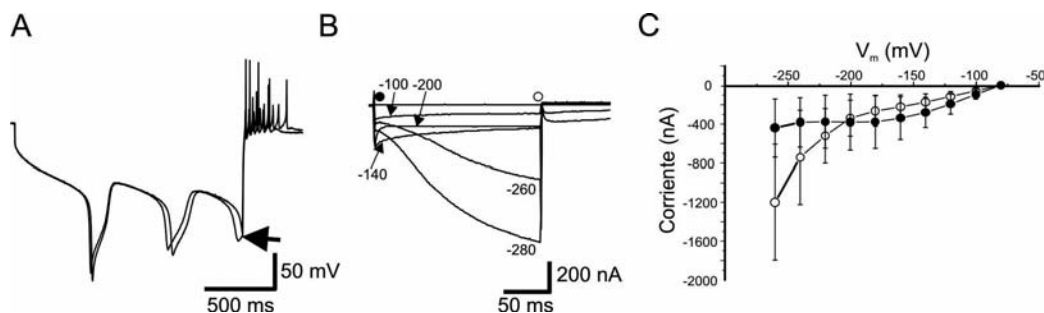


Figura VII-9. RHs y las corrientes que las determinan. A) RHs repetitivas superimpuestas provocadas por pulsos sucesivos de corriente hiperpolarizantes (1500 ms, 1000 nA). La última RH tipo espiga fue abortada en su pico por la terminación del pulso (flecha) indicando que no está mediada por un mecanismo regenerativo. Después del pulso se puede ver la descarga repetitiva de PAs. **B)** Corrientes activadas por hiperpolarización registradas en fijación de voltaje. Los comandos hiperpolarizantes entre -100 y -160 mV provocan una corriente rectificadora de entrada "instantánea" (IR1) seguida de una inactivación parcial que aumenta con el valor de la hiperpolarización. A potenciales más negativos se induce además una corriente rectificadora de entrada tardía (IR2) de mayor magnitud. **C)** La curva de la relación I-V promedio al inicio del pulso (círculos llenos) muestra una pendiente negativa entre -180 y -220 mV, consistente con una inactivación voltaje-dependiente. La corriente al final de los comandos (círculos vacíos) muestra valores menores que los de IR1 entre -80 y -200 mV, como resultado de la inactivación tiempo-dependiente parcial de esta corriente. La relación I-V lineal entre -80 y -180 mV probablemente representa la corriente de pérdida. A valores más negativos el aumento de la pendiente representa el aumento de conductancia debido a la activación de IR2.

de reposo. Esta activación "tardía" de canales de K^+ explicaría esa "respuesta depolarizante" remanente después del bloqueo con TTX. En realidad se trata de una "respuesta repolarizante" sobre lo que serían las respuestas pasivas.

VII.4. Respuestas hiperpolarizantes (RHs) y las corrientes que las explican.

Pulsos hiperpolarizantes en condiciones control provocaron una respuesta inicial de hiperpolarización en forma de rampa (Fig. VII-9A) seguida de hiperpolarizaciones similares a espigas hiperpolarizantes (amplitud desde el umbral 125.8 ± 33.2 mV; duración 182.3 ± 80.1 ms) que fueron provocadas cuando el V_m alcanzó un valor umbral (-214.5 ± 26.4 mV; $n=36$) (Fig. VII-9A). Estas respuestas hiperpolarizantes (RH) consistieron en respuestas con un comienzo abrupto hiperpolarizantes y una depolarización más lenta con una "joroba" (previamente descritas por Bennett y Grundfest, 1966). Las RHs terminan abruptamente cuando se interrumpe el pulso de corriente, aun en el pico de la hiperpolarización indicando que no son respuestas regenerativas activas (Fig. VII-9A, flecha). El pico de la RHs estuvo a valores promedio de V_m muy negativos (-340.4 ± 44.5 mV; $n=36$).

En la configuración de fijación de voltaje los comandos hiperpolarizantes generaron corrientes de entrada que mostraban rectificación de entrada. Al inicio de los saltos de voltaje se observó una corriente de entrada instantánea que mostró inactivación dependiente del tiempo y del voltaje. Estas inactivaciones aumentaron con la hiperpolarización (Fig. VII-9B). A esta corriente la llamamos rectificador de entrada 1 (IR1). Con hiperpolarizaciones mayores se activó otra corriente de entrada con una cinética más lenta a la que llamamos rectificador de entrada 2 (IR2) (Fig. VII-9B). Las relaciones I-V medidas al inicio de los saltos de voltaje (círculos llenos, Fig. VII-9C) y al final (círculos vacíos, Fig. VII-9C) muestran el diferente comportamiento de estas corrientes. La pendiente negativa en la curva I-V a valores de V_m intermedios entre -180 y -240 mV al inicio de los saltos de voltaje fue causada por la inactivación tiempo y voltaje dependiente típica de IR1 (Fig. VII-9C). Dentro de esos voltajes negativos la constante de tiempo de la inactivación

también disminuye (Fig. VII-9B). La curva I-V tomada al final de los saltos de voltaje muestra un incremento gradual de la corriente con una relación lineal hasta los -200 mV y un mayor aumento en la pendiente que corresponde a la activación tardía de IR2 a voltajes más negativos (círculos vacíos, Fig. VII-9B).

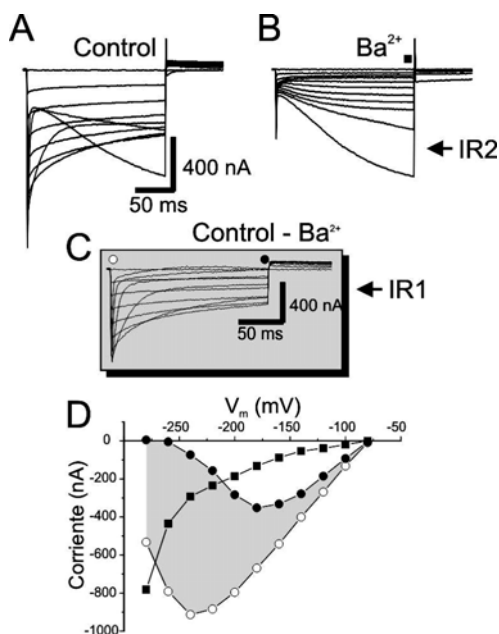


Figura VII-10. Aislamiento de IR1 e IR2. A) Corrientes IR1 e IR2 inducidas por comandos hiperpolarizantes en condiciones Control. En estos experimentos la corriente de pérdida lineal no fue sustraída. B) Perfusión con $BaCl_2$ 1 mM bloqueó IR1 sin afectar a IR2. C) IR1 fue aislada por resta de IR2 (aislada con Ba^{2+}) a partir de la corriente total ($IR1+IR2+pérdida$). Nótese que IR1 mostró inactivación tiempo- y voltaje-dependiente. D) Relaciones I-V de las corrientes de entrada activadas por hiperpolarización y medidas al inicio de los comandos de voltaje (pico de IR1; círculos vacíos) y antes del final del comando (IR1 inactivada; círculos llenos). Los cuadrados corresponden a IR2 (aislada con Ba^{2+}) y la corriente resistiva de pérdida medida antes del final del comando.

Estas dos corrientes también mostraron una sensibilidad diferente al Ba^{2+} extracelular; IR1 fue bloqueada totalmente por Ba^{2+} 1 mM mientras que IR2 no fue afectada. Por lo tanto ambas corrientes pueden ser analizadas aisladamente, IR2 con bloqueo de IR1 con Ba^{2+} (Fig. VII-10B) e IR1 al restarle las corrientes registradas con Ba^{2+} a las corrientes registradas en condiciones control (Fig. VII-10C). Al comienzo del pulso las corrientes pico aumentaron monótonicamente con la hiperpolarización desde -80 mV hasta -240 mV para luego disminuir con hiperpolarizaciones mayores (círculos vacíos, Fig. VII-10D). A la

terminación del pulso la curva I-V muestra un perfil en forma de U similar pero con valores de corriente menores para todos los valores de V_m explorados, consistente con la presencia de una inactivación dependiente del tiempo típica de IR1.

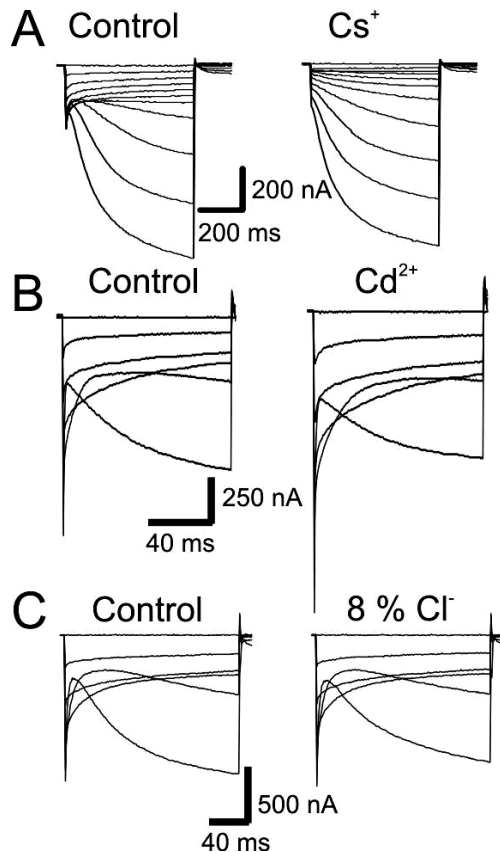


Figura VII-11. Identificación de IR1 e IR2. A) Corrientes en Control (izquierda) y bajo el efecto de 3mM de Cs⁺ (derecha). B) Lo mismo que en A mostrando que el Cd²⁺ (3 mM) no modifica IR1 ni IR2. C) La S8%Cl no modifica IR1 ni IR2.

El Cs⁺ extracelular (3 mM) produjo el mismo efecto que el Ba²⁺ bloqueando IR1 sin afectar IR2 sugiriendo que este último tipo de corriente no se trata de una corriente de tipo H (Fig. VII-11A). El Cd²⁺ extracelular no afectó a ninguna de las dos corrientes (Fig. VII-11B). Bajas concentraciones de Cl⁻ en el medio extracelular (8%) respecto al control por sustitución del NaCl y el KCl con metansulfonato de Na⁺ (130 mM) y acetato de K⁺ (5 mM), respectivamente, tampoco modificaron IR1 ni IR2 (Fig. VII-11C). La IR1 es probablemente el mismo rectificador de entrada sensible a Ba²⁺ y Cs⁺ descrito por Ferrari y Zakon (1993) en los electrocitos de *Sternopygus* y que mostró un comportamiento lineal desde el reposo hasta los -140mV. El rectificador de entrada de K⁺

I_{AB} descrito por Araque y Buño (1991) en el músculo de cangrejo presenta ciertas similitudes con IR2. Sin embargo, mientras IR1 fue bloqueado por Ba²⁺ y Cs⁺, IR2 no fue afectada por Cs⁺, Ba²⁺ o Cd²⁺. Este último fue capaz de bloquear la I_{AB}. El Cd²⁺ también fue capaz de bloquear la corriente de Cl⁻ caracterizada por Clark et al (1988) en neuronas simpáticas que presentaba características similares a IR2. Esto junto con la persistencia de IR2 con niveles bajos de Cl⁻ en la solución (8%), indican que esta corriente es mediada por K⁺ y no por Cl⁻. El K_{ir}2.1 que se expresa en músculo parece tener una cinética más vinculada con IR2. Sin embargo se bloquea con Ba²⁺ y Cs⁺. Por otro lado Kir2.2 tiene una inactivación muy parecida a IR1. Estas corrientes rectificadoras de entrada (I_{Kir}) que permean K⁺ son bloqueadas por Ba²⁺ y Cs⁺. Por otro lado las corrientes activadas por hiperpolarización de tipo I_h, que permean K⁺ y Na⁺, son bloqueadas por Cs⁺ pero no por Ba²⁺. Teniendo en cuenta estos antecedentes parecería que IR1 podría ser debida a un canal del tipo K_{ir}2.2 mientras que no podemos saber que tipo de canal es responsable de IR2. Esta última sería una corriente no descrita hasta ahora.

Para estimar la relación funcional entre el V_m y la conductancia total, que provee una estimación de la proporción de canales abiertos, calculamos las curvas de activación de IR1 e IR2. La conductancia de IR1 fue máxima en reposo y disminuyó a 0 cerca de -250 mV (Fig. VII-12A). Para IR2, en que no se pudo alcanzar el máximo de activación con los V_m usados, ajustamos los valores de conductancia a la ecuación de Boltzmann y usamos el valor máximo para normalizar y construir la curva de activación (Fig. VII-12B). La curva que representaría a IR2 mostró una conductancia de reposo de aproximadamente el 30% relativa a la mayor conductancia estimada (línea punteada, Fig. VII-12B) que en realidad estaría representando a la corriente de pérdida. La conductancia de IR2 aumentó a partir de los -200 mV para alcanzar un máximo a cerca de los -300 mV (Fig. VII-12B). Las líneas verticales y el sombreado en las Fig. VII-12A-C indican la media y el desvío estándar de el V_m umbral para las RHs generadas en fijación de corriente (ver más arriba). Nótese que hay una alta probabilidad de alcanzar el umbral de la RHs a V_m s en los que la probabilidad de apertura tanto de IR1 como de IR2 alcanza valores por debajo del 50% de sus máximos

respectivos. Además hay que agregar que para estos valores de V_m se produce una caída de la τ de inactivación de IR1 (Fig. VII-10C). Esto también contribuiría al rápido incremento en la resistencia de membrana que explicaría la fase de descenso de las RHs.

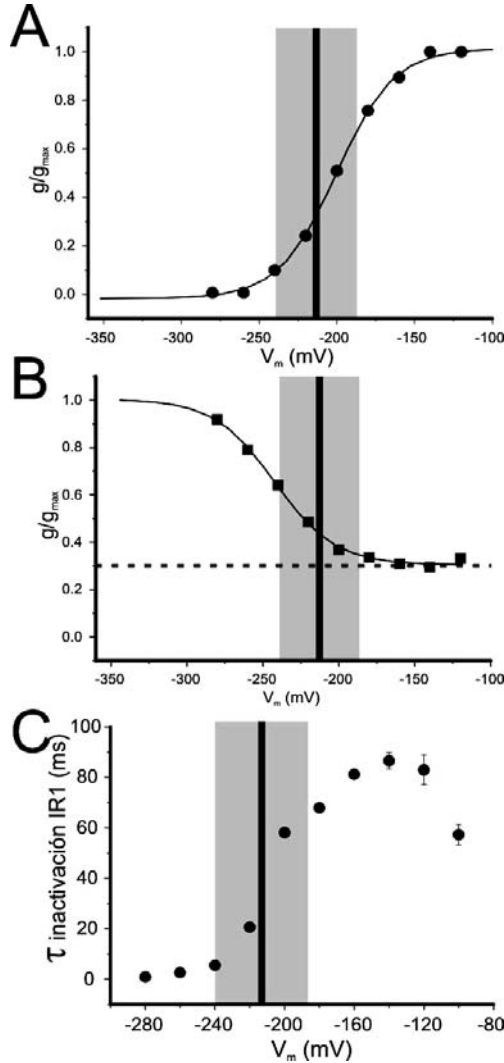


Figura VII-12. Rol de IR1 e IR2 en la generación de las RHs. A) Curva de activación de IR1 construida con los datos tomados de la figura VII-8D (círculos llenos). Los puntos fueron calculados asumiendo un potencial de equilibrio del K^+ de -80 mV; la línea continua representa el ajuste de los datos con el formalismo de Boltzmann ($V_{50} = -200.4 \pm 1.0$ mV). La línea vertical representa el valor promedio del umbral de las RHs (-214.5 mV) y el área gris el desvío standard del mismo, es decir los valores de V_m en los cuales es más alta la probabilidad de que se dispare una RH. B) Lo mismo que A para IR2, V_{50} fue de -242.3 ± 3.4 mV (tomando los datos de VII-8D; cuadrados llenos). La línea punteada indica el valor de saturación del ajuste en 30.5% de la conductancia máxima, esto es la corriente de pérdida que persiste después del bloqueo de IR1. La línea vertical y la zona gris igual que en A. C) Relación de la constante de tiempo (τ) de la inactivación de IR1 con el V_m . La línea vertical y la zona gris igual que en A.

La inactivación voltaje y tiempo dependiente de IR1 y el subsiguiente aumento de la R_{in} explican la hiperpolarización sostenida de los electrocitos y la fase de hiperpolarización de las RHs. La activación de IR2 a valores cercanos a -300 mV media la "fase repolarizante" de la RH.

Además de IR1 e IR2 ya descritas existe una corriente de pérdida. De acuerdo a los datos ya vistos, IR1 se encuentra abierta en reposo o se abre casi instantáneamente. También se encuentra abierta la corriente de fondo a la que llamaremos I_b . La conductancia en reposo de los electrocitos depende de las conductancias de los canales responsables de IR1 e I_b y los cambios iniciales por hiperpolarización dependerán de estas conductancias. Como ya vimos IR1 se inactiva en función del tiempo y también en función del voltaje. Esto determina que la hiperpolarización producida por una corriente y sostenida en el tiempo va a llevar a que la caída de voltaje sea cada vez mayor. Esta caída de voltaje en el tiempo dependerá de las características temporales de inactivación de IR1 e irá aproximándose a la caída de voltaje determinada por la conductancia de I_b . Cuando V_m alcanza los valores a los cuales IR1 se inactiva total y abruptamente, la caída de voltaje sólo dependerá del valor de conductancia de I_b . En esos valores que rondan los -220 mV encontramos el umbral promedio para la aparición de las RHs (-214.5 mV). Podemos decir que la aparición de las RHs es debida a que la membrana de los electrocitos pasa de un estado en que su resistencia depende de las conductancias de IR1 e I_b a un estado en el que pasa a depender exclusivamente de I_b y, por lo tanto, la caída de voltaje producida por nuestra corriente inyectada es mucho mayor.

Una vez que el V_m se hace más negativo se aproxima a los valores a los cuales la conductancia de IR2 se hace máxima (cercano a los -300 mV). Este aumento de la conductancia determina nuevamente que la caída de voltaje producida por nuestro pulso baje y entonces estamos frente a la repolarización de la RH. Esto lleva nuevamente la membrana a condiciones similares a las iniciales y si seguimos hiperpolarizando podemos obtener nuevamente un ciclo similar obteniendo HRs repetidas.

VII.5. Posible rol funcional de las conductancias dependientes de K^+ .

Las formas de onda de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* muestran cambios en la amplitud de la última onda negativa con el aumento de la temperatura. Esta sensibilidad a la temperatura está vinculada con el estado reproductivo y es modificada por las hormonas esteroides y la aclimatación (Caputi et al., 1998; Silva et al., 1999; Ardanaz et al., 2001; Quintana et al., 2004). La sensibilidad a la temperatura del agua puede estar relacionada con un aumento de las conductancias de membrana como se describió en *Gymnotus* y *Brachyhypopomus* (Macadar et al 1997). IR1 o una corriente de pérdida podrían ser el blanco de la sensibilidad a la temperatura ya que están activas en el reposo. Aunque es posible que los potenciales hiperpolarizantes alcanzados durante la RHs nunca sean alcanzados en condiciones funcionales IR1 e IR2 pueden jugar también un control en el flujo de corrientes extracelulares que son de gran magnitud en el OE (Caputi y Budelli 1995). Las corrientes longitudinales grandes que subyacen la DOE generadas por la actividad sincronizada de todos los electrocitos que componen El OE pueden ser especialmente importantes en el pequeño diámetro de la

punta de la cola donde se encuentran los electrocitos estudiados por nosotros. En esta región la densidad de corriente longitudinal puede alcanzar valores de más de 100 $\mu A/cm^2$ en el pico de las ondas principales V3 y V4 (Caputi y Budelli 1995). El control de estas grandes corrientes extracelulares por los rectificadores de entrada podría ser importante para direccionar longitudinalmente las corrientes y limitar interacciones efápticas no deseadas entre electrocitos pertenecientes a tubos vecinos. Por otro lado ya que IR1 está activa en el reposo cuando la depolarización comienza durante el PA la conductancia del rectificador disminuye rápidamente. Este apagado rápido de IR1 podría aumentar la excitabilidad y modificar la conducta del electrocito. Los rectificadores de entrada son sensibles a la concentración extracelular de K^+ y el V_m sigue una relación con la raíz cuadrada con la conductancia del rectificador de entrada en las células musculares (Standen y Stanfield 1978) una relación que podría estar presente en los electrocitos de *Gymnotus*. Por lo tanto ya que IR1 está activa en el reposo una posible reducción de la concentración extracelular de K^+ hiperpolariza y la conductancia del rectificador aumenta aumentando la hiperpolarización y proveyendo de una retroalimentación positiva que podría ser importante en el control de las corrientes extracelulares.

Capítulo VIII. El campo eléctrico de un electrocito.

VIII.1. Características del campo eléctrico generado por un electrocito.

Utilizando la técnica descrita en el capítulo V se determinó el campo eléctrico generado por un electrocito. Cuando se estimula el electrocito con electrodos intracelulares y se mueve un tercer electrodo a lo largo del eje longitudinal del OE pasando sobre el electrocito se puede comprobar que la cara caudal tiene un menor umbral y es la primera en descargar. Eso se evidencia por la negatividad registrada caudalmente respecto al electrocito (Fig. VIII-1). Luego se activa la cara rostral y eso se evidencia como una positividad caudal y una negatividad rostral (Fig. VIII-1). Se puede observar que cuando el electrodo extracelular se ubica sobre la cara lateral el registro es menor, eso estaría reafirmando que las caras laterales juegan un rol muy pobre o nulo en la generación de los potenciales de membrana activos de los electrocitos y tampoco participan en forma pasiva cerrando los circuitos locales de circulación de corriente. Estos registros parecen indicar que el PA "salta" de la cara caudal a la rostral sin invadir las caras laterales.

En el experimento de la Fig. VIII-2, donde se estimuló el NEP hasta obtener un PA en el electrocito que se estaba registrando (y se destruyeron los electrocitos vecinos) se puede ver que hay una "muesca" en el PA probablemente debido a la activación marcadamente separada de la cara caudal y rostral en forma sucesiva. Se confirma que primero se activa la cara caudal provocando una negatividad (colores rojos en la Fig. VIII-2) del lado caudal del electrocito y luego la polaridad del dipolo se invierte cuando se activa la cara rostral. No se observan valores que se aparten mucho del 0, en un sentido o en otro a los lados de los electrocitos. Esto estaría también confirmando los datos de la inmunohistoquímica que muestran que las caras con canales de Na^+ son las caras caudales y rostrales. Los datos obtenidos permiten concluir, entonces, que las corrientes generadas por los electrocitos circulan en la dirección longitudinal del OE y

que hay muy poca corriente que circule en sentido lateral. Esto estaría mostrando además que las caras laterales tampoco funcionan como fuentes de corriente que permitan la circulación de corriente durante la repolarización para cerrar el circuito en aquellas caras. Las caras rostrales y caudales funcionan como sumideros y fuentes de corriente determinando que las corrientes circulen principalmente en sentido longitudinal. Los datos surgen del análisis del campo de un electrocito considerando la teoría del conductor de volumen. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en nuestro caso es obvio que no existe la isotropía del tejido necesaria para darle valor cuantitativo a los resultados.

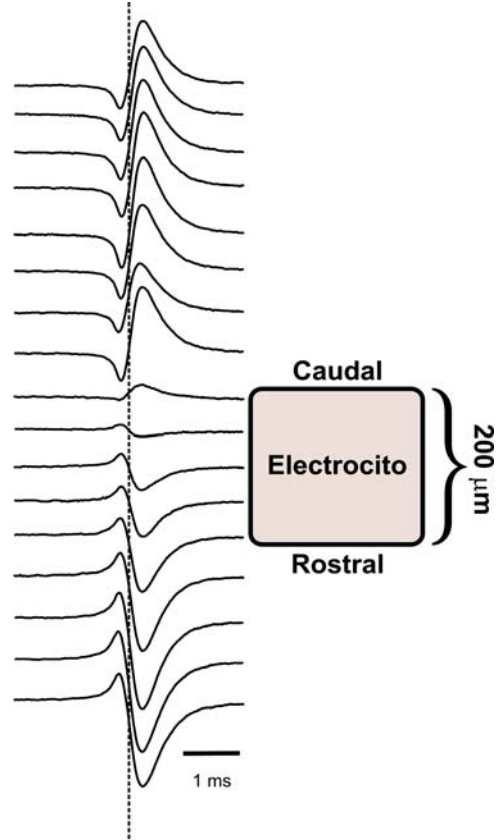


Figura VIII-1. Registro extracelular a lo largo de un electrocito. Registros extracelulares a lo largo de un electrocito (esquemático en la figura). Los registros se hicieron sobre la línea media del electrocito y a distancias de 50 μm uno de otro. El electrocito fue estimulado intracelularmente y se registraba simultáneamente el PA provocado por un pulso corto (2.5 ms). La línea punteada que atraviesa los registros señala el pico de dicho PA respecto al cual se sincronizaron los registros.

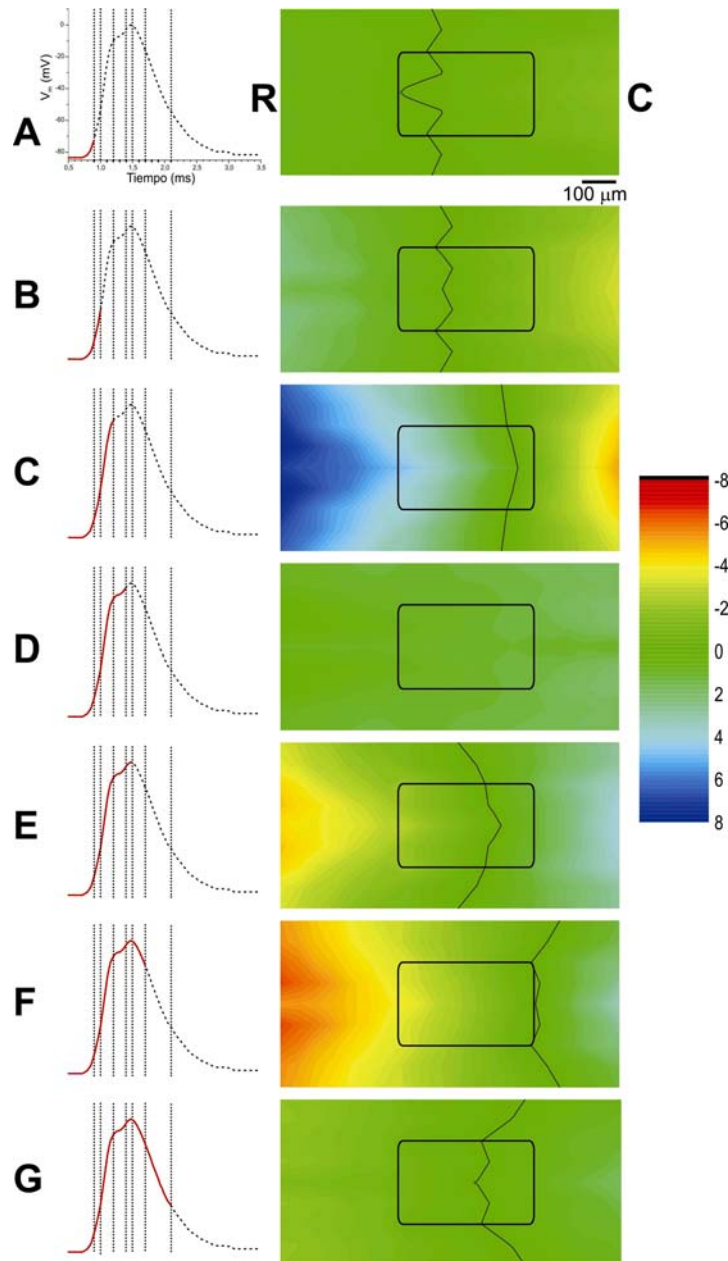


Figura VIII-2. Campo eléctrico alrededor de un electrocito. Campo eléctrico de un electrocito generado por la activación de un PA provocado por estimulación del NEP. Se tomaron diferentes tiempos respecto al inicio del estímulo. Se midieron los valores en una grilla de valores alrededor de una mitad del electrocito y se muestra la imagen especular suponiendo que la actividad es simétrica. Los valores en la escala de colores a la derecha representan mV. A la izquierda se muestra el PA registrado intracelularmente y en rojo el trayecto correspondiente al tiempo ya transcurrido hasta el registro, para simplificar la figura el PA que se muestra es el que se obtiene al comienzo del registro, debe tenerse en cuenta que, si bien el registro se mantuvo estable a lo largo del experimento, ocurrieron pequeñas variaciones en la forma de onda y en los tiempos de los fenómenos analizados. **A)** Campo generado a 1.4 ms, cuando apenas comienza la respuesta, probablemente durante el PSP. No hay variaciones mayores en el potencial registrado con la discriminación de colores usada, sin embargo existe una negatividad caudal (C) respecto al electrocito. La línea continua negra representa el 0. **B)** Campo a 1.5 ms cuando ya se aprecia el arranque del PA. Se pueden ver claramente valores negativos caudales (amarillo) y una positividad rostral (celeste). **C)** Campo medido a 1.7 ms, cerca del cambio de pendiente que podría estar indicando el pico del PA generado en la cara caudal. Se ve claramente la negatividad caudal y la positividad rostral. **D)** Registro a 1.9 ms, en el ascenso del segundo pico. En el campo se observan valores negativos en todas las posiciones (no se ve la línea del 0) con valores claramente positivos caudales que pueden estar representando la repolarización del PA caudal. **E)** Registro a 2.02 ms, en el pico absoluto del PA. Se observa ahora la negatividad rostral y la positividad caudal. **F)** Registro a 2.2 ms cuando ya ha pasado el pico se sigue observando una gran negatividad rostral y el cero se ha desplazado hacia la porción caudal del electrocito. **G)** Registro a 2.6 ms cuando ya todo ha pasado se observa todavía positividad del lado caudal del electrocito.

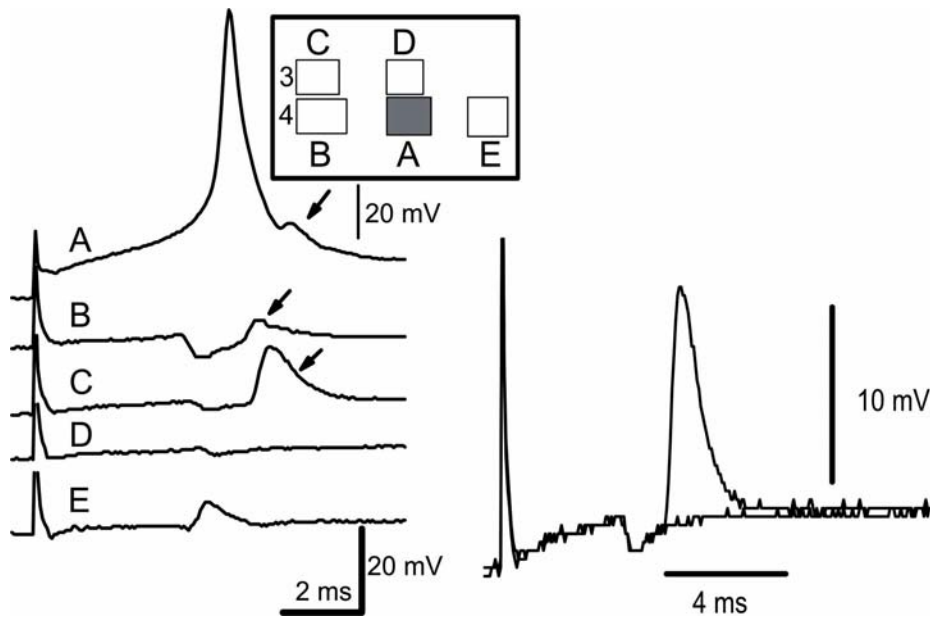


Figura VIII-3. Activación de botones sinápticos por corrientes de acción de electrocitos vecinos. Registros intracelulares en varios electrocitos vecinos. En el electrocito A (ver recuadro) se colocó un electrodo para pasar corriente depolarizante. Un segundo electrodo se utilizó para registrar el potencial de membrana en cinco electrocitos (A-E). En A se registra el comienzo de la respuesta a un pulso depolarizante largo (150 ms), se observa un potencial de acción provocado por ese pulso. Sin modificar los parámetros de estimulación se penetró a los demás electrocitos (B-C) y se registró el potencial de membrana. En B y C, además del potencial de campo generado por el electrocito A se observan potenciales sinápticos (flechas) provocados por la activación de terminales sinápticas debido a las corrientes de acción generadas en el electrocito A. No deben considerarse las comparaciones entre registros en la escala temporal ya que no se trata de registros simultáneos. A la derecha se observan dos registros sucesivos y superpuestos en el electrocito C. En uno de ellos falla la generación del potencial sináptico. La aparición de potenciales sinápticos parece ser "todo o nada" sugiriendo que ese potencial sináptico de más de 10 mV es generado por un solo botón sináptico.

VIII.2. Evidencias de interacciones efápticas entre electrocitos.

En varios experimentos de fijación de corriente se observaron pequeñas jorobas al final de la fase descendente del PA (Fig. VIII-3, A). Registrando en los electrocitos vecinos, que no eran estimulados directamente, se pudo observar que también, en algunos de ellos, se podían ver depolarizaciones pequeñas a continuación de los cambios de potencial determinados por la circulación de las corrientes de acción generadas en el electrocito estimulado (Fig. VIII-3). Los electrocitos que presentaron estas depolarizaciones, además del propio electrocito estimulado, fueron los que se encontraban en posición rostral respecto a éste (Fig. VIII-3, B, C). En algún electrocito estas depolarizaciones fueron del orden de los 10 mV y presentaban fallas que mostraban que eran "todo o nada" (Fig. VIII-

3, derecha). Todas estas características nos sugieren que las corrientes de acción generadas por un electrocito son capaces de activar las terminales sinápticas sobre los electrocitos vecinos y que las depolarizaciones observadas son PSPs unitarios. Esto nos muestra que es posible que haya interacciones efápticas entre los electrocitos vecinos, aunque sea indirectamente al estimular las terminales de las EMNs. Si bien esto no demuestra que en condiciones fisiológicas estas influencias jueguen un papel importante, es posible suponer que los efectos del campo eléctrico ayuden a descargar a los electrocitos o que el efecto de factores que modulan la forma de onda de la DOE utilicen estas influencias como blanco de sus acciones, modificando de alguna manera las características del campo eléctrico que rodea a cada electrocito, ya sea modificando la fuente del campo o modificando la resistencia del medio externo.

Capítulo IX. Conclusiones y Perspectivas.

Las propiedades básicas (V_m y R_{in}) de los electrocitos de *Gymnotus* no se diferencian en sus rasgos esenciales de las de otros electrocitos estudiados por otros autores. La resistividad de la membrana, muy baja comparada con otros tipos de células excitables, parece ser una característica de los electrocitos y es de suponer, por lo tanto, que es conveniente este hecho para su función.

Tal cual estaba descrito por Bennett y Grundfest (1959) *in vivo* los electrocitos de *Gymnotus* presentan descarga repetitiva cuando son estimulados por pulsos depolarizantes largos. Si bien este tipo de respuestas no es lo habitual en estas células en condiciones fisiológicas pone de manifiesto que las propiedades de membrana en estos electrocitos son más complejas que las que se describen para otros electrocitos. Eso es uno de los motivos del estudio de la descripción que constituyó el eje y principal objetivo de nuestro trabajo.

La amplitud de los PAs en la descarga repetitiva disminuye a lo largo de la descarga indicando la inactivación parcial de los canales de Na^+ y por otro lado se puede vislumbrar, en condiciones de fijación de corriente la presencia de un plateau subyacente.

Con pulsos breves o con activación sináptica se pudo observar la presencia de respuestas "subumbrales" activas sugiriendo la presencia de corrientes de Na^+ de bajo umbral similares a las observadas en *Electrophorus* (Altamirano, 1955a). Estas corrientes de bajo umbral podrían ser de fundamental importancia para permitir que se alcance el nivel crítico de V_m para la generación del PA en una célula que, como ya dijimos, tiene una baja resistividad de membrana y que recibe PSPs de múltiples fibras.

El bloqueo de las corrientes de K^+ y los experimentos de fijación de voltaje permitieron evidenciar, además de la corriente de Na^+ transitoria clásica (I_{NaT}), la presencia de dos corrientes persistentes dependientes de Na^+ (I_{NaPL} e I_{NaPH}) que producen dos tipos de plateaus (L-plateau y H-plateau) sensibles a TTX. Estas dos corrientes no se habían descrito con

anterioridad en electrocitos. Interpretamos que la corriente de bajo umbral (I_{NaPL}) está relacionada con las respuestas subumbrales ya señaladas. Algunos datos sin comprobación estadística parecen indicar que esta corriente sería debida a canales ubicados en las caras rostrales y estarían, por lo tanto, contribuyendo a la excitabilidad de esa cara y además de la generación del PA en la cara caudal adonde llega la inervación.

Los experimentos de inmunohistoquímica de canales de Na^+ mostraron que estos se expresan preferentemente en las caras rostrales y caudales de los electrocitos de *Gymnotus* al igual que lo visto por Stoddard (2006) en *Brachyhyopomus*. A su vez parecen concentrarse en algunos puntos de las membranas caudales, posiblemente rodeando las especializaciones sinápticas. La concentración de canales de Na^+ , del tipo responsable de la I_{NaT} , alrededor de las terminales sinápticas como se ha demostrado en sinapsis neuromusculares (Beam et al 1985) podría facilitar el efecto del PSP haciendo que en la cercanía de la terminal el nivel de disparo sea alcanzado más fácilmente. Algunos datos sugieren que los distintos tipos de canales de Na^+ se distribuyen diferencialmente en la membrana de los electrocitos, sin embargo eso no lo pudimos demostrar en nuestros experimentos de inmunohistoquímica ya que usamos un anticuerpo inespecífico para canales de Na^+ .

Se demostró que los canales de K^+ son importantes para determinar la brevedad de los PAs y para la descarga repetida de los mismos. La brevedad de los PAs puede ser de capital importancia en una especie en la que la forma de onda de la DOE implica la sucesión de ondas breves de polaridad opuesta cosa que no ocurre en las otras especies estudiadas. Que la descarga sea repetida en las condiciones experimentales en las que se observa no parece ser trascendente sino en el sentido de que es manifestación de la riqueza de conductancias presentes en los electrocitos de *Gymnotus*.

Existen dos tipos de corriente de K^+ , una con inactivación rápida (I_A) que no se había descrito con anterioridad en electrocitos y otra del tipo rectificador retardado (I_K). La

primera es la principal determinante de la corta DPA en los electrocitos de *Gymnotus* y es razonable que exista en esta especie cuya DOE bifásica requiere de la activación sucesiva de ambas caras y no haya en las otras especies estudiadas en las que la DOE es monofásica, lo que implica la activación de una sola cara del electrocito.

La hiperpolarización de los electrocitos mostró la presencia de respuestas hiperpolarizantes que ya habían sido descritas por Bennett y Grundfest (1966). El análisis de las corrientes activadas por hiperpolarización (dependientes de K^+) muestra que los dos tipos de rectificadores de entrada (IR1 e IR2) son responsables de estas respuestas. No está claro cual podría ser la importancia funcional de estas corrientes y de los tipos de respuestas que determinan. No debe descartarse, sin embargo, que en las condiciones naturales en que hay grandes corrientes circulando a lo largo del OE las membranas puedan ser afectadas con hiperpolarizaciones suficientes como para poner en juego a estas respuestas y que de alguna manera estén orientando la circulación de esas corrientes en sentido longitudinal con el eje principal del cuerpo y del OE. Del mismo modo puede pensarse, en sentido contrario, el rol de la corriente I_{NaPH} que podría estar disminuyendo la resistencia cuando las membranas son depolarizadas y favoreciendo las corrientes en ese sentido.

El campo eléctrico alrededor de un electrocito durante su activación se muestra como la sucesión de dos dipolos, con distinta polaridad, representados por las caras caudales y rostrales. Durante la fase depolarizante del PA se observa una negatividad caudal mientras que más tardíamente en el PA esta polaridad se invierte. En ningún momento parece haber dipolos orientados lateralmente. Esto último parece reforzar la idea de que las caras activas de los electrocitos son las caras caudales y rostrales.

Existen evidencias indirectas de que las corrientes de acción durante el PA son capaces de activar las terminales sinápticas de los electrocitos vecinos pudiendo ser este un mecanismo que colabore con la sincronización de la DOE en los distintos niveles.

No resulta fácil imaginarse que ocurre en el OE cuando circulan corrientes de gran intensidad a lo largo del mismo enfrentando membranas que están orientadas en paralelo entre sí y perpendiculares a la dirección de la

circulación de corriente pero que a la vez la polarización de estas membrana es opuesta. Las corrientes circulan enfrentando membranas que alternadamente serán depolarizadas o hiperpolarizadas por esa misma corriente.

Tratemos de hacer una descripción cualitativa de lo que debe ocurrir en un electrocito cuando es activado de acuerdo a nuestros datos.

Tengamos en cuenta que cada electrocito de la porción caudal del OE está innervado por terminales provenientes de varias EMNs espinales ubicadas en una porción amplia de la médula espinal. Ya vimos que existen varios mecanismos a nivel central que favorecen la sincronización de la descarga de las mismas. La activación de estas EMNs provocará PSPs compuestos que tendrán una forma y una duración que dependerá de cuan buena sea la sincronización del "pool" de 7 a 12 de esas neuronas. Podemos suponer que rodeando a las terminales y a sus especializaciones postsinápticas se haya una alta concentración de canales de Na^+ que determina la generación de I_{NaT} y que produce una rápida depolarización del electrocito. No debemos descartar que también en esta membrana se desarrollen corrientes del tipo I_{NaPL} que ayuden a "ecualizar" o "alisar" los PSP individuales y a sincronizar aún más su efecto sobre la membrana postsináptica. Tampoco debemos olvidarnos que las corrientes de otros electrocitos activados permitan que algunas terminales que pudieran no haber sido activadas a nivel central puedan ser ahora activadas y contribuyan al PSP compuesto. Se desarrolla, entonces, el PA en esta membrana y lo hace brevemente gracias a la rápida activación de I_A que limita la DPA. Durante esta breve depolarización también se estaría activando I_{NaPH} que generaría poca corriente pero que quizás contribuya a que durante el pico del PA haya una muy baja resistencia. Podríamos suponer que esa baja resistencia estaría facilitando la circulación de corrientes generadas por electrocitos vecinos en ese sentido sin que determinen la hiperpolarización de esa cara. Las corrientes de entrada (principalmente I_{NaT}) encuentran a las membranas laterales que no tendrían canales voltaje-dependientes y posiblemente tampoco muchos canales del tipo I_b . Esto favorecería a las corrientes circular hacia adelante depolarizando a las membranas rostrales. Como ya dijimos en estas membranas podrían activarse I_{NaPL} que

ayuden a alcanzar el nivel de disparo para el PA en esta cara. Una vez que ocurra esto, el sentido de la corriente a través del electrocito se invierte y produce otro PA breve. Es posible que el PA de la cara rostral no deba ser tan breve ya que está determinando el final de la DOE y no hay tanta necesidad de una corriente de salida de activación tan rápida como es I_A , quizás en esta cara tenga un rol más importante I_K . La corriente de entrada generada en la cara rostral ahora circula hacia atrás y depolarizaría a la cara caudal hasta alcanzar un nuevo PA si esta cara no se encontrara en período refractario. Esta cara de todas maneras tiene una baja resistencia de reposo lo que facilitaría la circulación de la corriente en ese sentido en el OE. Si pensamos en la cara rostral del electrocito vecino que está caudal respecto al que estamos analizando esta corriente estaría provocando una hiperpolarización. No podemos saber si esta corriente será suficiente como para provocar una hiperpolarización tal que desencadene una RH. En ese caso la respuesta hiperpolarizante actuaría como "freno" para la corriente longitudinal al ser debida al cierre de la IR1 por algunos milisegundos.

Esta descripción no es más que un modelo cualitativo de como debe funcionar el OEc, sería deseable, y podría ser parte de un proyecto futuro el lograr un modelo cuantitativo que permita reproducir el comportamiento eléctrico de cada electrocito. Eso a su vez permitiría construir un modelo realista de como funciona el OEc. Ese modelo permitiría también modificar distintas conductancias que expliquen los cambios que se producen en la DOE ante los factores ambientales y fisiológicos que la modifican. De esa forma nuestra investigación se podrá orientar a determinar las causas, a nivel celular de los cambios observados en la forma de onda de la DOE ante los cambios de temperatura o bajo efecto de las hormonas sexuales.

Hicimos experimentos preliminares, que no se presentan en este trabajo, para tratar de determinar la naturaleza molecular de los canales de Na^+ presentes en electrocitos de *Gymnotus* mediante la técnica de RT-PCR. Un experimento inicial hecho con la ayuda del Dr. José Sotelo Silveira en el que se usaron los primers utilizados por Lopreato et al (2001) muestra que en OE se expresa un único canal tal cual se describe en otras especies (Zakon et al 2006). La variación en la cinética de las corrientes en *Sternopygus*

debido a la diferenciación sexual le hizo sugerir a Zakon que debe haber al menos variaciones de los canales que se expresan en esta especie. El plantea la posibilidad de que se traten de diferentes tipos de canales o al menos de "splicing" alternativo de un mismo tipo de canal. De acuerdo a nuestros experimentos electrofisiológicos deberíamos encontrar al menos tres tipos de canales de Na^+ en OE de *Gymnotus*. No es posible descartar aun, de todas maneras, si no estamos ante un experimento fallido. Lo que esperamos encontrar es que se expresen tres tipos de canales en OE, un tipo de canal en músculo esquelético (correspondiente a $Na_v1.4$ en alguna de las formas ortólogas en peces) y quizás dos tipos de canales en corazón (correspondientes a $Na_v1.4$ y $Na_v1.5$ o sus homólogos en peces). Nosotros esperamos que las isoformas encontradas en OE coincidan con isoformas encontradas en músculo y corazón. El experimento nuestro no confirma esto pero nos plantea el desafío de continuar con el estudio molecular para ver si se encuentran más de un tipo de canal en el OE y comparar estos canales con los que se expresan en músculo esquelético y corazón.

Hemos podido observar en experimentos preliminares que la testosterona provoca, en pocas horas, un gran aumento de la amplitud de V_4 , más notorio que el que se observa en *Brachyhyopomus*. Nos proponemos en un futuro tratar de entender si este aumento se debe a un aumento de algún tipo de canales que provoca un incremento de la corriente que circula al final de la DOE o si se debe a un aumento del número de caras rostrales que descargan, suponiendo que hay una población, en condiciones normales, que no lo hace.

Se sabe que los aumentos de la temperatura del agua en la que viven los peces provocan cambio en la DOE, a corto y a largo plazo. Los cambios a corto plazo implican fundamentalmente una disminución de la amplitud de V_4 cuando se aumenta rápidamente la temperatura. Sin embargo en peces aclimatados a altas temperaturas (28-30°C) los aumentos rápidos de temperatura provocan un porcentaje menor de cambio, una suerte de termorresistencia. Esta termorresistencia no se manifiesta en muchos casos de inmediato sino que implica una especie de adaptación que ocurre en minutos: el cambio de temperatura produce un cambio en la DOE pero este es

compensado rápidamente. Esto parece ser fundamental para los peces en la época de altas temperaturas que coincide con el período reproductivo en estas latitudes. Los cambios producidos por la aclimatación pueden ser reproducidos por el tratamiento con testosterona. Resulta muy interesante estudiar estos cambios dinámicos que podrían implicar la presencia o ausencia de canales o al menos un cambio rápido en las propiedades de estos.

Nuestro trabajo planeado para el futuro implica caracterizar los efectos de la

testosterona sobre la DOE en el corto y largo plazo y como esto se puede explicar por cambios en las conductancias descritas en este trabajo.

El preparado de OE aislado es un modelo muy interesante para estudiar los efectos biológicos ya propuestos. Por otro lado permite estudiar los efectos de diferentes toxinas o drogas que actúen tanto a nivel de los canales voltaje-dependientes como a nivel de la sinapsis neuroelectrocítica como modelo simplificado de lo que es la sinapsis neuromuscular.

Bibliografía.

- Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ, Goldstein SA (2001) MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 104:217-231.
- Aguilera PA, Caputi AA (2003) Electroreception in *G. carapo*: detection of changes in waveform of the electrosensory signals. *J Exp Biol* 206:989-998.
- Aguilera PA, Castello ME, Caputi AA (2001) Electroreception in *Gymnotus carapo* : Differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *J Exp Biol* 204:185-198.
- Albe-Fessard D, Martins-Ferreira H (1953) Rôle de la commande nerveuse dans la synchronisation du fonctionnement des éléments de l'organe électrique du gymnote, *Electrophorus electricus* L. *J Physiol (Paris)* 45 : 533-546.
- Albert JS, Crampton WGR (2005) Diversity and phylogeny of neotropical electric fishes (gymnotiformes). In: *Electroreception* (Bullock TH, Hopkins CD, Popper AN, Fay RR, eds), pp 360-409. New York: Springer.
- Almers W, Palade PT (1981) Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline gap technique. *J Physiol (London)* 312:159-176
- Altamirano M (1956) Effect of acetylcholine in the electroplax of electric eel. *Biochim. Biophys. Acta* 20: 323-336
- Altamirano M & Coates CW (1957) Effect of potassium on electroplax of *Electrophorus electricus*. *J Cell Physiol.* 49:69-101.
- Altamirano M, Coates CW, Grundfest H (1955a) Mechanisms of direct and neural excitability in electroplaques of electric eel. *J. Gen. Physiol.* 38: 319-360.
- Altamirano M, Coates CW, Grundfest H, Nachmansohn D (1955b) Electrical activity in electric tissue. 111. Modifications of electrical activity by acetylcholine and related compounds. *Biochim. Biophys. Acta* 16: 449-463.
- Araque A, Buño W (1991) Novel inward rectifier blocked by Cd²⁺ in crayfish muscle. *Brain Res* 563:321-324.
- Ardanaz JL, Silva A, Macadar O (2001) Sensitivity of EOD waveform in *Gymnotus carapo*: a peripheral phenomenon modulated by steroid hormones. *J Comp Physiol A* 187:853-864.
- Baillet, D. C. 1969. Regeneration Of Electric Organ Of *Gymnotus carapo* (Pisces). *Archives D Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale*, 58:387.
- Barrio LC, Araque A, Buño W (1994) Participation of voltage gated conductances on the response succeeding inhibitory synaptic potentials in the crayfish slowly adapting stretch receptor neuron. *J Neurophysiol* 72:1140-1151
- Bass AH (1986a). Species Differences in Electric Organs of Mormyrids: Substrates for Species-Typical Electric Organ Discharge Waveforms. *J Comp Neurol* 244:313-330
- Bass AH (1986b). Electric organs revisited. In: *Electroreception* (Bullock TH, Heiligenberg W, eds), pp 13-70. Wiley: New York.
- Beam KG, Caldwell JH, Campbell DT (1985) Sodium channels in skeletal muscle concentrated near the neuromuscular junction. *Nature* 313: 588-590
- Bennett MVL (1971) Electric organs. In: *Fish physiology*, Vol. V (Hoar WS, Randall DJ, eds), pp 347-491. London: Academic Press.
- Bennett MVL, Grundfest H (1959) Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo*. *J Gen Physiol* 42:1067-1104.
- Bennett MVL, Grundfest H (1966) Analysis of depolarizing and hyperpolarizing inactivation responses in gymnotid electroplaques. *J Gen Physiol* 50:141-169.
- Black-Cleworth P (1970) The role of electric discharges in the nonreproductive social behavior of *Gymnotus carapo*. *Anim Behav Monogr* 3:1-77
- Brown DA, Gahwiler BH, Griffith WH, Halliwell JV (1990) Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog Brain Res* 83:141-60.

- Buckingham SD, Spencer AN (2002) Role of high-voltage activated potassium currents in high-frequency neuronal firing: evidence from a basal metazoan. *J Neurophysiol* 88:861–868.
- Bullock TH, Heiligenberg W (1986) Introduction. In: *Electroreception* (Bullock TH, Heiligenberg W, eds), pp 1–12. Wiley: New York.
- Capurro A., M. Reyes-Parada, J. L. Ardanaz, R. Silveira, and O. Macadar. 1994. Serotonergic Control Of Electric Organ Discharge In *Gymnotus carapo* - Role Of 5-Ht2a/2c Receptor Subtypes. *Comparative Biochemistry And Physiology A-Physiology*, 109:583-591.
- Caputi AA (1999) The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *J Exp Biol* 202:1229–1241
- Caputi AA, Silva A, Macadar O (1993) Electric organ activation in *Gymnotus carapo*: Spinal origin and peripheral mechanisms. *J Comp Physiol A* 173:227-232
- Caputi AA, Trujillo-Cenóz O (1994) The spinal cord of *Gymnotus carapo*: the electromotoneurons and their projection patterns. *Brain Behav Evol.* 44:166-74.
- Caputi, A., and P. Aguilera. 1996. A field potential analysis of the electromotor system in *Gymnotus carapo*. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 179:827-835.
- Caputi A, Budelli R (1995) The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *J Comput Neurosci* 2:131–147.
- Caputi A, Macadar O, Trujillo-Cenóz O (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. III. Analysis of the fish body as an electric source. *J Comp Physiol A* 165:361–370.
- Caputi A, Silva A, Macadar O (1998) The electric organ discharge of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*: the effects of environmental variables on waveform generation. *Brain Behav Evol* 52:148–158.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 57:397-409
- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162,156-159.
- Clark S, Jordt SE, Jentsch TJ, Mathie A (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 506:665–678.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular Diversity of K_v channels. In: *Molecular and functional diversity of ion channels and receptors* (Rudy B, Seeburg P, eds), pp 233–285. New York: New York Academy of Sciences.
- Cole KS (1975) Resistivity of axoplasm I. Resistivity of extruded squid axoplasm. *J Gen Physiol* 66:133–138.
- Comas V, Rivero C, Kunizawa H, Curti S, Borde M (2005) Neuronas premarcapaso implicadas en el comportamiento electromotor de escape en *Gymnotus carapo*. Resumen de las XI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. *Actas de Fisiología* 10: 267
- Curti, S., A. Falconi, F. R. Morales, and M. Borde. (1999). Mauthner Cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *Journal Of Neuroscience*, 19:9133-9140.
- 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
- Doiron B, Longtin A, Berman N, Maler L (2001) Subtractive and Divisive Inhibition: Effect of Voltage-Dependent Inhibitory Conductances and Noise. *Neural Computation* 13: 227-248.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5:268–277.
- Falconi A, Borde M, Hernández-Cruz A, Morales FR (1995) Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 176:679–689

- Falconi, A., Lorenzo, S. Curti, F. R. Morales, and M. Borde. 1997. Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 181:143-151.
- Ferrari MB, McAnelly ML, Zakon HH (1995) Individual variation in and androgen-modulation of the sodium current in electric organ. *J Neurosci* 15:4023-4032
- Ferrari MB, Zakon HH (1993) Conductances contributing to the action potential of *Sternopygus* electrocytes. *J Comp Physiol A* 173:281-292.
- Few WP, Zakon H.H (2000) Voltage-dependent K⁺ channels from the electric organ of a weakly electric fish. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26:1519.
- Few WP, Zakon H (2003) Hormonal regulation of K_v1 potassium channel expression in the electric organ. *Soc Neurosci Abstr* 29:899.9.
- Flucher BE, Franzini-Armstrong C (1996) Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci* 93:8101-8106.
- Goldin AL (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63:871-894
- Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol* 205:575-584
- Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S. (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57:527-540
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57:473-508.
- Hagedorn M (1986) The ecology, courtship and mating of gymnotiform electric fish. In: Bullock TH, Heiligenberg W (eds) *Electroreception*. Wiley, New York, pp 497-525
- Hagedorn M, Carr C (1985) Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *J Comp Physiol A* 156: 511-523.
- 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.
- Hille B (2001) *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hocherman SD, Bezanilla F (1996) A patch-clamp study of delayed rectifier currents in skeletal muscle of control and mdx mice. *J Physiol (Lond)* 493:113-128.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond)* 116: 449-472.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952b). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond)* 116: 473-496.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond)* 116: 497-506.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond)* 116: 500-544
- Hopkins CD (1999) Design features for electric communication. *J Exp Biol* 202:1217-1228.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 82:503-568
- Katz B (1949) Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3:285-300.
- 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
- 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
- Keynes RD, Martins-Ferreira H (1953) Membrane potentials in the electroplates of the electric eel. *J Physiol* 119: 315-351

- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:509-526
- Lopreato GF, Lu Y, Southwell A, Atkinson NS, Hillis DM, Wilcox TP, Zakon HH (2001) Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7588-7592
- Lorenzo, D., F. Sierra, A. Silva, and O. Macadar. 1990. Spinal Mechanisms Of Electric Organ Discharge Synchronization In *Gymnotus carapo*. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 167:447-452.
- Lorenzo, D., F. Sierra, A. Silva, and O. Macadar. 1993. Spatial-Distribution Of The Medullary Command Signal Within The Electric Organ Of *Gymnotus carapo*. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 173:221-226.
- Lorenzo D., J. C. Velluti, and O. Macadar. 1988. Electrophysiological Properties Of Abdominal Electrocytes In The Weakly Electric Fish *Gymnotus carapo*. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 162:141-144.
- Macadar O (1993) Motor control of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 173:728.
- Macadar O, Lorenzo D, Velluti JC (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. II. Electrophysiological properties of single electrocytes. *J Comp Physiol A* 165: 353-360.
- Macadar O, Silva A, Galeano M, Comas V, Sierra F (1997) Temperature and androgens modulate EOD waveform in electric fish acting on electrocytic membrane conductances. *Neurosci Abstr* 101:15.
- McAnelly ML, Zakon HH (2000) Coregulation of voltage-dependent kinetics of Na_v and K_v currents in electric organ. *J Neurosci* 20:3408-3414.
- McAnelly ML, Silva A, Zakon HH (2003) Cyclic AMP modulates electrical signaling in a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 189:273-282
- Mills A, Zakon HH (1991) Chronic androgen treatment increases action potential duration in the electric organ of *Sternopygus*. *J Neurosci* 11:2349-2361
- Moller P (1995) Electric fishes: History and behavior. Chapman & Hall, London.
- Nakamura Y, Nakajima S, Grundfest H (1965) Analysis of spike electrogenesis and depolarizing K⁺ inactivation in electroplaques of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 49:321-349.
- Niu XW, Meech RW (2000) Potassium inhibition of sodium-activated potassium (K(Na)) channels in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 526:81-90
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127
- Novak AE, Jost MC, Lu Y, Taylor AD, Zakon HH, Ribera AB (2006) Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. *J Mol Evol* 63:208-221
- Quintana L, Perrone R, Capurro A, Sierra F, Blanco F, Silva A, Macadar O (2002) Seasonal and sex differences in locomotor and electric displays in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Soc Neurosci Abstr* 781.16
- Quintana L, Silva A, Berois N, Macadar O (2004) Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhypopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *J Exp Biol* 207:1843-1853.
- Rall W (1959) Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp Neurol* 1: 491-527.
- Rudy B, Chow A, Lau D, Amarillo Y, Ozaita A, Saganich M, Moreno H, Nadal MS, Hernandez-Pineda R, Hernandez-Cruz A, Erisir A, Leonard C, Vega-Saenz De Miera E (1999) Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. In: Molecular and functional diversity of ion channels and receptors (Rudy B, Seeburg P, eds). Pp 233-285. New York: New York Academy of Sciences.
- Rudy B, McBain C (2001) Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24:517-526.

- Russell DF, Hartline DK (1982) Slow active potentials and bursting motor patterns in pyloric network of the lobster, *Panulirus interruptus*. *J Neurophysiol* 48:914–937
- Schuster S (2000) Changes in electric organ discharge after pausing the electromotor system of *Gymnotus carapo*. *J Exp Biol* 203: 1433–1446.
- Schwartz IR, Pappas GD, Bennett MV (1975) The fine structure of electrocytes in weakly electric teleosts. *J Neurocytol* 4:87–114.
- Shenkel S, Sigworth FJ (1991) Patch recording from the electrocytes of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 97:1013–1041.
- Sierra F (1991) Características de la sinapsis neuroelectroquímica y de los potenciales de membrana en electrocitos de *Gymnotus carapo*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Biología. Neurociencia. Montevideo, Uruguay.
- Sierra F, Comas V, Buño W, Macadar O (2005) Sodium-dependent plateau potentials in electrocytes of the electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 191:1–11.
- Sierra F, Lorenzo D, Macadar O, Buño W (1995) N-type Ca^{2+} channels mediate transmitter release at the electromotoneuron-electrocyte synapses of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Brain Res* 683:215–220.
- Silva (1990) Mecanismos espinales de sincronización de la descarga del órgano eléctrico en *Gymnotus carapo*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Biología. Neurociencia. Montevideo, Uruguay.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O (1999) Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *J Comp Physiol A* 185:187–197.
- Silva A, Quintana L, Ardanaz JL, Macadar O (2002) Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *J Physiol (Paris)* 96:473–484.
- Spiro JE (1997) Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cells enables a neural oscillator to produce distinct behaviors. *J Neurophysiol* 78:835–847
- Standen NB, Stanfield PR (1978) Inward rectification in skeletal muscle: a blocking particle model. *Pflugers Arch* 378:173–176.
- Stoddard PK (2006) Plasticity of the electric organ discharge waveform: contexts, mechanisms, and implications for electrocommunication. En: *Communication in fishes* (Ladich F, Collin SP, Moller P, Kapoor BG; eds). Science Publishers, Enfield.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385: 733–759.
- Szabo, T. 1961. Les organes électriques de *Gymnotus carapo*. *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap*, 64:584–586.
- Thornhill WB, Watanabe I, Sutachan JJ, Wu MB, Wu X, Zhu J, Recio-Pinto E (2003) Molecular cloning and expression of a Kv1.1-like potassium channel from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J Membr Biol* 196:1–8.
- Trujillo-Cenóz, O., and C. Bertolotto. 1988. Some Aspects Of The Structural Organization Of The Spinal-Cord Of *Gymnotus carapo* (Teleostei, Gymnotiformes).2. The motoneurons. *Journal Of Ultrastructure And Molecular Structure Research*, 101:224–235.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. I. Morphology and innervation of the electric organ. *J Comp Physiol A* 165:343–351.
- Trujillo-Cenóz, O., J. A. Echague, C. Bertolotto, and D. Lorenzo. (1986). Some Aspects Of The Structural Organization Of The Spinal-Cord Of *Gymnotus carapo* (Teleostei, Gymnotiformes).1. The Electromotor Neurons. *Journal Of Ultrastructure And Molecular Structure Research*, 97:130–143.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA, Macadar O (1984) Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *J Neurobiol* 15:273–281.
- Trujillo-Cenóz O, Lorenzo D, Bertolotto C (1993) Identification of neuronal types in the medullary electromotor nucleus of *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol [A]* 173:750.
- Vullhorst D, Klocke R, Bartsch JW, Jockusch H (1998) Expression of the potassium channel KV3.4 in mouse skeletal muscle parallels fiber type maturation and depends on excitation pattern. *FEBS Lett* 421:259–262.

- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472
- Yuan A, Santi CM, Wei A, Wang ZW, Pollak K (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* 37:765–773
- Zakon HH (1998) The effects of steroid hormones on electrical activity of excitable cells. *Trends Neurosci* 21:202–207.
- Zakon HH, Lu Y, Zwickl DJ, Hillis DM (2006) Sodium channel genes and the evolution of diversity in communication signals of electric fishes: convergent molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci* 103:3675-3680

Anexo A.

Sodium-dependent plateau potentials in electrocytes of the electric fish *Gymnotus carapo*

Felipe Sierra, Virginia Comas, Washington Buño, Omar Macadar

Journal of Comparative Physiology A 191 (2005): 1–11

Felipe Sierra · Virginia Comas · Washington Buño
Omar Macadar

Sodium-dependent plateau potentials in electrocytes of the electric fish *Gymnotus carapo*

Received: 16 April 2004 / Revised: 28 July 2004 / Accepted: 12 August 2004 / Published online: 11 September 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract The weakly electric fish *Gymnotus carapo* emits a triphasic electric organ discharge generated by muscle-derived electrocytes, which is modified by environmental and physiological factors. Two electrode current clamp recordings in an in vitro preparation showed that *Gymnotus* electrocytes fired repetitively and responded with plateau potentials when depolarized. This electrophysiological behavior has never been observed in electrocytes from related species. Two types of plateaus with different thresholds and amplitudes were evoked by depolarization when Na^+ -dependent currents were isolated in a K^+ - and Ca^{2+} -free solution containing TEA and 4-AP. Two electrode voltage clamp recordings revealed a classical fast activating-inactivating Na^+ current and two persistent Na^+ -dependent currents with voltage-dependencies consistent with the action potential (AP) and the two plateaus observed under current clamp, respectively. The three currents, the APs and the plateaus were reduced by TTX, and were absent in Na^+ -free solution. The different Na^+ -dependent currents in *Gymnotus* electrocytes may be targets for the modifications of the electric organ discharge mediated by environmental and physiological factors.

Keywords Sodium currents · Persistent currents · Electric fish · Electrocytes · Bistability

Abbreviations 4-AP: 4-Aminopyridine · AP: Action potential · EO: Electric organ · EOD: Electric organ discharge · I-V/V-I: Current-voltage/voltage-

current · MP: Membrane potential · PSP: Postsynaptic potential · TEA: Tetraethylammonium chloride · TTX: Tetrodotoxin

Introduction

Freshwater, weakly electric fish emit electric organ discharges (EOD) for electrolocation and communication with conspecifics in relation to agonistic and reproductive behaviors (Bullock and Heiligenberg 1986). Signals related to agonistic behaviors are represented in the discharge pattern (Black-Cleworth 1970), whereas sex hormones modulate both discharge pattern and EOD waveform (Hagedorn and Carr 1985; Hagedorn 1986; Ferrari et al. 1995; Zakon 1998). The EOD results from the activity of an electric organ (EO), composed, in most species, of electrocytes derived from muscle tissue, and of a neural system of control (Trujillo-Cenóz et al. 1984; Hopkins 1999). *Gymnotus carapo* is a South American pulse-type, weakly electric fish with a triphasic EOD, which depends on the synchronized activity of different types of muscle-derived electrocytes (Caputi et al. 1989; Trujillo-Cenóz and Echagüe 1989; Caputi 1999). Environmental factors, steroid hormones, and pauses modify the EOD waveform of *G. carapo* (Caputi et al. 1998; Silva et al. 1999; Schuster 2000; Ardanaz et al. 2001). The underlying cellular mechanisms of these plastic phenomena remain to be investigated in this species.

The electrophysiological properties of *G. carapo* electrocytes were previously studied in vivo by Bennett and Grundfest (1959). In addition, the electrophysiology of electrocytes of two other gymnotiform species, *Electrophorus electricus* and *Sternopygus macrurus*, have been reported (Nakamura et al. 1965; Shenkel and Sigworth 1991; Ferrari and Zakon 1993). These electrocytes discharge a single action potential (AP) when depolarized (Nakamura et al. 1965; Ferrari and Zakon 1993). These APs are mediated by a transient fast activating-inactivating Na^+ current that initiates and determines

F. Sierra (✉)
Unidad Asociada Neurofisiología-IIBCE,
Facultad de Ciencias, Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay

F. Sierra · V. Comas · O. Macadar
Dpto. de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable, Avda. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay
E-mail: fsierra@iibce.edu.uy
Fax: 598-2-4875548

W. Buño
Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

the AP waveform (Shenkel and Sigworth 1991; Ferrari and Zakon 1993).

Cloning and expression of channel subunits have revealed two types of voltage-gated Na^+ channels ($\text{Na}_v1.4$ and $\text{Na}_v1.5$) in skeletal muscle of mammals (Goldin 2001). Six Na^+ -channel genes have been found in *Sternopygus*, two (SterNa6 and SterNa1) associated with the mammalian $\text{Na}_v1.4$, and one (SterNa2) homologous to the $\text{Na}_v1.5$ of mammals (Lopreato et al. 2001; Goldin 2002). Therefore, three types of Na^+ -dependent currents may be expressed in striated muscle and related tissues of teleost fish. However, only the $\text{Na}_v1.4$ type of transient voltage-gated Na^+ channel has been described in *Electrophorus* and *Sternopygus*, where it mediates the AP of electrocytes (Nakamura et al. 1965; Ferrari and Zakon 1993).

We investigated the electrophysiological properties and Na^+ -dependent conductances of *G. carapo* electrocytes using an in vitro preparation of the isolated EO (Macadar et al. 1989; Sierra et al. 1995). Confirming the report of Bennett and Grundfest (1959), we observed that depolarization evoked repetitive APs. In addition, we observed that depolarization also evoked plateau potentials, and that the electrical activity of the electrocytes was mediated by persistent Na^+ -dependent current components besides the classical transient Na^+ current. The complex pattern of Na^+ -dependent currents of *Gymnotus* electrocytes may be the target of the plastic modifications of the EOD waveform induced by environmental and hormonal factors.

Materials and methods

Animals and preparation

Gymnotus carapo (10–15 cm long) were collected at Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay and housed in individual aquaria at controlled room temperature (20–21°C). Under deep anesthesia (immersion in 4°C water), a 1.5–2.0 cm portion of the tail containing the caudal segment of the EO was cut by hand with a razor blade. The skin, vertebral column and muscles were removed and the isolated EO was pinned in a 2-ml Sylgard recording chamber with different Ringer solutions (see below) at room temperature. After the surgery, fish were returned to their aquaria and their tails eventually regenerated. Fish with regenerated tails were never used for our experiments.

Microelectrodes and recordings

Electrocytes ($n=85$) were impaled with two micropipettes filled with 3 M KCl ($\approx 10 \text{ M}\Omega$) connected to an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments, USA). Amplifier probe gains were $\times 1$ and $\times 10$ for voltage and current electrodes, respectively. Electrodes were isolated from each other with a grounded shield. The bath ground was a chloride silver wire inserted into a 3% agar

bridge in 3 M KCl. Electrical responses, voltage commands and current pulses were continuously monitored on a digital oscilloscope.

Two electrode current clamp recordings were obtained from cells at their resting membrane potential (MP) and hyperpolarizing and depolarizing current pulses of up to 10,000 nA were delivered. Electrocytes were discarded when large depolarizing current pulses ($> 8,000 \text{ nA}$) did not elicit APs in control conditions. In some experiments, brief, low-intensity hyperpolarizing pulses (25 ms, 500 nA) were applied during the responses evoked by large depolarizing pulses to calculate the cells' input resistance.

In some experiments, postsynaptic potentials (PSPs) were evoked by electrical stimulation of the posterior electromotor nerve (Trujillo-Cenóz and Echagüe 1989) through a suction electrode.

Two electrode voltage clamp recordings were obtained at -80 mV holding potential, and voltage command pulses were delivered at increasing depolarized potentials (from -70 to 80 mV). In order to isolate non-inactivating currents, a 350-ms depolarizing prepulse to -40 mV that inactivated the "transient" Na^+ current was followed by 350-ms pulses from -80 to 70 mV . Currents were measured at the end of pulses and I-V relationships were constructed. Slowly increasing depolarizing ramp voltage commands (7.4 s, from -80 to 70 mV) that inactivated the "transient" Na^+ current and activated the persistent components were also used. The time required to reach the command pulse potential was $< 0.5 \text{ ms}$, and there were no MP variations throughout the voltage pulse. Recordings that failed to meet these criteria were rejected. Acceptable voltage control was feasible only in small electrocytes ($\approx 250 \mu\text{m}$ rostro-caudal $\times 250 \mu\text{m}$ dorso-ventral). In some voltage clamp experiments ($n=2$), NaCl was substituted with sodium metansulfate to eliminate Cl^- conductances and thus improve voltage control; no significant deviation in the responses was observed in these experiments.

Data were collected, digitized (LabMaster TM-100 interface board, Scientific Solutions, USA), and analyzed with the pCLAMP software (Axon Instruments, USA) on a Pentium-based personal computer. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Solutions

The control solution contained (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 4.5 CaCl_2 , 1.5 MgCl_2 , 10 HEPES. The K^+ - and Ca^{2+} -free solution contained (in mM): 130 NaCl, 5 CsCl, 6 MgCl_2 , 1 4-aminopyridine (4-AP), 25 tetraethylammonium chloride (TEA), 10 HEPES. The K^+ , Ca^{2+} - and Na^+ -free solution contained (in mM): 130 choline chloride, 5 CsCl, 6 MgCl_2 , 1 4-AP, 25 TEA, 10 HEPES and will be referred as Na^+ -free solution. Tetrodotoxin (TTX) was added to the solutions to attain different concentrations (from 0.5 nM – $10 \mu\text{M}$). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

Results

The mean resting MP of the electrocytes was -80.1 ± 13.0 mV ($n=85$). The mean input resistance was 2.91 ± 0.85 k Ω ($n=33$), calculated from linear fits of V-I relationships obtained from hyperpolarizing pulses.

Repetitive firing, action potentials and graded responses

A distinctive feature of *G. carapo* electrocytes was the repetitive firing evoked by prolonged (125 ms) supra-threshold depolarizing current pulses (Fig. 1A). Slightly suprathreshold pulses evoked repetitive APs with little decay in amplitude (Fig. 1A; 4,000 nA), while higher intensity pulses generated APs at decreasing amplitudes with the profile of an attenuated oscillation followed by a sustained depolarization that lasted throughout the rest of the depolarizing pulse (Fig. 1A; 5,000 and 5,500 nA). The number and amplitude of the APs decreased with pulse intensity (Fig. 1A). However, the initial AP peak amplitude did not change with pulse intensity (90.1 ± 15.1 mV; $n=30$). In addition, there were only minor variations in the MP value of the final sustained depolarization regardless of pulse intensity (-56.8 ± 10.2 mV; $n=30$).

A gradual decrease in AP depolarization and repolarization peaks characterized the attenuated oscillations evoked by the higher intensity current pulses. The complex and gradual repolarization profile (connected

by gray lines in Fig. 1A; 5,000 and 5,500 nA) ended in a persistent depolarization, which suggests the gradual activation of a plateau potential. The activation of the plateau depolarization may also explain the steady decrease in spike amplitude caused by the gradual voltage-dependent inactivation of the transient Na^+ conductance that mediates the APs.

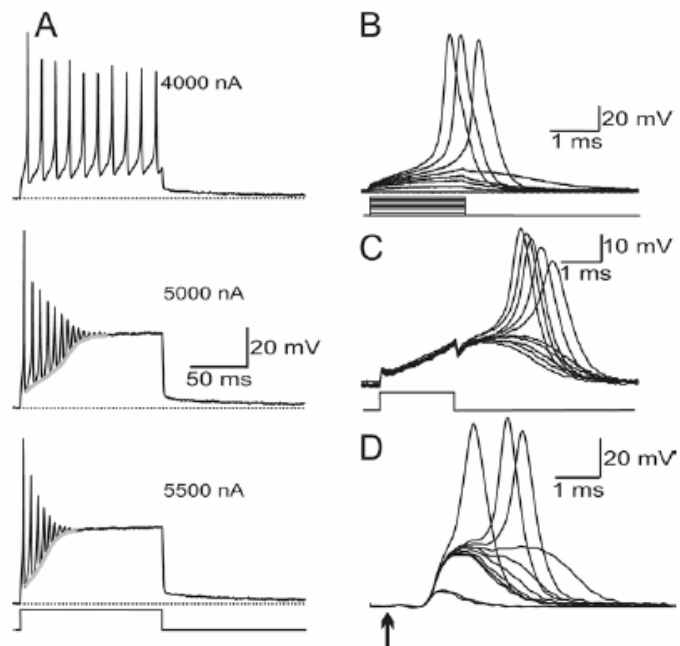
Brief (2 ms) current pulses of different intensities evoked a variety of responses (Fig. 1B). Low intensities induced responses similar to those of a passive RC circuit. Higher intensity pulses elicited responses that decayed more slowly and that could not be fitted by single exponentials; APs were evoked above a threshold depolarization (Fig. 1B). Interestingly, identical current pulses at threshold intensity elicited two types of "active" responses—small, slow depolarizations and APs (Fig. 1C). The duration and amplitude of both the slowly depolarizing response and the AP elicited by current pulses of identical intensity were variable. In addition, there was an inverse relation between the peak amplitude of the AP and its duration (Fig. 1C).

Synaptic stimulation elicited different responses: small PSPs, PSPs that could be followed by slow responses of different amplitudes and durations, and PSPs followed by APs (Fig. 1D).

Depolarization evoked two types of plateau potentials

In order to investigate the contribution of voltage-gated Na^+ -dependent conductances to the depolarizing

Fig. 1A–D Action potentials. A Repetitive discharge evoked by 125-ms depolarizing current pulses at increasing intensities of 4,000, 5,000 and 5,500 nA as indicated. Stimulation pulse waveforms are shown below, as in other figures. Peak repolarizations are linked by continuous gray lines at 5,000 and 5,500 nA. B Responses evoked by 2.5-ms depolarizing pulses at increasing intensities. C Different responses evoked by the same threshold intensity pulses (2 ms; 7,500 nA). D Responses evoked by stimulation with constant intensity pulses (arrow) of the posterior electromotor nerve



responses, we used a solution in which Ca^{2+} was substituted with Mg^{2+} or Co^{2+} , and K^{+} was substituted with Cs^{+} ; K^{+} -channel blockers TEA (25 mM) and 4-AP (1 mM) were also added to this solution which we call the K^{+} - and Ca^{2+} -free solution. In these conditions, depolarizing pulses evoked plateau potentials with a time profile that closely paralleled the maximum depolarization observed during attenuated oscillation evoked in control conditions (compare the gray line in Fig. 2A with the plateau in Fig. 2B for the same electrocyte). The depolarizing pulse intensity was reduced to match the plateau amplitude in the K^{+} - and Ca^{2+} -free solution with the amplitude in the control solution. The need to reduce the pulse intensity suggests that the input resistance was increased in the K^{+} - and Ca^{2+} -free solution (see below). Average resting MPs in these conditions were -92.4 ± 11.2 mV ($n=21$).

Anomalous or inward rectification was revealed by the asymmetric response to depolarizing and hyperpolarizing pulses of identical intensity in the K^{+} - and Ca^{2+} -free solution (Fig. 2C). Hyperpolarizing pulses evoked responses with exponential on and off trajectories indicating a passive RC membrane behavior

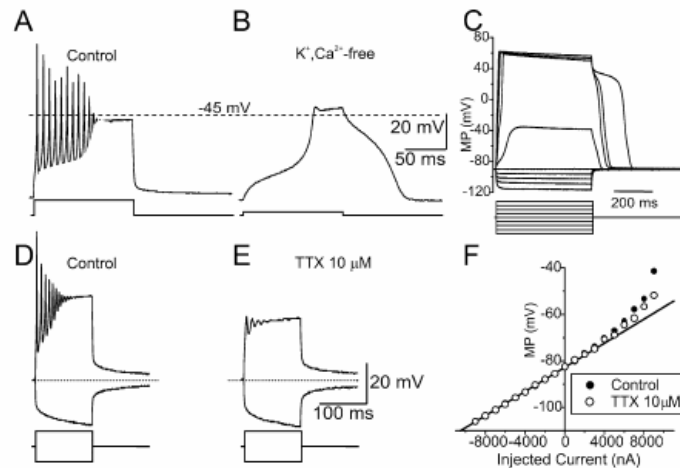
(Fig. 2C). The slope of the linear V-I relationship obtained with hyperpolarizing pulses showed an average input resistance of 9.54 ± 4.37 k Ω ($n=22$). This value is more than threefold the mean value calculated in control conditions (2.91 ± 0.85 k Ω ; $n=33$), indicating an important contribution of K^{+} -mediated conductances to the normal passive membrane behavior.

High concentrations of TTX ($10 \mu\text{M}$) induced a reduction in both APs and plateau amplitudes without modifying responses evoked by hyperpolarizing pulses (Fig. 2D, E). Therefore, inward rectification was reduced under TTX (Fig. 2F). The results suggest the presence of TTX-sensitive components and a TTX-insensitive Na^{+} -dependent conductance.

Low-intensity, depolarizing pulses could evoke linear passive responses (Fig. 3A; 500 nA). However, above a threshold pulse intensity, depolarizing pulses elicited responses with sigmoid-like trajectories that reached steady plateau depolarizations and that repolarized following sigmoid-like trajectories (Fig. 3A; 1,000 nA). A variety of long responses could be elicited both by prolonged (Fig. 3A) and brief (Fig. 3B) depolarizing current pulses. In particular, plateaus exhibited two widely different amplitude ranges depending on the pulse intensity (Fig. 3A, B). There was a low-threshold, small-amplitude plateau (L-plateau) and a high-threshold, large-amplitude plateau (H-plateau) which reached positive MP values and could outlast the end of depolarizing pulses by hundreds of milliseconds. The L-plateau reached an average MP of -35.97 ± 8.39 mV ($n=12$) whereas the H-plateau achieved an average MP of 54.26 ± 10.72 mV ($n=12$), thus near the estimated Na^{+} equilibrium potential. The H-plateaus outlasted the intracellular current pulses (e.g., >1 s when a 10 ms pulse was applied; Fig. 3C).

Long, intermediate-intensity pulses could evoke L-plateaus with a clear "hump" in the depolarizing trajectory, followed by an AP and an H-plateau that

Fig. 2A–F Plateau potentials. A Response evoked by 125-ms 5,500-nA depolarizing pulse. Peak repolarizations are connected by a continuous gray line. B Response elicited in the same electrocyte in K^{+} - and Ca^{2+} -free solution; the pulse intensity was lowered to 500 nA to adjust the plateau amplitude to that of the response in (A). Note that the response profile matches the continuous line and the plateau depolarization in (A). C Responses evoked by hyper- and depolarizing pulses in K^{+} - and Ca^{2+} -free solution. Note inward rectification and L- and H-plateaus. D Responses evoked by de- and hyperpolarizing pulses in control solution. E Same as (D), but under $10 \mu\text{M}$ TTX. Note that AP and plateaus were reduced but the hyperpolarizing response was unaffected by TTX. F V-I relationships of experiments as in (D) and (E); voltage values were measured at the end of responses. TTX markedly reduced inward rectification. The linear fits were calculated with hyperpolarizing responses



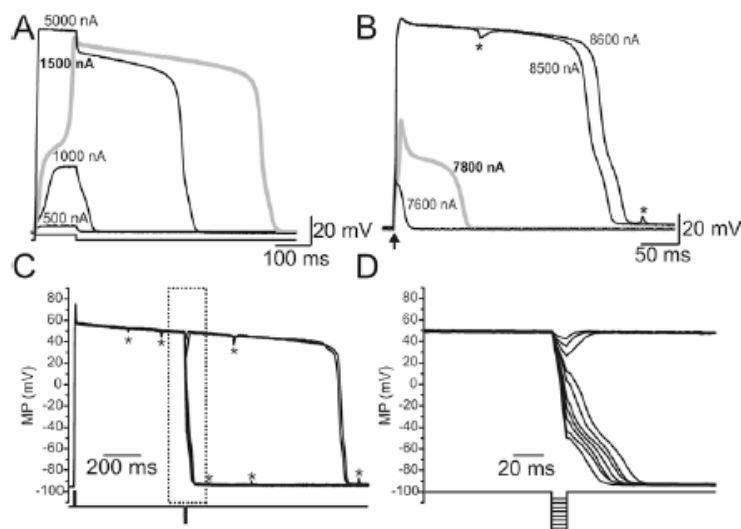


Fig. 3A–D Plateau potentials in K^+ - and Ca^{2+} -free solution. A Responses evoked by depolarizing 125-ms current pulses at different intensities (as indicated) in K^+ - and Ca^{2+} -free solution. The 500-nA pulse elicited a passive RC-circuit type response. The 1,000-nA pulse evoked a low-amplitude and low-threshold plateau (L-plateau). The 5,000-nA pulse elicited high-amplitude and high-threshold plateau (H-plateau). The response evoked by a 1,500 nA pulse (gray trace) shows the transition from L- to H-plateaus. B Responses evoked by 4-ms depolarizing pulses at different intensities (as indicated). A local response is generated at 7,600 nA. Note an AP and L-plateau at 7,800 nA (gray trace). The 8,500- and 8,600-nA pulses generated H-plateaus of the same amplitude and slightly different durations. Asterisks indicate the occurrence of “spontaneous” PSPs, induced by the TEA and 4-AP treatment. C Superposition of five H-plateaus generated by 10-ms and 8,000-nA depolarizing pulse, and responses induced by brief (10-ms) hyperpolarizing pulses of different intensities applied 600 ms after the depolarizing pulses. High intensity (3,000–5,000 nA) hyperpolarizing pulses terminated the H-plateau. Asterisks indicate the occurrence of “spontaneous” PSPs. D Expanded plot of the responses evoked by 10-ms hyperpolarizing pulses in (C) (framed by dotted lines)

outlasted the depolarizing pulse (gray trace in Fig. 3A). The “hump” occurred as the MPs reached by L-plateau, suggesting that the H-plateau rode on the L-plateau (Fig. 3A; 1,500 nA). The L-plateau was occasionally observed in isolation when its amplitude was under the AP threshold (Fig. 3A; 1,000 nA), but in some cases L-plateaus reached the AP threshold (gray trace in Fig. 3B).

“Spontaneous” depolarizing PSPs could be observed at the resting potential and with a reverted hyperpolarizing polarity during plateaus (asterisks; Fig. 3B, C). These “spontaneous” PSPs were most likely generated by APs triggered in electro-motor axons by the abnormally enhanced excitability produced by the TEA and 4-AP challenge. The reverted-PSP hyperpolarizations could terminate the H-plateau (not shown). Brief (10-ms) hyperpolarizing pulses of increasing intensities could also terminate H-plateaus

when a threshold hyperpolarization was reached (Fig. 3C, D). The hyperpolarizing trajectories at the end of plateaus showed a complex profile with two different sigmoid-like slopes separated by a “hump” (Fig. 3D). The hump usually occurred at the MPs reached the L-plateau (Fig. 3B, 8,500 and 8,600 nA and 3D), again suggesting that the H-plateau rode on the L-plateau. Essentially identical plateaus were evoked when Ca^{2+} was substituted with Co^{2+} (Fig. 4). This was an indication that plateaus were not due to the permeation of Na^+ ions through Ca^{2+} channels (Almers and Palade 1981; Hille 2001).

Taken together, the above results are consistent with plateaus and APs being mediated by persistent and transient Na^+ -dependent conductances, without contribution of voltage-gated Ca^{2+} conductances.

To further analyze the cellular mechanisms underlying the voltage responses of electrocytes, we compared V-I relationships measured at the end of sustained depolarizations in response to prolonged depolarizing pulses, obtained in control solution (filled circles, Fig. 5A), in the K^+ - and Ca^{2+} -free solution

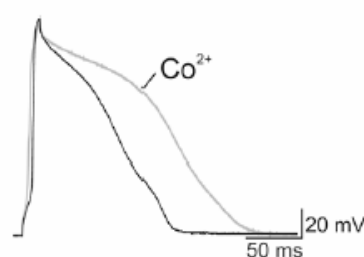


Fig. 4 Effect of Co^{2+} on plateaus. Plateaus generated by a 10-ms pulse in a K^+ -free solution (thin black trace) and after substitution of Ca^{2+} by Co^{2+} (thick gray trace)

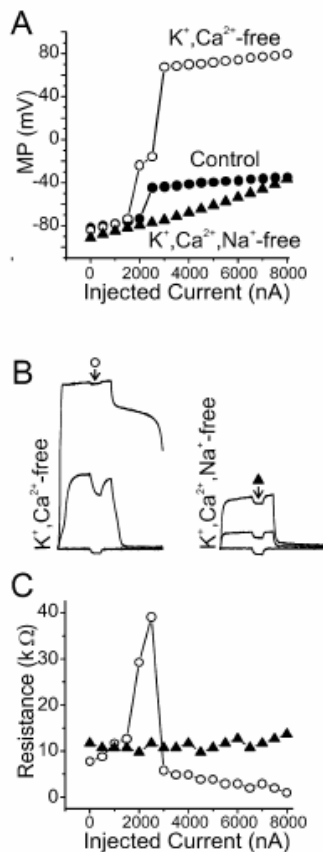


Fig. 5A–C V–I relationships and input resistance in control, K⁺- and Ca²⁺-, and Na⁺-free solutions. **A** V–I relationships in control (filled circles), K⁺- and Ca²⁺-free (open circles) and Na⁺-free (triangles) solutions. Measurements were at the end of responses evoked by depolarizing pulses at increasing intensities. Note two regions of relative stability (where the MP changes less as a function of pulse intensity) in the control solution that correspond to the passive behavior and the plateau that follows AP, and the steep transition between the two that corresponds to the plateau threshold. In K⁺- and Ca²⁺-free solution, there are three regions of relative stability that correspond to the passive response and the L- and H-plateaus and the corresponding transitions at the plateau thresholds. When Na⁺ is removed, values are much lower and the relationship tends to a linear model (triangles). **B** Representative examples of responses obtained both in K⁺- and Ca²⁺-free solution (circle) and after Na⁺ removal (triangle) that were used to estimate the input resistance. The resistance was calculated from responses elicited by brief hyperpolarizing test pulses (25 ms, 500 nA) presented during steady responses evoked by 125-ms depolarizing pulses of increasing intensity. **C** Plots of input resistance as a function of injected current both in K⁺- and Ca²⁺-free solution (circles) and after Na⁺ removal (triangles). Note the large increase in resistance during the L-plateau (2,000 and 2,500 nA) and the return to low-resistance values during the H-plateau. With Na⁺ removal, the resistance was low and unchanged by intensity

(open circles, Fig. 5A), and when Na⁺-dependent currents were removed in the K⁺-, Ca²⁺- and Na⁺-free solution (triangles, Fig. 5A). The V–I relationship in

control solution revealed two regions of relative stability where the MP changed less with pulse intensity, separated by a steep transition. The small-amplitude region corresponds to the linear passive responses evoked by low-intensity depolarizing pulses; the larger-amplitude region is associated with the plateaus evoked by higher intensity pulses, and the transition corresponds to the threshold of the plateaus (filled circles, Fig. 5A).

The V–I relationship in K⁺- and Ca²⁺-free solution showed several slopes with three regions of relative stability. An initial region close to -80 mV corresponds to the linear passive responses evoked by low-intensity depolarizing pulses as in control conditions; an intermediate region between -30 and 0 mV is associated with the L-plateau and a third region at 70–80 mV corresponds to the H-plateaus (open circles, Fig. 5A). The steep transitions at -70 and -10 mV correspond to the L- and H-plateau thresholds, respectively (Fig. 5B).

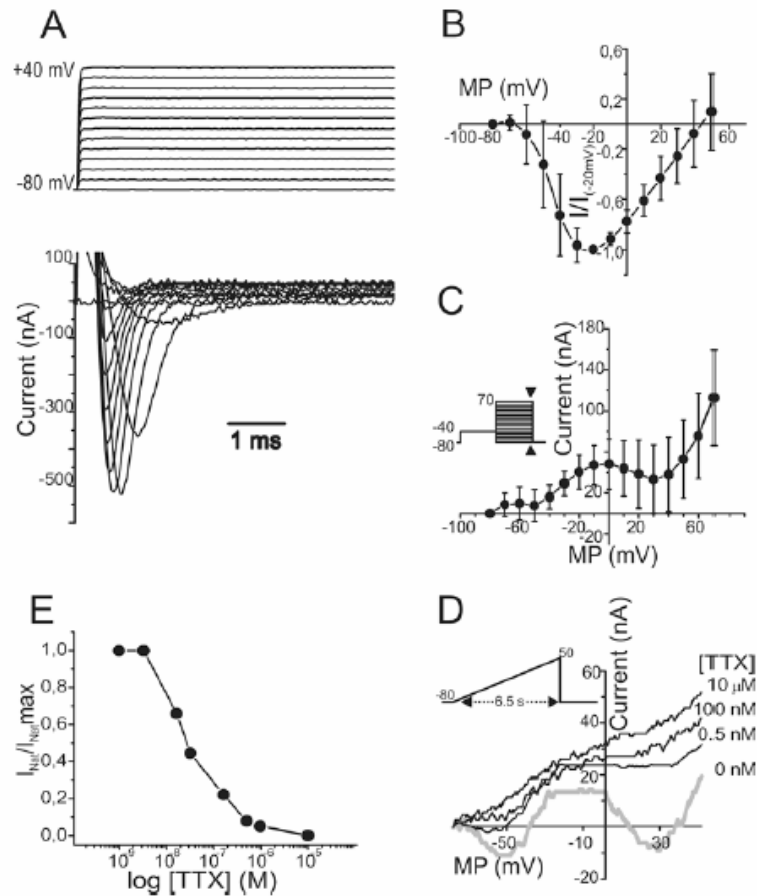
Finally, the V–I relationship in the Na⁺-free solution showed a single linear relationship with a smaller average slope (triangles, Fig. 5B), suggesting that Na⁺-dependent conductances subserve the responses in control and K⁺- and Ca²⁺-free solutions.

In an attempt to differentiate between the two candidate mechanisms of plateau generation (closure of a previously open outward current or opening of an inward one), we compared the effect of relatively short (25-ms) hyperpolarizing test pulses at the time corresponding to the occurrence of the plateaus under K⁺- and Ca²⁺-free and Na⁺-free conditions. The duration of pulses was that required to reach a stable potential under these conditions. The input resistance was estimated by the amplitude of the hyperpolarizing voltage deflections evoked by these brief hyperpolarizing test pulses applied at a fixed low intensity (500 nA; Fig. 5B). In the K⁺- and Ca²⁺-free solution, gradually increasing resistance values were observed at low current intensities. Much larger resistance values were estimated from responses corresponding to L-plateaus, and there was a sudden drop in input resistance to values below controls during H-plateaus (Fig. 5C, open circles). The abrupt changes in input resistance values at ≈ -70 and ≈ -10 mV indicated by the slope change in the V–I relationship (Fig. 5A, open circles) correspond to the L- and H-plateau thresholds, respectively. When Na⁺ was removed, the input resistance showed little variation and the values were lower than during the L-plateau (Fig. 5C, triangles).

Electrocytes display three Na⁺-dependent currents

Two electrode voltage clamp recordings in control solution were impossible because of poor voltage control caused by the large membrane conductance. Sufficient voltage control was attained in the K⁺- and Ca²⁺-free solution. Nevertheless, even in these more favorable

Fig. 6A–E Na^+ currents in K^+ - and Ca^{2+} -free solution. **A** Example of “transient” Na^+ currents activated by depolarizing step commands between -80 and 40 mV (shown above). Capacitive and leak currents were not subtracted, as in all other voltage clamp recordings. **B** Average I–V relationship calculated with peak current values obtained in experiments as in (A) ($n=13$) and normalized to the maximum current at -20 mV. **C** Average ($n=14$) I–V relationship calculated with the current amplitudes at the end of 350-ms voltage command pulses. **A** 350-ms depolarizing prepulse to -40 mV inactivated transient currents (the prepulse–pulse voltage command is shown in the inset). **D** Representative I–V relationships calculated with currents evoked by slow depolarizing ramp command (shown in inset) in control conditions (0 nM) and with increasing concentrations of TTX (from 0.5 nM to 10 μM). **E** Normalized dose–response curve of TTX inhibition of peak inward “transient” Na^+ current in K^+ - and Ca^{2+} -free solution in a representative experiment. The IC_{50} calculated for this experiment was 32.9 nM.



conditions, the presence of nonlinearities at different voltages did not allow us to perform the classical linear leak and capacitive current subtraction protocols required to isolate voltage-gated currents. Therefore, only experiments in K^+ - and Ca^{2+} -free solution and without leak subtraction will be presented.

Brief depolarizing voltage commands (6 ms) elicited a classical fast activating–inactivating “transient” inward Na^+ current in all electrocytes (Fig. 6A). In most experiments, inward currents peaked at -20 mV ($n=13$); these cases were used to construct average I–V relationships. The curve showed the typical N-shape of the “transient” Na^+ current with a threshold at ≈ -80 mV, a maximum peak current (685 ± 448 nA) at ≈ -20 mV and an apparent reversal potential slightly over 40 mV (Fig. 6B). The maximum current value and the ≈ 40 mV reversal potential are most likely underestimated since the outward leak current is contributing to the I–V relationship and more so for larger depolarizations. In addition, persistent inward currents may also contribute to the I–V profile (see below).

To analyze the non-inactivating “persistent” Na^+ -dependent currents, we applied two types of voltage-command protocols which isolate persistent Na^+ -dependent currents by previous inactivation of the transient Na^+ current (see Materials and methods). A depolarizing prepulse–pulse protocol was used in order to inactivate the transient current, and the V–I relationships were constructed from the remaining persistent currents measured at the end of the pulses (Fig. 6C). Slowly depolarizing voltage ramp commands were also applied to inactivate the transient while activating the persistent currents (Fig. 6D). The I–V relationships estimated in both types of experiments yielded similar results with complex curves showing two regions of negative slope conductance that led to inward currents (Fig. 6C, D). The inward current regions could either indicate the voltage-dependent activation of inward currents or the de-activation of outward currents. The first negative conductance region was small and not clearly evident in the average I–V relationship because of the added positive slope of the leak current (not sub-

tracted). However, it was evident in some individual experiments where net inward currents could be observed peaking at ≈ -50 and 30 mV with negative slope conductance regions between -80 and -50 mV and between 0 and 40 mV, respectively (Fig. 6C and gray trace in Fig. 6D).

The MP values at which the two inward current regions peaked match those of the two regions of stability observed in the current clamp I-V relationships that correspond to the L- and H- plateaus. However, the H-plateau is paralleled by a large conductance increase, thus the inward current region between -10 and 40 mV is probably due to the activation of a persistent voltage-gated Na^+ current (see Discussion).

The transient inward current was totally abolished by low doses of TTX (Fig. 6E) with a mean IC_{50} of 4.85 ± 8.87 nM ($n=9$), which is a comparable value to the TTX sensitivity of mammalian $\text{Na}_v1.4$ channels (Goldin 2001). The persistent currents induced by voltage ramp command protocols were also sensitive to TTX application (Fig. 6D). For the high threshold current, the average IC_{50} was 8.43 ± 12.5 nM ($n=6$) and therefore similar to the IC_{50} of the transient current. These data suggest that both transient and persistent currents in *Gymnotus* electrocytes have similar TTX sensitivity. However, nonlinearities in the I-V relationship of the persistent currents including inward deflections were not completely abolished in $10 \mu\text{M}$ TTX (Fig. 6D), suggesting that a component of the Na^+ -dependent persistent current is TTX-resistant (see above).

Discussion

The main new finding revealed by the above results is that electrocytes of *G. carapo* respond in vitro to long-lasting depolarizing current pulses with repetitive firing and plateau potentials that may outlast the imposed depolarization; this unique electrophysiological characteristic has not been observed in related species thus far. This complex electrical behavior is consistent with the demonstration of a variety of Na^+ -dependent conductances not previously described in electric fish.

Multiple Na^+ -dependent conductances underlie the electrical activity

Our in vitro current clamp results confirm the repetitive firing of *G. carapo* electrocytes described in vivo by Bennett and Grundfest (1959). However, they contrast with the electrophysiology of electrocytes of related gymnotiform species—*E. electricus* and *S. macrurus*—which fire a single AP discharge when depolarized (Nakamura et al. 1965; Ferrari and Zakon 1993). The transient Na^+ current in *Gymnotus* and *Electrophorus* electrocytes (Nakamura et al. 1965) show similar voltage dependence. However, both voltage dependencies were

shifted to negative values relative to the transient Na^+ currents in *Sternopygus* electrocytes (Ferrari and Zakon 1993). The differences could be caused by the large leak current which would particularly contribute at positive potentials thus inducing an underestimation of the Na^+ reversal potential in our experiments. In fact, the average MP reached by the H-plateau was more positive and suggests a Na^+ equilibrium potential near 54 mV.

A K^+ inward rectifier and a delayed rectifier were found in electrocytes of *Electrophorus* and *Sternopygus*, but the delayed rectifier was not functionally correlated to the AP in *Sternopygus* (Ferrari and Zakon 1993). A low density of delayed rectifier K^+ channels was detected in *Electrophorus* electrocytes (Shenkel and Sigworth 1991). Therefore, in these two species, the AP is mainly determined by the activation and subsequent inactivation of a transient Na^+ current without an important contribution of K^+ currents. The lack of effective outward repolarizing K^+ currents explains both the long duration of the AP and the lack of repetitive discharge during prolonged depolarizations in electrocytes of *Electrophorus* and *Sternopygus*. McAnelly and Zakon (2000) reported an outward K^+ current with similar hormone sensitivity to that of the Na^+ current. Repetitive discharges require the activation of sufficient outward current to repolarize the electrocyte and remove the inactivation of the transient Na^+ current; as a result there would be sufficient Na^+ channels available (de-inactivated) to generate the subsequent AP. McAnelly et al. (2003) described a similar behavior (including a plateau potential) in *Sternopygus* electrocytes after treatment with cAMP.

Several findings suggest an important contribution of Na^+ and K^+ conductances to the electrical activity of *Gymnotus* electrocytes. The absence of APs and plateaus in Na^+ -free solution and the marked decrease in AP and plateau amplitudes under TTX are consistent with Na^+ -dependent currents mediating the depolarizing phases of the electrical responses of *Gymnotus* electrocytes. The importance of K^+ conductances was revealed by the following findings. Firstly, brief low-intensity current pulses evoked APs of different amplitudes which were negatively correlated with AP duration, suggesting that the voltage-dependent activation of outward K^+ current controlled the AP repolarization and duration. Secondly, repetitive discharges were abolished and plateau potentials were induced by blockade of K^+ -mediated conductances. These results suggest that, under control conditions, voltage-dependent K^+ currents effectively repolarize the electrocyte, de-inactivate the transient Na^+ current, and thus enable its subsequent activation and the repetitive firing. However, high-intensity depolarizing pulses activate the persistent Na^+ -dependent currents which add to the imposed depolarizing current. There would be a gradual voltage-dependent inactivation of the transient Na^+ current that mediates the APs because of the combined depolarizing action of the persistent inward current and the imposed currents. This inactivation of the transient Na^+ current would dimin-

ish the AP peak amplitude, leading to a reduced activation of the voltage-gated outward K^+ current. In these conditions, a damped oscillatory-like repose is evoked. This oscillation ends in a plateau when the inward transient Na^+ -dependent current fully inactivates and the outward K^+ current is insufficient to repolarize the electrocyte. Once the plateau threshold is reached, the amplitude is only slightly modified by further increases in the stimulation intensity because a maximum activation of the persistent current has been reached.

Persistent Na^+ -dependent conductances mediate plateau potentials

The L- and H-plateaus, described above, that were induced when K^+ and Ca^{2+} channels were blocked, indicate that voltage-gated Ca^{2+} conductances do not contribute to plateaus. The plateaus fulfill the main criteria proposed by Russell and Hartline (1982) to define plateau potentials. Both (L and H) plateaus, as well as the accompanying changes in input resistance, were abolished when Na^+ was removed from the extracellular solution. There were, however, important differences between both types of plateaus: threshold was lower for the L-plateau, the voltage at which they stabilized was different, and the input resistance was increased in the L-plateau whereas it appeared to be lowered in the H-plateau. The L-plateau could be due to either the activation of an inward (Na^+) current or the de-activation of an outward (K^+) current, active at rest. Bennett and Grundfest (1966) also reported plateaus when the extracellular K^+ concentration was increased in order to depolarize and to abolish firings in *Gymnotus* electrocytes. These plateaus were also paralleled by an increased input resistance and were interpreted as being mediated by the de-activation of a resting K^+ conductance that was re-activated during the plateau repolarization. However, in our experiments the increased input resistance during L-plateaus disappeared when Na^+ was removed from the extracellular solution. This conductance, de-activated by depolarization, acted as an inward rectifier insensitive to TEA and 4-AP, similar to the one described in crayfish muscle fibers (Araque and Buño 1994). It also shared some properties with I_h (a nonselective cationic current activated by hyperpolarization), but the conductance we observed in *Gymnotus* electrocytes was not blocked by Cs^+ (used in our extracellular fluid). Also, Na^+ -activated K^+ -mediated inward rectifiers have been demonstrated in cardiac fibers (Niu and Meech 2000; Yuan et al. 2003) and could be responsible for the L-plateau in *Gymnotus* electrocytes. On the other hand, in order to explain the L-plateau as resulting from activation of an inward Na^+ current, we must accept that the increase in input resistance is only apparent. The test pulses during the L-plateau may evoke larger hyperpolarization than expected because of a rapid and partial de-activation of the persistent inward Na^+ current responsible for this plateau.

The small input resistance paralleling the H-plateau and the high threshold persistent inward current, considered together with their absence in Na^+ -free solution, suggest that activation of voltage-dependent Na^+ channels mediates the H-plateau.

Therefore, three different Na^+ -dependent currents are present in *G. carapo* caudal electrocytes. However, it was impossible to completely separate the three currents by differential sensitivity to TTX. The transient Na^+ current had an average IC_{50} value (4.85 ± 8.87 nM; $n=9$) similar to those reported for $Na_v1.4$ in mammals (Goldin 2001) and in *Sternopygus* (Ferrari and Zakon 1993). The TTX resistance of persistent current components under voltage clamp and of a part of the AP and plateau responses in current clamp experiments with high $10 \mu M$ TTX concentrations may indicate the presence of a TTX-resistant component or a channel sensitive to extremely high TTX concentrations as reported for mammalian $Na_v1.5$ (Goldin 2001). In addition, the Na^+ -activated K^+ inward rectifier that could underlie the L-plateau is insensitive to TTX and may represent the inward component not affected by the toxin.

Functional significance of persistent Na^+ -dependent currents

The control of MP and excitability are of prime importance in a membrane that unceasingly discharges APs at rates of near 25 Hz with peaks of up to 60 Hz (Barrio et al. 1994; Falconi et al. 1995). In the closely related species *Brachyhyopomus pinnicaudatus*, courting males generate transient, sharp rate increases accompanied by a decrease in EOD amplitude usually referred to as "chirps". Although we never observed chirps in our sample of (probably juvenile) *G. carapo*, the amplitude decrease induced by repetitive firing and related to the L-plateau in one electrocyte could be the basis of the amplitude decrease observed during chirping.

At the EO level—in addition to synchronization of the AP generation by multiple independent electrocytes composing the EOD—the system must ensure a high safety factor resistant to a variety of environmental and physiological changes. Synaptic transmission must reliably generate APs in a cell with a very low resting input resistance and a very short time constant, innervated by 6–9 electromotor neurons from several spinal cord levels. To serve this purpose, the depolarizing effect of PSPs is favored by the marked inward rectification that underlies L-plateaus. This effect may also favor the PSPs temporal summation and synchronize the discharge of different electrocytes. Interestingly, when the H-plateau is activated (and presumably also when the AP grows to its maximum amplitude) the membrane resistance drops below resting values, thus effectively increasing the current flowing through the membrane of the electrocytes. This

functional property may be extremely important because the production of an effective EOD requires the concomitant generation of voltage change and drop in input resistance.

In *Sternopygus* electrocytes, the change in AP duration is attained by coordinated changes in the kinetics of Na^+ and K^+ currents (Zakon 1998; McAnelly and Zakon 2000). The EOD waveform of *G. carapo* is affected by temperature and hormonal influences, mainly acting on the amplitude and duration of the V4 negative wave. This wave is generated by simultaneous activation of the rostral, non-innervated faces of caudal electrocytes (Macadar et al. 1989). An increase in the amplitude and duration of V4 may involve an increase in amplitude and duration of the APs generated by the rostral faces of caudal electrocytes. A decrease in the K^+ current involved in the fast repolarization of the AP in *Gymnotus* may be sufficient to change both amplitude and duration of the AP, allowing the high-threshold, persistent Na^+ current to be activated. This could be a possible mechanism which underlies the effects of temperature and hormones. These speculative issues are the aim of further investigations.

Acknowledgements This work was partially supported by CSIC (Proyecto de Iniciación a F.S.). V. Comas was supported by a contract under a CSIC I+D grant to O. Macadar. The travel of Drs. O. Macadar and W. Buño was funded by a grant from Programa de Colaboración Internacional con Hispanoamérica, Ministerio de Educación y Ciencia/Consejo Superior de Investigación Científica, Spain. Special thanks to Dr. Ana Silva for critical reading of the manuscript. The experiments comply with the "Principles of Animal Care", publication no. 86-23, revised in 1985, of The National Institutes of Health and also with the guidelines of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, Uruguay.

References

- Almers W, Palade PT (1981) Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. *J Physiol (London)* 312:159–176
- Araque A, Buño W (1994) Novel hyperpolarization-activated K^+ current mediates anomalous rectification in crayfish muscle. *J Neurosci* 14:399–408
- Ardanaz JL, Silva A, Macadar O (2001) Sensitivity of EOD waveform in *Gymnotus carapo*: a peripheral phenomenon modulated by steroid hormones. *J Comp Physiol A* 187:853–864
- Barrio LC, Araque A, Buño W (1994) Participation of voltage-gated conductances on the response succeeding inhibitory synaptic potentials in the crayfish slowly adapting stretch receptor neuron. *J Neurophysiol* 72:1140–1151
- Bennett MVL, Grundfest H (1959) Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo*. *J Gen Physiol* 42:1067–1104
- Bennett MVL, Grundfest H (1966) Analysis of depolarizing and hyperpolarizing inactivation responses in Gymnotid electroplaques. *J Gen Physiol* 50:141–169
- Black-Cleworth P (1970) The role of electric discharges in the non-reproductive social behavior of *Gymnotus carapo*. *Anim Behav Monogr* 3:1–77
- Bullock TH, Heiligenberg W (1986) Introduction. In: Bullock TH, Heiligenberg W (eds) *Electroreception*. Wiley, New York, pp 1–12
- Caputi AA (1999) The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *J Exp Biol* 202:1229–1241
- Caputi A, Macadar O, Trujillo-Cenóz O (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. III. Analysis of the fish body as an electric source. *J Comp Physiol A* 165:361–370
- Caputi A, Silva A, Macadar O (1998) The electric organ discharge of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*: the effects of environmental variables on waveform generation. *Brain Behav Evol* 52:148–158
- Falconi A, Borde M, Hernández-Cruz A, Morales FR (1995) Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 176:679–689
- Ferrari MB, Zakon HH (1993) Conductances contributing to the action potential of *Sternopygus* electrocytes. *J Comp Physiol A* 173:281–292
- Ferrari MB, McAnelly ML, Zakon HH (1995) Individual variation in and androgen-modulation of the sodium current in electric organ. *J Neurosci* 15:4023–4032
- Goldin AL (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63:871–894
- Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na^+ channels. *J Exp Biol* 205:575–584
- Hagedorn M (1986) The ecology, courtship and mating of gymnotiform electric fish. In: Bullock TH, Heiligenberg W (eds) *Electroreception*. Wiley, New York, pp 497–525
- Hagedorn M, Carr C (1985) Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *J Comp Physiol A* 156:511–523
- Hille B (2001) *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer, Sunderland
- Hopkins CD (1999) Design features for electric communication. *J Exp Biol* 202:1217–1228
- Lopreato GF, Lu Y, Southwell A, Atkinson NS, Hillis DM, Wilcox TP, Zakon HH (2001) Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7588–7592
- Macadar O, Lorenzo D, Velluti JC (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. II. Electrophysiological properties of single electrocytes. *J Comp Physiol A* 165:353–360
- McAnelly ML, Zakon HH (2000) Coregulation of voltage-dependent kinetics of Na^+ and K^+ currents in electric organ. *J Neurosci* 20:3408–3414
- McAnelly ML, Silva A, Zakon HH (2003) Cyclic AMP modulates electrical signaling in a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 189:273–282
- Nakamura Y, Nakajima S, Grundfest H (1965) Analysis of spike electrogenesis and depolarizing K^+ inactivation in electroplaques of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 49:321–349
- Niu XW, Meech RW (2000) Potassium inhibition of sodium-activated potassium ($\text{K}(\text{Na})$) channels in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 526:81–90
- Russell DF, Hartline DK (1982) Slow active potentials and bursting motor patterns in pyloric network of the lobster, *Panulirus interruptus*. *J Neurophysiol* 48:914–937
- Schuster S (2000) Changes in electric organ discharge after pausing the electromotor system of *Gymnotus carapo*. *J Exp Biol* 203:1433–1446
- Shenkel S, Sigworth FJ (1991) Patch recording from the electrocytes of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 97:1013–1041
- Sierra F, Lorenzo D, Macadar O, Buño W (1995) N-type Ca^{2+} channels mediate transmitter release at the electromotoneuron-electrocyte synapses of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Brain Res* 683:215–220
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O (1999) Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *J Comp Physiol A* 185:187–197

- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. I. Morphology and innervation of the electric organ. *J Comp Physiol A* 165:343–351
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA, Macadar O (1984) Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotiformes). *J Neurobiol* 15:273–281
- Yuan A, Santi CM, Wei A, Wang ZW, Pollak K (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* 37:765–773
- Zakon HH (1998) The effects of steroid hormones on electrical activity of excitable cells. *Trends Neurosci* 21:202–207

Anexo B.

Voltage-gated potassium conductances in *Gymnotus* electrocytes

Felipe Sierra, Virginia Comas, Washington Buño, Omar Macadar

Neuroscience 145 (2007): 453–463

VOLTAGE-GATED POTASSIUM CONDUCTANCES IN *GYMNOTUS* ELECTROCYTES^{AB}

F. SIERRA,^{a,*} V. COMAS,^b W. BUÑO^c AND O. MACADAR^b

^aUnidad Asociada Neurofisiología-IBCE, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^bDpto. de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

^cInstituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

Abstract—Electrocytes are muscle-derived cells that generate the electric organ discharge (EOD) in most gymnotiform fish. We used an *in vitro* preparation to determine if the complex EOD of *Gymnotus carapo* was related to the membrane properties of electrocytes. We discovered that in addition to the three Na⁺-mediated conductances described in a recent paper [Sierra F, Comas V, Buño W, Macadar O (2005) Sodium-dependent plateau potentials in electrocytes of the electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 191:1–11] there were four K⁺-dependent conductances. Membrane depolarization activated a delayed rectifier (I_K) and an A-type (I_A) current. I_A displayed fast voltage-dependent activation-inactivation kinetics, was blocked by 4-aminopyridine (1 mM) and played a major role in action potential (AP) repolarization. Its voltage dependence and kinetics shape the brief AP that typifies *Gymnotus* electrocytes. The I_K activated by depolarization contributed less to AP repolarization. Membrane hyperpolarization uncovered two inward rectifiers (IR1 and IR2) with voltage dependence and kinetics that correspond to the complex “hyperpolarizing responses” (HRs) described under current-clamp. IR1 shows “instantaneous” activation, is blocked by Ba²⁺ and Cs⁺ and displays a voltage and time dependent inactivation that matches the hyperpolarizing phase of the HR. The activation of IR2 is slower and at more negative potentials than IR1 and is resistant to Ba²⁺ and Cs⁺. This current fits the depolarizing phase of the HR.

The EOD waveform of *Gymnotus carapo* is more complex than that of other gymnotiform fish species, the complexity originates in the voltage responses generated through the interactions of three Na⁺ and four K⁺ voltage- and time-dependent conductances although the innervation pattern also contributes [Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. I. Morphology and innervation

of the electric organ. *J Comp Physiol A* 165:343–351]. © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: potassium current, potassium channel, A-current, inward rectifier, electric organ discharge.

Freshwater weakly electric fish utilize the electric organ discharge (EOD) for electrolocation and communication (Bullock and Heiligenberg, 1986). The EOD results from the activity of an electric organ (EO), composed in most species by electrocytes derived from muscle tissue, and of a neural system of control (Trujillo-Cenóz et al., 1984; Hopkins, 1999). *Gymnotus carapo* (*G. carapo*) is a South American pulse-type weakly electric fish with a triphasic EOD which depends on the synchronized firing of action potentials (APs) on the membranes of electrocytes (Trujillo-Cenóz and Echagüe, 1989; Caputi et al., 1989; Caputi, 1999). Different factors (i.e. temperature, steroid hormones, and pauses) modify the EOD waveform of *G. carapo* (Schuster, 2000; Ardanaz et al., 2001; Silva et al., 2002). The underlying cellular mechanisms of these plastic phenomena remain to be investigated in this species.

The electrophysiological properties of *G. carapo* electrocytes were previously studied *in vivo* by Bennett and Grundfest (1959) who showed that these electrocytes fired repetitively when depolarized. The repetitive firing is an indication of repolarizing K⁺ currents that allow the sodium channels to deinactivate (Hille, 2001; Buckingham and Spencer, 2002). In a previous paper we confirmed the repetitive AP discharge of these electrocytes and showed that the repetitive firing relied on the activation of K⁺-mediated repolarizing conductances (Sierra et al., 2005). In addition, Bennett and Grundfest (1966) described transient responses evoked by hyperpolarization and attributed them to inactivation of K⁺ currents and depolarizing inactivating responses caused by the closure of K⁺ channels. However, our data suggested that the depolarizing “inactivation responses” were Na⁺-mediated plateau potentials caused by the activation of persistent Na⁺ currents (Sierra et al., 2005). However, there is no information on the ionic mechanisms mediating the transient responses induced by membrane hyperpolarization.

On the other hand, the electrocytes of two other gymnotiform species, *Electrophorus electricus* and *Sternopygus macrurus*, discharge a single AP when depolarized. This AP is mediated by a transient Na⁺ current that initiates and terminates the AP, shaping its waveform with minor or no contribution of K⁺-mediated conductances

*Correspondence to: F. Sierra, Dpto. de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay. Tel: +598-24875532; fax: +598-2-487-5461.

E-mail address: fsierra@ibce.edu.uy (F. Sierra).

Abbreviations: AP, action potential; APD, action potential duration; *B. pinnicaudatus*, *Brachyhypopomus pinnicaudatus*; EO, electric organ; EOD, electric organ discharge; *G. carapo*, *Gymnotus carapo*; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid; HR, hyperpolarizing response; I_A, A-type potassium current; I_K, delayed rectifier potassium current; IR1, inward rectifier 1; IR2, inward rectifier 2; I–V, current–voltage; K_o, extracellular K⁺ concentration; R_{in}, input resistance; TEA, tetraethylammonium chloride; V–I, voltage–current; V_m, membrane potential; V₅₀, half activation/inactivation voltage; 4-AP, 4-aminopyridine.

0306-4522/07/\$30.00+0.00 © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.002

(Nakamura et al., 1965; Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993). The negligible contribution of K^+ currents could also explain the absence of repetitive firing in these two species. However, K^+ currents that match the description of delayed rectifiers (I_K) have been described in *Electrophorus* and *Sternopygus* electrocytes (Shenkel and Sigworth, 1991; McAnelly and Zakon, 2000; Few and Zakon, 2003; Thornhill et al., 2003). An inward rectifier blocked by Ba^{2+} has also been reported in *Sternopygus* electrocytes (Ferrari and Zakon, 1993).

Because electrocytes are muscle-derived cells, it is reasonable to expect that the channels expressed in electrocytes are related with those expressed in skeletal muscle fibers. Mammalian skeletal muscle fibers have different types of K^+ channels, such as delayed rectifier and $Kv3.4$ channels (Hocherman and Bezanilla, 1996; Vullhorst et al., 1998). The latter is an A-type channel with fast activation and inactivation kinetics and a shift to positive values in the voltage dependence respect to other A-channels (Rudy and McBain, 2001). Inward or “anomalous” rectifiers of the K_v2 family were also described in skeletal muscle (Katz, 1949; Doupnik et al., 1995).

In view of the differences in firing behavior most likely attributable to the presence of K^+ currents (Sierra et al., 2005), we investigated the K^+ -mediated conductances in *Gymnotus* electrocytes. We used an *in vitro* preparation of the isolated EO of *G. carapo* (Macadar et al., 1989; Sierra et al., 1995, 2005) and analyzed under two-electrode current- and voltage-clamp conditions the K^+ -mediated currents in the electrocytes of this species. In addition, we analyzed the conductances mediating the transient hyperpolarizing response (HR) described by Bennett and Grundfest (1966).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Methods used in this work were basically the same as in Sierra et al. (2005).

Animals and preparation

G. carapo (10–15 cm long) were collected at Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay and housed in individual aquaria at controlled room temperature (20–21 °C). Under deep anesthesia (immersion in 4 °C water), a 1.5–2.0 cm portion of the tail—containing the caudal segment of the EO—was cut by hand with a razor blade. The skin, vertebral column and muscles were removed and the isolated EO was pinned in a 2 ml Sylgard recording chamber and superfused with different Ringer solutions (see below) at room temperature. The experiments comply with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80–23) revised in 1996 and also with the guidelines of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, Uruguay. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Microelectrodes and recordings

Electrocytes ($n=76$) were impaled with two KCl 3 M filled micropipettes (~ 10 M Ω) connected to an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Amplifier probe gains were $\times 1$ and $\times 10$ for voltage and current electrodes, respectively.

Electrodes were isolated from each other with a grounded shield. The bath ground was a chloride silver wire inserted into a 3% agar bridge in 3 M KCl. Electrical responses, voltage commands and current pulses were continuously monitored on a digital oscilloscope.

Two-electrode current-clamp recordings were obtained from cells at their resting membrane potential (V_m) of -80.1 ± 13.0 mV, as estimated by Sierra et al. (2005), and hyperpolarizing and depolarizing current pulses of up to 1000 nA were delivered. Electrocytes were discarded when large depolarizing current pulses (>800 nA) did not elicit APs in control conditions.

Two-electrode voltage-clamp recordings were at a -80 mV holding potential which corresponds to the average resting V_m . Voltage command pulses were delivered at increasing depolarized (from -70 to 80 mV) or hyperpolarized (from -90 to -280 mV) potentials. The time required to reach the command pulse potential was <0.5 ms and there were no V_m variations throughout the voltage pulse. Recordings that failed to meet these criteria were rejected. In some voltage-clamp experiments ($n=2$), NaCl was substituted with sodium metansulfate to eliminate Cl^- conductances and to attempt improvement of voltage control; no significant deviation in the responses was observed in these experiments and therefore we did not use Cl^- substitution in our experiments as Ferrari and Zakon (1993) did.

Acceptable voltage control was feasible only in small electrocytes (maximal size of $250 \mu m$ rostro-caudal $\times 250 \mu m$ dorso-ventral). In *Gymnotus*, tail electrocytes are cuboid- or drum-shaped cells with average dimensions of ~ 200 by $200 \mu m$. A space constant of $\sim 870 \mu m$ was estimated assuming a cylindrical cell with a diameter of $200 \mu m$ and a length of $200 \mu m$ with an average membrane resistivity of $37.7 \Omega \cdot cm^2$ (based on the average input resistance, R_{in}) and an axial resistivity of $25 \Omega \cdot cm$ (i.e., based on Cole's, 1975 measurement in squid axon). Since the current microelectrode was placed close to the center of the electrocyte, the maximal distance to the active membranes was $\sim 100 \mu m$, and the estimated voltage drop from the current injection site to these membranes should only be $\sim 11\%$. This should also be correct during active responses, since lateral membranes are believed to be only passive. However, error in space clamp cannot be ruled out, because the above estimations do not take into account that the membrane of the electrocyte is not homogeneous and voltage gated conductances are not uniformly distributed over the cell's membrane, making the estimation of clamp errors difficult. In addition, although compared with other electrocytes those of *Gymnotus* have fewer invaginations, resulting in little increase in surface area (Schwartz et al., 1975), voltage errors could also be introduced by external and internal series resistances present in these cells. Therefore, while in the present work qualitative statements are clear and informative, caution should be used in evaluating some of the quantitative measurements of the membrane currents (see also Discussion).

Data were collected, digitized (LabMaster TM-100 interface board, Scientific Solutions Inc., Mentor, OH, USA), and analyzed with the pCLAMP software (Axon Instruments) on a Pentium-based personal computer. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Solutions

The control solution contained (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 4.5 $CaCl_2$, 1.5 $MgCl_2$, 10 Hepes. The Na^+ - and Ca^{2+} -free solution used in voltage-clamp experiments contained (in mM): 130 choline chloride, 5 KCl, 6 $MgCl_2$, 10 Hepes. In experiments with Cs^+ KCl was partially (3 mM) substituted by CsCl. Tetraethylammonium chloride (TEA) (25 mM), 4-aminopyridine (4-AP) (1 mM), Ba^{2+} (1 mM) and Cd^{2+} (3 mM) were added to the control or Na^+ -

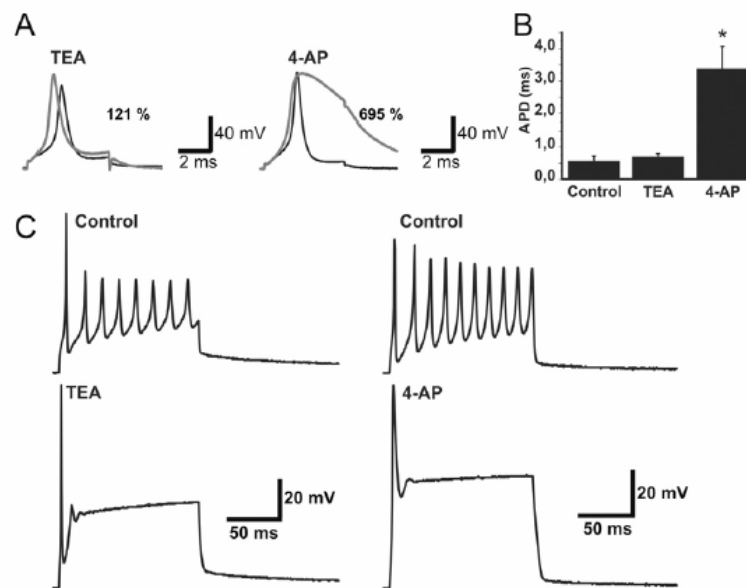


Fig. 1. Effects of K^+ channel blockers on the AP waveform. (A) Representative records showing that 4-AP (1 mM) clearly increased APD measured at half-amplitude. In the examples shown, 4-AP induced a large increase of the APD to 695% of the corresponding control, whereas TEA only increased the APD to 121%. (B) Summary data showing that 4-AP significantly increased the APD to 593% with respect to the control ($P < 0.01$; $n = 9$), whereas the increase provoked by TEA was not statistically significant (123%; $P > 0.05$; $n = 5$). (C) Both TEA and 4-AP prevented repetitive firing, and prolonged depolarization evoked a single AP followed by a plateau that was larger under 4-AP. The same TEA and 4-AP concentrations were used throughout.

and Ca^{2+} -free solutions. To test the possible involvement of chloride channels in hyperpolarization-activated currents NaCl and KCl were substituted with sodium methanesulfonate (130 mM) and potassium acetate (5 mM), respectively. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

RESULTS

Changes in AP features induced by K^+ channel blockers

In control current-clamp conditions, brief depolarizing pulses evoked action potential durations (APDs) of 0.57 ± 0.16 ms ($n = 20$), measured at half-amplitude. To test the involvement of K^+ -mediated conductances on AP waveform in current-clamp conditions we blocked K^+ channels with extracellular application of 4-AP (1 mM) and TEA (25 mM) (Fig. 1A). There was a strong and statistically significant effect of 4-AP that increased the APD (Fig. 1B) to 3.38 ± 0.68 ms ($P < 0.01$, $n = 9$). In contrast, the effect of TEA on the APD (0.70 ± 0.09 ms; $P > 0.05$, $n = 5$) was not significant even when the control and after TEA applications were analyzed using the paired Wilcoxon test in the same electrocytes ($z = 1.75$; $P = 0.08$; $n = 5$). In addition, both blockers prevented the repetitive firing that typifies responses evoked by prolonged depolarizing current pulses in control Ringer (Sierra et al., 2005). Under TEA and 4-AP, electrocytes fired a single AP followed by a prolonged plateau-like depolarization (Fig. 1C). However, there were differences in the effect of both drugs because

although the delay of APs was shortened by TEA and 4-AP the effect was larger for TEA. Moreover, the post-AP repolarization showed oscillations under TEA that were absent with 4-AP and the plateau was larger under 4-AP than TEA (Fig. 1C). The above results are consistent with an important involvement of K^+ -mediated conductances in the repolarization of the AP and in the genesis of repetitive firing. In addition, the results suggest a more influential involvement of 4-AP-sensitive than TEA-sensitive K^+ currents in AP repolarization.

Changes in membrane properties induced by K^+ channel blockers

The major effect of extracellular TEA (25 mM) on intrinsic properties was a marked increase in R_{in} (Fig. 2), as estimated from the slopes of linear fits of voltage–current ($V-I$) curves calculated with responses evoked by hyperpolarizing current pulses (Fig. 2A). The control R_{in} was 21.2 ± 1.1 k Ω and increased to 35.8 ± 1.1 k Ω under TEA for the electrocyte of Fig. 2A. The mean R_{in} values of all electrocytes were 65.4 ± 54.0 k Ω ($n = 29$) in control conditions and 131.3 ± 87.7 k Ω ($P < 0.01$; $n = 11$) under TEA, respectively.

Note also the voltage step in the $V-I$ relationship for depolarizing pulses (> 100 nA) that is a consequence of the plateau (Fig. 2A). A plateau-like depolarization was also generated in control Ringer (Sierra et al., 2005) but at considerably higher current pulse intensities (> 700 nA), as revealed by the step depolarization in the $V-I$ relationship

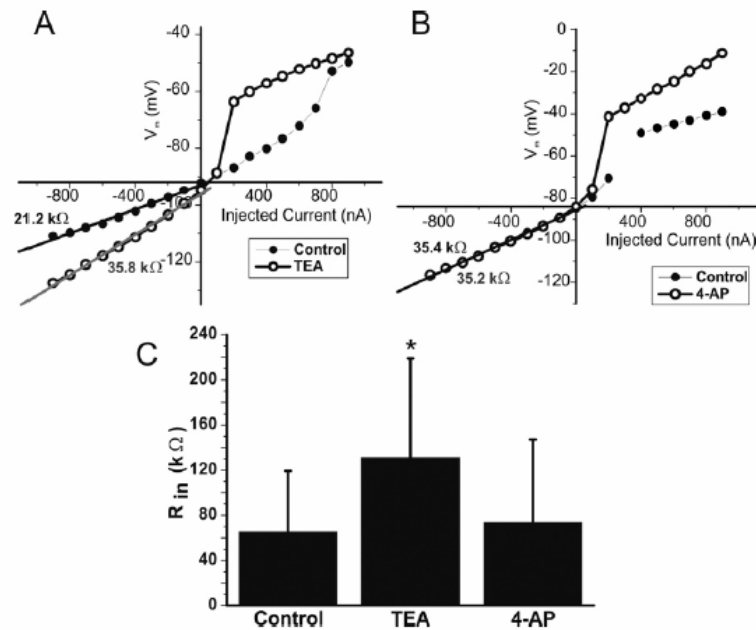


Fig. 2. Modifications of the R_{in} induced by K^+ channel blockers. (A) V – I curves in control conditions and under TEA. TEA increased the slope of the V – I relationship in the hyperpolarizing direction. The corresponding R_{in} estimated by the linear fits were 35.8 and 21.2 kΩ under TEA and in control conditions, respectively. There were steps in all I – V relationships for depolarizing pulses (due to the Na^+ plateau). TEA decreased the plateau threshold without modifying its amplitude. (B) Same as A, but under 4-AP. The slopes of both relationships were essentially identical in the hyperpolarizing direction (R_{in} was 35.4 and 35.2 kΩ, respectively). The step in the depolarizing direction was larger under 4-AP than in control conditions, consistent with the larger plateau in the former. (C) Summary data showing the effects of TEA (significant increase of 101%; $P < 0.01$; $n = 11$) and 4-AP (non-significant increase of 12%; $P > 0.05$; $n = 14$) on R_{in} .

calculated in control Ringer (Fig. 2A). Under block of K^+ conductances with 4-AP the plateau could be triggered at lower intensities (Fig. 2B).

Interestingly, R_{in} was not significantly modified by 4-AP (Fig. 2B, C), as is shown by the perfectly superimposed control and 4-AP V – I relationships in the hyperpolarizing direction (Fig. 2B). In contrast, 4-AP increased the plateau amplitude without modifying its threshold (Fig. 2B).

The above results, taken together, are consistent with TEA inhibiting a K^+ -mediated current that is essential in determining the cells' R_{in} , but that contributes scarcely to AP repolarization. In contrast, the effects of 4-AP suggest that it blocks a K^+ conductance that is of key importance in repolarizing the cell after the AP.

Voltage-clamp analysis of outward currents evoked by depolarizing commands

Voltage-clamp experiments were performed in Na^+ - and Ca^{2+} -free solution to isolate K^+ -mediated conductances. In these conditions depolarizing step commands activated an outward current that gradually increased with depolarization and showed an initial transient component followed by a persistent current (Fig. 3A, B). Both components showed a linear (i.e. Ohmic) current–voltage (I – V) relationship above ~ -40 mV with a much

steeper slope for the transient current component (Fig. 3C). The activation curves showed that both currents had a similar threshold, slightly > -60 mV (Fig. 3D), but that the transient A-type current (I_A) had a steeper voltage dependence and a more negative half voltage activation value ($V_{50} = -19.46 \pm 1.12$ mV) than the persistent I_K component ($V_{50} = -12.24 \pm 3.96$ mV); those values were significantly different as estimated by the paired Wilcoxon test ($z = 2.201$; $P = 0.028$; $n = 6$).

Since the kinetics of the transient current suggests an I_A behavior (reviewed in Storm, 1987; Brown et al., 1990) we applied pre-pulse voltage command protocols designed to analyze the voltage-dependent inactivation that typifies I_A . Protocols with hyperpolarizing and depolarizing pre-pulses followed by a depolarizing test pulse (Fig. 4) confirmed that the initial transient component had voltage-dependent inactivation consistent with the I_A (Fig. 4A).

The transient I_A could be isolated by subtraction of the total current ($I_A + I_K$) evoked by a pulse from -80 to -10 mV from the I_K remaining after a pre-pulse to 70 mV that completely inactivated I_A (Fig. 4B). In contrast, the outward current measured at delays > 30 ms was not affected by pre-pulses (Fig. 4C). The non-inactivating component (I_K), that remained after complete inactivation of I_A was $\sim 40\%$ of the total outward current (Fig. 4D). The percentage of

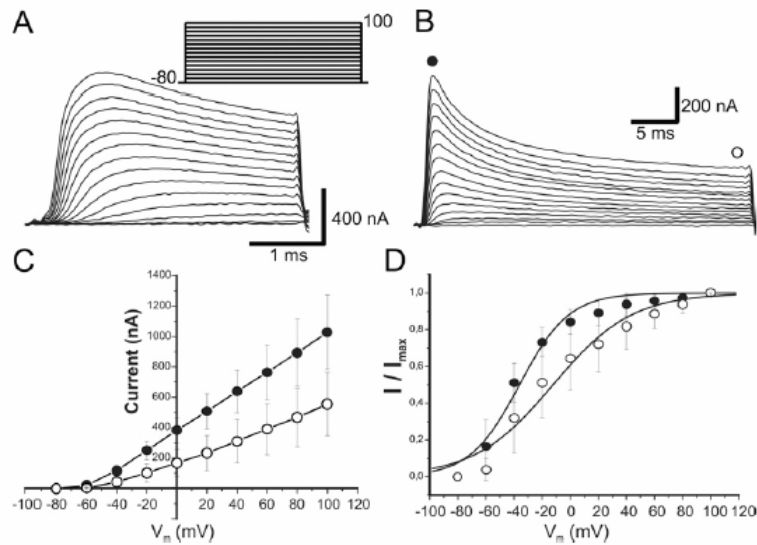


Fig. 3. Outward currents activated by depolarizing steps. (A) Typical family of currents evoked by depolarizing steps from -80 to 100 mV. (B) Same as A at an expanded time scale. (C) I–V curves of the average ($n=6$) current taken at the peak (I_A , filled circles) and 30 ms from the onset of the step (I_K , open circles). (D) Activation curves taken from same data as in C, considering a K^+ equilibrium potential of -80 mV. The V_{50} for I_A was -19.46 ± 1.12 mV and for I_K -12.24 ± 3.96 mV. The continuous lines represent the fit to the Boltzmann formalism.

the I_K remaining after complete inactivation of I_A with pre-pulses >0 mV showed important dispersion being very different in different cells with values ranging between 18.5% and 74.4% of the total outward current. This dispersion could be caused by the variable proportion of both types of conductances in different electrocytes (Fig. 4D);

however, a contribution of space clamp errors cannot be completely ruled out.

Therefore, the above results are consistent with two different K^+ -mediated conductances being activated by depolarization; an initial transient fast activating-inactivating outward current (I_A) and a persistent I_K .

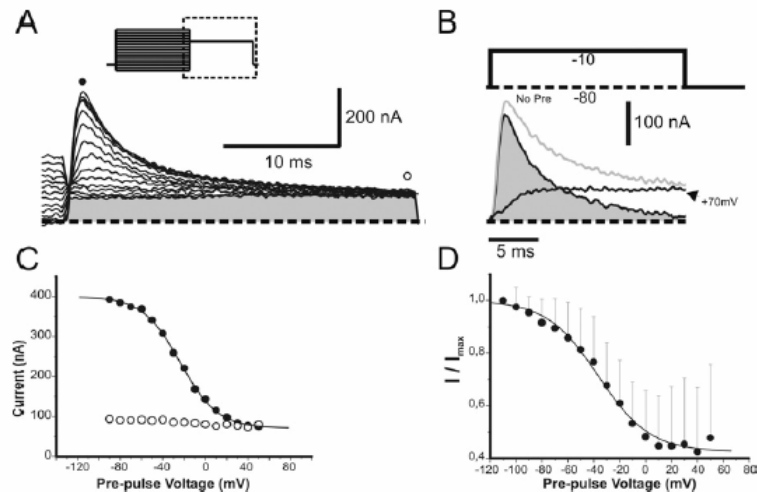


Fig. 4. Voltage-dependent inactivation of I_A . (A) Currents elicited by a step to 0 mV after varying pre-pulses from -90 to 50 mV (shown above). The initial, transient, outward current evoked by the step decreased as a function of pre-pulse depolarization (i.e., inactivated). The outward current remaining after complete inactivation of the transient I_A component (shadowed) corresponds to I_K . (B) Currents activated both in the absence of pre-pulse—or $I_A + I_K$ —(no Pre) and after a pre-pulse to 70 mV—or I_K —(+70). The shadowed area corresponds to the I_A obtained by subtraction of both currents ($[I_A + I_K] - I_K = I_A$). The voltage command protocol is shown above. (C) Plot of the peak transient I_A (filled circles) as a function of pre-pulse voltage, and of the steady current I_K measured 30 ms later (open circles), taken from data in A. The continuous line represents the fit to the Boltzmann equation. (D) Average inactivation curve measured as in B ($n=5$). Note that the final conductance value is $\approx 40\%$ of the maximum conductance.

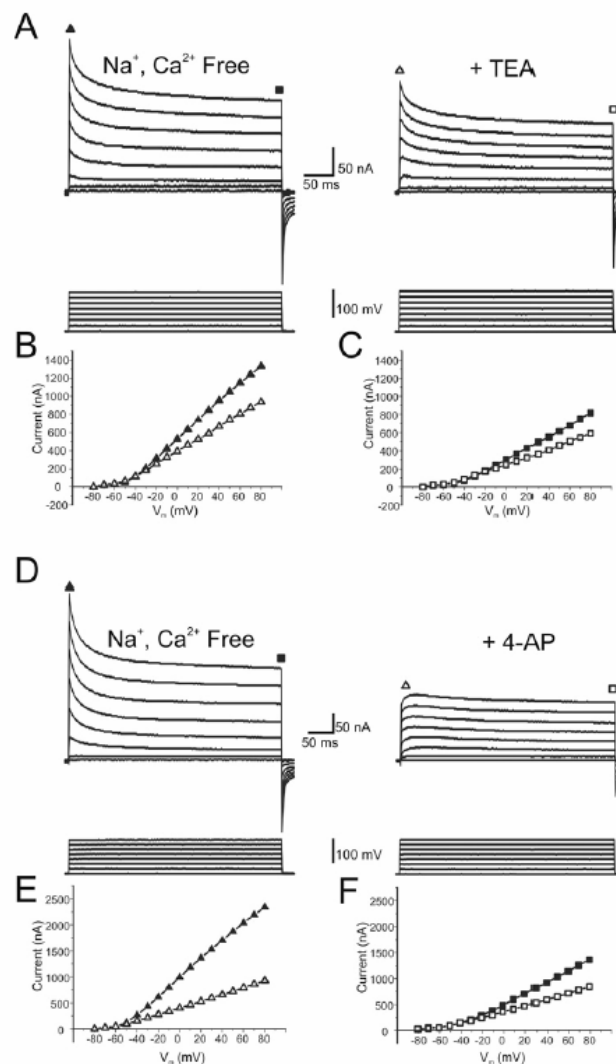


Fig. 5. Effect of TEA and 4-AP on outward currents. (A) Family of currents in control (Na^+ - and Ca^{2+} -free) and TEA solutions. The voltage protocols showed correspond to actual voltage recordings. (B) I–V relationships of peak transient I_A in control (Na^+ - and Ca^{2+} -free; filled triangles) and TEA (open triangles). (C) I–V curves of sustained I_K in control (Na^+ - and Ca^{2+} -free; filled squares) and TEA (open squares). (D–F) Same as A–C but showing the effect of 4-AP on the outward currents. Note the much larger effect of 4-AP on I_A in E.

Differential effects of TEA and 4-AP on I_A and I_K

The effects of TEA and 4-AP under current-clamp suggest that the drugs inhibit different K^+ -mediated conductances (Figs. 1 and 2). Therefore, we analyzed under voltage-clamp the effects of TEA (25 mM) and 4-AP (1 mM) on I_A and I_K . Both currents were similarly inhibited by TEA, as revealed by the similar reductions of the slopes of the corresponding I–V relationships (Fig. 5A–C). However, TEA did not modify the slope or the V_{50} of the corresponding activation curves (data not shown). In contrast, 4-AP markedly inhibited I_A and reduced I_K to a similar degree as

TEA (Fig. 5D–F). These results are consistent with the more potent action of 4-AP than TEA on AP repolarization (Fig. 1A), where the faster transient I_A , that has a steeper voltage dependence than I_K is maximally activated during the AP, thus favoring its fast repolarization.

Responses evoked by hyperpolarization under current-clamp

In control conditions hyperpolarizing pulses evoked an initial ramp-like hyperpolarizations (Fig. 6A) followed by transient “spike-like” hyperpolarizations (amplitude $125.8 \pm$

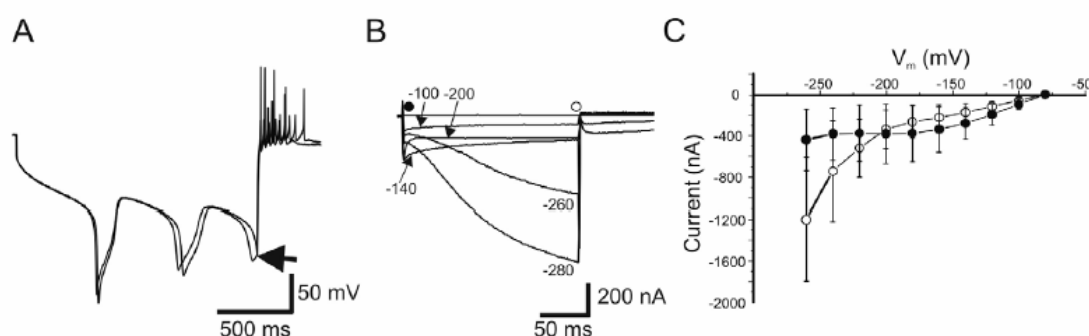


Fig. 6. HR and underlying currents. (A) Superimposed repetitive HR evoked by two successive current pulses (1500 ms, 1000 nA). The last "spike-like" HR is aborted at its peak by pulse termination (arrow), indicating that it is not mediated by a regenerative mechanism. Repetitive APs are evoked at the rebound after the pulse. (B) Currents activated by hyperpolarizing voltage steps. An "instantaneous" inward rectifier current (IR1) followed by partial inactivation that increases with hyperpolarization was evoked by steps between -100 and -160 mV. A late, larger inward rectifier current (IR2) was induced at more negative potentials. (C) Average I-V relationship of IR1 curve (filled circles) shows a negative slope between -180 and -220 mV, consistent with the voltage-dependent inactivation. The current at the end of the steps (open circles) shows lower values than IR1 between -80 and -200 mV, as a result of the partial time-dependent inactivation of this current. The linear I-V relationship between -80 and -180 mV probably represents the leak current. At more negative values the increased slope represents the conductance increase due to the activation of IR2.

33.2 mV from threshold; duration 182.3 ± 80.1 ms) that were evoked when the V_m reached a threshold value (-214.5 ± 26.4 mV; $n=36$); (Fig. 6A). These "spike-like" transient HR consisted of responses with a steep onset hyperpolarizing slope and slower depolarization with a hump (previously described by Bennett and Grundfest, 1966). The HRs were abruptly terminated at peak of the hyperpolarizing "spike-like" wave, suggesting that they were not active regenerative responses (Fig. 6A, arrow). The HR peak values were at very negative V_m s (-340.4 ± 44.5 mV; $n=36$).

Responses evoked by hyperpolarizing commands under voltage-clamp

In the voltage-clamp configuration, hyperpolarizing step commands generated inward currents that showed inward rectification. At the onset of voltage steps there was an instantaneous inward current that displayed time- and voltage-dependent inactivation. Both the time- and voltage-dependence of the inactivation increased with hyperpolarization (Fig. 6B). We termed this current inward rectifier 1 (IR1). Larger hyperpolarizing steps activated another inward current with slower on kinetics that we called inward rectifier 2 (IR2) (Fig. 6B). The I-V relationships measured at the onset (filled circles, Fig. 6C) and offset (open circles, Fig. 6C) of voltage steps show the different behaviors of both currents. The negative slope in the I-V relationship at intermediate voltage values between -180 and -240 mV at the onset of the voltage steps was caused by the time- and voltage-dependent inactivation that typifies IR1 (Fig. 6C). Within these negative voltage values, the time constant of the inactivation also decreased (Fig. 6B). The I-V relationship measured at the offset of the steps shows a gradually increasing current with a linear relationship with hyperpolarization up to ~ -200 mV and a large increase in the slope that corresponds to the late activation of IR2 at more negative voltages (open circles, Fig. 6B).

The two inward rectifiers also showed a differential sensitivity to extracellular Ba^{2+} ; IR1 was totally blocked by 1 mM Ba^{2+} , while IR2 was not affected. Therefore, both currents could be analyzed in isolation, (i) IR2 under block of IR1 with Ba^{2+} (Fig. 7B) and (ii) IR1 by subtracting the currents recorded in control conditions from those obtained after complete isolation of IR2 with Ba^{2+} (Fig. 7C). At pulse onset the peak current increased monotonically with hyperpolarization from the -80 mV holding up to ~ -240 mV to decrease with larger hyperpolarizations (open circles, Fig. 7D). At pulse termination the I-V plot showed a similar U-shaped profile but with smaller current values at all V_m s explored, consistent with the time-dependent inactivation that typifies IR1.

Extracellular Cs^+ (3 mM) induced the same effect as Ba^{2+} (not shown), blocking IR1 without affecting the IR2, suggesting that the latter is not an H-type current. Extracellular Cd^{2+} did not affect IR2 or IR1 (not shown). Low Cl^- concentration to 8% than the control by substitution of NaCl and KCl with sodium methanesulfonate (130 mM) and potassium acetate (5 mM), did not modify either IR1 nor IR2 (not shown).

To estimate the functional relationship between V_m and total conductance, which provides an estimate of the proportion of open channels, we calculated the activation curves of IR1 and IR2. The IR1 conductance was maximal at rest and decreased to 0 around -250 mV (Fig. 7E). For IR2—in which maximum activation was not reached with the V_m s used—we fitted the conductance values to a Boltzmann equation and used its maximum value to normalize and construct the activation curve (Fig. 7F). IR2 shows a resting conductance of $\sim 30\%$ relative to the highest estimated conductance (dotted line, Fig. 7F) that increased from ~ -200 mV to reach a maximum value at ~ -300 mV. The vertical lines and the shadows in Fig. 7E and F, indicate the mean and standard deviation values of the threshold V_m s at which HRs were evoked under cur-

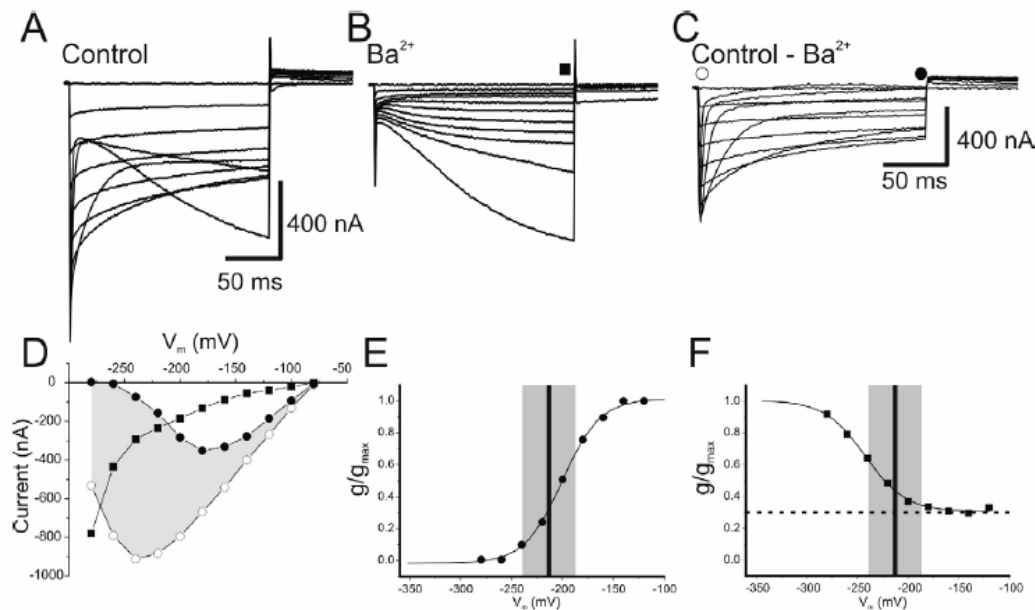


Fig. 7. Isolation of IR1 and IR2 and their role in the genesis of the HR. (A) Currents IR1 and IR2 induced by hyperpolarizing steps in control conditions. In these experiments the linear 'leak' current was not subtracted. (B) Superfusion with 1 mM Ba^{2+} blocked IR1 without affecting IR2. (C) IR1 was isolated by subtraction of IR2 (isolated under Ba^{2+}) from the total current (IR1+IR2+leak). Note that IR1 showed time- and voltage-dependent inactivation. (D) I–V relationships of hyperpolarization activated inward currents measured at the onset of voltage commands (IR1 peak: open circles) and before step offset (inactivated IR1: filled circles). Filled squares correspond to IR2 (isolated in Ba^{2+}) and leak current measured before step-off. (E) Activation curve of IR1 constructed with data from D (filled circles). The points were calculated assuming a K^+ equilibrium potential of -80 mV; the continuous line represents the fit to the Boltzmann formalism ($V_{50} = -200.4 \pm 1.0$ mV). The vertical line represents the average value of the HR threshold (-214.5 mV) and the gray bar the threshold's standard deviation; i.e., the V_m at which there is a higher probability of triggering HRs (same in F). (F) Same as E for IR2, the V_{50} was -242.3 ± 3.4 mV (from data in D; filled squares). The horizontal dashed line indicates desaturation values of the fit at 30.5% of the maximum conductance; i.e., a background current that persisted after blocking IR1.

rent-clamp (see above). Note that there was a high probability of reaching the HR threshold at V_m s where the open probability of both IR1 and IR2 channels attained values below 50% of the respective maxima.

DISCUSSION

We describe for the first time the properties of the K^+ -mediated conductances present in caudal electrocytes of *Gymnotus* and show that they are of fundamental functional importance because they enable both the generation of brief APs and the repetitive AP activity evoked by sustained depolarization that differentiates these electrocytes from those of other electric fish species (Nakamura et al., 1965; Ferrari and Zakon, 1993; Sierra et al., 2005). In addition, we confirm the presence of the interesting and atypical "spike-like" HRs previously described by Bennett and Grundfest (1966) in *G. carapo* and other species electrocytes and provide original evidence indicating that the interaction of two K^+ -mediated inward rectifiers underlie such complex responses.

In addition to the Na^+ -mediated currents that sustain the AP and the plateau-like depolarizations that typify the responses of these electrocytes (Sierra et al., 2005), the more complex electrical behaviors that these cells display,

as compared with those of other fish species, are explained by the interactions of the Na^+ -mediated currents with at least four different K^+ -mediated conductances. We were able to isolate an I_A and a I_K both activated by depolarization and two inward rectifiers (IR1 and IR2) that were induced by membrane hyperpolarization. Interestingly, both I_A and IR2 had not been observed in electrocytes of other fish species, whereas I_K and IR1 are also present in the electrocytes of other gymnotiformes (Nakamura et al., 1965; Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993; McAnelly and Zakon, 2000; Thornhill et al., 2003).

Although qualitative statements are clear and informative, the quantitative data on the kinetics and voltage dependence of the currents presented here have to be considered carefully because of possible errors in space-clamp of the electrocytes (see Experimental Procedures). In *Gymnotus* electrocytes, due to their shape and especially short length, we could not introduce a third electrode to measure the space constant without damaging the membrane. Therefore estimations as those performed by Ferrari and Zakon (1993) in the ~ 1 mm long spindle shaped electrocytes of *Sternopygus* were not feasible.

Role of the transient I_A in AP repolarization

K^+ -mediated currents are essential in controlling both the fast AP repolarization and the repetitive firing that typifies the responses evoked by brief and sustained depolarization, respectively (Sierra et al., 2005). We show that in current-clamp conditions the duration of the AP is markedly increased by 4-AP, and is little or not at all affected by TEA. In addition, 4-AP has a major blocking effect on the initial transient I_A component of the K^+ -mediated currents recorded under voltage-clamp. Both results are consistent with a transient 4-AP sensitive I_A being the main K^+ -mediated current controlling the fast AP repolarization.

The I_A in *Gymnotus* electrocytes have a voltage dependence shifted to positive values relative to the I_A usually observed in other excitable cells. The positive shift in the voltage-dependence and the characteristic activation and inactivation kinetics of the I_A in *Gymnotus* electrocytes are consistent with channels of the Kv3.4 type. Kv3.4 channels are abundant in skeletal muscle fibers, where they play an important role in AP repolarization (Vullhorst et al., 1998; Rudy et al. 1999). In addition, Kv3 channels also underlie the high frequency discharge that characterizes several types of excitable cells by reducing the number of Na^+ channels inactivated during AP (Rudy and McBain, 2001). On the other hand, I_A in electrocytes of *Gymnotus* are poorly blocked with 25 mM concentration of TEA while Kv3 channels are sensitive to low doses of 4-AP and of TEA (Coetzee et al., 1999). This inconsistency in pharmacological profile and the similarity in the V_{50} of the *Gymnotus* I_A and the *Electrophorus* Kv1.1 (-19.46 ± 1.12 mV and -22.8 ± 0.7 mV, respectively) studied by Thornhill et al. (2003) open the possibility that this I_A current was due to another type of channel different to the Kv3.4 as could be the Kv1.1 described in other gymnotid electrocytes but with a transient kinetics (Few and Zakon, 2003; Thornhill et al., 2003). Thus, the question about the molecular nature of these channels and of that responsible for the I_K remains open (see below).

AP duration in *Gymnotus* is extremely brief (0.57 ± 0.16 ms), a remarkable value since our recordings were made at room temperature (20 – 22°C). I_A plays an important role in AP repolarization and in reducing AP duration because of the relatively positive V_{50} of ~ -19 mV and rapid on kinetics that typifies the I_A in *Gymnotus* electrocytes. The V_{50} value is an indication of the V_m at which I_A exerts its strongest repolarizing effect and it coincides with the depolarizing phase of the AP before the peak value is reached. This would explain both the briefer and smaller APs of *Gymnotus* electrocytes relative to those in other species (Nakamura et al., 1965).

The EOD in *Gymnotus* is triphasic and the two late large waves are the result of the sequential activation of caudal and rostral faces of tail electrocytes (Macadar, 1993). Therefore, long AP durations would cause subtraction of the opposed and simultaneously flowing extracellular currents generated by opposite electrocyte faces, thus canceling out summation of extracellular currents along the EO. In the case of *Gymnotus* electrocytes, the brief

APs guarantee extracellular current summation. Consistent with the above discussion, I_A was not reported in related species with less complex monophasic EODs (Nakamura et al., 1965; Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993; McAnelly and Zakon, 2000; Thornhill et al., 2003), but I_A is a key factor in the generation of brief APs and biphasic EODs in *Gymnotus*. If this is true I_A should also be present in other gymnotiform species with multiphasic EODs, a possibility that remains to be investigated.

The I_A could also play a role in shortening the refractory period to enable high frequency discharges that could eventually reach up to 200 Hz (Bennett, 1971). The closely related species *Brachyhypopomus pinnicaudatus* has a brief biphasic EOD and is able to fire high frequency bursts of up to 600 Hz, referred to as “chirps” (Kawasaki and Heiligenberg, 1989; R. Perrone, personal communication). Chirps require both brief APs and short refractory period which could also be mediated by I_A . It cannot be discarded that *Gymnotus* could also have this type of communication signal not described so far.

AP duration is an important determinant of the EOD waveform; therefore a change of both the duration—by modulation of the voltage dependence—or the number of I_A channels expressed could be mechanisms by which steroid hormones mediate the changes in duration of the different EOD components in *Gymnotus* as occurs in male *Brachyhypopomus* during breeding (Hagedorn and Carr, 1985; Ardanaz et al., 2001).

Role of the I_K

We show that TEA did not affect AP repolarization to the same extent as 4-AP, and did not clearly block a specific current activated by depolarization. In addition, extracellular TEA only partially inhibited both the early transient I_A peak and the late sustained I_K . However, TEA increased R_{in} , suggesting it inhibited a K^+ -mediated current active at resting V_m . In contrast, 4-AP inhibited I_A , but had a much lesser effect on I_K .

The presence of I_K in electrocytes of gymnotiformes was previously described (Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993). This type of current is mediated in electrocytes by K^+ channels of the Kv1 family (Few and Zakon, 2003; Thornhill et al., 2003) and the same could happen in *Gymnotus*. In the well-studied *Sternopygus* electrocytes, this current plays a role in the modulation of the AP duration induced by sex steroids (McAnelly and Zakon, 2000; Few and Zakon 2003).

K^+ -mediated currents induced by hyperpolarization

Hyperpolarizing current steps elicit the hyperpolarizing “spike-like” response or HR. We show that pulse break immediately terminates the HR even during the peak of the hyperpolarizing “spike-like” wave, indicating that it is not a bona fide “active response” but instead most likely depends on an increased R_{in} , as suggested by Bennett and Grundfest (1966).

Hyperpolarizing step commands under voltage-clamp revealed two inward rectifiers (IR1 and IR2) with clearly

distinct voltage dependences and kinetics. IR1 was blocked by Ba^{2+} and Cs^+ , whereas IR2 was unaffected by Cs^+ , Ba^{2+} or Cd^{2+} which were able to block the inward K^+ rectifier I_{AB} described by Araque and Buño (1991) in crayfish muscle and the chloride current characterized by Clark et al. (1998) in sympathetic neurons. In addition, low chloride (8%) solution did not affect IR2 either, consistent with the current being mediated by K^+ and not Cl^- .

The IR1 is probably the same Ba^{2+} and Cs^+ sensitive inward rectifier described by Ferrari and Zakon (1993) in *Sternopygus* electrocytes that displays a linear behavior from rest to -140 mV. In addition, we demonstrate that at more negative V_m values there was an increase in time and voltage dependent inactivation that tended to close IR1 channels. The time and voltage dependent inactivation of IR1 and the subsequent increase in R_{in} explain the sustained hyperpolarization of electrocytes and the hyperpolarizing phase of HR. The activation of IR2 at values near -300 mV mediates the "repolarizing phase" of the HR.

Functional implications and relevance to other systems

The presence of an I_A in these electrocytes as well as in other excitable cells has important functional relevance because it correlates well with their firing properties typified by brief APs and high frequency repetitive firing (Rudy and McBain, 2001). These firing properties contrast with those described in electrocytes of other gymnotids that do not express I_A and only fire single long duration APs (Nakamura et al., 1965; Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993).

An interesting possibility that remains to be investigated is that electrocytes of species with complex multi-wave EODs may require the function of the fast and transient outward I_A . In contrast, the presence of I_A may not be necessary to generate the simple monophasic EODs of other fish species (Nakamura et al., 1965; Shenkel and Sigworth, 1991; Ferrari and Zakon, 1993).

The EOD waveforms in *G. carapo* and *B. pinnicaudatus* (a related gymnotiform fish) show changes in the amplitude of the late head negative wave with increasing temperature. This temperature sensitivity is linked to reproductive states and is modified by steroid hormones and acclimation (Caputi et al., 1998; Silva et al., 1999; Ardanaz et al., 2001; Quintana et al., 2004). The sensitivity to water temperature could be related to an increased membrane conductance, as described in *Gymnotus* and *Brachyhyopomus* (Macadar et al., 1997). Besides a leak current, IR1 could be the target of the temperature sensitivity since it is active at rest.

Although the hyperpolarizing potentials reached by HRs are probably never attained in functional conditions IR1 and IR2 could also possibly play a role in the control of extracellular currents, which are of large magnitude in the EO (Caputi and Budelli, 1995). The large longitudinal currents that underlie the EOD generated by the synchronized activity of all electrocytes composing the EO may be especially important in the small diameter tail end where our

experimental electrocytes were obtained. In this region, the longitudinal current density could reach values of more than $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ at the peak of the large waves V3 and V4 (Caputi and Budelli, 1995). The control of these large extracellular currents by inward rectifiers may be important to funnel large currents in a longitudinal direction and limiting undesired ephaptic interactions between neighbor electrocytes.

In addition, since IR1 is active at rest, when depolarization starts during the AP the conductance of the IR rapidly decreases, leading to a regenerative closure of the IR. This fast switch-off of IR1 could enhance excitability and modify the firing behavior of the electrocyte. Inward rectifiers are sensitive to the extracellular K^+ concentration (K_o) and the V_m follows a square-root relationship with the inward rectifier conductance in muscle cells (Standen and Stanfield, 1978), a relationship that could be present in *Gymnotus* electrocytes. Therefore, since IR1 is active at rest, upon a possible reduction of K_o the membrane hyperpolarizes and the conductance of the inward rectifier increases, thus enhancing the hyperpolarization and providing a positive feedback regenerative property that could be important in the control of extracellular currents.

Acknowledgments—Work partially supported by CSIC (Proyecto de Iniciación a F.S.). V.C. was supported by a contract from CSIC "I+D" grant to O.M. The displacements of Drs. O.M. and W.B. were funded by a grant from "Programa de Colaboración Internacional con Hispanoamérica," Ministerio de Educación y Científica Consejo Superior de Investigación Científica, Spain. Special thanks to Dr. Ana Silva for critical reading of a preliminary version of the manuscript.

According to a recent review of Albert and Crampton (2005), the species pertaining to the genus *Gymnotus* present in the territory of Uruguay—where we collected the fish—is *G. inaequilabiatus*. Since this species is referred to as *Gymnotus carapo* in all the bibliography, we maintained this name.

REFERENCES

- Albert JS, Crampton WGR (2005) Diversity and phylogeny of neotropical electric fishes (gymnotiformes). In: *Electroreception* (Bullock TH, Hopkins CD, Popper AN, Fay RR, eds), pp 360–409. New York: Springer.
- Araque A, Buño W (1991) Novel inward rectifier blocked by Cd^{2+} in crayfish muscle. *Brain Res* 563:321–324.
- Ardanaz JL, Silva A, Macadar O (2001) Sensitivity of EOD waveform in *Gymnotus carapo*: a peripheral phenomenon modulated by steroid hormones. *J Comp Physiol A* 187:853–864.
- Bennett MVL (1971) Electric organs. In: *Fish physiology*, Vol. V (Hoar WS, Randall DJ, eds), pp 347–491. London: Academic Press.
- Bennett MVL, Grundfest H (1959) Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo*. *J Gen Physiol* 42:1067–1104.
- Bennett MVL, Grundfest H (1966) Analysis of depolarizing and hyperpolarizing inactivation responses in gymnotid electroplaques. *J Gen Physiol* 50:141–169.
- Brown DA, Gahwiler BH, Griffith WH, Halliwell JV (1990) Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog Brain Res* 83:141–60.
- Buckingham SD, Spencer AN (2002) Role of high-voltage activated potassium currents in high-frequency neuronal firing: evidence from a basal metazoan. *J Neurophysiol* 88:861–868.
- Bullock TH, Heiligenberg W (1986) Introduction. In: *Electroreception* (Bullock TH, Heiligenberg W, eds), pp 1–12. Wiley: New York.

- Caputi A, Budelli R (1995) The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *J Comput Neurosci* 2:131–147.
- Caputi A, Macadar O, Trujillo-Cenóz O (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. III. Analysis of the fish body as an electric source. *J Comp Physiol A* 165:361–370.
- Caputi A, Silva A, Macadar O (1998) The electric organ discharge of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*: the effects of environmental variables on waveform generation. *Brain Behav Evol* 52:148–158.
- Caputi AA (1999) The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *J Exp Biol* 202:1229–1241.
- Clark S, Jordt SE, Jentsch TJ, Mathie A (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 506:665–678.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular Diversity of K^+ channels. In: Molecular and functional diversity of ion channels and receptors (Rudy B, Seeburg P, eds), pp 233–285. New York: New York Academy of Sciences.
- Cole KS (1975) Resistivity of axoplasm I. Resistivity of extruded squid axoplasm. *J Gen Physiol* 66:133–138.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5:268–277.
- Ferrari MB, Zakon HH (1993) Conductances contributing to the action potential of *Sternopygus* electrocytes. *J Comp Physiol A* 173:281–292.
- Few WP, Zakon H (2003) Hormonal regulation of KV1 potassium channel expression in the electric organ. *Soc Neurosci Abstr* 29:899.9.
- Hagedorn M, Carr C (1985) Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *J Comp Physiol A* 156:511–523.
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hocherman SD, Bezanilla F (1996) A patch-clamp study of delayed rectifier currents in skeletal muscle of control and mdx mice. *J Physiol (Lond)* 493:113–128.
- Hopkins CD (1999) Design features for electric communication. *J Exp Biol* 202:1217–1228.
- Katz B (1949) Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3:285–300.
- 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.
- Macadar O (1993) Motor control of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 173:728.
- Macadar O, Lorenzo D, Velluti JC (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. II. Electrophysiological properties of single electrocytes. *J Comp Physiol A* 165:353–360.
- Macadar O, Silva A, Galeano M, Comas V, Sierra F (1997) Temperature and androgens modulate EOD waveform in electric fish acting on electrocytic membrane conductances. *Neurosci Abstr* 101:15.
- McAnelly ML, Zakon HH (2000) Coregulation of voltage-dependent kinetics of Na^+ and K^+ currents in electric organ. *J Neurosci* 20:3408–3414.
- Nakamura Y, Nakajima S, Grundfest H (1965) Analysis of spike electrogenesis and depolarizing K inactivation in electroplaques of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 49:321–349.
- Quintana L, Silva A, Berois N, Macadar O (2004) Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhypopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *J Exp Biol* 207:1843–1853.
- Rudy B, Chow A, Lau D, Amarillo Y, Ozaita A, Saganich M, Moreno H, Nadal MS, Hernandez-Pineda R, Hernandez-Cruz A, Erisir A, Leonard C, Vega-Saenz De Miera E (1999) Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. In: Molecular and functional diversity of ion channels and receptors (Rudy B, Seeburg P, eds), pp 233–285. New York: New York Academy of Sciences.
- Rudy B, McBain C (2001) Kv3 channels: voltage-gated K^+ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24:517–526.
- Schuster S (2000) Changes in electric organ discharge after pausing the electromotor system of *Gymnotus carapo*. *J Exp Biol* 203:1433–1446.
- Schwartz IR, Pappas GD, Bennett MV (1975) The fine structure of electrocytes in weakly electric teleosts. *J Neurocytol* 4:87–114.
- Shenkel S, Sigworth FJ (1991) Patch recording from the electrocytes of *Electrophorus electricus*. *J Gen Physiol* 97:1013–1041.
- Sierra F, Comas V, Buño W, Macadar O (2005) Sodium-dependent plateau potentials in electrolytes of the electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 191:1–11.
- Sierra F, Lorenzo D, Macadar O, Buño W (1995) N-type Ca^{2+} channels mediate transmitter release at the electromotoneuron-electrocyte synapses of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Brain Res* 683:215–220.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O (1999) Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *J Comp Physiol A* 185:187–197.
- Silva A, Quintana L, Ardanaz JL, Macadar O (2002) Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *J Physiol (Paris)* 96:473–484.
- Standen NB, Stanfield PR (1978) Inward rectification in skeletal muscle: a blocking particle model. *Pflügers Arch* 378:173–176.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733–759.
- Thornhill WB, Watanabe I, Sutachan JJ, Wu MB, Wu X, Zhu J, Recio-Pinto E (2003) Molecular cloning and expression of a Kv1.1-like potassium channel from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J Membr Biol* 196:1–8.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA (1989) Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. I. Morphology and innervation of the electric organ. *J Comp Physiol A* 165:343–351.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA, Macadar O (1984) Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *J Neurobiol* 15:273–281.
- Vullhorst D, Klocke R, Bartsch JW, Jockusch H (1998) Expression of the potassium channel KV3.4 in mouse skeletal muscle parallels fiber type maturation and depends on excitation pattern. *FEBS Lett* 421:259–262.

(Accepted 1 December 2006)
(Available online 12 January 2007)