

Papel de las propiedades de una “one-spike-neuron” en la implementación de un filtro sensorial.

Mag. Javier Nogueira

Tesis de Doctorado en Biología

Subárea Neurociencia

PEDECIBA 2011

Orientador: Dr. Angel A Caputi

Laboratorio de ejecución:

Unidad de Neurociencias Integrativas y Computacionales.

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Tribunal:

Dr. Omar Macadar

Dr. Ruben Budelli

Dr. José L. Peña

Este trabajo está dedicado a Julia, Violeta, Diego y Adriana.

AGRADECIMIENTOS:

A Julia, Violeta y Diego por hacer salir el sol todos los días.

A Adriana por su compañía incondicional.

A Ruben Budelli, Omar Macadar y José Luis Peña por aceptar formar parte del tribunal.

A Angel Caputi por tenerme de aprendiz durante todos estos años.

A mi madre por estar siempre dispuesta a dar una mano.

A mi tío Michel por tener siempre abierta la puerta de su laboratorio.

A toda mi familia.

A Rafael Saa por sus múltiples asesoramientos y socorros informáticos.

A mis compañeros de Facultad de Medicina y del Instituto Clemente Estable por tantos años compartidos.

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a:

PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas).

Fmed-UdelaR (Facultad de Medicina de la Universidad de la República).

IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

NIH (National Institute of Health).

IBRO (International Brain Research Organization).

INDICE :

RESUMEN.....	6
CAPÍTULO I	
Introducción general.....	8
Hipótesis general.....	10
Objetivos.....	11
CAPITULO II: DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA Y CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA ESTUDIADO	
La neurona como dispositivo funcional.....	12
La elección de la neurona y su contexto.....	15
La electrorecepción.....	16
El lóbulo eléctrosensorial de los Gymnotiformes de pulso.....	19
CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN ANATOMO-FUNCIONAL DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL LÓBULO ELECTRO-SENSORIAL DE <i>GYMNOTUS OMARORUM</i> .	
Introducción.....	27
Resultados	
• Neuronas piramidales basilares.....	31
• Neuronas piramidales no-basilares.....	34
• Neuronas esféricas.....	36
Discusión.....	38
CAPITULO IV: PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS INTRÍNSECAS SUBYACENTES AL FENOTIPO “ONE-SPIKE-NEURON” EN LAS NEURONAS ESFÉRICAS.	
Introducción.....	40
Resultados	
• Análisis de la respuesta subumbral.....	40
• Caracterización farmacológica de la rectificación de salida.....	46
• Caracterización farmacológica de la rectificación de entrada.....	53
• Estudio de las consecuencias de las propiedades intrínsecas descriptas sobre la función de respuesta neuronal.....	55
• La deactivación lenta de la K_{HT} subyace a los cambios descriptos en la excitabilidad.....	59
Discusión.....	68

CAPITULO V: LAS NEURONAS ESFÉRICAS COMO FILTRO SENSORIAL.

Introducción.....	73
Resultados	
• Relación de fase entre los eventos auto y alo-generados durante los despliegues comportamentales.....	80
• La excitabilidad de las neuronas esféricas.....	83
• La hipótesis del filtro dinámico.....	85
• La respuesta de las neuronas esféricas depende del patron temporal de estimulación.....	85
• La respuesta de la vía electrosensorial rápida a las señales autogeneradas se encuentra facilitada en peces que descargan libremente.....	89
Discusión.....	92
PARTE VI: DISCUSIÓN GENERAL.....	95
PARTE VII: CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	97
PARTE VII: MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
REFERENCIAS.....	105
PUBLICACIONES.....	113

RESUMEN

Si bien en la actualidad se encuentra ampliamente aceptado que las propiedades neuronales constituyen un factor importante en el determinismo de la función de los circuitos, la correlación precisa entre las propiedades neuronales y las circuitales es aún un terreno relativamente poco explorado. Establecer dicha relación requiere del estudio de las propiedades neuronales y de su análisis bajo patrones fisiológicos de estimulación que reproduzcan las condiciones de actividad observadas *in vivo*, ya que es en estas condiciones que se expresa el papel funcional de la neurona. Con este fin abordamos el estudio del papel de las propiedades neuronales en la función circuital utilizando como modelo el Lóbulo Electro sensorial de *Gymnotus omarorum*, un pez eléctrico de descarga débil. Este modelo resulta ventajoso por los siguientes motivos: la relativa simplicidad de los circuitos involucrados en los primeros niveles del procesamiento de la información electro sensorial; la facilidad con que se puede manipular la escena sensorial; y la existencia de una serie de comportamientos estereotipados y relativamente bien estudiados.

Inicialmente se caracterizaron, *in vitro*, mediante la técnica de "whole cell patch", las propiedades de las neuronas de proyección del Lóbulo Electro sensorial pertenecientes a las dos vías de procesamiento de la información electro sensorial, la vía rápida y la lenta. Dentro de la vía lenta se lograron identificar dos tipos de neuronas piramidales, basilares y no basilares, morfológicamente similares a las descritas en el lóbulo electro sensorial de *Apteronotus leptorhynchus*. Desde el punto de vista de sus propiedades intrínsecas las piramidales basilares mostraron un perfil funcional similar a las de *A. leptorhynchus*. Este perfil se caracteriza por la ausencia de actividad espontánea y por responder a la estimulación intracelular con dos tipos de potenciales de acción que se diferencian por su amplitud y forma de onda. Los estudios hechos en *A. leptorhynchus* muestran que estos dos tipos de potenciales de acción son originados unos a nivel del segmento inicial del axón y otros a nivel dendrítico. Por su parte, las propiedades de las piramidales no basilares muestran diferencias con ambos tipos de piramidales de *A. leptorhynchus* y con las piramidales basilares de *G. omarorum*. En primer lugar estas neuronas presentan descarga espontánea repetitiva interrumpida periódicamente por hiperpolarizaciones prolongadas y de gran amplitud. En segundo lugar solo fueron capaces de descargar un único tipo de potencial de acción presumiblemente de origen axonal.

En la vía electro sensorial rápida, caracterizamos las propiedades del único tipo de neurona que forma esta vía a nivel del lóbulo electro sensorial, las neuronas esféricas. Estas neuronas de soma redondeado y pausidendrítico están especializadas en la codificación y transmisión precisa del

tiempo de ocurrencia de los estímulos sensoriales. La caracterización de las propiedades intrínsecas mediante registros intracelulares mostró que las propiedades antes mencionadas son consecuencia de la expresión de dos corrientes resonantes subumbrales (una corriente resonante se opone a la causa que la generó y constituye por lo tanto una retroalimentación negativa); una corriente de potasio de bajo umbral y una corriente catiónica mixta activada por hiperpolarización. En particular, la expresión de la corriente de potasio de bajo umbral le confiere a la célula la capacidad de descargar un único potencial de acción y de presentar un período refractario prolongado similar en duración a la refractariedad observada *in vivo* para la vía electro-sensorial rápida.

Para comprender el papel funcional de la refractariedad de esta vía, que se encuentra implementada a nivel de las neuronas esféricas, analizamos su respuesta a nivel celular y circuital durante el comportamiento de evitación de interferencia desplegado por *G. Omarorum*. Este comportamiento se produce en condiciones naturales cuando co-específicos cercanos presentan una frecuencia de descarga del órgano eléctrico similar, y puede ser reproducido artificialmente mediante la aplicación de pulsos artificiales en el agua a una frecuencia cercana a la de descarga del órgano eléctrico del animal en estudio. Este comportamiento consta de aumentos transitorios de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico. Como consecuencia de estas aceleraciones se produce un cambio en la probabilidad de ocurrencia de los pulsos interferentes dentro del intervalo entre descargas del órgano eléctrico, observándose un pico de probabilidad en la primera mitad del ciclo. De esta manera, la respuesta electromotora de evitación de interferencia determina que la mayoría de los pulsos interferentes caigan dentro del período refractario de la vía electrosensorial rápida.

Utilizando este comportamiento como escenario funcional de las neuronas esféricas analizamos, a nivel de célula única y a nivel circuital, la capacidad de respuesta a los pulsos propios e interferentes bajo las condiciones de estimulación producidas por el comportamiento de evitación de interferencia. A nivel celular estudiamos, *in vitro*, la respuesta a protocolos que reproducen los tiempos de ocurrencia de los pulsos propios y los interferentes observados *in vivo*. A nivel circuital estudiamos, *in vivo*, la respuesta del núcleo mesencefálico al cual proyectan las neuronas esféricas, a los pulsos propios e interferentes cuando el animal se encuentra desplegando la respuesta de evitación de interferencia. En ambos casos la transferencia de información fue mayor para los pulsos propios que para los interferentes, demostrando que un filtro celular estereotipado como el período refractario prolongado de las neuronas esféricas, es capaz de establecer un filtro sensorial dinámico al combinarse con el patrón de estimulación impuesto por el sistema electro-motor.

CAPITULO I

Introducción general

La función de un circuito neuronal está determinada por varios factores entre los que se destacan el conexionado sináptico y las propiedades de las neuronas que lo componen. A partir de los trabajos de Cajal, quién introduce implícitamente este problema al enunciar la teoría de la polaridad dinámica y economía, se han hecho diversos avances en la descripción de las conexiones y propiedades neuronales. Sin embargo, la relación precisa entre las propiedades de una neurona y la función que esta desempeña dentro de un determinado circuito es un terreno relativamente poco explorado y comprendido.

La concepción de que las propiedades neuronales son un factor a partir del cual se establecen las propiedades de procesamiento de los circuitos se formalizó a partir de un trabajo pionero publicado por Llinas (1988) y la posterior postulación, por parte del mismo, de la "ley de la no intercambiabilidad" de las neuronas (Llinas, 1990)¹. Llinas plantea que la función de un circuito depende, además de las conexiones sinápticas y los tipos de neurotransmisor involucrados en las mismas, de las propiedades dinámicas de las neuronas. Estas a su vez dependen de una serie de propiedades electrofisiológicas intrínsecas que incluyen los tipos de canales iónicos expresados y su distribución subcelular, los tipos de neurotransmisores, y los sistemas de segundos mensajeros expresados por la neurona. Según Llinas, la expresión diferencial de estos rasgos en los diferentes tipos de neuronas determina que no sea posible intercambiar una determinada neurona por otra y obtener el mismo comportamiento del circuito.

Más recientemente Shepherd y Migliore (2005) expandieron el criterio de clasificación de las neuronas en base a las propiedades electrofisiológicas intrínsecas propuesto por Llinas, proponiendo agrupar a las neuronas en "fenotipos funcionales" de acuerdo a una serie de "rasgos estructurales básicos" que incluyen a las propiedades intrínsecas, la morfología, y propiedades funcionales emergentes de la combinación de las anteriores; como por ejemplo la capacidad de las neuronas de presentar espigas retropropagadas desde el soma a las dendritas.

¹Dada una neurona de un determinado tipo (e.g. una neurona talámica) no puede ser funcionalmente remplazada por una de otro tipo (e.g. una neurona de la oliva inferior) incluso si su conectividad sináptica y el tipo de neurotransmisor liberado son idénticos (la diferencia entre las neuronas talámicas y las neuronas de la oliva inferior es que las propiedades electrofisiológicas intrínsecas son extraordinariamente distintas).

Si bien lo propuesto por estos autores constituye un importante punto de partida para la caracterización de las neuronas como dispositivos funcionales, estos criterios son insuficientes ya que no son capaces de resolver las siguientes ambigüedades: a) las propiedades de neuronas pertenecientes a un mismo “fenotipo funcional” pueden estar implementadas por diferentes combinaciones de rasgos estructurales básicos; b) para un determinado arreglo de rasgos estructurales básicos la función de una neurona dependerá del circuito en que se encuentre inserta y de la estructura temporal y espacial de la entrada sináptica.

En cuanto a la función de una célula en un circuito, una aproximación útil es considerar la función del sistema nervioso como una transformación de señales, que ejecutada a un determinado nivel de organización convierte una entrada en una salida determinada. Esto implica caracterizar formalmente la operación por la cual la neurona es capaz de transformar la entrada sináptica en un patrón determinado de actividad eferente (“función de respuesta neuronal”). Esta “función de respuesta neuronal” se implementa por la “diferenciación morfológica y estructural” de las neuronas, que les permite al decir de Ramón y Cajal (al enunciar la “ley de la economía”, 1899), “adaptarse mejor al papel transmisor que deben desempeñar”. Como resultado de dicha diferenciación morfológica y estructural surgen propiedades celulares emergentes, que llamaremos siguiendo a Arbib y cols. (1998), “propiedades estructurales”. Éstas, constituyen solo una potencialidad, que se expresa funcionalmente bajo condiciones circuitales y patrones de activación naturales. Esta integración circuital provee a la célula del marco o contexto de requerimientos en el cual la neurona ejerce una función estadísticamente adaptada a las necesidades evolutivas del individuo. Volviendo a considerar las ambigüedades que surgen a partir de la definición de “fenotipos funcionales” planteada por Shepherd y Migliore (2005), proponemos que estos “fenotipos” son la realización funcional de las propiedades estructurales de una neurona. De esta propuesta deriva el argumento central de esta tesis, en la cual se demuestra para un caso particular de célula que para comprender la relación entre la diferenciación morfológica y estructural de una neurona y su función circuital, es necesario estudiar y caracterizar la “función de respuesta neuronal”; determinar las propiedades estructurales que le subyacen, y analizar la expresión funcional de estas propiedades bajo un régimen de actividad aferente similar al observado *in vivo*. Sólo tomando en cuenta estos tres factores se puede definir el fenotipo funcional de una neurona.

Si bien, abordar el estudio de los diferentes tipos de neuronales de acuerdo las condiciones mencionadas en el párrafo anterior resulta difícil, la naturaleza nos ofrece sistemas donde es posible caracterizar tanto la computación ejecutada por el circuito (la codificación de las señales de entrada y salida, y la relación entre ambas), como las propiedades de las neuronas que lo constituyen (neuronas de geometría simple), y por lo tanto es posible estudiar la existencia de

fenotipos funcionales de acuerdo a lo ya expuesto. Además, la existencia de sistemas análogos, que desempeñan el mismo papel funcional, y con las características antes mencionadas, permite estudiar cómo se encuentra resuelto en diferentes organismos el mismo requerimiento computacional, tanto a nivel circuital como celular, y el estudio comparativo de estos sistemas podría servir a la comprensión del papel de las neuronas dentro del circuito (Carr, 1986).

Para el abordaje de este problema resulta útil entonces analizar circuitos simples desde el punto de vista estructural y funcional, con al menos un rasgo funcional bien definido, donde sea posible caracterizar las propiedades estructurales de los diferentes tipos neuronales, y establecer su relación con las propiedades computacionales del circuito. El sistema electrosensorial de los peces eléctricos de descarga débil es un modelo que reúne dichas características. En este, la escena sensorial puede ser manipulada con relativa facilidad, los circuitos neuronales presentes en los primeros niveles de procesamiento son relativamente simples, y se han descrito una serie de patrones comportamentales estereotipados que se encuentran relativamente bien caracterizados.

En virtud de lo expuesto, el presente trabajo aborda el problema de comprender la relación entre las propiedades neuronales y las circuitales, y de la categorización de las neuronas de acuerdo a su función dentro del circuito, utilizando como modelo el sistema electrosensorial de *G. omarorum* (Richer de Forges y cols., 2009).

Hipótesis General

La hipótesis general que vertebró inicialmente este estudio fue la siguiente:

Los “fenotipos funcionales” de neuronas son consecuencia de diferentes combinaciones de propiedades estructurales, y solo se expresan como tales bajo patrones actividad fisiológicos. Es en estas condiciones que se debe analizar la contribución de las propiedades estructurales al determinismo de las propiedades computacionales de un circuito.

En particular, este trabajo plantea que las propiedades de las células piramidales son importantes para el desarrollo de respuestas adaptativas de la vía lenta y las propiedades estructurales de las células esféricas son importantes en la alta sincronización de la respuesta y en el desarrollo de una ventana de baja respuesta a partir de la activación de la vía.

Objetivos

El análisis experimental se realizó en dos etapas correspondientes a los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar las propiedades funcionales de las neuronas principales del lóbulo electrosensorial de *G. omarorum* y los rasgos estructurales que las determinan.
- 2) Una vez alcanzado el objetivo anterior se plantea determinar la “función de respuesta neuronal” de uno de estos tipos neuronales, analizando sus propiedades en el contexto circuital y bajo patrones naturales de estimulación.

Con el fin de alcanzar dichos fines se realizó: a) la caracterización anatomo-funcional de neuronas principales (o eferentes) del Lóbulo Electrosensorial de *G. Omarorum*; b) el análisis de las propiedades estructurales que subyacen a las propiedades funcionales de uno de estos tipos neuronales; y c) el estudio de la manera en que las propiedades estructurales de este tipo de neuronas se expresan funcionalmente como “función de respuesta neuronal”, y como “fenotipo funcional” cuando son sometidas a patrones naturales de estimulación.

En el capítulo II se delimita el problema abordado y se exponen los antecedentes principales del sistema en estudio. En los capítulos III a V se presentan los resultados obtenidos precedidos de una breve exposición de antecedentes específicos y seguidos de la discusión de los hallazgos y las hipótesis específicas que los mismos sugieren. Los métodos se presentan brevemente en cada capítulo y se detallan en el apéndice. Finalmente en el capítulo VI se realiza una discusión general y se exponen los argumentos que nos permiten sostener las siguientes **tesis**:

1) Las propiedades estructurales de las neuronas influyen significativamente en la función del circuito al cual pertenecen, y la función neuronal en dicho circuito depende del patrón de estimulación.

2) En nuestro principal caso de estudio, células esféricas, las propiedades estructurales permiten la sincronización precisa de la respuesta celular y el desarrollo de una ventana de baja respuesta a partir de su activación.

3) Estas propiedades basadas en un par de corrientes resonantes (Kv1.2 y Ih), generan una función de respuesta neuronal que puede describirse como célula de disparo inicial.

4) Integradamente con la modulación temporal de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico la función de respuesta neuronal descrita permite la facilitación del flujo de las señales auto-generadas en detrimento de las señales alo-ógenas. Funcionalmente actúan como filtro selectivo pasa-señales autogeneradas.

CAPITULO II: DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA Y CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA ESTUDIADO

La neurona como dispositivo funcional

Uno de los avances más importantes en el estudio de las propiedades eléctricas de las neuronas fue la demostración por Hodgkin, Huxley y Katz (1952) del papel central de conductancias voltaje-dependientes específicas de la membrana en la generación del impulso nervioso, en invertebrados. Posteriormente, Coombs, Eccles, y Fatt (1955), trabajando en el soma de las motoneuronas espinales de mamífero, concluyeron que en esta estructura, al igual que en el “axón gigante”, el potencial de acción es producto de la activación transitoria de una conductancia de sodio seguida de una de potasio. En ese entonces se concebía al árbol dendrítico como eléctricamente pasivo, capaz de efectuar la suma más o menos lineal de los potenciales sinápticos. Estos estudios y el prestigio de Eccles indujeron al sistema académico (salvo contadas voces disidentes) a suponer durante más de una década que todas las neuronas del sistema nervioso central son similares a las motoneuronas desde el punto de vista electrofisiológico, y que funcionarían como simples integradores lineales de los potenciales sinápticos que al alcanzar el nivel umbral disparan un potencial de acción (Llinas, 1988).

Esta concepción extrapolaba y proveía un sustrato celular a los hallazgos computacionales de McCulloch y Pitts (1943). Ellos habían demostrado que modelos construidos en base a la interconexión de elementos neuronales muy simplificados (neuronas esféricas funcionando como integradores lineales con umbral) son capaces de resolver operaciones computacionales complejas. En consecuencia, se produjo un sesgo hacia la hipótesis (acertada en general) de que la complejidad de las operaciones computacionales efectuadas por un circuito neuronal se encuentra determinada por el número de neuronas y las interconexiones que estas establecen. Conduciéndola a una proposición extrema, donde se considera que todas las neuronas son iguales y las propiedades intrínsecas de la membrana y la morfología neuronal son irrelevantes para las propiedades del circuito.

El papel de dichos elementos en el determinismo de la función computacional de la neurona en un circuito comienza a reconocerse una década más tarde. En 1957 Rall aporta la primera evidencia teórica sobre la importancia de la geometría neuronal y el papel de las dendritas en las propiedades de procesamiento de las neuronas. Concomitantemente, Henneman (1957) demuestra que la excitabilidad de las motoneuronas se relaciona con el diámetro de su axón y por ende con el tamaño del soma, siendo este uno de los componentes del “principio de tamaño”. Poco

tiempo después, Lloyd (1959) y Lorente de No y Condouris (1959) señalan que podrían haber otros fenómenos activos de membrana además del potencial de acción clásico, destacando entre estos la posible importancia de la interacción con la entrada sináptica de potenciales propagados activa, retrógrada, y decrementalmente hacia las dendritas.

Por otra parte, la utilización de organismos invertebrados (Kandel, 1976), cuyas células de mayor tamaño permiten la utilización de técnicas electrofisiológicas más complejas, permitió importantes avances en el estudio de las propiedades intrínsecas de las neuronas, mostrando que las neuronas poseen otras conductancias además de las responsables de la generación del potencial de acción (Doroshenko y cols., 1978). Estos hallazgos condujeron nuevamente al planteo inicial de Ramón y Cajal de que la diferenciación morfológica y estructural de las neuronas es evolutivamente significativa en tanto se encuentra relacionada con las propiedades de procesamiento del circuito. A pesar de ello, muchos investigadores que trabajaban en mamíferos mantuvieron el supuesto que de la complejidad observada en las neuronas de invertebrados resultaba de una estrategia diferente en la cual el procesamiento celular sustituía al circuital en sistemas con bajo número de neuronas (Llinas, 1988).

El posterior desarrollo de las técnicas de registro *in vitro*, de biología molecular, y de microscopía han permitido abordar el estudio de las propiedades de diferentes regiones de las neuronas de mamíferos (soma, dendritas, cono de arranque, segmento inicial, axón y teledendron incluyendo las terminales), aportando numerosas evidencias de la diversidad en la expresión de conductancias, además de las responsables de la generación del potencial de acción, así como de los mecanismos reguladores capaces de modificar su actividad (Llinas, 1988; Johnston y cols., 2010; Sjöström y cols., 2008). Sin embargo, y a pesar de estos avances, comprender el papel de las neuronas individuales en términos de la función de la red neural a la que pertenecen continúa siendo un desafío mayor en neurociencia (Migliore y Shepherd, 2005); y la determinación de las características responsables de las propiedades computacionales de las neuronas y cómo estas se implementan resulta fundamental para comprender como operan los circuitos.

Los criterios tradicionales que utilizan únicamente la morfología (Golgi, 1903 y 1929; Ramón y Cajal, 1899-1905) o las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de la membrana (Llinas, 1988) resultan inadecuadas para categorizar a las neuronas como dispositivos funcionales. Migliore y Shepherd (2005) utilizan el concepto de fenotipo y proponen la clasificación de las neuronas en “fenotipos funcionales” definidos en base a la morfología, las especies de canales iónicos expresados y su distribución, y propiedades funcionales específicas como la propagación retrógrada de potenciales de acción hacia las dendritas.

Si bien el planteo de Migliore y Shepherd significa un importante avance en la categorización de las neuronas de acuerdo a sus rasgos estructurales y funcionales específicos, estas constituyen solo una potencialidad que se expresa como una función de respuesta neuronal (la forma en que la neurona procesa las entradas sinápticas y elabora un patrón de actividad que se transmite a las neuronas postsinápticas, Dayan y Abbot, 2001) solo cuando la neurona está inserta en algún contexto circuital. Las características de dicho circuito y la estadística de su actividad proveen el marco o contexto que permite expresar un rango de dichas potencialidades. Reservamos entonces la expresión “fenotipo funcional” a la función de respuesta neuronal expresada en un contexto de actividad circuital determinado.

Reconsiderando dicha semántica podemos resumir diciendo que la expresión “fenotipo funcional” es la potencialidad expresada en una tarea determinada, y la función que determina la historia de la salida celular a partir de la historia de entrada es la función de respuesta neuronal.

Ambos, “fenotipo neuronal” y “función de respuesta neuronal” se encuentran determinados por una combinación de rasgos fenotípicos, a los cuales nos referiremos como “propiedades estructurales” (Arbib y cols., 1998) expandiendo el concepto de propiedades electrofisiológicas intrínsecas introducido por Llinas (1988). Las propiedades estructurales comprenden, además de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas, al menos la morfología, las cascadas intracelulares de señalización, el tipo y la distribución de las entradas sinápticas, y el o los neurotransmisores expresados por la neurona. Estos rasgos fenotípicos no son permanentes sino que cambian a lo largo de la vida del individuo (desarrollo (Moody y Bosma, 2005), lesiones (Paz y cols., 2010), envejecimiento (Randall y cols, 2012)).

Mientras las propiedades estructurales constituyen rasgos fenotípicos que podrían considerarse como primarios o elementales, las propiedades que implican un nivel superior de organización pueden considerarse como rasgos fenotípicos emergentes. Neuronas que comparten un repertorio similar de propiedades estructurales pueden expresarse como fenotipos funcionales diferentes cuando son sometidas a distinto rango de entradas, y neuronas que difieren en sus repertorios de propiedades estructurales pueden expresarse como un mismo fenotipo funcional. Sólo es necesario que ejecuten una misma función computacional. Es posible concluir entonces que la emergencia de un fenotipo funcional en un circuito no necesariamente indica la presencia de determinadas propiedades estructurales y que la presencia de un alto grado de similitud en las propiedades estructurales no es condición necesaria ni suficiente para que un grupo de neuronas sean clasificadas como pertenecientes a un mismo “fenotipo funcional”.

Esta dualidad determina que para identificar los fenotipos funcionales de neuronas y los rasgos que los caracterizan sea necesario analizar su inserción en un nivel de organización superior, el circuital. Este punto de vista puede ser abordado siguiendo la estrategia introducida por Marr (1982) para el análisis de la visión². Extrapolando esta estrategia al nivel de organización celular, para comprender completamente un tipo celular sería necesario determinar cuál es la tarea que desempeña una neurona dada dentro del circuito al cual pertenece, determinar las reglas que vinculan el tren de espigas en el axón con el conjunto de entradas sinápticas, y la forma en que esta función se implementa a nivel de la combinación de las propiedades estructurales. No obstante, las posibilidades de una célula no son infinitas, la célula está allí comprometida desde su diferenciación con el desarrollo del circuito al que pertenece y a una función del sistema a la cual sirve y al mismo tiempo condiciona.

Surge así la pregunta que motiva esta tesis: ¿cuál es la relación entre las propiedades estructurales de una neurona y su papel computacional dentro de un circuito? Con el fin de resolver dicha pregunta evitando las ambigüedades discutidas en la sección anterior, se propone estudiar la relación de las propiedades estructurales y funcionales específicas en un caso particular. Analizamos la relación de la estructura de un tipo neuronal con su función de respuesta neuronal en un contexto circuital determinado.

Podría criticarse la singularidad del estudio, pero establecer reglas generalizables y avanzar en su validación requiere del estudio detallado de las propiedades de un gran número de tipos neuronales, ampliamente distribuida en la escala zoológica. Dicha tarea es muy compleja debido a la gran variedad de tipos neuronales y a la complejidad de los circuitos a los que pertenecen. No obstante el objetivo general de este estudio, es decir, establecer la relación de las propiedades estructurales y funcionales específicas con la función de respuesta neuronal en al menos una clase de neuronas, es un punto de referencia tan necesario como importante en tanto: a) demostraría la existencia de clases de neuronas con un papel computacional determinado, y b) abriría el camino para la definición de otras aún no establecidas.

La elección de la neurona y su contexto

Estudiaremos nuestro problema en el sistema electrosensorial de *Gymnotus omarorum* (un pez gymnotiforme emisor de pulsos eléctricos), enfocándonos en los circuitos que este presenta a nivel de Lóbulo Electrosensorial (primera estación de relevo a nivel del sistema nervioso central), las llamadas vía electrosensorial rápida y lenta respectivamente. En las secciones siguientes se

presentan antecedentes generales sobre esta modalidad sensorial y sobre el Lóbulo Eléctrosensorial de *G. omarorum*.

La electrorecepción

Electrorecepción es la habilidad de sentir y comunicarse utilizando electricidad como vehículo sensorial. Tomando en cuenta el origen de la energía portadora que estimula los electroreceptores situados a nivel de la piel, la electro-recepción se clasifica en dos tipos: pasiva y activa (Bullock y Heiligengerg, 1986; Lissmann, 1958a, 1958b; Kalminj, 1974; Mohres, 1957). En la electro-recepción pasiva, las señales son modulaciones de un campo eléctrico generado externamente, mientras que las señales para la electro-recepción activa son campos eléctricos autogenerados por la descarga de órganos eléctricos (OE). Estos campos eléctricos autogenerados tienen una doble función: a) vehiculizar imágenes autogeneradas del ambiente (por eso es llamada electro-recepción activa) y b) vehiculizar señales de comunicación a sus co-específicos (una forma de electrorecepción pasiva) (Lissmann y Machin, 1958; Mohres, 1957).

Asimismo, los cambios de los campos eléctricos capaces de estimular los electroreceptores se pueden originar de una fuente virtual o real. Las fuentes eléctricas reales son aquellas con capacidad de transformación de energía potencial o cinética en corriente eléctrica mientras que las fuentes eléctricas virtuales resultan de una elaboración teórica. Así como la luna iluminada por el sol puede considerarse una fuente de luz, cuando objetos con impedancia diferentes de la del agua son sometidos a un campo eléctrico modifican el campo como si en su lugar existiese una fuente de energía eléctrica. Por esta razón, el sentido eléctrico no solo es capaz de detectar señales emitidas por objetos electrogénicos sino que además detecta señales generadas por la conducción, las cargas y las sombras generadas por la presencia de objetos no electrogénicos (Migliaro y cols., 2005; Pereira y Caputi, 2010). En virtud de esto último, las escenas sensoriales que se le presentan a un pez no solo dependen de las propiedades y la localización de los objetos, sino también de la relación espacial del pez con los mismos. Ya sea que la fuente provenga de una fuente externa, como que provenga de la descarga del órgano eléctrico propio, la posición del pez en el espacio es un determinante principal de la escena sensorial.

Los sistemas de electro-generación de taxa filogenéticamente distantes (mormyriiformes africanos y gymnotiformes americanos) ha convergido durante la evolución en las siguientes estrategias para la generación de la descarga del órgano eléctrico (DOE): (a) pulsos eléctricos cortos, emitidos de forma irregular por una fuente localizada (mormíridos de pulso); (b) una descarga continua de

forma cuasi-sinusoidal generada por múltiples fuentes con un mismo componente principal de frecuencia (mormíridos y gimnótidos de onda); (c) pulsos eléctricos cortos, emitidos de forma relativamente regular, que resultan de la suma ponderada de múltiples fuentes, cada una contribuyendo con diferentes componentes de onda a lo largo de la DOE (gimnótidos depulso, Caputi, 2010). Estas tres estrategias no solo difieren en los mecanismos motores de generación de la DOE, sino que también presentan diferencias correlativas en las estrategias sensoriales adoptadas por cada uno de estos grupos (Caputi y cols., 2008; Bell, 1981, 1986; Bastian, 1986).

En todos los grupos antes mencionados la descarga del órgano eléctrico determina, en condiciones basales, el establecimiento de un patrón de corriente transcutánea que es capaz de estimular a los electro-receptores situados a nivel de la piel (Szabo, 1974; Szabo y Fessard, 1974; Zakon, 1986). La presencia de objetos cercanos, con conductividad diferente a la del agua, determina la generación de un nuevo patrón de corriente transcutánea (Bullock y cols., 1961; Caputi y cols., 2004), de modo que la imagen así generada se traduce en un nuevo patrón de activación de los electroreceptores. El hecho de que en la electrorecepción activa las imágenes proyectadas por los objetos sean modulaciones de la imagen eléctrica basal producida en cada descarga del OE, determina que el patrón de estimulación electrosensorial auto-generado constituya una reaferencia a partir de la cual se debe extraer la exaferencia debida a la presencia de objetos. En la electro-recepción activa los movimientos del pez también generan señales reaferentes. La orientación y el arqueado del cuerpo canalizan las corrientes. De esta forma, el cuerpo actúa como un refractor que permite iluminar eléctricamente los objetos de interés (Caputi, 2004; Engelmann y cols., 2009).

Por su parte, electrorecepción pasiva no significa que las acciones autogeneradas no modulen las señales electro-sensoriales. De hecho, dado que el cuerpo del pez es un objeto de conductividad diferente de la del agua, el mismo es capaz de modular el campo eléctrico local. Entonces, la orientación activa del cuerpo en una escena canaliza el campo eléctrico “iluminándola” e “iluminándose”, y como consecuencia el pez modifica el patrón de estimulación con su propia presencia (Caputi, 2004; Migliaro y cols., 2005). Entonces, la electro-recepción pasiva también es un sentido reafereente.

Un caso particular de electrorecepción pasiva es la electrocomunicación dado que los peces gymnotiformes utilizan el mismo grupo de receptores en forma dual, para recibir señales propias y señales de conespecíficos. Cuando dos peces se comunican, las señales propias y las generadas por un co-específico se suman en la periferia actuando ambos trenes de señales sobre receptores capaces de detectar a ambos. Esto determina que que las señales generadas por la descarga propia y por la del co-específico fluyan intercaladas a nivel de los axones aferentes periféricos y deban ser discriminadas a nivel central.

Luego de ser traducida por los electroreceptores y codificada por parte de las fibras aferentes primarias, la información electrosensorial es enviada por medio de estas últimas al Lóbulo Electrosensorial (LE), primer sitio de relevo a nivel del sistema nervioso central. Tanto en Gymnótidos como en Mormyridos las aferentes primarias proyectan sobre el LE de forma somatotópica formando mapas de la superficie electrorreceptiva de la piel y determinando la división del órgano en segmentos paralelos al eje antero-posterior.

En Gymnótidos, tres mapas se encuentran formados por la ramificación de la mismas fibras aferentes, mientras que el cuarto mapa recibe una aferencia electrosensorial diferente (Carr y Maler, 1986). Dicho mapa, el más medial, recibe aferencias somatotópicas de los receptores ampulares y procesa información de señales eléctricas de baja frecuencia provenientes del ambiente (electrorecepción pasiva). Cada uno de los tres segmentos restantes llamados lateral, centrolateral, y centromedial reciben proyecciones somatotópicas completas de las fibras aferentes provenientes de los electroreceptores de tipo tuberoso, y codifican información proveniente de descarga del órgano eléctrico (electrorecepción activa). El lóbulo eléctrico de Mormyridos en cambio tiene tres mapas, y cada uno recibe aferencias originadas en un tipo diferente de receptor (Bell y Szabo, 1986, Bell y Maler, 2005).

Desde el punto de vista histoarquitectural, en cortes coronales, cada uno de los segmentos del lóbulo electrosensorial se divide de igual manera en varias capas con diferente aspecto y relativamente paralelas a la superficie ventral: ventralmente una capa de fibras profunda conteniendo las fibras aferentes primarias; una capa neuropílica profunda donde las fibras aferentes primarias terminan sobre células esféricas y sobre las dendritas basales de las células piramidales e interneuronas; una capa granular conteniendo principalmente dos clases de interneuronas; una capa plexiforme conteniendo los axones eferentes de las células principales del circuito; una capa conteniendo los somas de las células piramidales; el estrato fibroso, una capa compacta de fibras mielínicas que constituyen un bucle de retroalimentación directo al lóbulo electrosensorial; y dorsalmente una capa molecular donde vías de retroalimentación directas e indirectas terminan sobre las dendritas apicales de las células piramidales (Bell y Maler, 2005).

El lóbulo electrosensorial de los Gymnotiformes de pulso

En gimnótidos, la porción del lóbulo electrosensorial involucrada en la electrorecepción activa es la base estructural de dos corrientes de información: la vía rápida que codifica el tiempo de ocurrencia de cada descarga del órgano eléctrico, y la vía lenta que codifica las características y las variaciones de cada descarga causadas por la presencia de objetos. Estas dos vías procesan de forma paralela y diferencial la misma imagen física que se proyecta sobre la piel en cada descarga del OE. Los electroreceptores de tipo I producen la activación de las fibras aferentes de tipo M, también conocidas como marcadores de pulso, que responden con un único potencial de acción por cada descarga del OE. Estas fibras proyectan al lóbulo electrosensorial estableciendo contacto con las células esféricas, las cuales a su vez envían sus axones al núcleo magnocelular mesencefálico (N. Magnocellularis) a través de la decusación del lemnisco lateral. Los electroreceptores de tipo II producen la activación de las fibras aferentes de tipo B, también conocidas como “burst duration coders”, que responden con un tren de potenciales de acción por cada descarga del órgano eléctrico. Estas fibras proyectan sobre el lóbulo electrosensorial estableciendo contacto con diferentes elementos correspondientes al circuito de la vía electrosensorial lenta, que a ese nivel se organiza como un circuito de tipo cerebeloso (Bell y Maler, 2005). Los axones de las células piramidales abandonan el lóbulo electrosensorial y a través del lemnisco lateral proyectan, sobre el lado contralateral, al Torus semicircularis y el núcleo preminencialis (Fig. 1).

Los potenciales de campo registrados en el Lóbulo electrosensorial en respuesta a la descarga de la DOE propia muestran dos componentes claros que pueden ser atribuidos a la vía rápida y a la vía lenta definidas por Szabó y cols. (1973): (i) Una espiga breve ocurre a latencia corta (1-3 ms) luego de la DOE, correspondiente a la vía electrosensorial rápida (Castelló y cols., 1998; Pereira y cols., 2005); (ii) Una onda lenta que inicia entre 2-4 ms luego de la DOE y que dura por el resto del intervalo entre DOEs (Pereira y cols., 2005).

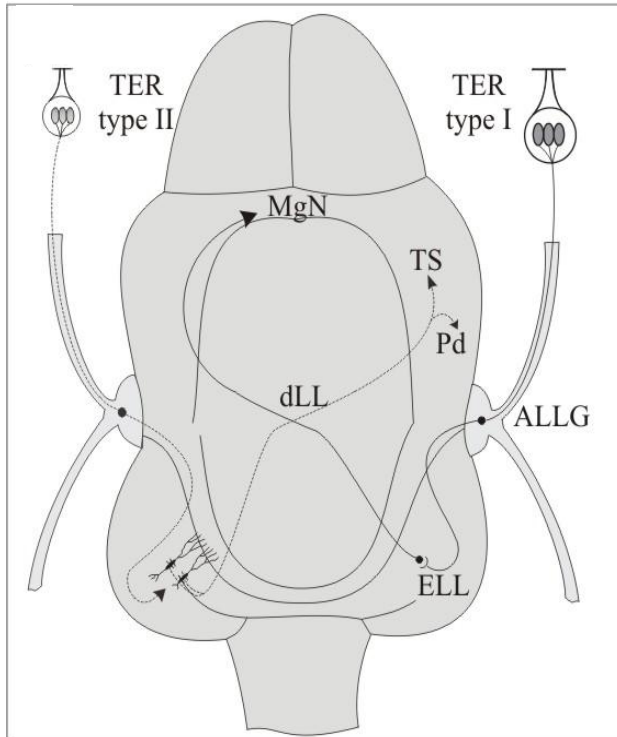


Figura 1. Representación esquemática del cerebro de *G. Omarorum* mostrando los principales componentes de la vía electrosensorial rápida y la lenta. La vía electrosensorial lenta comienza a nivel de los electrosensores tuberosos de tipo II (TER type II) y la rápida a nivel de los electrosensores tuberosos de tipo I (TER type I). Las fibras aferentes primarias, cuyo soma se localiza en el ganglio de la línea lateral anterior (ALLG), contactan por un extremo con los electrosensores y por el otro proyectan al lóbulo electrosensorial (ELL). A este nivel las fibras de la vía electrosensorial rápida toman contacto con las neuronas esféricas que a su vez proyectan al núcleo magnocelular mesencefálico (MgN), mientras que las fibras de la vía electrosensorial lenta toman contacto con diferentes elementos de un circuito de tipo cerebeloso del cual las neuronas piramidales son un componente principal. Estas últimas proyectan al torus semicircularis (TS) y al núcleo peminancialis (Pd).

La **vía electrosensorial rápida** se caracteriza desde el punto de vista funcional por la transmisión precisa del tiempo de ocurrencia de la descarga del órgano eléctrico, y la codificación de la intensidad del campo eléctrico local producido a nivel de la piel por cada descarga del órgano eléctrico en la latencia de una espiga aferente. En las fibras aferentes tipo M la amplitud del estímulo local es codificada utilizando la latencia relativa de una única espiga con respecto a las fibras que inervan regiones vecinas. A nivel del lóbulo electrosensorial, estas fibras establecen sinapsis de tipo mixto con las neuronas esféricas (Réthelyi y Szabo, 1973; Castelló y cols., 1998), permitiendo la transmisión rápida y precisa del impulso nervioso. De esta manera, la imagen eléctrica es codificada en un código de latencia relativa y es transmitida al lóbulo electrosensorial donde las células esféricas reciben y transmiten el estímulo preservando de forma muy precisa las diferencias de latencia entre diferentes regiones de la piel (Szabo, 1967; Szabo, 1974; Szabo y cols., 1975).

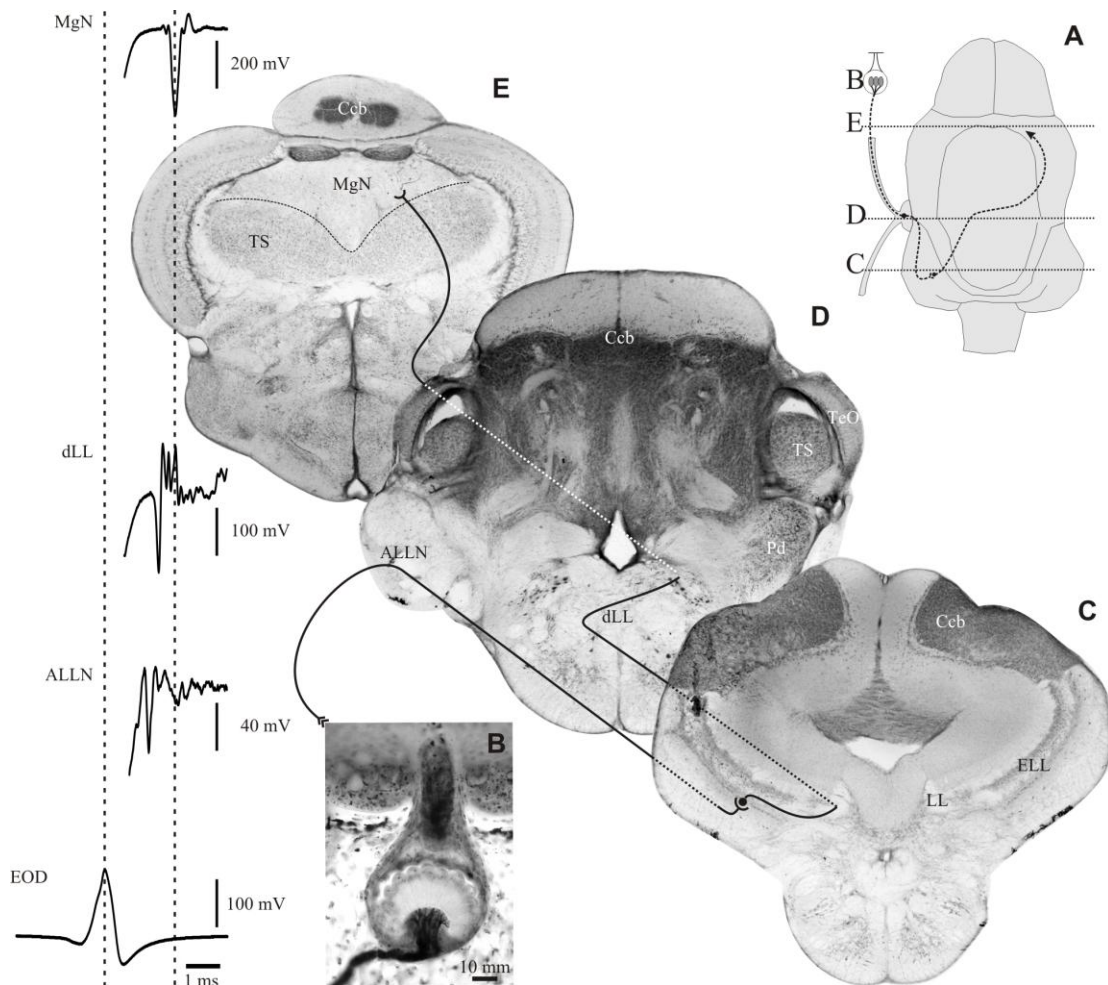


Figura 2. Vía electrosensorial rápida de *G. Omarorum*. A) Diagrama del cerebro de *G. Omarorum* con una representación esquemática de la vía, extendiéndose desde los electroreceptores cutáneos de tipo I (B), a través del Lóbulo Electrosensorial (ELL, C) hasta el núcleo magnocelular mesencefálico (MgN, D). B) Electroreceptores tuberosos de tipo I (revelados por la técnica de impregnación argéntica de Cajal y De Castro) son inervados por fibras aferentes marcadores de pulso (tipo M) que alcanzan el sistema nervioso central a través de las ramas del nervio de la línea lateral anterior (ALLN). C) Sección frontal del tronco encefálico. Se representa el contacto entre fibra aferente primaria de tipo M y una célula esférica cuyo axon abandona el ELL a través del lemnisco lateral (LL). D) Sección frontal que muestra la decusación del LL. Los axones de las células esféricas alcanzan la región rostral del mesencéfalo, atraviesan el torus semicircularis (TS) y penetran en el MgN (sección frontal E). A la izquierda se muestran los registros de potenciales de campo a los sucesivos niveles de la vía rápida (ALLN; LL and MgN). Estos se caracterizan por una onda aguda que aparece luego de un corto retardo con respecto al pico de la descarga del órgano eléctrico. Ccb: cerebelo, TeO: tectum óptico. Caputi y Castelló en preparación.

Registrada extracelularmente, *in vivo*, la vía electrosensorial rápida se encuentra silente en ausencia de descarga del órgano eléctrico (EOD). La estimulación por parte de la descarga del órgano eléctrico propio o de un co-específico produce la aparición de un breve potencial de acción compuesto que se observa todo a lo largo de la vía. Esto es, en el nervio electrosensorial (es aquí un signo de la entrada aferente a las células esféricas), el lóbulo electrosensorial, el lemnisco lateral (es aquí un signo de la salida de las células esféricas) y el núcleo magnocelularis (Fig.2). La amplitud del potencial de acción compuesto registrado a nivel de los axones de las células esféricas (lemnisco lateral) se relaciona de forma lineal con la amplitud de la EOD auto-generada (Szabo y cols., 1975; Castelló y cols., 1998; Pereira y cols., 2005). Sin embargo, la amplitud de la respuesta evocada por la descarga auto-generada (aEOD) y generada por co-específicos (cEOD) depende fuertemente del intervalo entre ésta última y la aEOD. Este intervalo decrece progresivamente cuando la frecuencia de la cEOD es ligeramente superior y crece progresivamente cuando es ligeramente inferior. En asociación con la reducción del intervalo entre la aEOD y la cEOD se produce una reducción de la amplitud de la respuesta evocada por la cEOD a nivel del lemnisco lateral y del núcleo magnocelularis, pero no se observa esta reducción en la amplitud de la respuesta evocada a nivel del nervio mandibular. Esto indica que la activación por parte de la aEOD de las estructuras pertenecientes a la vía electrosensorial rápida localizadas en el lóbulo electrosensorial, determina la activación de una ventana de baja respuesta (Castelló y cols., 1998). La figura 3 muestra el registro de campo de un animal implantado de forma crónica en el núcleo magnocelularis. En este la amplitud de la respuesta a la cDOE varía su amplitud en función del intervalo entre la aDOE y la cDOE.

Es así que la ventana de baja respuesta previene la activación subsiguiente de la vía por señales externas potencialmente interferentes (Schlegel, 1973; Castelló y cols., 1998). Este fenómeno podría intervenir en la segregación y diferenciación de señales de electrolocación y electrocomunicación (Black Cleworth, 1969; Westby, 1975; Westby, 1979; Capurro y cols., 1998). Sin embargo, la activación de la ventana de baja respuesta no es exclusiva de los pulsos autogenerados sino que también es producida por estímulos externos que ocurran tardíamente dentro del ciclo, afectando así la respuesta a la aDOE (Fig. 3, trazo 2). Esto significa que el filtro sensorial impuesto por la ventana de baja respuesta no es producto de un comando central proveniente de los centros motores responsables de la descarga del órgano eléctrico (descarga corolario), sino de la propia activación de la vía, independientemente del origen de la señal activadora (Castelló y cols., 1998).

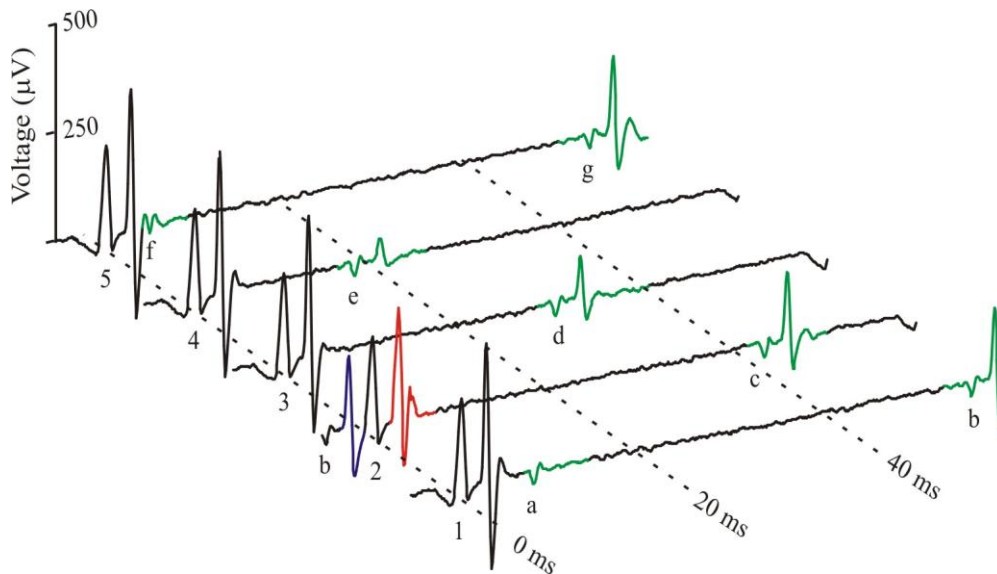


Figura 3. La ventana de baja respuesta de la vía electrosensorial rápida. Potenciales de campo provocados por las DOEs auto- (artefacto trifásico en el entorno del tiempo cero en cada trazo) y co-específico-generada, a nivel del núcleo magnocelular mecencefálico en un pez en libre movimiento. La onda trifásica al inicio de cada trazo (1 a 5) es el artefacto de la DOE propia, seguida por una espiga que corresponde a la respuesta provocada en la vía electrosensorial rápida. La DOE generada por un co-específico es la onda trifásica pequeña resaltada en verde (a a g). La respuesta de la vía electrosensorial rápida provocada por la DOE generada por un co-específico (espigas verdes), no se observa a intervalos cortos (a y f), y su amplitud crece conforme aumenta el intervalo entre la DOE propia y la generada por el co-específico (espigas verdes evocadas en respuesta a e, d, c y b). Note que una disminución similar, pero menor, en la respuesta a la DOE auto-generada (trazo 2, espiga roja) es provocada por la activación de la vía por parte de la DOE del co-específico (espiga azul) cuando ésta ocurre inmediatamente antes de la DOE auto-generada (modificada de Nogueira et al., 2006).

La **vía electrosensorial lenta** se caracteriza por presentar diferentes tipos de neuronas que se encuentran formando un circuito pluri-sináptico en el tronco encefálico, cuya característica más importante es la presencia de varios bucles recurrentes y bucles de integración lado a lado (Carr y cols., 1981; Maler y cols., 1982; Sas y Maler, 1983; Bastian y Bratton, 1990; Lewis y Maler, 2002; Diron y cols., 2003; Bastian y cols., 2004).

La actividad evocada por la DOE propia en la vía lenta pone de manifiesto la complejidad de su organización anatómica (Pereira y cols., 2005), pudiéndose reconocer dos componentes: (i) Una onda lenta temprana que se inicia entre 2-4 ms luego de la DOE y que dura aproximadamente 5 ms. (ii) Una serie de ondas lentas tardías que comienzan entre 7-10 ms luego de la DOE y que duran por el resto del intervalo entre DOEs. Este componente tardío de la respuesta presenta mayor variabilidad que el componente temprano, y probablemente corresponda a la actividad de las capas más dorsales del lóbulo electrosensorial (Maler, 1979). La variabilidad del componente tardío se observa únicamente ante cambios en la escena electrosensorial pero no en respuesta a estímulos de otra naturaleza (Fig. 4F; Pereira y cols., 2005).

El análisis a través del tiempo de la respuesta de campo a nivel del lóbulo electrosensorial, luego de un cambio en la escena electrosensorial, muestra diferencias en el comportamiento de los diferentes componentes de dicha respuesta. La amplitud de la respuesta correspondiente a la vía electrosensorial rápida se correlaciona de forma lineal con la energía del estímulo local y no varía en las sucesivas DOEs. Por su parte, la respuesta de la vía electrosensorial lenta, ante un cambio de la escena sensorial modifica su forma de onda. La amplitud de esta señal se mantiene relativamente constante a través de los sucesivos ciclos para el componente temprano, mientras que para el componente tardío se observa una atenuación (Fig. 5 A-B; Pereira y cols., 2005; Caputi y cols., 2008).

Según Pereira y colaboradores (2005), el componente temprano de la respuesta de la vía electrosensorial lenta (que no presenta adaptación) correspondería a la actividad de los elementos más ventrales del circuito (fibras aferentes primarias y células granulares), mientras que el componente tardío (que presenta adaptación) correspondería a la actividad de las capas más superficiales del lóbulo electrosensorial, incluyendo la capa de células polimórficas y el efecto de aferencias recurrentes provenientes de centros superiores. El análisis más detallado de la respuesta del potencial de campo ante un cambio de la imagen sensorial muestra, dentro del componente tardío, dos componentes con diferentes tasas de adaptación. El primer componente atenúa su respuesta en una decena de ciclos, alcanzando niveles de actividad similares a los observados en ausencia de estímulo, mientras que el componente más tardío atenúa muy lentamente. La diferencia en la dinámica de adaptación observada en ambos componentes de la respuesta tardía de la vía lenta podría explicarse por la presencia de dos tipos de neuronas implicadas en diferentes componentes del bucle recurrente: un tipo de neurona que presenta respuesta adaptativa y el otro no. Neuronas con comportamientos similares han sido descritas por Bastian y colaboradores (2004) en el lóbulo electrosensorial de *Apteronotus leptorinchus* (pez eléctrico de onda).

Estos resultados experimentales sugieren que la respuesta adaptativa de la vía electrosensorial lenta observada luego de un cambio de la escena electrosensorial forma parte de un mecanismo de detección de novedad en el que se produciría el almacenamiento de un promedio móvil de las imágenes pasadas, y una comparación de dicha imagen central con la imagen electrosensorial actual proveniente de la periferia (Caputi y cols., 2003). Este tipo de mecanismo, que se encuentra implementado de distintas formas en los peces eléctricos de descarga débil, podría constituir un mecanismo general capaz de proveer a los sistemas sensoriales la capacidad de dejar de responder a elementos permanentes en la escena sensorial, confiriéndoles así mayor sensibilidad para la detección de elementos novedosos (Bell, 1981; Bell y cols., 1993; Caputi y Nogueira, 2010).

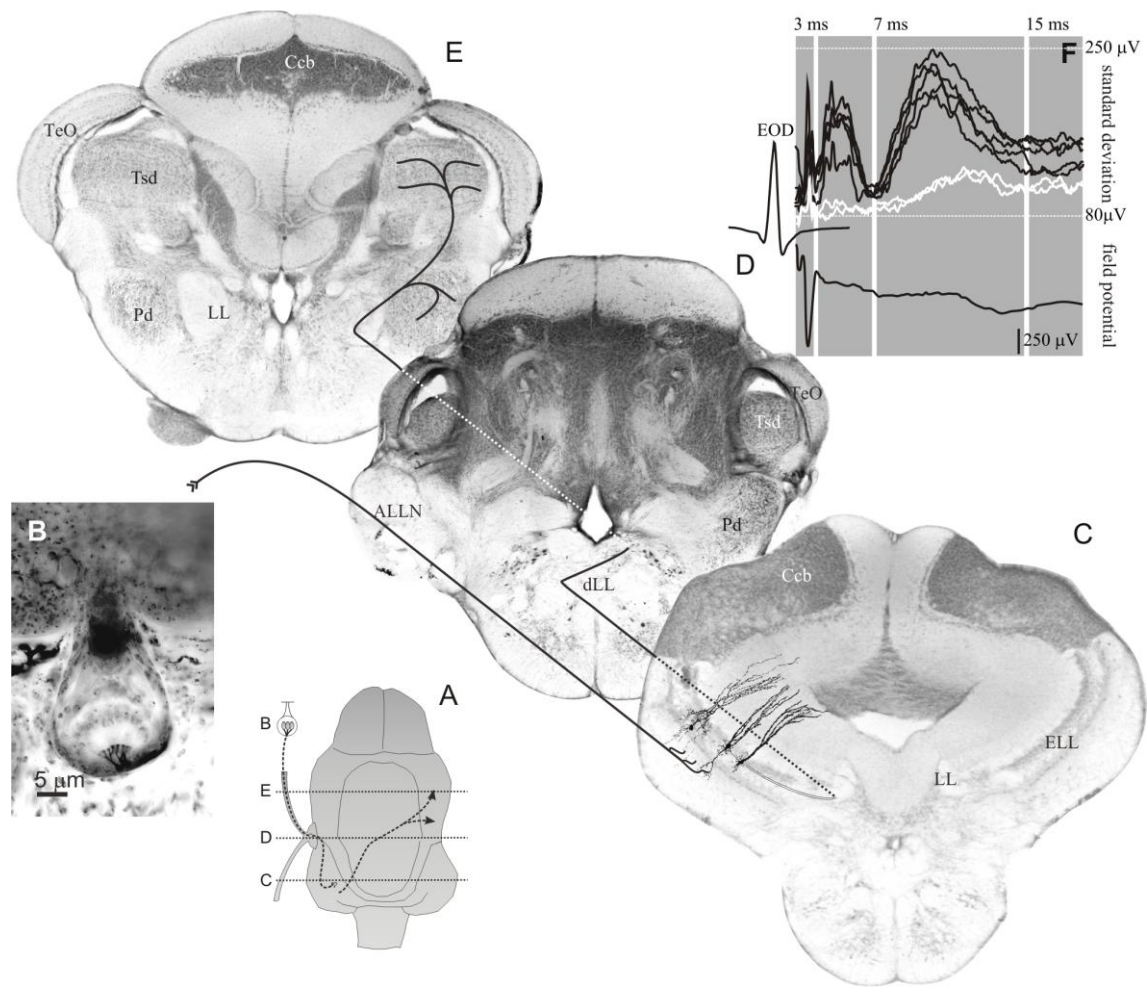


Figura 4. La vía electrosensorial lenta de *G. omarorum*. A) Diagrama del cerebro de *G. omarorum* con una representación esquemática de la vía, extendiéndose desde los electroreceptores cutáneos de tipo II (B), a través del lóbulo electrosensorial (ELL, C) hasta el torus semicircularis (TS) y el núcleo preeminencialis dorsal (Pd) (E). B) Electroreceptores tuberosos de tipo II revelados con la técnica de impregnación argéntica de Cajal y De Castro. Estos son inervados por fibras primarias codificadoras de trenes (aférentes primarias de tipo B) que alcanzan el sistema nervioso central a través de las ramas del nervio de la línea lateral anterior (ALLN). C) Sección transversal del bulbo. Se representa el campo terminal de una aférente primaria de tipo B, y algunos de los principales componentes celulares de la vía electrosensorial lenta a nivel del ELL. Los axones de las neuronas de proyección (neuronas piramidales basales y no basales) abandonan el ELL por el lemnisco lateral (LL). D) Sección frontal mostrando la decusación del LL. Como se esquematiza en E, los axones de las neuronas eferentes del ELL proyectan al núcleo preeminencialis dorsal (Pd) y al torus semicircularis (TS). F) Los registros de los potenciales de campo (trazo inferior) muestran la actividad de la vía electrosensorial rápida y los tres componentes de la vía electrosensorial lenta: una actividad lenta temprana (ondas entre 3 y 7 ms), y actividad lenta tardía (iniciando aproximadamente a los 7 y a los 15 ms luego del pico de la DOE, respectivamente). La variabilidad de estas ondas tardías es incrementada significativamente por estímulos electrosensoriales (trazos negros superiores), en comparación con la menor variabilidad que presentan cuando se presentan estímulos no electrosensoriales (trazos medios blancos). Ccb: cerebelo; TeO: tectum óptico. Caputi y Castelló en preparación.

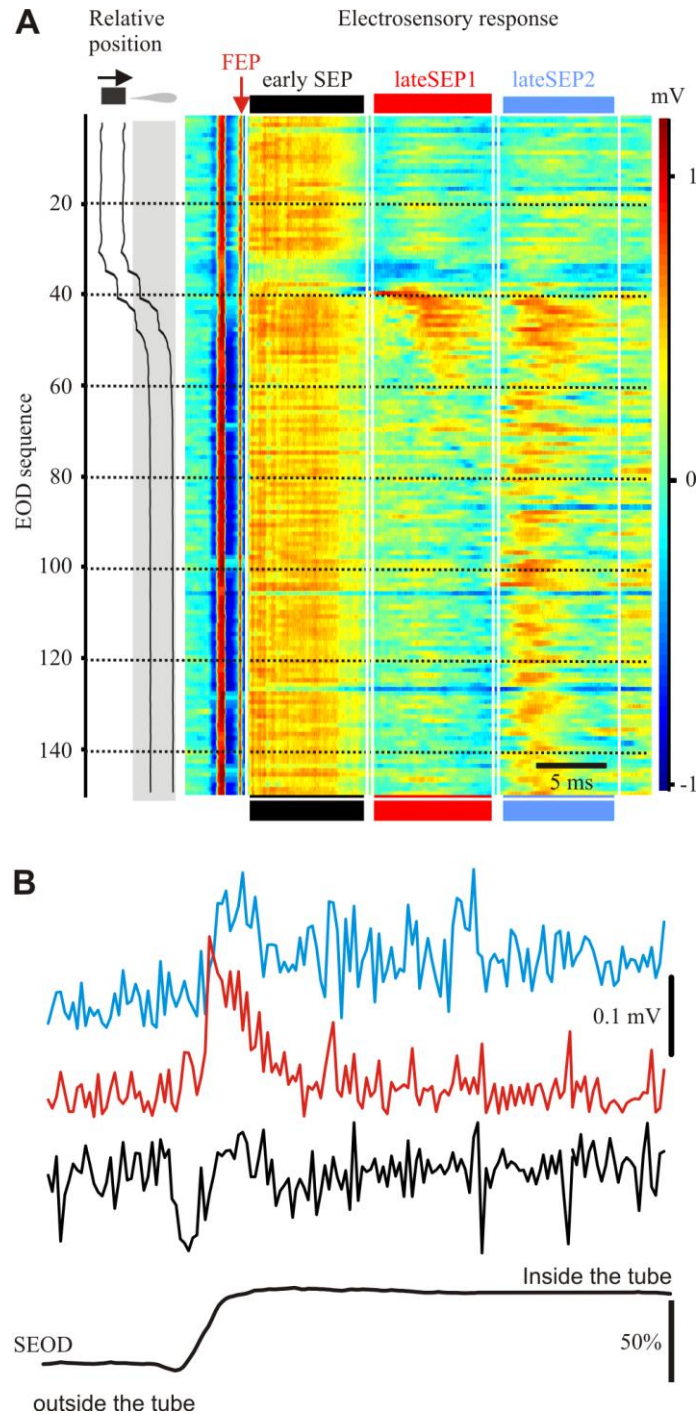


Figura 5. Registro de potenciales de campo evocados en peces crónicamente implantados a nivel del ELL, en libre movimiento. Los diferentes componentes pueden ser identificados cuando un tubo plástico que rodea al pez se mueve hacia adelante y atrás. A) La columna de la izquierda muestra la posición relativa del pez y el tubo de plástico durante la secuencia de 150 DOEs. Los límites del área sombreada corresponden al extremo cefálico y a la punta de la cola respectivamente. La columna derecha muestra el mapa de colores del potencial de campo del ELL evocado en cada DOE. El voltaje está codificado en colores, la dimensión horizontal corresponde al tiempo luego de cada DOE, y la dimensión vertical corresponde a la secuencia de DOEs. B) Muestra el valor del rms en el centro de la fovea de la DOE local auto-generada, y la respuesta de la vía electrosensorial lenta a la DOE (el valor de rms fue calculado en los tres períodos indicados con las barras de colores horizontales que se muestran en A). Note la clara adaptación observada en el trazo rojo y algo menor en el celeste. Modificado de Pereira y cols. (2005).

CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN ANATOMO-FUNCIONAL DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL LÓBULO ELECTRO-SENSORIAL DE *GYMNOTUS OMARORUM*.

Introducción

La **vía electrosensorial rápida** de *G. omarorum* presenta características que lo sitúan dentro del grupo de sistemas conocido con el nombre “time coding systems” (Carr y Friedman, 1999; Carr y cols., 2001). En estos sistemas se produce la codificación precisa del estímulo en el tiempo de ocurrencia de potenciales de acción. Ejemplos de este tipo de circuitos se encuentran en diferentes sistemas además del electrosensorial; sistema auditivo (Carr, 1986; Carr y Friedman, 1999; Carr y cols., 2001), y sistema somatosensorial (Prescott y De Koninck, 2002). En particular, los sistemas auditivo y electrosensorial presentan un elevado grado de analogía, observándose en ambos la ocurrencia de dos tipos de codificación temporal: la codificación del tiempo de ocurrencia de los eventos sensoriales y la codificación de la imagen sobre una base temporal (Carr, 1986; Carr y Friedman, 1999; Carr y cols., 2001). Los algoritmos que utilizan las “vías rápidas” de ambos sistemas son similares y presentan las siguientes características: a) espigas enganchadas en fase codifican el momento de ocurrencia del estímulo, y b) la utilización por parte del sistema nervioso central de la diferencia de fase para medir diferencias en una dimensión del estímulo. Estas vías están formadas por pocas neuronas altamente especializadas y comparten las siguientes características estructurales: a) receptores capaces de responder en una fase determinada del estímulo; b) fibras con muy alta precisión temporal en la transmisión del estímulo; y c) alta eficacia sináptica. En las células codificadoras de fase, la relación entre su estructura y la capacidad de transmitir de forma rápida y precisa el estímulo es llamativa, contando para ello con cuerpos neuronales grandes con pocas o ninguna dendrita, axones gruesos, y espigas de corta duración (Carr, 1986).

En el sistema auditivo de aves las neuronas localizadas en el núcleo magnocellularis (NM) proyectan sus axones sobre el núcleo laminaris ipsi y contralateral. Por su parte, cada neurona del núcleo laminaris establece contactos sinápticos con fibras provenientes de ambos NM (Carr y Konishi, 1990), y son capaces de detectar la ocurrencia simultánea de señales provenientes de ambos lados con un nivel de precisión del orden de micro-segundos (Moiseff y Konishi, 1981, 1983; Carr y Konishi, 1990; Wagner y cols., 2005). La combinación de estas células comparadoras con líneas de retardo que compensan las diferencias en los tiempos de arribo entre el oído izquierdo y derecho, determina que el sistema sea capaz de detectar de forma muy precisa la posición en el plano horizontal de las fuentes sonoras (Sullivan y Konishi, 1986; Moiseff, 1989).

En la vía electrosensorial rápida de peces eléctricos el circuito se organiza de forma similar al sistema auditivo (Carr, 1986). Coincidentemente con las características descritas para las neuronas pertenecientes a los “time coding systems” (Soares y cols., 2002), las células esféricas del lóbulo eléctrico de *G. omarorum* presentan un soma compacto con pocas dendritas cortas que establecen uniones comunicantes (GAP) con el soma de células esféricas vecinas. Además reciben contactos químicos, axosomáticos y axodendríticos, de fibras finas de origen desconocido (Castelló y cols., 1998). Dentro de la estructura laminar del Lóbulo Electrosensorial las neuronas esféricas se localizan formando una monocapa discontinua entre la capa granulosa y la plexiforme. Las células esféricas proyectan sobre el núcleo magnocelular mesencefálico, donde se cree que tiene lugar la detección de coincidencia entre eventos provenientes de diferentes regiones de la superficie corporal.

A pesar de que estas vías han sido descritas hace varias décadas en peces eléctricos de descarga débil (Szabo, 1967), y sus circuitos se encuentran bien caracterizados (Carr y cols., 1986a, b; Castelló y cols., 1998), no se habían caracterizado aún las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas que lo componen. Por otra parte el circuito análogo en el sistema auditivo se encuentra bien estudiado desde el punto de vista celular (Carr, 1986). Resulta interesante entonces estudiar las propiedades celulares de la vía rápida de *G. omarorum* a la luz de los conocimientos existentes del sistema auditivo, con el fin de comparar de que manera estos dos sistemas análogos implementan a nivel celular las funciones computacionales requeridas para el funcionamiento del circuito.

Por su parte, la **vía electrosensorial lenta** presenta a nivel del lóbulo electrosensorial, un circuito polisináptico complejo constituido por diferentes tipos neuronales. Las fibras aferentes primarias de tipo B, que establecen contacto con los electroreceptores de tipo II, y que funcionan como codificadores en trenes de pulsos, proyectan sobre tres regiones diferentes del lóbulo electrosensorial donde el mosaico sensorial se encuentra mapeado. Estos mapas consisten en varias capas de células y fibras, y poseen, además a de las aferentes primarias, cuatro entradas (dos del lóbulo contralateral y dos del núcleo praemientialis) y cinco salidas principales (dos al lóbulo contralateral, dos al praemientialis y una al torus semicircularis) que forman parte de un circuito general similar al descrito en gimnótidos de onda (Réthelyi y Szabo, 1973a; Maler, 1979; Maler y cols., 1982; Carr y Maler, 1986; Bell y Maler, 1986): a) las células ovoides grandes de las capas más profundas y células polimórficas de las capas intermedias proveen un fuerte efecto inhibitorio sobre el lado contralateral (Bastian y cols., 1993; Maler y Mugniani, 1994); b) las células piramidales situadas en las capas intermedias proyectan al núcleo praemientialis, el cual a su vez proyecta sobre el mismo lóbulo electrosensorial por dos caminos diferentes (Sas y Maler, 1993; Bastian,

1986b, 1986c; Bastian y Braton 1990), uno directo y el otro indirecto a través de la eminencia granularis posterior, donde se produce la integración con otras señales sensorio-motoras (Bastian J., 1986b, 1986c); y c) células piramidales dorsales integran esas señales en diferentes regiones de su árbol dendrítico incidiendo directamente o a través de interneuronas locales, y proyectan tanto sobre el núcleo preminencialis como sobre el torus semicircularis (Réthelyi y Szabo, 1973a; Maler, 1979; Maler y cols., 1981).

A nivel del Lóbulo Electrosensorial existen dos categorías principales de neuronas piramidales de proyección asociadas a las fibras aferentes de tipo B, las neuronas piramidales basilares y las no-basilares. Las neuronas piramidales basilares tienen dendritas que alcanzan la capa neuropílica profunda, donde toman contacto con las aferentes de tipo B (Maler, 1979). Estas células son excitadas al producirse un aumento de la amplitud de la descarga del órgano eléctrico (E cells; Saunders y Bastian, 1984). Las neuronas piramidales no-basilares carecen de dendrita basal y son inhibidas por las fibras aferentes de tipo B a través de interneuronas. Estas células son inhibidas al producirse un incremento en la amplitud de la descarga del órgano eléctrico (I cells; Saunders y Bastian, 1984). Tanto las neuronas basilares como las no basilares presentan dendritas que se extienden por la capa molecular.

Tres clases de interneuronas son contactadas por las fibras aferentes de tipo B: las células ovoides y las interneuronas granulares de tipo 1 y 2. Las células ovoides que son gabaérgicas establecen contactos sinápticos de tipo mixto con las fibras de tipo B y no reciben influencia de bucles de retroalimentación. Estas células proyectan sus axones extensamente sobre los lóbulos electrosensoriales homo y contra-laterales terminando sobre los troncos dendríticos basales de las piramidales basilares (Bastian y cols., 1993; Maler y Mugnaini, 1994). Las neuronas granulares de tipo 1 y 2 establecen sinapsis con las aferentes primarias de tipo B sobre sus dendritas basilares. Las neuronas granulares de tipo 2 también tienen dendritas apicales que reciben información proveniente de los bucles de retroalimentación a nivel de la capa molecular (Maler, 1979). Ambos tipos de neuronas granulares proyectan sobre las neuronas piramidales estableciendo contactos de tipo inhibitorio (Maler y cols., 1981; Maler y Mugnaini, 1994). Se ha propuesto que las neuronas granulares de tipo 1 podrían ser responsables de un mecanismo de inhibición centro-periferia de las neuronas piramidales (Berman y Maler, 1999; Bastian y cols., 2002).

Resultados

En función de la relativa facilidad para ser registradas (principalmente por el tamaño de su soma y su fácil identificación dentro del patrón de organización laminar del lóbulo electrosensorial), y de su relevancia dentro de sus respectivos circuitos ya que son las neuronas principales o de proyección, este trabajo se centro en el estudio de las neuronas piramidales y esféricas. Con el fin de caracterizar las propiedades estructurales de estos tipos neuronales estudiamos la respuesta a estímulos eléctricos intracelulares (mediante la técnica de “whole cell patch”) y la morfología mediante el llenado de las mismas con biocitina. En los casos en que fue posible también se estudió la respuesta a la estimulación sináptica.

El patrón de organización laminar característico del lóbulo electrosensorial puede ser reconocido con relativa facilidad en rodajas transversales de 200 micras de espesor mantenidas vivas en una cámara perfundida con solución de tipo Ringer, visualizadas directa y electrónicamente en un microscopio con óptica Nomarski e iluminación infrarroja. Por esta razón la identificación primaria de las neuronas a ser registradas se realizó de acuerdo a su localización dentro de las capas del lóbulo electrosensorial. La identificación final de la localización y la morfología de los diferentes tipos de neuronas registradas, se realizó mediante el llenado de las mismas con biocitina (contenida en la solución de registro intracelular). Luego de finalizado el registro las rodajas de tejido fueron fijadas en paraformaldehído (4% en buffer fosfato Ph-7.4) y la presencia de biocitina revelada con la técnica de avidina-peroxidasa.

La correlación entre la respuesta de las neuronas del lóbulo electrosensorial a diferentes protocolos de estimulación eléctrica intracelular, y su marcado intracelular con biocitina, permitieron identificar claramente tres tipos de neuronas principales: las células piramidales basilares y las no basilares de la vía electrosensorial lenta, y las células esféricas de la vía electrosensorial rápida.

Neuronas piramidales basilares: Se localizan en la capa polimórfica donde se destacan de sus vecinas por presentar un cuerpo celular de mayor tamaño. Este es de forma redondeada y se encuentra rodeado de dendritas cortas y finas. A partir del polo dorsal nace un árbol dendrítico apical que en general tiene una sola rama originada a partir del soma. Dicha rama se ramifica abundantemente expandiéndose en la capa molecular cerca de 500 micras; en el polo ventral, y en dirección a la capa neuropílica profunda nace una dendrita basilar de la cual emergen ramificaciones cortas que contactan con las fibras aferentes primarias (Fig. 6A).

Las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de estas neuronas se estudiaron mediante la aplicación de pulsos intracelulares cuadrados de corriente de diferente polaridad e intensidad variable, así como pulsos cuadrados de corriente depolarizante de igual duración y apareados a diferentes intervalos. Las propiedades de las diferentes entradas sinápticas que recibe este tipo neuronal se exploraron mediante experimentos de estimulación sináptica utilizando como electrodo una pipeta conteniendo solución extracelular en contacto con un alambre conectado a una unidad aisladora de estímulo. En este caso pulsos cuadrados de corta duración a diferentes intervalos de frecuencia e intensidades fueron generados mediante un estimulador.

En total se registraron 9 neuronas piramidales basilares. En ninguno de los casos se observó la descarga de potenciales de acción en ausencia de estimulación. La aplicación intracelular de pulsos cuadrados de corriente muestra, a intensidades subumbrales, una respuesta simétrica para pulsos de una misma intensidad y polaridades opuestas, mientras que a intensidades inmediatamente por encima del umbral la célula comienza a descargar de forma repetitiva aunque con un importante retardo con respecto al inicio del estímulo. Este retardo en el tiempo de inicio de la descarga es similar al observado en células que expresan una corriente de potasio transitoria y de bajo umbral (Storm, 1990; Johnston y Wu, 1995; Reyes, 2001), y se acorta en la medida que aumenta la intensidad de estimulación (Fig. 6B). A intensidades de corriente moderadas las espigas que se observan son de corta duración, con un valor máximo de voltaje que ronda en los 20 mV, y con una post-hiperpolarización corta que en ocasiones es seguida por una pequeña oscilación del potencial de membrana (Fig 6B-C). A intensidades mayores se produce un aumento de la frecuencia de descarga y se observa la aparición de un nuevo tipo de espiga, de mayor duración, con un pico de voltaje que ronda en los 0mV, y con una hiperpolarización post espiga de gran amplitud y duración (Fig. 6C). Este hallazgo coincide con los resultados encontrados en el lóbulo electrosensorial de peces eléctricos de onda. En estos se ha identificado que este segundo tipo de espiga es consecuencia de la invasión del soma por parte de una espiga generada a nivel del árbol dendrítico apical (Turner y cols., 1994; Lemon y Turner, 2000). El análisis del número de espigas descargadas

por un pulso de 500 ms en función de la intensidad del pulso intracelular, tomando en cuenta solo las espigas de mayor amplitud, muestra una relación sigmoïdal (Fig. 6D).

Por otra parte, la aplicación de pulsos apareados a distintos intervalos muestra una ventana de facilitación de la respuesta al segundo pulso cuando se utilizan pulsos condicionantes subumbrales de 10 ms de duración. Dicha facilitación se mantiene hasta 10 ms después de cesado el estímulo condicionante y en ausencia de respuesta electrotónica discriminable visualmente. Este efecto al igual que el retardo en el inicio de la descarga antes mencionado podría explicarse por la activación transitoria y posterior inactivación de una corriente de potasio de tipo I_A (Storm, 1990; Johnston y Wu, 1995; Reyes, 2001). Este tipo de conductancia de potasio se activa rápidamente cerca del potencial de reposo con una constante de tiempo cercana a 1 ms (Hoffman y cols., 1997; Bekkers, 2000; Johnston y cols., 2000; Korngreen y Sakmann, 2000) mientras que su constante de tiempo de inactivación es corta para valores de voltaje superiores a 20 mV (en el entorno de los 5–8 ms) pero es sustancialmente más larga (mayor a los 50 ms) a valores de voltaje cercanos al potencial de reposo (Korngreen y Sakmann, 2000).

En todas las neuronas registradas se intentó caracterizar la respuesta sináptica evocada utilizando un electrodo de estimulación localizado en diferentes regiones del lóbulo electrosensorial. Inicialmente el electrodo se localizó en regiones alejadas a la neurona y se fue aproximando en busca de respuestas evocadas por estímulos de duración e intensidad variables. En la mayoría de los casos sólo localizando el electrodo en las regiones inmediatamente vecinas a la neurona se logró obtener una repuesta evocada. La corta latencia de estas respuestas sugiere que son producto de la estimulación directa de la neurona y no de la activación sináptica. En 3 neuronas se observó actividad sináptica espontánea caracterizada por muy frecuentes EPSP de corta duración y baja amplitud, que en dos de estos casos pudieron ser evocados por estímulos extracelulares aplicados tanto a nivel de la capa molecular como de la neuropílica profunda. En ocasiones esta respuesta sináptica evocada consistió en dobletes. Además, en otras 2 células se observó la aparición espontánea y bastante regular de IPSPs de baja frecuencia (0.1 - 0.2 Hz) larga duración y de gran amplitud que fueron reclutados por el estímulo de la capa molecular.

La relativa dificultad para obtener respuestas sinápticas reproducibles se debió probablemente a la utilización cortes coronales de cerebro, ya que el lóbulo electrosensorial transcurre a ambos lados de la línea media de forma oblicua respecto al eje antero posterior. En este plano de corte la mayoría de las fibras aferentes son cortadas de forma que solo se conserva un pequeño cabo próximo a la neurona. Intentando solucionar este problema se realizaron cortes del cerebro en otras orientaciones que permitieran una mejor conservación de las fibras aferentes, pero como

resultado se obtuvieron piezas de tejido frágiles y difíciles de manilular, o muy pequeñas; mientras que en otros casos no fue posible observar el patrón de organización laminar característico del lóbulo electrosensorial.

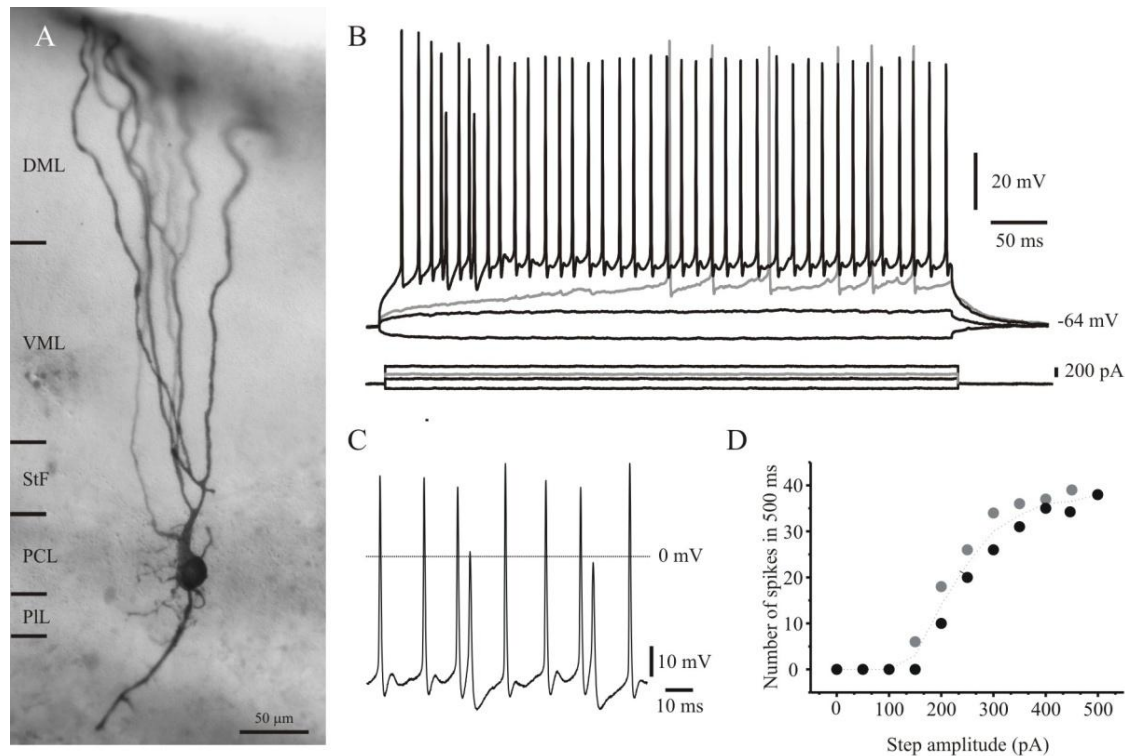


Figura 6: Neurona piramidal basilar. A) Microfografía de una neurona piramidal basilar marcada intracelularmente con biocitina. Su soma se localiza en la capa de células polimórficas y la mayoría presenta entre uno y tres troncos dendríticos que brotan del soma dorsalmente ramificándose en varias dendritas orientadas paralelamente que atraviesan toda la capa molecular. En la region perisomática se observan algunas dendritas finas y cortas, y de la porción ventral del soma nace una única dendrita basilar que atraviesa la capa plexiforme y la granular y se ramifica en la capa neuropílica profunda donde contacta con las aferentes primarias. Estas células se encuentran generalmente silentes en reposo y descargan de forma repetitiva cuando son depolarizadas (B y C). El número de espigas provocadas por un pulso de corriente tiene una relación sigmoideal con la intensidad de la misma (D). El patrón de intervalo inter-espiga también depende de la intensidad. La respuesta a estímulos de baja intensidad muestra un retardo en la aparición de las espigas (trazos grises en B) que son seguidas de un patrón de hiperpolarización-depolarización (B y C). Estímulos de alta intensidad producen una respuesta rápida que adapta y en la cual se pueden identificar dobletes (C). En estos dobletes se observa una depolarización luego de la primera espiga que da origen a la segunda espiga, de menor amplitud, que es seguida a su vez de una gran hiperpolarización.

Neuronas piramidales no-basilares: Estas neuronas se localizan en la capa de células polimórficas, y al igual que las piramidales basilares fueron identificadas de forma primaria por presentar un tamaño mayor que el de sus vecinas. Desde el punto de vista morfológico se diferencian de las piramidales basilares por la ausencia de una dendrita basilar; las dendritas que rodean el soma son más cortas y menos numerosas; el tronco dendrítico apical presenta ramas más gruesas y aparentemente con menor densidad de espinas dendríticas (Fig. 7A). Registradas de forma intracelular presentaron descarga espontánea repetitiva, interrumpida con cierta regularidad por hiperpolarizaciones prolongadas similares a las descritas para las neuronas basilares (Fig 7D). En estas células se observa un único tipo de potencial de acción que surge a partir de una pendiente de despolarización lenta, y no se identifica un potencial de hiperpolarización post-espiga. De hecho cada espiga es sucedida inmediatamente de un nuevo potencial depolarizante lento. La frecuencia basal de descarga espontánea puede ser modulada por la aplicación de pulsos cuadrados de corriente de larga duración (0,5 s; Fig. 7B); esta modulación de la frecuencia presenta una discreta adaptación temporal. Mientras que los pulsos de corriente hiperpolarizante producen la disminución de la frecuencia de descarga y el silenciamiento de la célula a intensidades mayores, los pulsos depolarizante producen un aumento del número de espigas de forma proporcional a la intensidad de la corriente inyectada (Fig. 7C). La linealidad de la relación entre la frecuencia de descarga y intensidad de estimulación intracelular sugiere que este tipo de neurona piramidal podría codificar de forma lineal diferencias en la intensidad de la imagen electrosensorial.

Los intentos de caracterizar las propiedades de los contactos sinápticos que recibe esta neurona fallaron, seguramente debido a las mismas razones expuestas para las neuronas piramidales basilares. Sin embargo, el IPSP prolongado fue ocasionalmente reclutado por el estímulo de la capa molecular.

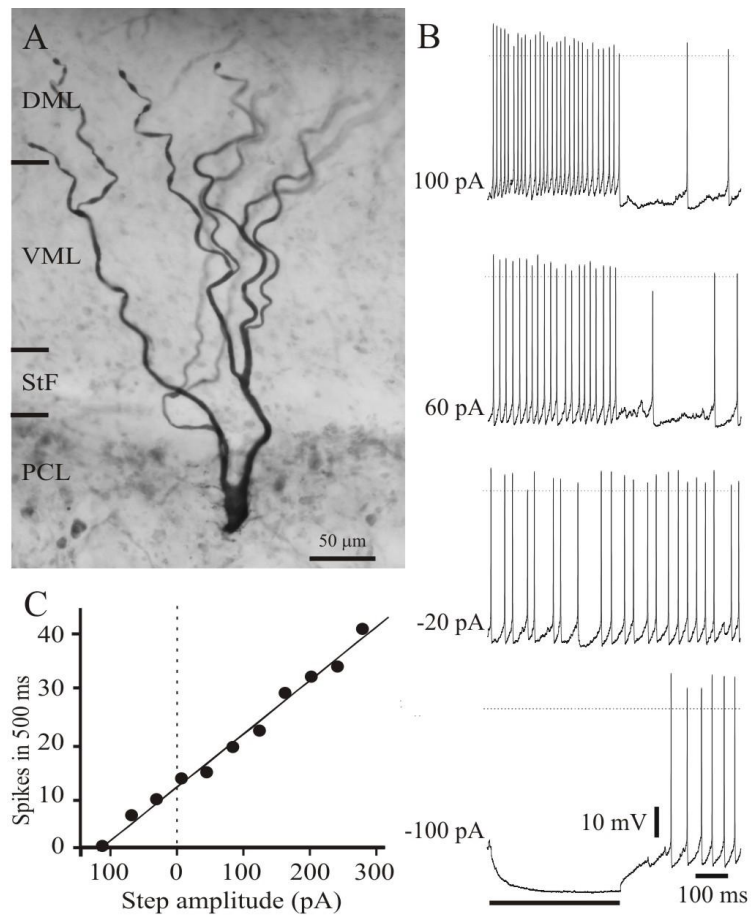


Figura 7. Neurona piramidal no basilar. A) El soma de este tipo celular se localiza en la capa de células polimórficas, presenta unas pocas dendritas perisomáticas finas y cortas, y dendritas apicales largas que se ramifican en la capa molecular. Note la ausencia característica de dendrita basilar. En rodajas de cerebro, *in vitro*, muestran descarga espontánea cuya frecuencia se modula linealmente por la aplicación de pulsos de corriente de diferentes intensidades (B y C).

Neuronas esféricas: Estas células fueron identificadas por su forma y su localización entre la capa neuropílica profunda y la capa granular. Registradas en reposo, estas células nunca (55 células) mostraron actividad espontánea, siendo su potencial de reposo medio de -70.5 mV (entre -61.2 y -74.2 mV) y con bajo nivel de ruido (coeficiente de variación entre 7×10^{-4} y 9×10^{-3}). Se hizo la correlación anátomo-funcional en 6 células, 3 de las cuales presentaron marca completa (soma y axón). La morfología y la localización observadas mediante el marcaje intracelular coinciden con los experimentos de marcaje retrógrado realizados por Castelló et al. 1988, donde se observa que se trata de células pausidendríticas con un axón muy grueso conectado con el soma a través de un segmento inicial estrecho. El axón se dirige inicialmente en dirección dorsal, por una corta distancia, y luego transcurre horizontalmente en sentido medial por la capa plexiforme interna hasta alcanzar el lemnisco lateral.

La aplicación de pulsos de corriente constante que producen una depolarización de la membrana mayor a un valor medio de -40 mV (entre -48 y -34.3 mV, N=55) provocó la descarga de un único potencial de acción, independientemente de la intensidad y la duración del estímulo (Fig. 8B). Esta espiga se caracteriza por una fase ascendente rápida seguida por una fase de descenso más lenta, luego de la cual se observa una hiperpolarización post-espiga. Esta última es eliminada y revertida si el potencial de membrana es llevado a un valor de voltaje por debajo de los -80 mV (valor medio, N=4) mediante la inyección de corriente (ver más adelante). La latencia de la espiga decrece siguiendo una función hiperbólica de intensidad del estímulo (Fig. 8B–D, N=24). En 4 de estas células, la espiga se originó durante la fase descendente luego del máximo de voltaje subumbral (Fig. 8C, trazos negro y rojo), sugiriendo que la espiga se genera en un lugar eléctricamente distante, probablemente el primer nodo de Ranvier en el axón.

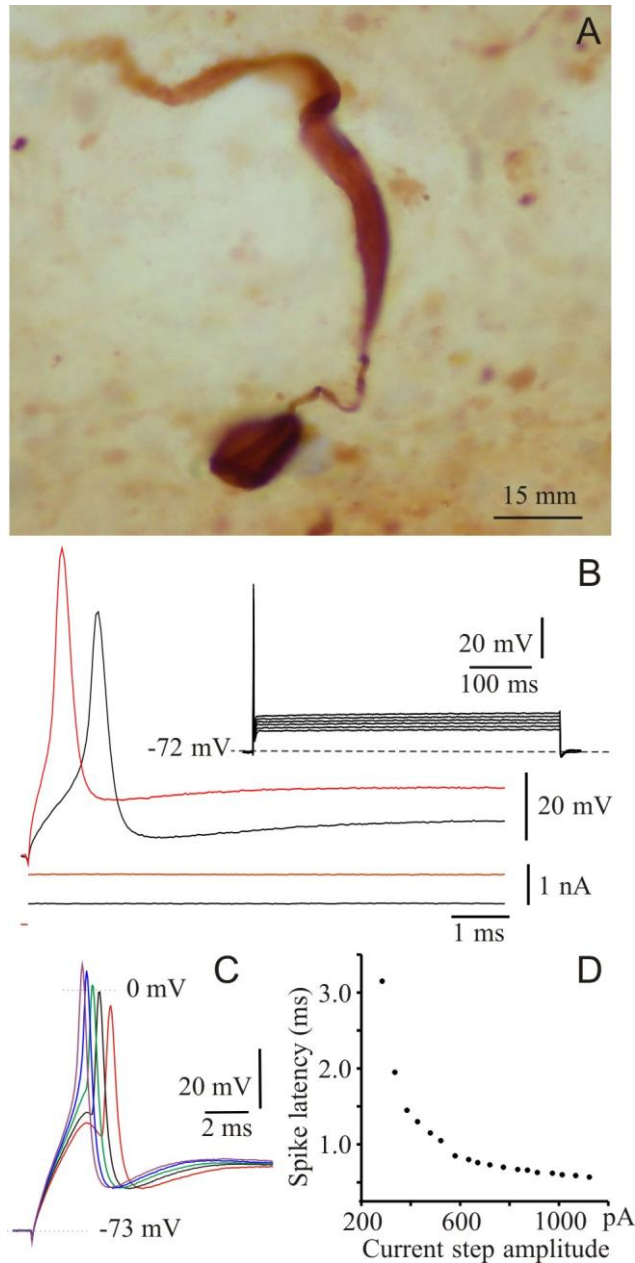


Figura 8. Neurona esférica. A,B) Neurona esférica marcada con biocitina que característicamente descarga un único potencial de acción cuando es estimulada con pulsos de corriente de larga duración. (A) Las neuronas esféricas presentan un soma esférico liso de aproximadamente 15 μm de diámetro del cual solo unas pocas dendritas finas pueden emerger (este no es el caso), y de donde nace un axón grueso con un segmento inicial fino. (B) Trazos de la misma célula se presentan a diferente magnificación para mostrar la forma de las espigas (trazo negro y rojo) y la ausencia de descarga repetitiva cuando se aplican estímulos de larga duración (inserto). (C) Algunas células (trazo rojo y negro) descargan la espiga el la fase descendente de la giba provocada por el pulso de estimulación (estímulo en nA: violeta 0.95; azul 0.75, verde 0.60, negro 0.50, rojo 0.40). (D) La latencia de la espiga es una función hiperbólica de la intensidad del estímulo (datos de otra célula).

Discusión

Neuronas Piramidales: Los resultados obtenidos en el estudio primario de la vía electrosensorial lenta permitieron establecer la correlación anátomo-funcional de dos tipos de neuronas principales correspondientes a las neuronas piramidales basilares y no basilares descritas en el lóbulo electrosensorial de *A. leptorhynchus* (Bastian, 1986). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en esta especie los dos tipos de neuronas piramidales de *G. omarorum* presentaron propiedades funcionales diferentes entre sí. Los registros intracelulares de las neuronas piramidales basilares de *G. omarorum* son similares a los reportados para ambos tipos de neuronas piramidales (basilares y no basilares) de *A. leptorhynchus* (Maler, 1979). Un rasgo distintivo que comparten las piramidales basilares es la capacidad de descargar dos tipos de potenciales de acción. En *A. leptorhynchus* el potencial de acción de mayor amplitud, menor duración, y con una post-hiperpolarización menos pronunciada, se identificó como originario de la región somática (probablemente del segmento inicial del axón); mientras que el potencial de acción más pequeño, ancho, y con post-hiperpolarización más pronunciada ha sido identificado como originario del árbol dendrítico apical (Turner y cols., 1994; Lemon y Turner, 2000). En esta misma especie se ha demostrado que ambos tipos de potenciales de acción son capaces de establecer un régimen de descarga oscilatoria, entre el soma y el árbol dendrítico apical, que permite aumentar la ganancia de la respuesta de la neurona (Mehaffey y cols., 2005). Se ha mostrado que este aumento de la ganancia puede ser modulado diferencialmente por la activación de canales ionotrópicos activados por ácido gama-amino-butírico presentes en el soma, o en la región proximal del árbol dendrítico apical. La activación de la inhibición a nivel somático produce un efecto sustractivo sobre la relación entre la intensidad del estímulo intracelular y la frecuencia de descarga. Por su parte, la activación de la inhibición a nivel de la región proximal del tronco dendrítico apical tiene un efecto multiplicativo sobre la ganancia de la respuesta neuronal (Mehaffey y cols., 2005). Este mecanismo de control de ganancia descrito para *A. Leptorinchus* podría ser la base de la respuesta adaptativa observada en la respuesta de la vía electrosensorial lenta luego de un cambio en la escena sensorial (Pereira y cols., 2005).

Los registros de las neuronas piramidales no-basilares de *G. omarorum* mostraron diferencias con los de *A. leptorhynchus*. En primer lugar, estas neuronas presentan actividad espontánea interrumpida por periodos prolongados de hiperpolarización; y en segundo lugar, presentan un único tipo de potencial de acción. Dada la relación lineal entre la intensidad de estimulación intracelular y la frecuencia de descarga de potenciales de acción es posible que la capacidad de respuesta de las neuronas piramidales no basilares se relacione con la porción no adaptativa del potencial de campo observado ante un cambio en la escena electrosensorial (Pereira y cols., 2005).

Las diferencias de las propiedades funcionales de las neuronas piramidales, observadas entre ambas especies, podrían estar relacionadas con diferencias en el procesamiento de la información electrosensorial. El abordaje de este problema requiere del registro *in vivo* de estas neuronas, así como de un análisis profundo del circuito local en el que se encuentran insertas.

Neuronas esféricas: El perfil de respuesta presentado por las neuronas esféricas ante la aplicación de pulsos intracelulares de corriente se caracteriza por la presencia de una doble rectificación del voltaje, tanto cuando este es llevado a valores depolarizantes como hiperpolarizantes. Cuando la intensidad de estimulación alcanza el nivel de disparo se produce la descarga de un único potencial de acción, independientemente de la intensidad y duración del estímulo, cuya latencia disminuye conforme aumenta la intensidad de estimulación. Tanto la respuesta subumbral como el perfil de disparo de las neuronas esféricas presentan un elevado grado de similitud con lo observado en células equivalentes del sistema auditivo de aves y mamíferos (Golding y cols., 1999). En el sistema auditivo, registros intracelulares en modo de fijación de voltaje y en presencia de bloqueantes farmacológicos específicos han identificado a la corriente de potasio de bajo umbral y la corriente catiónica mixta activada por hiperpolarización como los factores determinantes de la respuesta de tipo “one-spike-neuron” (Soares y cols., 2002).

El grupo de neuronas que presenta un perfil de respuesta de tipo “one-spike-neuron” se caracteriza por presentar un soma relativamente redondeado con escasas dendritas cortas o sin dendritas (Soares y cols., 2002). Desde el punto de vista funcional estas neuronas presentan la capacidad de responder de forma rápida y en relación de fase precisa con el estímulo. Estas propiedades se deben a la expresión de un par de corrientes resonantes cuyos rangos de activación se encuentran cercanos al potencial de reposo de membrana. Como veremos en el análisis detallado realizado en el capítulo IV las neuronas esféricas de *G. omarorum* son entonces un ejemplo perteneciente a este fenotipo neuronal, y un ejemplo en el cual la respuesta global de la vía se encuentra claramente relacionada con la respuesta individual de las neuronas que la componen y sus propiedades estructurales.

CAPITULO IV: PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS INTRÍNSECAS SUBYACENTES AL FENOTIPO “ONE-SPIKE-NEURON” EN LAS NEURONAS ESFÉRICAS.

Introducción

Debido a la simplicidad relativa del circuito subyacente a la vía electrosensorial rápida y de las propiedades estructurales de las neuronas esféricas (en comparación con la vía electrosensorial lenta), este sistema presenta mejores condiciones para profundizar en el estudio de la relación entre las propiedades neuronales y las circuitales. El presente trabajo se centrará entonces en el análisis detallado de las propiedades estructurales de las células esféricas y de su relación con las propiedades funcionales del circuito.

Resultados

Análisis de la respuesta subumbral: Como primer paso en el estudio de las bases iónicas del perfil funcional de las células esféricas analizamos el voltaje de membrana en respuesta a pulsos de corriente subumbral. La figura 9 muestra la respuesta subumbral de voltaje a la aplicación de pulsos intracelulares de corriente de diferente amplitud e intensidad. Como lo muestra el curso temporal del cambio de voltaje durante pulsos de corriente de larga duración (hasta 500 ms de duración; Figs. 9 y 10), cantidades iguales de corriente depolarizante subumbral y de corriente hiperpolarizante tuvieron efectos asimétricos sobre el potencial de membrana. Los pulsos de corriente que produjeron depolarizaciones del potencial de membrana de -65 mV o más (media, $N=24$) provocaron la aparición de una joroba graduada, con un valor máximo entre 1.9 y 2.6 ms siguientes al inicio del pulso. Luego de esta joroba el potencial de membrana permaneció fijado a un valor dependiente de la amplitud del pulso de corriente aplicado (Fig. 9A-B). Por otra parte, el cambio de potencial producido por la aplicación de pulsos de corriente negativos sigue un curso no exponencial, evidenciado por la separación de la recta de la pendiente del gráfico semilogarítmico de la derivada del voltaje en el tiempo, en función del tiempo (Fig. 9C). De forma consistente, esta desviación de la pendiente se produjo en dirección ascendente, indicando un aumento progresivo en la impedancia de membrana con la hiperpolarización entre 2 y 10 ms después del comienzo del pulso hiperpolarizante. Fundamentamos dicha afirmación en el siguiente razonamiento y basados en el circuito equivalente eléctrico de la membrana de una célula esférica como la que se describe en la figura 8.

Cuando se aplica un escalón de corriente constante a partir de cero, la diferencia entre el potencial transmembrana actual ($V(t)$) y el potencial transmembrana en ausencia de estimulación (V_0) es una función de la amplitud del escalón de corriente (I), del tiempo, y de la impedancia de la membrana. Si la Capacidad (C) y la resistencia (R) equivalentes de la membrana son constantes y despreciamos la impedancia en serie del electrodo, la diferencia de potencial antedicha ($\Delta V = V(t) - V_0$) será igual a:

$$\Delta V = R.I.(1 - e^{-(t-t_0)/\tau})$$

Donde la constante de tiempo es igual al producto $R.C$ y t_0 representa el tiempo de instalación del estímulo. Por lo tanto, si R y C son constantes para todo $t > t_0$ existe $K(t) = (1 - e^{-(t-t_0)/\tau}).R$ tal que:

$$\Delta V = I. K(t)$$

Suponiendo que dichos parámetros $C(t)$ y $R(t)$ son constantes en el tiempo la derivada de $K(t)$ será:

$$K'(t) = (R/\tau).e^{-(t-t_0)/\tau} \text{ o } K'(t) = (1/C).e^{-(t-t_0)/\tau}$$

Y consiguientemente la derivada del voltaje V' para un escalón de corriente de amplitud constante I será:

$$V' = (I/C).e^{-(t-t_0)/\tau}$$

si tomamos logaritmos a cada lado de la expresión:

$$\log(V') = \log(I/C) - (t-t_0)/\tau$$

Dado que esta relación no se cumple para $t - t_0 > 2$ ms podemos concluir que el supuesto (R y C constantes) no es verdadero más allá de dicho tiempo. Dado que la variable más probable de ser afectada por el estímulo es la resistencia, la hipótesis más plausible es que el cambio de voltaje modifica la conductancia de la membrana de tal forma que más allá de los 2 ms este cambio es claramente evidente.

Sin embargo, el hecho de que para todo I se cumpla la relación

$$\log(V'/I) = -(\log(C) + (t-t_0)/\tau)$$

y que para todo t tal que $2 \text{ ms} > t > t_0$ se cumpla la relación

$$\Delta V = I.K$$

sugiere que podemos estimar la resistencia y la capacidad de membrana en reposo a partir de la ordenada en el origen ($-\log(C)$) y la pendiente ($1/RC$) de una serie de curvas obtenidas con escalones de corriente de distinta amplitud. Aplicaremos esta idea seguidamente para entender el efecto de los pulsos depolarizantes y más adelante para evaluar el cambio en la resistencia de membrana al utilizar series de pulsos pareados.

El análisis de los cambios de voltaje en función de la corriente (gráficos V/I) a diferentes tiempos desde el inicio de los pulsos de corriente, nos permite dilucidar los mecanismos subyacentes a la joroba de potencial observada al depolarizar la membrana. El cambio del potencial de membrana

con respecto de su potencial de reposo, y la amplitud del pulso de corriente, fueron proporcionales hasta los 2,4 ms, donde se localiza el máximo de la giba (Fig. 9B, trazo rojo, 9D, símbolos rojos). Para cualquier valor de tiempo menor que 2.4 ms luego del inicio del estímulo, la variación del potencial de membrana fue proporcional a la amplitud del pulso de corriente, indicando que esta fase de cambio de potencial es consecuencia, principalmente, de la depolarización pasiva de la membrana producida por la inyección de corriente.

En la fase estable que sigue a la giba, los gráficos V/I ajustan a una curva convexa con dos pendientes asintóticas diferentes para corrientes depolarizantes e hiperpolarizantes. Los símbolos azules en la figura 9D ejemplifican esta relación a 10.4 ms luego del inicio del pulso de corriente (Fig. 9B, línea azul, 9D, círculos azules). Mientras que la pendiente asintótica para valores de corriente hiperpolarizantes aumenta hasta alcanzar un máximo (Fig. 9D, línea sólida), la pendiente asintótica para valores de corriente depolarizantes (Fig. 9D, línea punteada) permaneció constante hasta el final del pulso (Fig. 9D, símbolos azules y verdes). La pendiente depolarizante fue de 6 a 12 veces menor que la pendiente máxima para valores de corriente hiperpolarizante. Esta desviación asimétrica de la proporcionalidad en la fase estable de la respuesta indica que depolarizaciones superiores a -65 mV desencadenan grandes cambios persistentes en la conductancia equivalente de membrana sin cambios mayores en la fuerza electromotriz equivalente. Esto sugiere además que el incremento de una corriente de salida de bajo umbral es la principal causa de la giba y la fijación de voltaje a posterior. Por otra parte, el incremento de la resistencia de membrana tardío, causado por la hiperpolarización, y con una latencia similar al efecto depolarizante (Fig 9 C), sugiere que esta conductancia se encuentra parcialmente abierta en reposo.

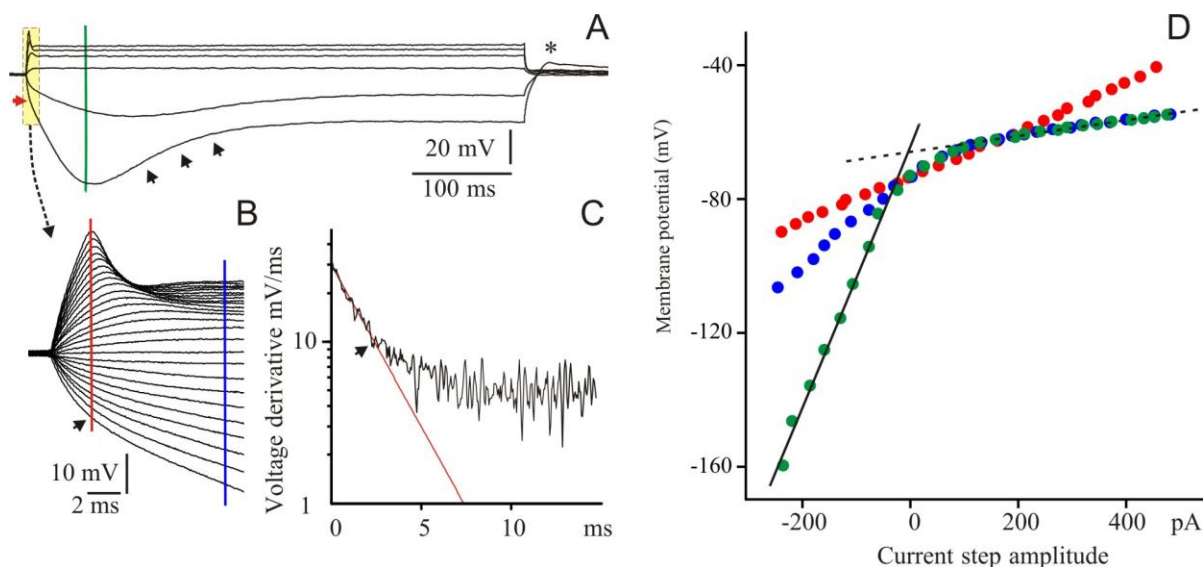


Figura 9. Típica respuesta subumbral temprana en una célula esférica. A) Estímulos depolarizantes e hiperpolarizantes provocaron respuestas muy asimétricas. Note la característica joroba y estabilización del potencial de membrana producido en respuesta a pulsos depolarizantes y la curva depolarizante que se establece a partir de los 63 ms del inicio de los pulsos hiperpolarizantes (flechas negras en A). B) Ampliación de los primeros 11 ms de las respuestas donde se observa claramente la joroba de voltaje alcanzando su valor máximo a los 2.4 ms luego de iniciado el pulso (los pulsos de corriente están igualmente espaciados por 25 pA). Hasta este pico máximo de voltaje (línea roja en B) existe una relación lineal entre el el potencial de membrana y la corriente inyectada (símbolos rojos en D). A partir de este momento la respuesta es asimétrica. Para pulsos depolarizantes se produce una reducción de la caída de voltaje causada por el flujo de la corriente inyectada a través de la membrana, y por lo tanto un incremento en la conductancia de la membrana. Como se evidencia por la coincidencia de sus pendientes asíntóticas depolarizantes (línea discontinua en D) de los graficos V/I construidos a los 10.4 (línea azul en D) y a los 63 ms (línea verde en A), no existen cambios en la pendiente del gráfico V/I durante la fase de estabilización que sucede a la joroba, indicando que durante este período no existe inactivación de la conductancia. Al analizar más detalladamente la respuesta a pulsos hiperpolarizantes, mediante el gráfico semilogarítmico (C) de la derivada del voltaje en función del tiempo del trazo de voltaje inferior de B, observamos que existe una relación exponencial simple (línea roja) hasta los 2.4 ms (flecha en B y C). A partir de ese tiempo existe una desviación ascendente de una curva exponencial simple indicando una reducción de la conductancia de membrana.

Otro rasgo importante de la respuesta de voltaje evocada por la aplicación de pulsos de corriente constantes hiperpolarizantes fue la rectificación del voltaje hacia valores más positivos, provocando en la mayoría de las células estudiadas una “joroba inversa” que presenta un mínimo entre 20 y 70 ms luego del inicio de los pulsos (Figs 9A y 10A, flechas negras). La pendiente asintótica hiperpolarizante fue máxima en el mínimo de voltaje, justo antes del inicio de la pendiente de repolarización (media: 210 mV/pA; Figs 9D, 10D, símbolos verdes). Consistentemente con el inicio de la rectificación de entrada, la pendiente asintótica hiperpolarizante justo antes del comienzo (Fig. 10A, línea roja, 10D, símbolos rojos) decae hasta un valor intermedio entre la pendiente asintótica máxima depolarizante (Fig. 10D, línea punteada) e hiperpolarizante (Fig. 10D, línea continua).

Estos cambios duraderos en la conductancia de membrana causados por el alejamiento del potencial de membrana de su valor de reposo también se hacen evidentes comparando el potencial de reposo luego de la finalización de pulsos de corriente de 50 y 200 ms (Fig. 10A-B). Las curvas de retorno luego de la hiperpolarización decaen mucho más lentamente que las producidas luego de depolarizar la membrana. Además, cuando el pulso termina en el punto de mayor hiperpolarización (Fig. 10B), el tiempo de decaimiento (medido como el tiempo en el que el voltaje alcanza el valor medio entre el valor de partida y el de reposo) fue más del doble del valor obtenido para pulsos más duraderos donde la pendiente depolarizante alcanza un valor estable (Fig. 10A). Mientras que pulsos hiperpolarizantes de 50 ms de duración fueron seguidos por una relajación lenta del potencial de membrana, pulsos más prolongados, que produjeron la activación de la rectificación de entrada, fueron seguidos en la mitad de las células por “potenciales rebote” cuyo máximo valor de voltaje se sitúa 20–25 ms luego de finalizado el pulso (Figs 9A asterisco, 10C). Esto sugiere que la rectificación de entrada es debida a una conductancia catiónica mixta de tipo I_h , y el rebote es consecuencia de su activación remanente luego de la finalización del pulso.

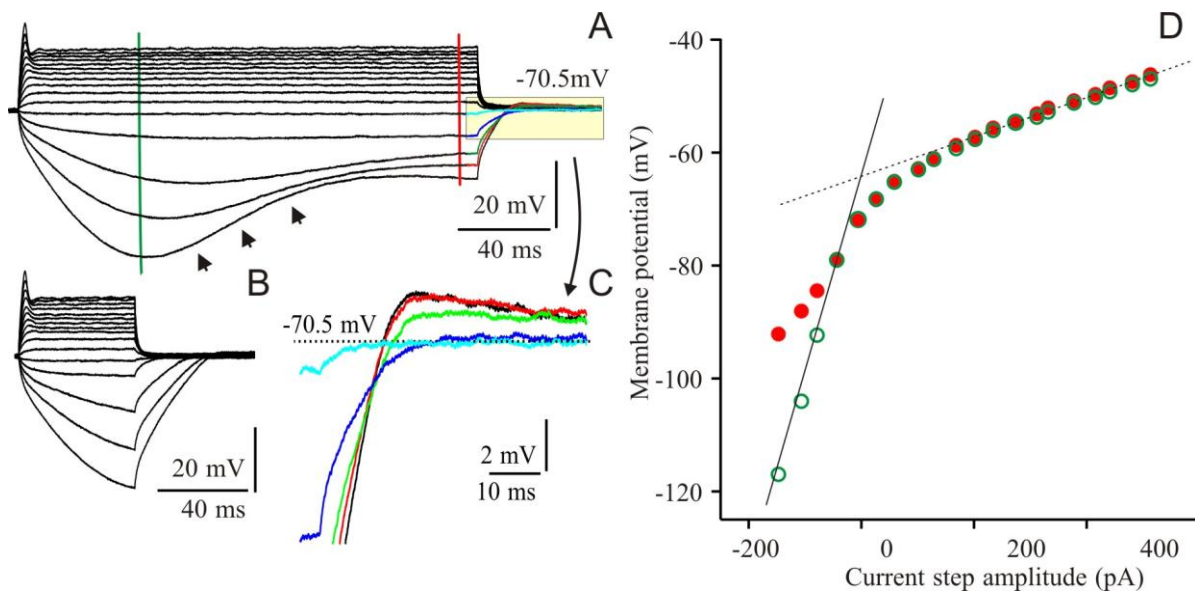


Figura 10. Respuesta tardía a pulsos subumbrales. Respuesta (otra célula) a pulsos de corriente de 200 (A) y 50 (B) ms. Los pulsos de corriente varían su intensidad en escalones de 33 pA. Para valores depolarizantes de corriente, los pulsos de larga duración provocan una rectificación de salida evidenciada por la reducción del espaciamiento entre los trazos de voltaje luego de la giba (A y B) y también por la comparación de la V/I obtenida a los 54 ms (línea verde en A) y a los 195 ms (línea roja en A) que corresponden a los símbolos rojos y verdes que ajustan a la línea punteada en (D). Para los pulsos hiperpolarizantes, aproximadamente a los 54 ms de iniciados (línea verde en A) se observa una rectificación de entrada con una curva depolarizante (flechas en A), sugiriendo un incremento en la conductancia de membrana. Consecuentemente, en el pico de la hiperpolarización la pendiente asintótica para las corrientes hiperpolarizantes es máxima (símbolos verdes que ajustan a la línea continua en D). Al final del pulso de corriente, las curvas de retorno para las depolarizaciones tienen un decaimiento mucho más rápido que para las hiperpolarizaciones. Cuando los pulsos de corriente hiperpolarizante se cortan a los 50 ms (B), la curva de retorno dura mucho más que cuando el pulso dura 200 ms (A). Esto coincide con la caída de la pendiente asintótica del lado hiperpolarizante del gráfico V/I (comparar la línea continua y los puntos rojos, D). Luego del pulso prolongado, se produce un rebote en el potencial de membrana graduado con la intensidad de la corriente hiperpolarizante, como se muestra en C (ampliación del área sombreada en A).

Caracterización farmacológica de la rectificación de salida: La rectificación de salida demostrada en la sección anterior tiene 3 características importantes: a) es de bajo umbral; b) es persistente durante varias centenas de milisegundos; y c) tiene activación y desactivación relativamente lentas. Esta rectificación de salida podría ser causada por el incremento de una corriente catiónica (probablemente potasio) o el decremento de una corriente aniónica (probablemente cloro). Debido a la similitud de las características de la rectificación de salida con las propiedades intrínsecas observadas en células pertenecientes a otros sistemas sensoriales, propusimos en primera instancia que se trataba como en dichos casos de una conductancia de potasio de bajo umbral (Golding y cols., 1999; Soares y cols., 2001). Para confirmar esta hipótesis estudiamos la sensibilidad de la respuesta de la membrana a un agente farmacológico, la 4-aminopiridina (4-AP), que ejerce un efecto bloqueante a muy bajas dosis sobre este tipo de conductancias (Johnston y Wu, 1995). El procedimiento utilizado fue el análisis de las respuestas de voltaje de las células esféricas a la aplicación de escalones de corriente en presencia de 4-AP a diferentes concentraciones. El tratamiento a baja concentración de 4-AP (50 μM) produjo una reducción significativa de la rectificación de salida, evidenciada por una reducción en el cambio de pendiente asintótica de la curva V/I para valores positivos de corriente (incremento medio de la pendiente asintótica de 59%, rango entre 27-152% N=9, Wilcoxon test para muestras pareadas $p=0,0039$; Fig. 11A). Este bloqueo fue dependiente de la dosis de 4-AP utilizada en un amplio rango de concentraciones que van desde 12,5 a 4000 μM . En particular, el incremento de la pendiente asintótica depolarizante fue significativamente mayor para 2mM (media=355%) que para 50 μM (median= 59%) de 4-AP (Wilcoxon test para muestras independientes $p=0.0112$) y se incrementa de forma relativamente monótona con la concentración de 4-AP. La figura 11B ejemplifica con datos de la misma célula, el cambio de la pendiente de la porción depolarizante de la curva V/I en presencia de diferentes concentraciones de 4AP entre 25 y 400 μM . Los cambios en la rectificación de salida producidos por el tratamiento con 4-AP fueron acompañados por un corrimiento del potencial de reposo hacia valores más depolarizados (potencial de reposo control = $-67,37 \pm 4,9$ mV vs. 4AP 50 μM = $-61,6 \pm 6,3$ mV; N=9, Wilcoxon test para muestras pareadas, $p= 0.0195$), favoreciendo la hipótesis de que conductancia responsable de la rectificación de salida se encuentra parcialmente abierta en reposo.

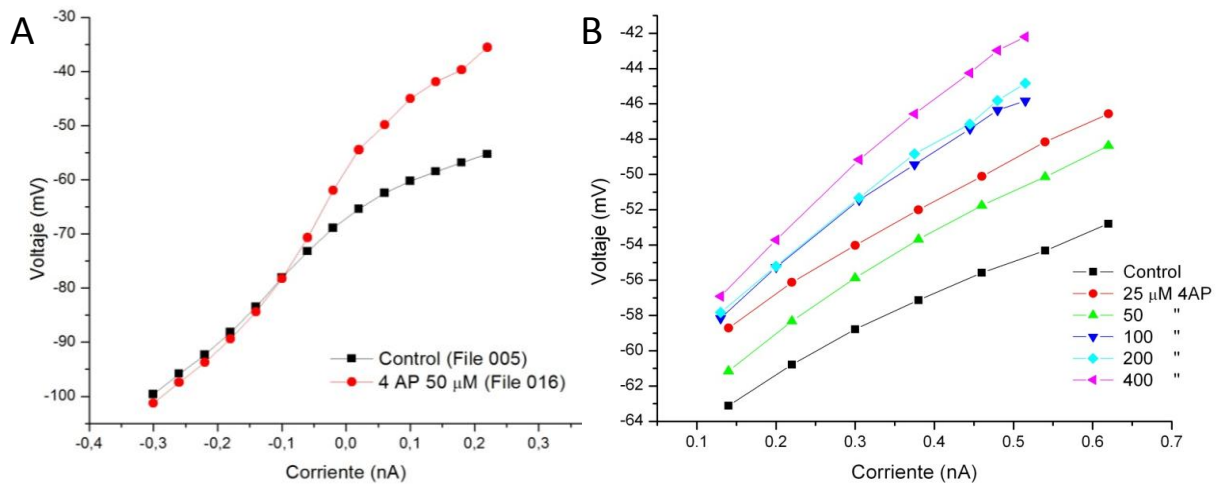


Figura 11. Efecto de la 4-aminopiridina (4-AP) sobre la rectificación de salida. A) La curva V/I muestra la diferencia en el efecto de los pulsos de corriente depolarizante sobre la resistencia de la membrana en presencia y ausencia de 4-AP. El aumento de la pendiente de la curva V/I para valores depolarizantes de corriente en presencia de 4-AP (50 μM) indica una disminución de la conductancia de membrana responsable de la rectificación de salida. B) Muestra en una misma neurona la porción depolarizante de la curva V/I en presencia de diferentes concentraciones de 4-AP (Control, 25, 50, 100, 200, 400 μM). El aumento de la pendiente con el aumento de la concentración de 4-AP indica un aumento progresivo del bloqueo de la conductancia de membrana activada por depolarización.

La presencia de 4-AP también afectó la descarga de potenciales de acción. La duración del potencial de acción, medida a la mitad del voltaje entre el potencial de reposo y el valor máximo de depolarización alcanzado durante el mismo, se incrementó en aproximadamente 3 veces luego de la aplicación de 50 μM 4-AP (control = 0.45 ± 0.11 ms vs. 4AP = 1.55 ± 0.82 ms; Wilcoxon test para muestras pareadas, $p < 0.0039$, $N = 9$; Fig. 12C). En 8 células el bloqueo de la rectificación de salida determinó que las mismas descargaran varios potenciales de acción dentro de un mismo pulso de estimulación (Fig. 12A-B). Este resultado fue obtenido a concentraciones bajas de 4-AP o durante el inicio del tratamiento con dosis elevadas. Los potenciales de acción generados en estas condiciones mostraron una duración mayor y una disminución gradual de la amplitud a lo largo del tren de descarga (Fig. 12B-C). Además, comparando las espigas generadas en condiciones control con la primera espiga producida en presencia de 4-AP (50 μM) se observa un reducción en la latencia como consecuencia del bloqueo de la conductancia responsable de la rectificación de salida (Fig. 12D). Este resultado apoya la hipótesis de que esta conductancia se encuentra abierta en reposo contribuyendo a determinar la excitabilidad de la neurona.

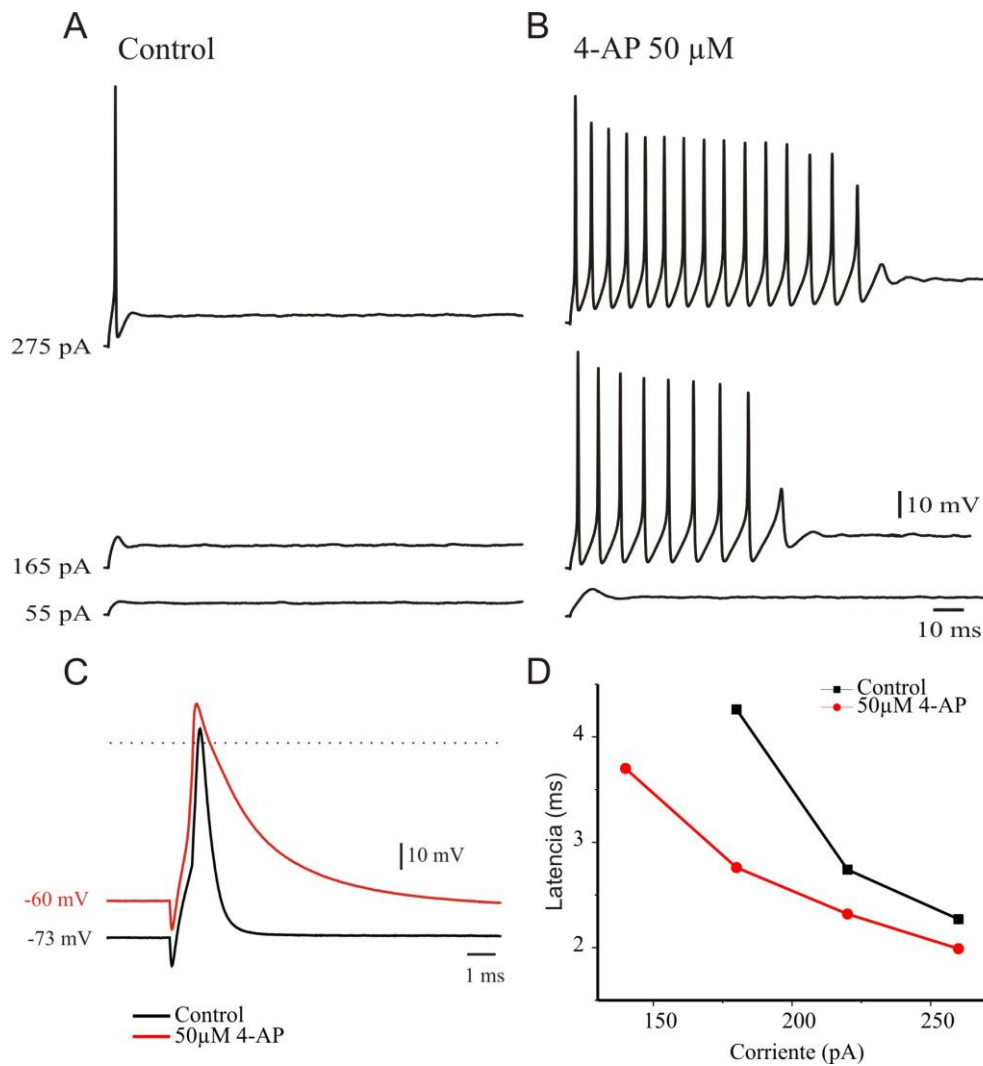


Figura 12. Efectos de la 4-AP sobre las propiedades de descarga de las neuronas esféricas. A) Los trazos muestran el voltaje de membrana en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente de diferente intensidad (55, 165, 275 pA). El trazo superior muestra como la aplicación de un pulso de corriente supra-umbral produce la descarga de un único potencial de acción. B) Potencial de membrana en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente a las mismas intensidades que en A, en presencia de 4-AP. Note como la aplicación de concentraciones bajas de 4-AP produce la descarga repetitiva de potenciales de acción como consecuencia del bloqueo parcial de rectificación de salida (este efecto se observó en 8 de las células registradas en presencia de 4-AP). C) Aumento en la duración del potencial de acción en presencia de 4-AP. D) Aumento de la excitabilidad de la membrana en presencia de 4-AP 50 μ M. Los puntos negros representan la latencia del único potencial de acción producido por cada estímulo en función de la intensidad de estimulación en condiciones control. Los puntos rojos muestran la latencia de la primera espiga de la neurona, descargando de forma repetitiva, en función de la intensidad de estimulación en presencia de 4-AP 50 μ M. Note la disminución de la latencia producida por bloqueo parcial de la conductancia de potasio de bajo umbral y el aumento de la amplitud de la respuesta subumbral (B) en presencia de la droga.

Podría argumentarse que además de la corriente de bajo umbral bloqueada por la 4-AP, la descarga del potencial de acción podría provocar la apertura de canales de potasio de alto umbral (tipo Kv3, cuyo umbral de activación se encuentra en el entorno de los 0 mV; Johnston y cols., 2010). El hecho de que la curva V/I sea lineal, no mostrando mayores cambios para series de depolarizaciones subumbrales y supra-umbrales post espiga sugiere que la contribución de dichas conductancias de alto umbral no sería muy importante. Sin embargo, con el fin de analizar la posible contribución a la rectificación de salida de una corriente de potasio de alto umbral desencadenada por la ocurrencia de un potencial de acción, estudiamos la respuesta del voltaje de membrana a la aplicación de protocolos de estimulación similares a los anteriores en presencia de trietilamonio (TEA, un bloqueante específico para conductancias de potasio de alto umbral). El tratamiento con 10 mM TEA no produjo un aumento significativo de la pendiente de la curva V/I para valores de corriente depolarizante (Fig. 13A; incremento medio 7%, rango -11 a +16%, sign test $p=0,625$ $N=5$), como tampoco de la duración del potencial de acción (Fig. 13B) y el potencial de reposo ($p=0,625$, $N=5$). En ningún caso el tratamiento con TEA produjo la descarga de múltiples potenciales de acción.

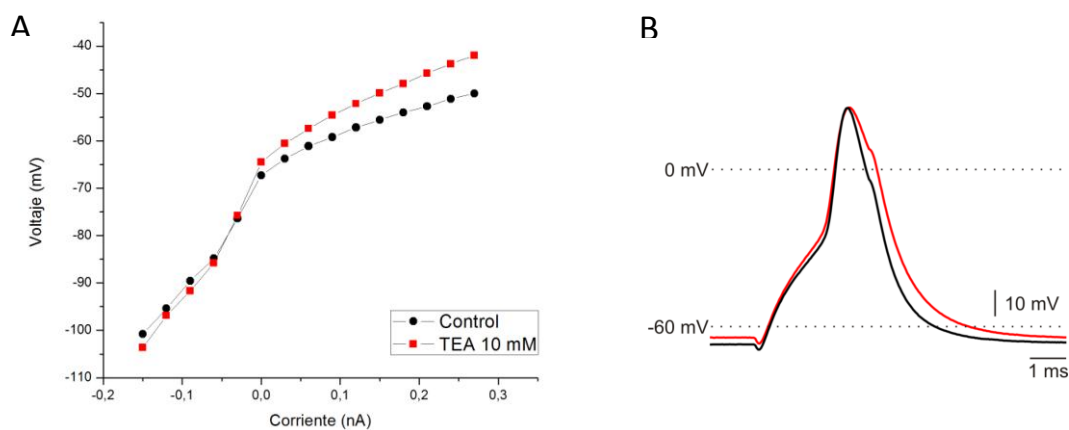


Figura 13. Efecto del tetraetilamonio (TEA) sobre la rectificación de salida. A) El gráfico muestra la relación entre el voltaje y la intensidad de la corriente, en condiciones control y en presencia de 10 mM de TEA. Note el aumento relativamente pequeño en la pendiente de la curva V/I para valores de corriente depolarizantes producido por el tratamiento con TEA. Por otra parte la porción hiperpolarizante permaneció prácticamente incambiada. B) El tratamiento con TEA también produjo un leve incremento en la duración del potencial de acción.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la rectificación de salida observada al aplicar pulsos cuadrados de corriente depolarizante es parcialmente bloqueada con 4-AP y TEA, presentando mayor sensibilidad para la 4-AP. Con el fin de establecer si ambas drogas ejercen su efecto actuando sobre un mismo tipo de canal, analizamos la respuesta de la membrana celular a la aplicación de pulsos cuadrados de corriente bajo tratamiento combinado con ambas drogas.

Primero se registro la respuesta de las neuronas esfericas en presencia 4-AP (2mM), buscando obtener un bloqueo máximo de la rectificación de salida con la droga a la cual presento mayor sensibilidad (Fig. 14A). El tratamiento con 2mM de 4-AP produjo un incremento drástico de la resistencia equivalente de membrana, evidenciada por la amplitud del cambio de voltaje a diferentes intensidades de corriente (Fig. 14A, panel medio), y que se refleja en el aumento del la pendiente de la curva V/I para valores de corriente positivos (Fig 14B, círculos rojos). Simultáneamente se produjo un corrimiento del potencial de reposo de la célula hacia valores más depolarizados, apoyando la hipótesis de que la conductancia de potasio de bajo umbral se encuentra parcialmente abierta en reposo y contribuyendo al mantenimiento del potencial de reposo. Analizando con más detalle la respuesta a diferentes tiempos de iniciados los pulsos de corriente, encontramos que al inicio se produce un pico de voltaje cercano a 0 mV para los pulsos de corriente de mayor intensidad (Fig. 14A, asterisco). Este pico se produce a un tiempo equivalente al de ocurrencia de los potenciales de acción en condiciones control (compare panel superior y medio de la Fig. 14A), aunque son de menor amplitud, graduada con la intensidad de la corriente inyectada, y se continúan en un potencial fijo muy cercano el valor máximo del pico. Al finalizar los pulsos depolarizantes, en estas condiciones se observa la aparición de un potencial hiperpolarizante post estímulo cuya amplitud depende de la intensidad del pulso de corriente aplicado, y con una pendiente lenta de retorno al potencial de reposo (Fig. 14A, compare panel superior y medio). La aparición de este potencial hiperpolarizante post estímulo se debe seguramente a la corriente responsable de la rectificación de salida que persiste luego del bloqueo con 4-AP. Es posible que esta corriente se encuentre enmascarada en condiciones control debido a que el valor de su potencial de inversión es cercano al de reposo. En presencia de 4-AP se produce un corrimiento del potencial de reposo hacia valores más positivos, y por ende un alejamiento con respecto al potencial de equilibrio de la corriente responsable esta hiperpolarización post estímulo.

Luego del tratamiento con 4-AP 2mM se cambió a una solución de perfusión conteniendo 4-AP 2mM + TEA 10mM (Fig. 14A, panel inferior; 14B, triángulos azules). En presencia de ambas drogas se produjo un aumento leve en el bloqueo de la rectificación de salida, evidenciado por el aumento de la pendiente de la curva V/I obtenida para valores positivos de corriente (Fig. 14B, triángulos azules). En estas condiciones desaparece casi por completo la pendiente de bajada y estabilización

del potencial de membrana que sigue al pico de voltaje observado al inicio de los pulsos de corriente positiva durante el tratamiento con 4-AP. Simultáneamente con la desaparición de la rectificación de salida remamente se produjo la eliminación total de la hiperpolarización post estímulo observada en presencia de 4-AP, sugiriendo que esta es producida por una componente de potasio alto umbral (posiblemente debido a canales de tipo Kv 3).

Por otra parte, la respuesta a la aplicación de pulsos de corriente negativa no muestra diferencias en la pendiente de la curva V/I de los diferentes tratamientos con respecto al control (Fig. 14B). Sin embargo, existe un aumento en la amplitud del cambio de voltaje producido por el pulso de corriente hiperpolarizante de menor intensidad. Además, el análisis del curso temporal del voltaje de membrana muestra un acortamiento del tiempo en que este alcanza el pico de voltaje negativo previo al inicio de la pendiente repolarizante producido por la rectificación de entrada (Fig. 14, línea punteada). El corrimiento del potencial de reposo a valores más depolarizados, la mayor amplitud de la respuesta a intensidades bajas de corriente hiperpolarizante, y el adelantamiento del pico mínimo producido por hiperpolarización, observados tanto en presencia de 4-AP como de 4-AP + TEA, podrían ser explicados por el bloqueo de la porción de la conductancia responsable de la rectificación de salida que se encuentra activa en reposo.

Es interesante resaltar la aparición de potenciales de acción a partir del potencial depolarizante transitorio que se establece luego de finalizados los pulsos de corriente hiperpolarizante (Fig. 14A, círculo). El hecho de que podamos observar estos potenciales de acción en presencia de 4-AP y no en condiciones control se debe al corrimiento del potencial de reposo hacia valores más cercanos al umbral y a un aumento de la amplitud de los picos depolarizante post estímulo producidos por la lh. Esto último también se explica por el aumento de la resistencia equivalente de la membrana en reposo producido por el bloqueo de la conductancia de potasio de bajo umbral.

Los resultados expuestos hasta ahora muestran que la rectificación de salida, observada al aplicar pulsos depolarizantes, se debe principalmente a una corriente de potasio de bajo umbral sensible a 4-AP que se encuentra parcialmente abierta en reposo. Este tipo de corrientes, en otras células, se deben a la expresión de canales de potasio de tipo Kv 1.2 y son sensibles a Dendrotoxina (Johnston y cols., 2010). Sin embargo, la exposición de las neuronas esféricas a diferentes concentraciones de esta droga no produjo efectos apreciables sobre las propiedades de membrana (N=7). Este resultado podría deberse a problemas en el estado de conservación de la droga, o que en las células esférica de *G. Omarorum* se expresa una isoforma de canales de potasio de bajo umbral insensible a DTX.

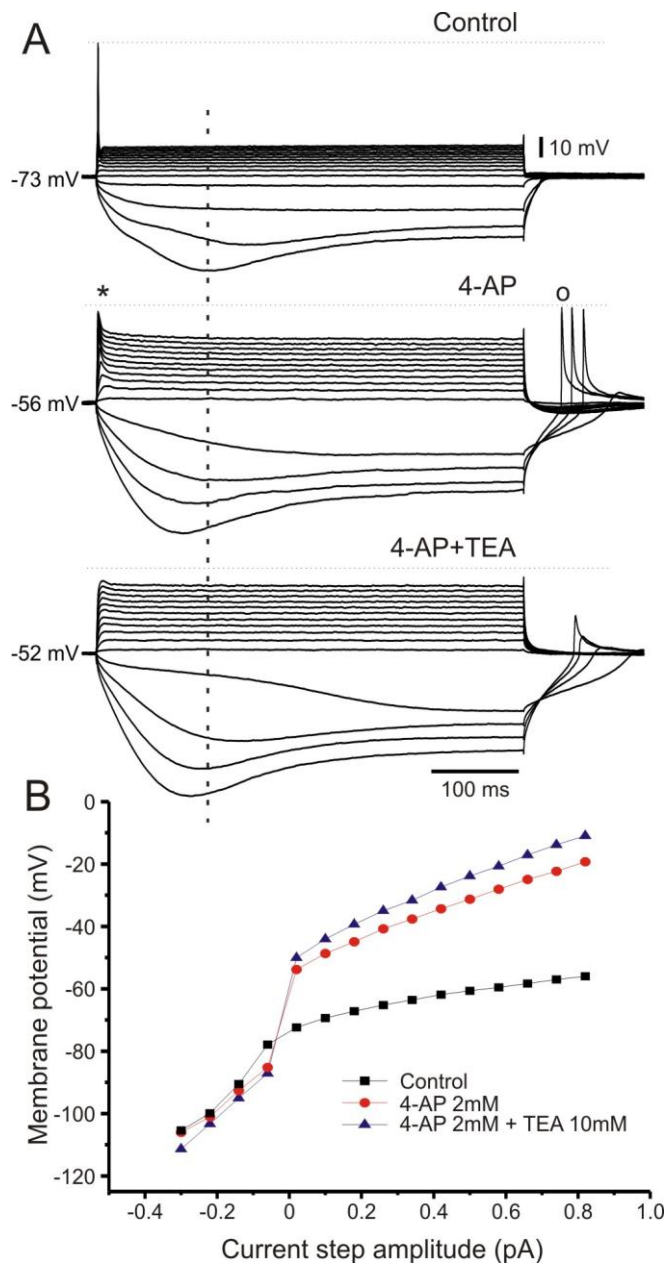


Figura 14. Efecto combinado de la 4-AP y el TEA. A) Muestra el registro de voltaje en respuesta a la aplicación de pulsos cuadrados de corriente de diferente amplitud y polaridad (500 ms duración). Superior: muestra la respuesta en condiciones control. Medio: muestra la respuesta en presencia de 2 mM de 4-AP. El asterisco indica el pico de máximo voltaje a una latencia similar a la de aparición del potencial de acción, obtenido por la aplicación de pulsos depolarizantes. Note en la posición señalada por el círculo la aparición de potenciales de acción provocados por los potenciales depolarizantes producidos luego de la finalización de los estímulos hiperpolarizantes de mayor amplitud. Inferior: muestra la respuesta en presencia de 2 mM de 4-AP + 10 mM de TEA. La línea punteada vertical señala el pico mínimo de voltaje observado en el registro superior al aplicar el pulso hiperpolarizante de mayor intensidad. Observe el adelantamiento de este pico producido por la presencia de 4-AP y 4-AP + TEA. B) Gráfico V/I para las tres condiciones mostradas en A (los valores fueron tomados inmediatamente antes de la finalización de los pulsos de corriente). Observe el aumento de la pendiente de la curva V/I para valores de corriente depolarizantes producido por el tratamiento con 4-AP 2 mM, y el pequeño aumento subsiguiente producido por la adición de TEA 10 mM.

Caracterización farmacológica de la rectificación de entrada: De acuerdo a lo propuesto, las células esféricas deben su perfil funcional a la expresión de dos conductancias además de las descritas por Hodgking y Huxley (1952); la conductancia de potasio de bajo umbral (K_{LT}), que ha sido estudiada en la sección anterior, y la conductancia catiónica mixta (I_h). Con el fin de confirmar la identidad de esta última, estudiamos la rectificación de entrada producida por la aplicación de pulsos de corriente negativa de larga duración en presencia de Cloruro de Cesio (ClCs), agente bloqueante de los canales de tipo I_h .

En 5 células registradas en presencia de ClCs 5 mM, se eliminó la rectificación de entrada responsable de la pendiente repolarizante iniciada aproximadamente a los 50 ms del inicio de los pulsos hiperpolarizantes, y que lleva el voltaje de membrana hacia valores más depolarizados. Esto determina que el valor de voltaje de membrana alcanzado en el pico mínimo previo a la apertura de la corriente I_h se mantenga relativamente constante hasta la finalización del pulso (Fig. 15A). Las curvas V/I tomadas a los 500 ms de iniciados los escalones de corriente muestran un aumento de la pendiente para valores negativos de corriente en presencia de ClCs, producido por el bloqueo de la pendiente repolarizante activada por hiperpolarización (Fig. 15B). El bloqueo de la conductancia responsable de la rectificación de entrada se evidencia también por la ausencia del potencial depolarizante transitorio observado inmediatamente después de la finalización de los pulsos de corriente negativa (Fig. 15A).

Además de los efectos descritos sobre la rectificación de entrada, se observó un incremento leve en la pendiente para pulsos de corriente positiva (Fig. 15B). Esta disminución de la rectificación de salida producida por la aplicación de ClCs podría deberse al bloqueo directo de los canales responsables de dicha rectificación, o a un aumento de la resistencia basal de membrana producido por el bloqueo de la corriente I_h . Esta última posibilidad implicaría que dicha corriente se encuentra abierta en reposo contribuyendo al mantenimiento del potencial de membrana. De ser así, el bloqueo de esta conductancia produciría un aumento de la resistencia equivalente de membrana determinando que la variación de voltaje producida por pulsos depolarizantes sea mayor a la observada en condiciones control. Sin embargo, la observación en 3 de las 5 células estudiadas bajo CsCl de un corrimiento hacia valores más positivos del potencial de reposo, apoya la hipótesis de que el tratamiento con CsCl estaría bloqueando parcialmente la corriente responsable de la rectificación de salida y su contribución al potencial de reposo, produciendo así un aumento de la resistencia equivalente de la membrana.

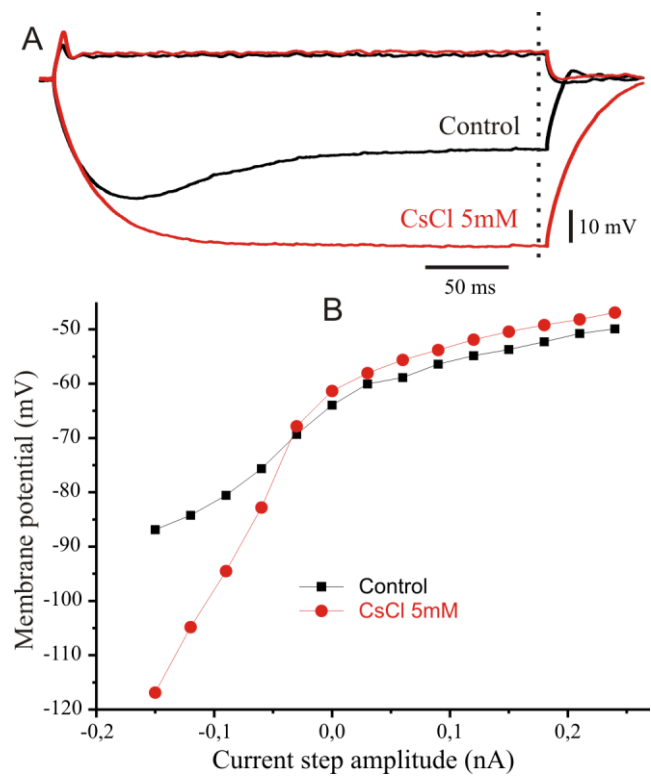


Figura 15. Efecto del Cloruro de Cesio sobre la rectificación de entrada. A) Los registros de voltaje superpuestos muestran la respuesta de la célula a pulsos de corriente depolarizante e hiperpolarizante (de igual intensidad) en condiciones control (trazos negros) y en presencia de CsCl 5mM (trazos rojos). Note como para los mismos valores de corriente no se observan diferencias importantes en la respuesta a corriente depolarizantes, mientras que en la respuesta a corriente hiperpolarizante se observa que el tratamiento con CsCl 5mM produce un bloqueo total de la rectificación de entrada evidenciada por la ausencia del potencial depolarizante activado por hiperpolarización. B) El análisis de los gráficos de voltaje en función de la intensidad de corriente muestra el cambio en la pendiente de la curva para valores de corriente hiperpolarizantes inducido por el tratamiento con 5mM CsCl (los valores del gráfico V/I fueron tomados inmediatamente antes de la finalización de los pulsos de corriente; línea punteada en A).

Estudio de las consecuencias de las propiedades intrínsecas de las neuronas esféricas sobre su función de respuesta neuronal: Con el fin de caracterizar las propiedades de filtro de la membrana de las neuronas esféricas y su papel en la transmisión de información, estudiamos la respuesta neuronal a la aplicación intracelular de otros patrones de estimulación. En particular, estudiamos la capacidad de descargar potenciales de acción ante la aplicación de corriente sinusoidal de distintas frecuencias, y el efecto de la actividad neuronal sobre la excitabilidad de membrana a través de protocolos de estimulación por pulsos pareados.

En primer lugar estudiamos el efecto de la aplicación de corriente sinusoidal sobre las propiedades de filtro de la membrana neuronal. Para ello tomamos como intensidad de referencia aquella capaz de producir la descarga de un potencial de acción por ciclo a una frecuencia de estimulación de 25 Hz, frecuencia cercana a la de descarga del órgano eléctrico en condiciones naturales. Luego variamos la frecuencia manteniendo fija la intensidad de la corriente.

La **Figura 16** muestra la respuesta celular a diferentes frecuencias de estimulación, por encima y por debajo de la frecuencia utilizada para calcular el umbral (3, 10, 30, 300 Hz). A frecuencias inferiores a 25 Hz (0.3, 1, 3, 10 y 20 Hz) la célula no es capaz de disparar potenciales de acción, aún cuando la variación de voltaje es de gran amplitud y sobrepasa el umbral de disparo en la respuesta obtenida a 25 Hz (línea roja punteada). La respuesta sub umbral es asimétrica, con una fase hiperpolarizante más aguda y de mayor amplitud que la respuesta depolarizante que alcanza una fase de meseta. Estos fenómenos podrían explicarse por la lenta fase de ascenso del potencial de membrana que podría determinar la inactivación de los canales de sodio (acomodación clásica), la apertura de la corriente de potasio de bajo umbral antes de alcanzar el nivel de disparo, o a la suma de ambos factores.

A partir de los 25 Hz (30, 60 Hz), y hasta los 120 Hz, la célula descarga un potencial de acción por ciclo, teniendo en este rango su máxima capacidad de respuesta. Por encima de los 130 Hz la célula comienza a fallar, descargando de forma alternada en uno de cada dos ciclos. A los 150 Hz la respuesta se da en uno de cada tres ciclos de forma alternada, y a 300 Hz la célula se silencia por completo. Observe además como la amplitud de la respuesta sub umbral se reduce progresivamente, expresando probablemente la capacidad de filtro pasa altos de la membrana y en donde podrían influir tres componentes a) el pasivo debido a la capacidad, b) la apertura parcial y permanente de la corriente de potasio de bajo umbral, y c) la inactivación de los canales de sodio.

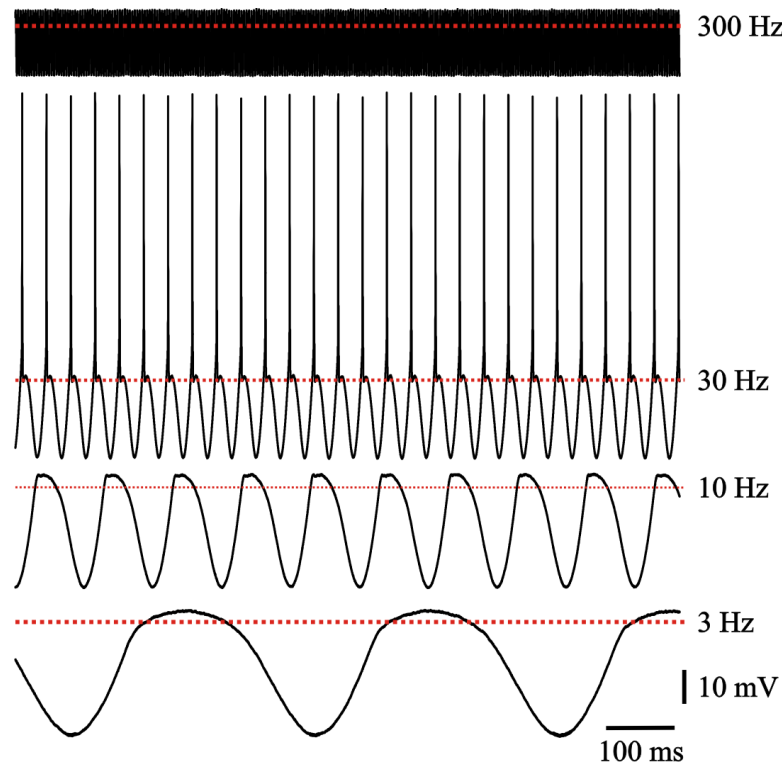


Figura 16. Respuesta de las neuronas esféricas a la aplicación de corriente de forma sinusoidal. La figura muestra las variaciones del voltaje de membra en respuesta a corriente de forma sinusoidal de distintas frecuencias (3, 10, 30, 300 Hz), manteniendo constante la intensidad. Note que si bien todas las frecuencias producen depolarizaciones de membrana superiores al umbral de disparo observado a 30 hz (líneas rojas punteadas), solo a esa frecuencia se observa la descarga de potenciales de acción.

Para analizar la contribución de la corriente de potasio de bajo umbral a las propiedades de filtro de las neuronas esféricas observadas en respuesta a la estimulación con corriente sinusoidal, estudiamos la respuesta de las mismas en presencia de 4-AP. La aplicación de 50 μ M 4-AP determinó que la célula comenzara a responder descargando potenciales de acción a frecuencias inferiores a 25Hz. Como se muestra en la figura 17, en presencia de 4-AP la célula responde con la descarga de un potencial de acción por ciclo a 3 y 10 Hz, frecuencias a las cuales las neuronas no son capaces de responder en condiciones control. Este resultado demuestra como la capacidad de la célula de comportarse como un filtro pasa alto, y por lo tanto de responder solamente a eventos rápidos de cambio de voltaje, es debida a la activación de la corriente de potasio de bajo umbral.

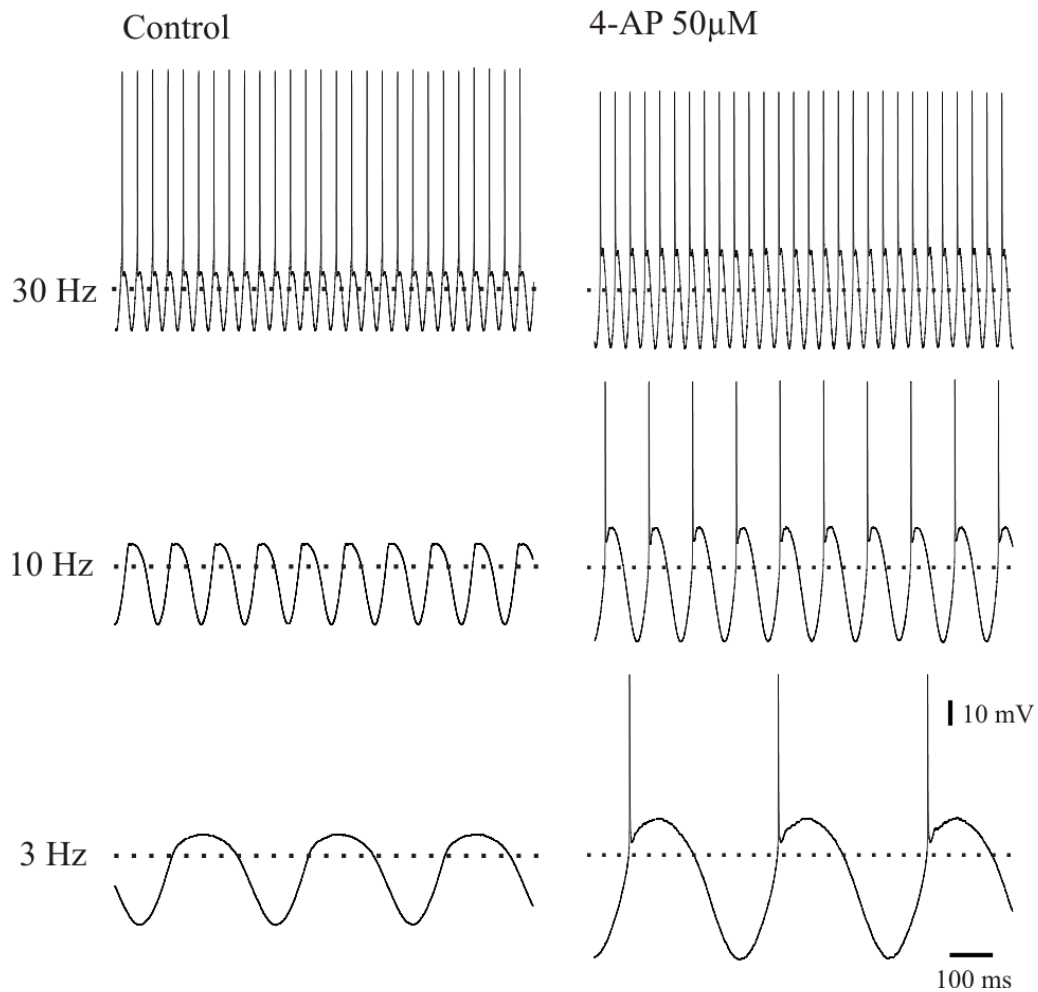


Figura 17. Efecto de la 4-AP sobre la respuesta de las células esféricas a la aplicación de corriente sinusoidal. La columna izquierda muestra la respuesta de la célula en condiciones control a la aplicación de corriente de forma sinusoidal, a diferentes frecuencias (3, 10 y 30 Hz) y manteniendo fija la intensidad (0.9 nA). Note que la célula no es capaz de responder con la descarga de potenciales de acción a las frecuencias más bajas, mientras que a 30 Hz responde con la descarga de un potencial de acción por ciclo. La columna derecha muestra la respuesta de la célula a las mismas condiciones de estimulación en presencia de 4-AP 50 μ M. En este caso, el bloqueo de la conductancia de potasio de bajo umbral determina que la célula deje de comportarse como un filtro pasa alto. Las líneas punteadas representan el potencial de reposo de la membrana en condiciones control (-66 mV).

En las secciones anteriores se muestra la relación entre las propiedades intrínsecas de las neuronas esféricas y la respuesta de campo correspondiente a la vía electrosensorial rápida observada *in vivo*, a nivel del lóbulo electrosensorial. Aquí analizamos el papel de estas propiedades neuronales en la implementación de la ventana de baja respuesta. Para ello analizamos los cambios en la excitabilidad neuronal producidos por la activación, utilizando estimulación por pulsos pareados. La excitabilidad neuronal se evaluó de acuerdo a los siguientes parámetros: a) la probabilidad de ocurrencia del potencial de acción a diferentes intensidades de estimulación, b) la latencia del potencial de acción con respecto al inicio del pulso, y c) la variabilidad en el tiempo de ocurrencia del mismo para una intensidad de estimulación dada.

En primer lugar analizamos el efecto de la aplicación de pulsos condicionantes (de intensidad constante), a una latencia fija, sobre la respuesta a pulsos cuadrados de corriente positiva de diferentes intensidades. Los pulsos depolarizantes de intensidades superiores al umbral produjeron la descarga de un único potencial de acción, cuya latencia y variabilidad en el tiempo de ocurrencia disminuyeron con el aumento de la intensidad de la corriente aplicada (Fig. 18). La aplicación de pulsos condicionantes (5ms intervalo) determinó un aumento en la tasa de falla y en el coeficiente de variación (CV) en las espigas generadas por el segundo pulso (Fig 18B and C).

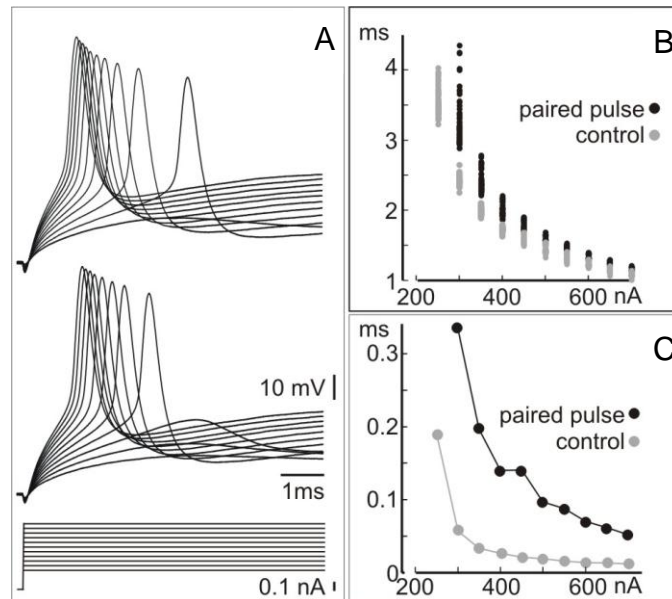


Figura 18. Efecto de la actividad en la excitabilidad de las neuronas esféricas. A) Respuesta a pulsos cuadrados de corriente depolarizante de diferente amplitud, en ausencia (superior) y en presencia (inferior) de un pulso condicionante (5 ms antes). Note la variación de la latencia a diferentes intensidades de estimulación y la disminución de la excitabilidad reflejada en la ausencia de la espiga de mayor latencia cuando se aplica el pulso condicionante. B) Muestra la latencia de la espiga en función de la intensidad de corriente para varias corridas de los protocolos de estimulación mostrados en A (puntos grises- control; puntos negros- con pulso condicionante). Note como la aplicación del pulso condicionante produce un aumento en la dispersión de la latencia de las espigas para cada una de las intensidades de estimulación, y la ausencia de espigas para la intensidad de estimulación menor. C) Coeficiente de variación de la espiga en función de la intensidad de estimulación (puntos grises- control; puntos negros- con pulso condicionante).

La deactivación lenta de la conductancia de potasio de bajo umbral subyace a los cambios descritos en la excitabilidad: Con el fin de estudiar la contribución de la conductancia de potasio de bajo umbral a la excitabilidad de las neuronas esféricas, estudiamos el efecto de la aplicación de pulsos condicionantes subumbrales sobre la capacidad de descargar potenciales de acción. Bajo estas condiciones se observó un cambio en la excitabilidad graduado con la amplitud del estímulo condicionante (Fig. 19A, segunda y tercera fila). El cambio en la probabilidad de descarga de la neurona fue acompañado por un cambio en amplitud de la respuesta subumbral a un estímulo test de una determinada amplitud, que fue inversamente proporcional a la amplitud de la respuesta subumbral del estímulo condicionante (Fig. 19B). Esto indica que la conductancia responsable de los cambios de excitabilidad es activada de forma gradual por depolarizaciones subumbrales. Además, luego de un pulso depolarizante se observa un post-potencial hiperpolarizante que también es graduado con la amplitud del salto de voltaje, confirmando que el período refractario es causado por la activación de una corriente de salida de bajo umbral, cuyo potencial de equilibrio se encuentra por debajo del potencial de reposo (Fig. 19B, flechas).

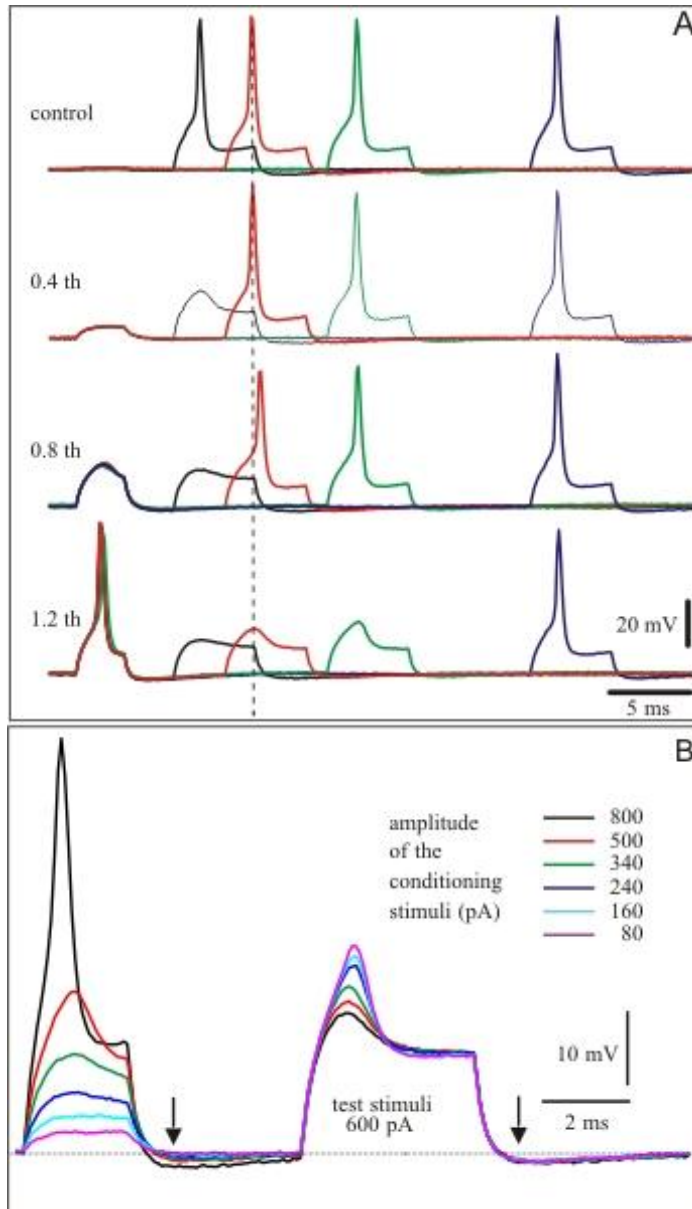


Figura 19. Efecto de la intensidad del pulso interferente sobre el período refractario prolongado.

A) Respuesta evocada por cuatro pulsos intracelulares (600 pA, 5 ms) aplicados a 4 intervalos deiferntes luego de un pulso condicionante de 3 ms de duración y a cuatro amplitudes diferentes 0, 200, 400 and 600 pA. El incremento en la amplitud del pulso condicionante causa: i) una depresion de la giba en las respuestas sub-umbrales (compare los trazos negros); ii) el increment de la latencia del potencial de acción (compare los potenciales de acción rojos con la línea punteada de referencia); y iii) el incremento del umbral para la descarga de potenciales de acción (ausencia de potencial de acción en los trazos negros en todas las filas menos en el control, trazos rojo y verde en la fila inferior). B) La amplitud de la giba evocada por la aplicación de un estímulo test de amplitud constante (600 pA, 5ms) decrece cuando aumenta la respuesta evocada por el estímulo condicionante (codificado en colores, 3 ms). El efecto máximo es causado cuando el estímulo condicionante provoca la descarga de un potencial de acción. Note la hiperpolarización producida luego de los estímulos sub-umbrales (flechas).

Adicionalmente se analizó el efecto de la aplicación de corriente constante en simultáneo con pulsos intracelulares breves. A diferentes intensidades de corriente se analizó el potencial post-espiga y se compararon los gráficos de voltaje vs. corriente (V/I) obtenidos 1 ms antes, 5 y 10 ms después del estímulo, con el objetivo de determinar el efecto de la espiga en la relación voltaje-corriente. En otras dos células el potencial de membrana fue cambiado lentamente mientras que la espiga fue evocada a la frecuencia normal de descarga del órgano eléctrico (25 Hz). Ese procedimiento muestra un cambio similar de la conductancia de membrana post-espiga de entre 10 y 15 ms de duración (Fig. 20A). Coincidentemente, la pendiente de los gráficos V/I a 5 y 10 ms (Fig. 20B, rojos y verdes respectivamente) luego de la espiga fueron similares a la asíntota de la pendiente depolarizante y varias veces menor que la pendiente obtenida 1 ms antes de la espiga (Fig. 20B, círculos blancos).

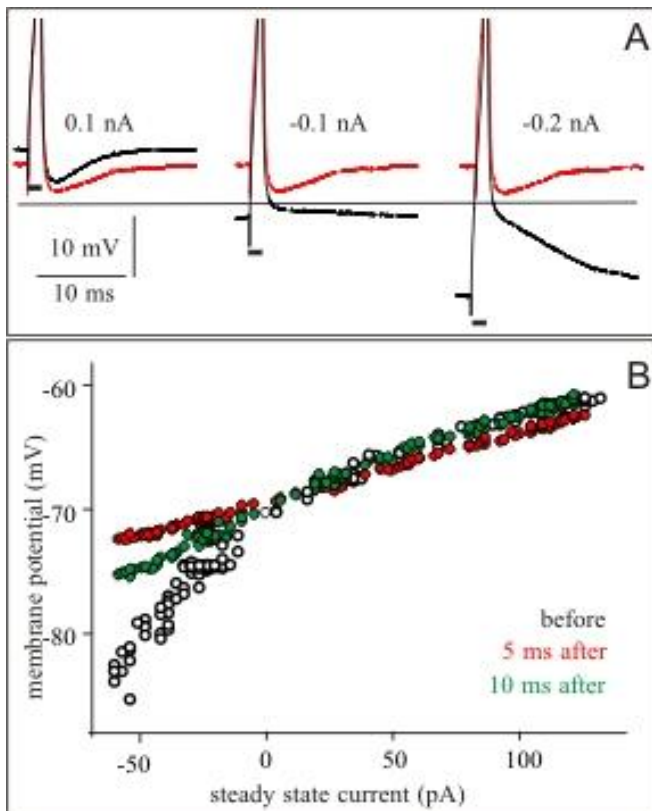


Figura 20. El incremento post-espiga de la conductancia de membrana es evidenciado por la aplicación de corriente constante. A) Espigas únicas evocadas por un pulso breve (barras horizontales) mientras se aplican diferentes intensidades de corriente constante (trazos negros). Los trazos rojos superpuestos corresponden a espigas control sin aplicar corriente. Observe la inversión de la hiperpolarización post-espiga cuando el potencial basal de membrana alcanza valores inferiores a -80 mV (línea gris horizontal). B) Gráficos V/I obtenidos en otra célula, antes (símbolos blancos), 5 ms después (símbolos rojos) y 10 ms luego de la espiga (símbolos verdes). La relación lineal observada 5 ms después de la espiga (símbolos rojos) indica que la espiga causa un incremento de la conductancia similar al causado por la depolarización tónica de la membrana 1 ms antes de la espiga (símbolos blancos).

Con el fin de correlacionar los cambios en la excitabilidad con los cambios de la conductancia de membrana, en tres células se elaboraron curvas V/I de la respuesta subumbral a series de pulsos intracelulares tests de diferente amplitud, a diferentes intervalos luego de una espiga condicionante. La curva V/I tomada 1 ms después del inicio del estímulo test fue siempre lineal; de modo que su pendiente puede ser utilizada como un indicador del cambio remanente de la conductancia de membrana causado por el estímulo condicionante. A pesar de que la medida de la pendiente a un intervalo de tiempo tan corto con respecto al inicio del pulso no revela la verdadera conductancia de membrana (debido a que la corriente también se encuentra circulando por el componente capacitivo de la membrana celular), los cambios en la pendiente observados al aplicar la serie de estímulos test a diferentes intervalos de tiempo respecto del estímulo condicionante es un buen indicador del curso temporal de los cambios de conductancia de membrana. La pendiente fue menor cuando la serie de estímulos test fue localizada cerca del final del pulso condicionante, y fue acercándose a los valores basales a medida que aumentamos el intervalo entre los pulsos condicionantes y test (Fig. 21A). Además, la disminución de la pendiente de la curva V/I causada por la disminución del intervalo, se correlaciona con el incremento del umbral (Fig. 21B) y la latencia de la espiga (Fig. 21C).

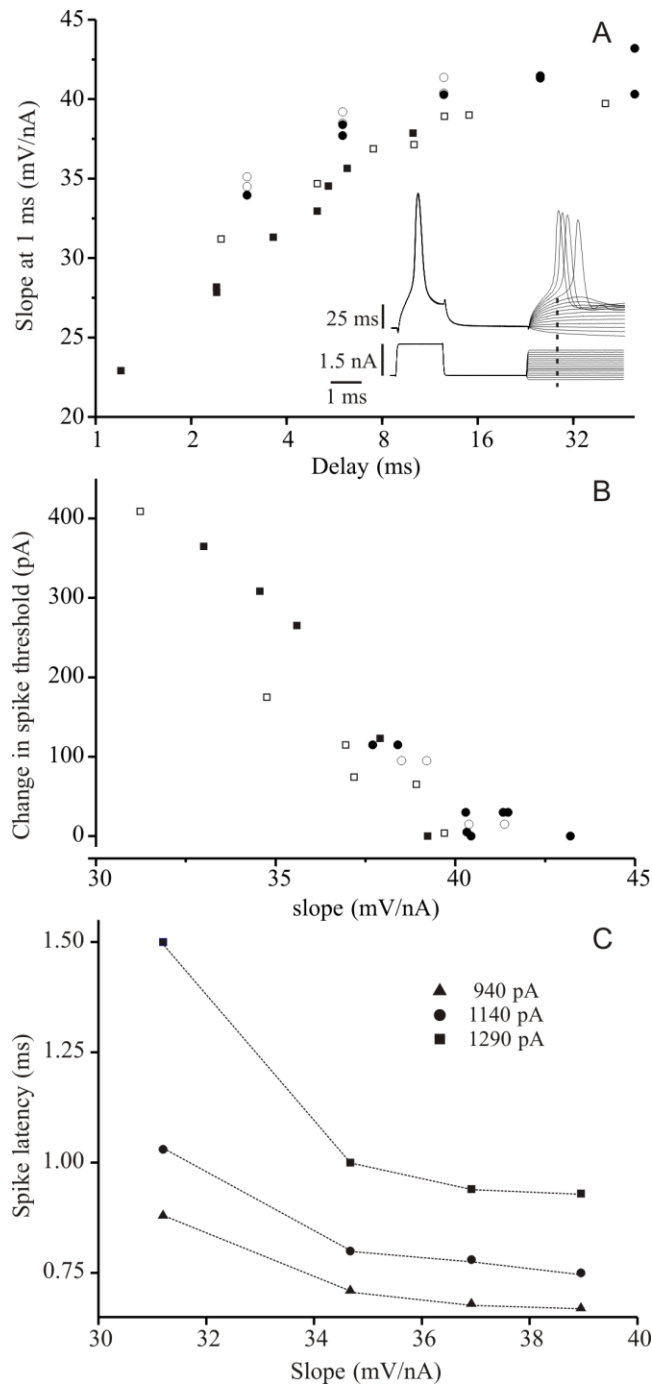


Figura 21. La conductancia de membrana y la excitabilidad de la célula cambian conjuntamente luego de una espiga condicionante. El cambio en la resistencia de membrana fue evaluado por la curva del gráfico V/I construido con los datos obtenidos 1 ms después del inicio de una serie de pulsos de corriente de diferente intensidad (línea roja vertical en el inserto), aplicados a diferentes intervalos luego de una espiga condicionante (en 4 células codificadas en colores). (A) El aumento de la pendiente en función del intervalo indica que luego de la espiga condicionante se produce un incremento en la conductancia de membrana y un lento retorno a los valores de reposo. (B,C) Cambio en el umbral y en la latencia de la espiga en función de la pendiente. El cambio en el umbral se definió como la diferencia entre la intensidad de corriente necesaria para producir una espiga cuando el estímulo es precedido de una espiga condicionante a un intervalo determinado, menos la intensidad de corriente necesaria para producir una espiga en ausencia de espiga condicionante. Mientras que el umbral y la latencia de la espiga disminuyen en función de la pendiente, la excitabilidad de la célula se reduce por el incremento de la conductancia de membrana causado por la espiga condicionante.

Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos *in vivo* por Castelló y colaboradores (1998), postulamos que la variación de la excitabilidad de las neuronas esféricas observada en respuesta a la activación celular podría ser responsable de la ventana de baja respuesta observada *in vivo*. Para confirmarlo estudiamos la excitabilidad neuronal usando series de pulsos intracelulares apareados (condicionante y test), separados por diferentes intervalos. Como estímulo condicionante se utilizaron pulsos cuadrados de 1,5 ms de duración y de una intensidad una o dos veces mayor que la intensidad umbral (obtenida a partir de pulsos de larga duración y en ausencia de pulso condicionante), mientras que como estímulo test utilizamos pulsos de 5 ms de duración y de una intensidad entre 5 y 10% por encima del umbral. Como umbral de la espiga se tomó la mínima intensidad de corriente capaz de evocar la descarga de potenciales de acción en pulsos de 20 ms de duración, en todos los estímulos (la latencia de la espiga nunca fue mayor a 3,5 ms).

Estos experimentos demostraron la existencia de un período refractario relativo prolongado (Fig. 22A), de entre 10 y 40 ms de duración dependiendo de la célula. En 10 células, la aplicación de un pulso hiperpolarizante corto inmediatamente después del estímulo condicionante redujo significativamente o suprimió por completo el cambio en la excitabilidad provocado por la espiga condicionante (Fig. 22B). Este fenómeno podría deberse a un favorecimiento de la de-inactivación de los canales de sodio, al cierre de una conductancia remanente activada por depolarización, o a ambos. La segunda posibilidad es consistente con la deactivación lenta de la corriente de potasio de bajo umbral propuesta en secciones anteriores.

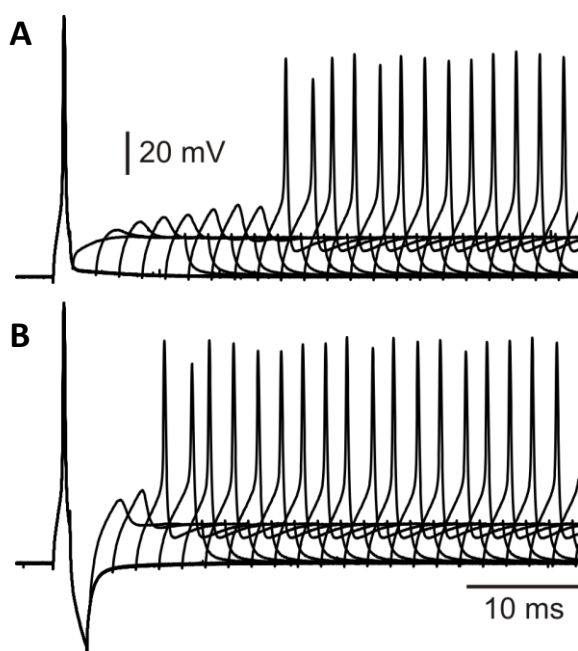


Figura 22. Cambios en la excitabilidad de las neuronas esféricas producidos por la activación celular. A) La aplicación de pulsos pareados a diferentes intervalos muestra como la activación celular (pulso condicionante) determina la reducción de la excitabilidad por un período relativamente prolongado (pulso test). B) Este cambio de la excitabilidad celular se reduce significativamente cuando se interpone un pulso breve de corriente negativa inmediatamente después del pulso condicionante. Pulso condicionante de 830 pA y 2ms de duración; y pulso test de 560 pA y 7 ms de duración; interpulso de -400 pA y 2 ms de duración.

La joroba de la respuesta subumbral del estímulo test aumenta su amplitud con el aumento de la latencia respecto del estímulo condicionante, pero la depolarización posterior al mismo permanece constante (Fig. 23A). Cuando se mantiene constante el intervalo e intensidad del estímulo condicionante, el incremento de la intensidad del estímulo test produce un incremento en la probabilidad de descarga (Fig. 23A) y una reducción de la latencia del potencial de acción (Fig. 23B). Además, la latencia de la espiga provocada por el estímulo test disminuyó al incrementar la latencia entre pulsos (Fig. 23C).

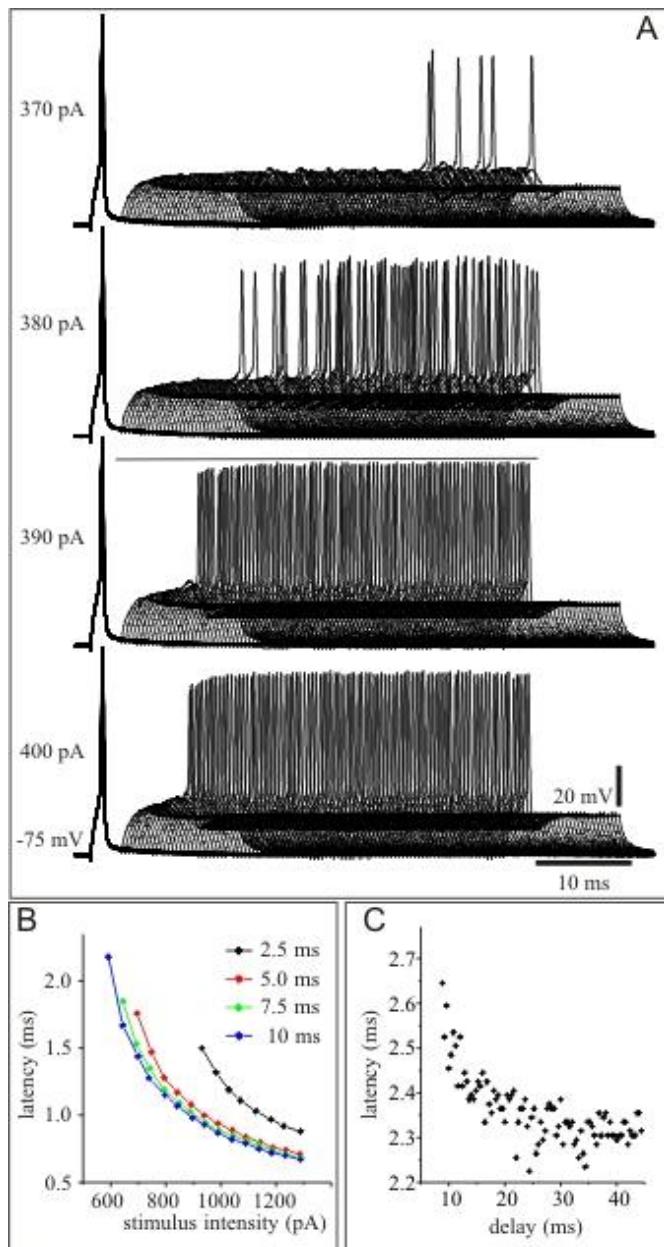


Figura 23. Las células esféricas tienen un período refractario prolongado. La estimulación sistemática de la célula con pares de estímulos intracelulares a diferentes intervalos muestra que el umbral y la latencia de la segunda espiga dependen del intervalo entre los pulsos. A) Trazos superpuestos obtenidos con cuatro intensidades diferentes de estímulo test (370, 380, 390 y 400 pA) a diferentes intervalos luego de un pulso condicionante (800 pA). B) Latencia de la espiga en función de la intensidad del estímulo test para cuatro intervalos diferentes luego del la espiga condicionante (datos de otra célula). C) Latencia de la espiga en función del intervalo entre pulsos, correspondiente a las condiciones de estimulación del experimento inferior mostrado en A.

Para confirmar el papel de la conductancia de potasio de bajo umbral en el determinismo del período refractario prolongado y la ventana de baja respuesta, bloqueamos farmacológicamente la conductancia responsable de la rectificación de salida con 4-AP y TEA.

El tratamiento con 4-AP produjo una disminución en la duración del período refractario absoluto (Fig. 24A-B). Interesantemente, concentraciones relativamente bajas de la droga (entre 50 y 100 μM) produjeron reducciones del período refractario cercanas a las observadas a concentraciones 10 veces mayores. En particular, el tratamiento con 50 μM de 4-AP produjo una disminución significativa de la duración del período refractario absoluto (control = 13.3 ± 3.6 ms vs. 4-AP = 7.5 ± 1.66 ms Wilcoxon paired samples test $p < 0.0039$, $N=9$, Fig. 24A-C). Simultáneamente se observaron cambios en el período refractario relativo evidenciados como una disminución de la variabilidad de ocurrencia de la espiga; esto puede considerarse como un aumento en la excitabilidad neuronal. El cambio en la variabilidad del tiempo de ocurrencia del potencial de acción se puede observar comparando el promedio de varios protocolos de estimulación por pulsos pareados a intervalos variables, en presencia y ausencia de 4-AP (Fig. 24B-D). Para cada célula, el período refractario mínimo (aprox. 5 ms) no se modificó aún aumentando la dosis más allá de 2 mM.

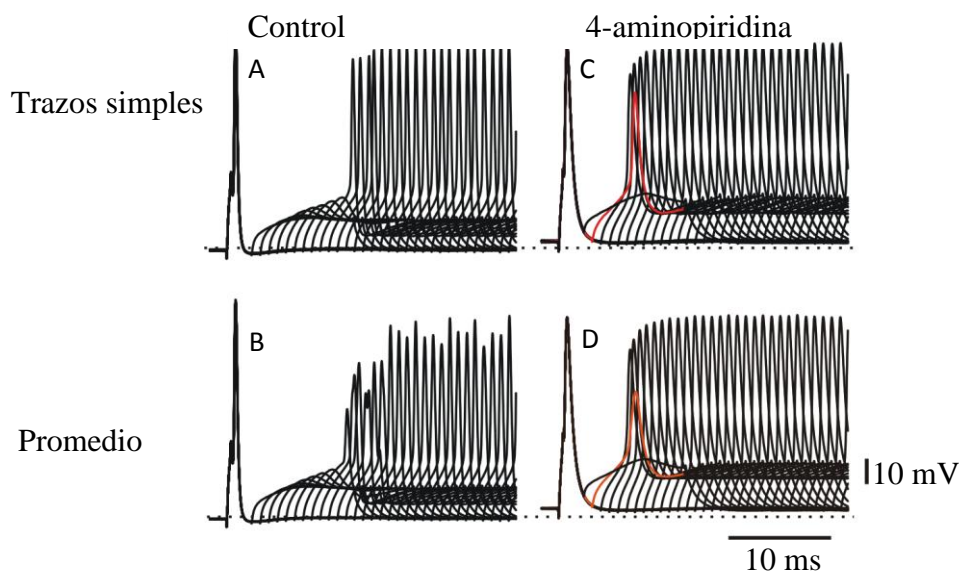


Figure 24. Efecto de la 4-AP sobre el período refractario de las neuronas esféricas. **A)** La estimulación con pares de pulsos a diferentes latencias muestra el curso temporal de la disminución de la excitabilidad producida por la aplicación de pulsos condicionantes (pulso condicionante= 1,2 nA, y test=0,6 nA). **B)** El promedio de la respuesta a la aplicación repetida (5 veces) del protocolo de pulsos pareados mostrado en A, evidencia la existencia de un período refractario relativo que se expresa como un aumento en la variabilidad del tiempo de ocurrencia de la espiga. **C)** La aplicación de 4-AP 50 μM produjo una disminución de la duración del período refractario absoluto que se observa como un aumento de la probabilidad de descarga de potenciales de acción a intervalos cortos (trazos simples, en rojo se señala la respuesta al primer estímulo test capaz de producir la descarga de un potencial de acción). **D)** El promedio de las respuestas a la aplicación repetida (5 veces) del protocolo de pulsos pareados a diferentes intervalos, en presencia de 4-AP, muestra como además de un aumento en la probabilidad de descarga a intervalos cortos se produjo una disminución de la variabilidad del tiempo de ocurrencia de la espiga. Este último efecto se evidencia por la desaparición casi total de la variación en función del intervalo de la amplitud del promedio de la respuesta a los estímulos test.

El bloqueo de las conductancias de potasio de alto umbral (TEA 10 mM) produjo una pequeña disminución del período refractario absoluto, sugiriendo una posible participación asociada de estas conductancias en la refractariedad post-espiga.

Finalmente, los resultados obtenidos *in vitro* se compararon con los obtenidos *in vivo* utilizando un protocolo de estimulación similar. La envolvente del promedio de la respuestas obtenidas utilizando series de pulsos pareados (*in vitro*), y el gráfico de la amplitud de los potenciales de campo en función del intervalo de tiempo entre las descargas del órgano eléctrico propio y de un conespecífico (*in vivo*), mostraron una notable similitud (Fig. 25).

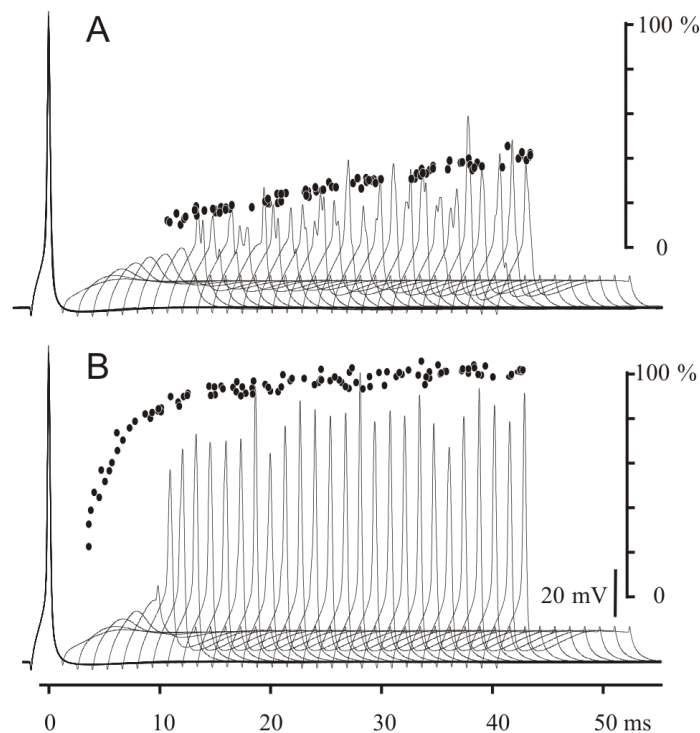


Figura 25. El period refractario relativo coincide con la duración de la ventana de baja respuesta. Promedio de la respuesta de 10 series de pulsos de corriente de intensidad constante aplicados intracelularmente a diferentes intervalos luego de una espiga condicionante (trazos) superpuesto a la amplitud de la respuesta del núcleo magnocellularis a la descarga de la DOE de un co-específico (normalizada como porcentaje de la amplitud de la respuesta a la DOE propia; puntos negros). A) *in vitro*: pulso tests intracelular de 400 pA, *in vivo*: co-específico localizado a 6 cm de forma antiparalela; B) *in vitro*: pulso test intracelular 430 pA, *in vivo*: co-específico localizado a 3 cm de forma antiparalela. El potencial de membrana de reposo es de -70 mV, y la intensidad del pulso intracelular condicionante es de 500 pA. Con el fin de comparar ambos gráficos, el cero de la respuesta del núcleo magnocellularis se alineó con el nivel de depolarización crítica, y el 100 por ciento de la respuesta del núcleo magnocellularis se alineó con el pico de la espiga mayor (eje a la derecha).

Discusión

Bases estructurales de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas esféricas:

Los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades estructurales de las neuronas esféricas nos permiten afirmar que las propiedades funcionales de dichas neuronas se encuentran determinadas por la expresión de dos tipos de corrientes iónicas resonantes. Una corriente resonante se opone a la causa que la generó, es decir que constituye una retroalimentación negativa, y dependiendo de sus constantes de tiempo pueden causar oscilaciones de membrana o facilitar la resonancia de la misma a ciertas frecuencias. Por el contrario, una corriente amplificadora facilita la causa que la generó y por tanto tiende a amplificar sus efectos. En ambos casos la presencia de fenómenos de inactivación determina propiedades de membrana aún más complejas. En el caso particular de las neuronas esféricas la corriente resonante subyacente a la rectificación de salida corresponde a una corriente de potasio de bajo umbral, y la subyacente a la rectificación de entrada a una corriente catiónica mixta. Además, este trabajo permite establecer la relación de una conductancia de membrana, la corriente de potasio de bajo umbral, con dos propiedades funcionales principales de la vía electrosensorial rápida de *G. omarorum*; la precisión en la codificación temporal y el período refractario prolongado. Los potenciales de acción y cambios sub-umbrales del voltaje de membrana causan un incremento de larga duración en la conductancia de membrana que reduce su excitabilidad. Esto determina que ante la aplicación de estímulos supra-umbrales, las neuronas esféricas respondan con un único potencial de acción, independientemente de la intensidad y duración de los mismos. Por otra parte, la deactivación lenta de la conductancia que se observa luego de la finalización del pulso que la activó, contribuye al período refractario prolongado de las neuronas esféricas. Estas características funcionales de las neuronas esféricas se correlacionan directamente con las propiedades funcionales de la vía electrosensorial rápida observadas *in vivo*.

Las neuronas esféricas del ELL son “one-spike-neurons”: Las neuronas esféricas, neuronas secundarias de la vía electrosensorial rápida, responden de forma característica con un único potencial de acción ante la aplicación sostenida de pulsos depolarizantes. Esta es una característica común de las llamadas “onset cells”, un tipo neuronal altamente especializado, adaptado estructuralmente para transmitir información utilizando un código de latencia (Carr y cols., 2005). La conductancia responsable de la expresión por parte de las neuronas esféricas del perfil “one-spike-neuron” es similar a la conductancia de potasio de bajo umbral descrita en células piramidales de *gymnótidos* de onda (Fernandez et al., 2005) y onset-neurons de otras vías rápidas

(Golding y cols., 1999, Manis y Marx, 1991, Wu y Oertel, 1984; Brew y Forsythe, 1995; Oertel y cols., 2000). Otra característica que la mayoría de las neuronas esféricas comparten con otras onset-neurons es la respuesta a pulsos hiperpolarizantes, con pendientes depolarizantes en el potencial de membrana que inician entre 20 y 70 ms luego del inicio del pulso. La pendiente de la curva V/I al final de pulsos de larga duración, y la tasa de decaimiento del potencial de membrana al final de los mismos, son menores a la mitad de los obtenidos para pulsos de corriente de corta duración (en el valor máximo de hiperpolarización). Estas observaciones, junto con el rebote que se produce luego de la curva depolarizante y de finalizado el pulso de corriente negativo, indican la presencia de una corriente rectificadora entrante con activación e inactivación lentas. Al igual que lo observado en aves y mamíferos (Bal y Oertel, 2000; Trussell, 1999) la conductancia descrita en las neuronas esféricas es de tipo catiónica mixta, y pertenece a la familia de conductancias llamadas I_Q o I_h .

Como se muestra en la figura 8C, la espiga frecuentemente surge a partir de la fase descendente de una joroba de voltaje, indicando que el sitio de registro no es el sitio de menor umbral para la generación del potencial de acción. Tomando en cuenta la naturaleza esférica de la célula y su relativo pequeño diámetro, se podría concluir que todo el soma tiene el mismo potencial de membrana y que la espiga se inicia a partir del axón. Asimismo, el incremento de la conductancia de la membrana celular podría resultar en el drenaje de las corrientes sinápticas, previniendo la generación de potenciales de acción. Nuestros resultados sugieren que estos atributos son conferidos por propiedades intrínsecas no-lineales del soma neuronal. La rectificación de salida, y el potencial inhibitorio post-estímulo graduado con la intensidad de estimulación, indican la activación de una corriente de bajo umbral cuyo potencial de equilibrio se encuentra por debajo del potencial de reposo, y que podría corresponder tanto a una conductancia de K^+ como a una de Cl^- . La activación de la conductancia de bajo umbral inmediatamente después de pequeñas depolarizaciones explica la joroba inicial observada en los registros de voltaje. La estabilidad del voltaje luego de la joroba, y la constancia de la asíntota de la pendiente depolarizante de la curva V/I , aún para depolarizaciones de larga duración, indican que la conductancia de bajo umbral no se inactiva con el tiempo. Las curvas V/I obtenidas al final de una serie de pulsos de corriente constantes y de larga duración mostraron grandes diferencias entre las pendientes asíntóticas depolarizantes e hiperpolarizantes, indicando que cuando la corriente de bajo umbral se encuentra totalmente abierta la conductancia celular es varias veces mayor que en reposo. Por otra parte, el incremento en la constante de tiempo de la membrana a partir de los 2.5 ms luego del inicio de los pulsos hiperpolarizantes sugieren que la conductancia de potasio de bajo umbral se encuentra parcialmente abierta en reposo. Esta activación parcial de la rectificación de salida cerca del

potencial de reposo acorta la constante de tiempo de la membrana, y por lo tanto aumenta la precisión temporal de la ocurrencia del potencial de acción.

La identidad de la conductancia de bajo umbral responsable de la rectificación de salida fue estudiada mediante la aplicación de pulsos constantes de corriente de diferente amplitud y polaridad, en presencia de bloqueantes específicos de canales de potasio. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía el tipo de conductancia de potasio de bajo umbral observada en la respuesta de las neuronas esféricas se debe a la expresión de canales de tipo Kv 1 y por lo tanto es bloqueable por 4-AP y DTX (Johnston y cols., 2010). El tratamiento con 4-AP produjo un bloqueo de la rectificación de salida dependiente de la dosis. En algunos casos el bloqueo parcial de la corriente produjo que las neuronas descargaran un tren de potenciales de acción. La amplitud de los mismos disminuyó en el transcurso del pulso hasta su apagado. El hecho de que la descarga de varios potenciales de acción por pulso se produjera por el bloqueo parcial de la conductancia de potasio de bajo umbral, la disminución de su amplitud durante el transcurso de un mismo pulso hasta apagarse, y el marcado aumento de su duración en presencia de 4-AP, sugieren que esta corriente juega un papel importante en la fase de repolarización del potencial de acción. Por su parte la DTX no produjo efectos apreciables en la rectificación de salida, sugiriendo que las neuronas esféricas expresan una combinación particular de subunidades de canales de potasio insensible a DTX.

El análisis de las propiedades de filtro de la membrana mediante la aplicación intracelular de corriente de forma sinusoidal, mostró que las neuronas esféricas se comportan como filtros pasa alto con respecto a su capacidad de disparar potenciales de acción. A intensidades de corriente supraumbrales se observó como las neuronas esféricas solo son capaces de responder con la descarga de potenciales de acción a sinusoides de alta frecuencia, aún cuando los cambios de voltaje producidos por frecuencias bajas produjeron niveles de depolarización superiores al nivel crítico de disparo. El análisis de la respuesta neuronal a sinusoides en presencia de concentraciones bajas de 4-AP, mostró que cuando la conductancia de potasio de bajo umbral se encuentra bloqueada las neuronas esféricas son capaces de responder a frecuencias bajas. Estas observaciones podrían explicarse por el cambio en la pendiente de ascenso del voltaje impuesto por la activación de la corriente de potasio de bajo umbral. A frecuencias altas el cambio de voltaje producido por la aplicación de corriente depolarizante, y el arribo al umbral de disparo, se produce antes que se comience a activar la conductancia de potasio de bajo umbral. Sin embargo, a frecuencias bajas la variación del voltaje es más lenta y el inicio de la activación de la conductancia de bajo umbral se produce antes de alcanzar el umbral de disparo. Este aumento de la conductancia de membrana produce un enlentecimiento de la pendiente de ascenso del voltaje,

determinando la inactivación de los canales de sodio e imposibilitando a la neurona descargar potenciales de acción aún a valores de voltaje supraumbrales. Es interesante destacar que las propiedades de filtro de la membrana de las neuronas esféricas podrían constituir una adaptación que les permitiera responder a los potenciales sinápticos producidos por la activación de las sinápsis de tipo mixto que estas establecen con las fibras aferentes primarias. La capacidad de estas neuronas de funcionar como filtro pasa alto favorecería la respuesta a los cambios de voltaje rápidos generados por el componente eléctrico de la sinápsis mixta. Además, estas propiedades de filtro de la membrana podrían jugar un papel determinante en la capacidad de sumación por parte de las neuronas esféricas (en el caso de las neuronas que reciben aferencias de múltiples fibras aferentes primarias), y por lo tanto en su capacidad de funcionar como detectores de coincidencia.

Hipótesis sobre el papel funcional del período refractario relativo prolongado de las neuronas esféricas de *G. omarorum*: Uno de los resultados principales de este trabajo, es que el período refractario prolongado de las neuronas esféricas prodría deberse a la deactivación lenta de la conductancia de potasio de bajo umbral. Esta hipótesis fue puesta a prueba calculando la pendiente de los gráficos V/I construidos a 1 ms de iniciados los pulsos de corriente, aplicados a diferentes intervalos luego de una espiga condicionante. El incremento gradual de la pendiente de los gráficos V/I indica que la conductancia de membrana decae gradualmente hasta alcanzar el valor de reposo a los 10–15 ms luego de la espiga. La reducción de la pendiente post-espiga se correlaciona fuertemente con el incremento de umbral y de latencia de las espigas generadas por la misma serie de pulsos, indicando que el periodo refractario relativo de estas neuronas se debe al incremento de la conductancia de membrana más que a la inactivación de los canales de sodio. Dado que la refractariedad también es producida por pulsos condicionantes subumbrales, la interpretación más parsimoniosa es que la misma conductancia que causa la rectificación de salida también causa la refractariedad observada luego de la aplicación de pulsos condicionantes. El importante bloqueo del período refractario prolongado producido por el tratamiento con 4-AP confirma esta hipótesis. De forma similar a lo observado para la rectificación de salida el tratamiento con DTX no tuvo efecto sobre el período refractario prolongado.

Como el periodo refractario prolongado bloquea la respuesta al segundo de un par de entradas aferentes, son las propiedades de excitabilidad descritas para las neuronas esféricas las que implementan la ventana de baja respuesta observada *in vivo* luego de la activación vía. La comparación hecha en la figura 25 se basa en el supuesto de que el promedio temporal de los registros intracelulares tomados de una única célula pueden reproducir la suma de la actividad de

varias células similares registradas como un potencial de acción compuesto. Cuanto mayor sea la amplitud de las EODs generadas por un co-específico y, por convergencia, aumente la probabilidad de ocurrencia de estímulos de mayor amplitud en cada célula, se superará más fácilmente el período refractario relativo y, en consecuencia, la ventana de baja respuesta. La convergencia de las fibras aferentes y las sinapsis eléctricas entre células esféricas vecinas podrían explicar además el decremento graduado en la capacidad de respuesta de la vía como un todo en función del incremento de la amplitud del estímulo condicionante. El incremento del estímulo condicionante resulta en un reclutamiento más completo de la población de fibras aferentes. Esto causa refractariedad no solo en las neuronas que dispararon potenciales de acción ante la llegada de la ráfaga aferente, sino que también en el grupo de células en las cuales la entrada aferente provocó depolarizaciones sub-umbrales (ya sea de forma directa o a través de células esféricas vecinas). De esta manera, el incremento de la intensidad del estímulo condicionante reduce la capacidad de respuesta de la vía. Por consiguiente, la DOE auto-generada, que es un estímulo mucho más fuerte, podría permitirle al pez mantener un flujo de información constante de la ocurrencia de la DOE auto-generada a pesar de la ocurrencia de señales eléctricas potencialmente interferentes como las DOEs generadas por co-específicos. La evaluación experimental de esta hipótesis se describe en el siguiente capítulo.

CAPITULO V: LAS NEURONAS ESFÉRICAS COMO FILTRO SENSORIAL

Introducción

De acuerdo a lo planteado en secciones anteriores, para comprender la relación entre las propiedades estructurales de las neuronas y el papel que las mismas desempeñan dentro de un circuito, es necesario conocer sus propiedades estructurales, el circuito en el que se encuentran insertas y la función que este realiza. Este último punto requiere del estudio del circuito bajo condiciones naturales de estimulación, donde se conserven las principales características espaciales y temporales del estímulo, y la forma en que el individuo interactúa con el mismo.

Los sentidos activos como el tacto, la propiocepción, ecolocación y electrorecepción, tienen receptores sensoriales sintonizados al rango dinámico de un vehículo sensorial autogenerado. Debido a que este rango dinámico puede ser compartido por eventos auto-generados, los animales han desarrollado diferentes mecanismos para segmentar las señales auto- y alo- que fluyen a través del mismo canal sensorial. Algunos de esos mecanismos se basan en señales de expectativa producidas por descargas corolario que informan a los centros sensoriales sobre el tiempo de ocurrencia de los comandos motores, y de las potenciales consecuencias de las acciones autogeneradas (Sperry, 1950; von Holst y Mittelstaedt, 1950; Bell, 1981; Poulet y Hedwig, 2006; Sommer y Wurtz, 2002). Las descargas corolario pueden ser simples eventos facilitadores o inhibidores que ocurren en el tiempo al cual se esperan las señales autogeneradas (Bell y Grant, 1989). En otros casos, las descargas corolario son complejas y plásticas, generando imágenes espejo del flujo sensorial precedente (Bell 1981; Bell y Grant 1992; Bell y cols., 1993). Estas imágenes son integradas con la entrada permitiendo el filtrado adaptativo de las características sensoriales (Bell y cols., 1992; Bell y Grant, 1992; Bell y cols., 1993). Alternativamente, los comandos motores descendentes podrían adaptar las acciones autogeneradas al mejor rango de respuesta de un filtro sensorial estereotipado.

Para hacer frente al influjo de señales autogeneradas y a las generadas por fuentes externas, en los animales electroreceptivos han evolucionado varios mecanismos organizados a diferentes niveles (desde el subcelular al comportamiento), y es posible que muchas de las estrategias posibles para la discriminación sensorial de este tipo de señales se encuentren presentes en estos animales (Bullock, 1986). En el caso de la electro-recepción activa las señales eléctricas generadas tienen la doble función de electro-localización y electro-comunicación, por lo cual en un ambiente natural cada individuo recibe las señales eléctricas auto-generadas y las generadas por co-específicos

vecinos. Esta escena sensorial compleja plantea el problema de evitar el efecto interferente de las señales externas sobre la electro-localización y de distinguir las señales propias de las ajenas. Esto último adquiere particular importancia en los Gymnótidos de pulso, ya que en estos no se ha identificado la existencia de una descarga corolario que informe al sistema del tiempo de ocurrencia de las señales autogeneradas. Para este caso particular, un mecanismo posible además del filtro impuesto por los receptores periféricos, es que las propiedades de las neuronas principales de los primeros niveles de procesamiento de la información electrosensorial establezcan filtros sensoriales que contribuyan a la segmentación de las señales auto- y alo- generadas.

En esta sección analizamos el papel de las neuronas esféricas y sus propiedades estructurales en la segmentación de las señales electrosensoriales. Para ello analizamos la respuesta neuronal ante un comportamiento electromotor relativamente bien caracterizado (Heiligenberg, 1977, 1991; Westby, 1974, 1979, 1981; Kawasaki, 1996; Capurro y cols., 1998), como son las variaciones de frecuencia que se producen cuando un animal se encuentra en presencia de co-específicos, o de pulsos interferentes de frecuencia cercana a la de descarga del órgano eléctrico propio. La respuesta electromotora desplegada en presencia de co-específicos interferentes, determina un cambio en la probabilidad de ocurrencia de los estímulos interferentes dentro del intervalo entre DOEs propias (Jamming avoidance response, JAR). Este cambio de probabilidad, combinado con las propiedades de filtro de las neuronas esféricas, podría determinar el establecimiento de un filtro sensorial capaz de favorecer o bloquear la transmisión de los diferentes flujos de señales presentes en la escena electrosensorial. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, estudiamos la respuesta de las neuronas esféricas ante un patrón de estimulación intracelular que reproduce el patrón de actividad aferente que se establece durante los despliegues comportamentales de abolición de interferencia (JAR) observados *in vivo*.

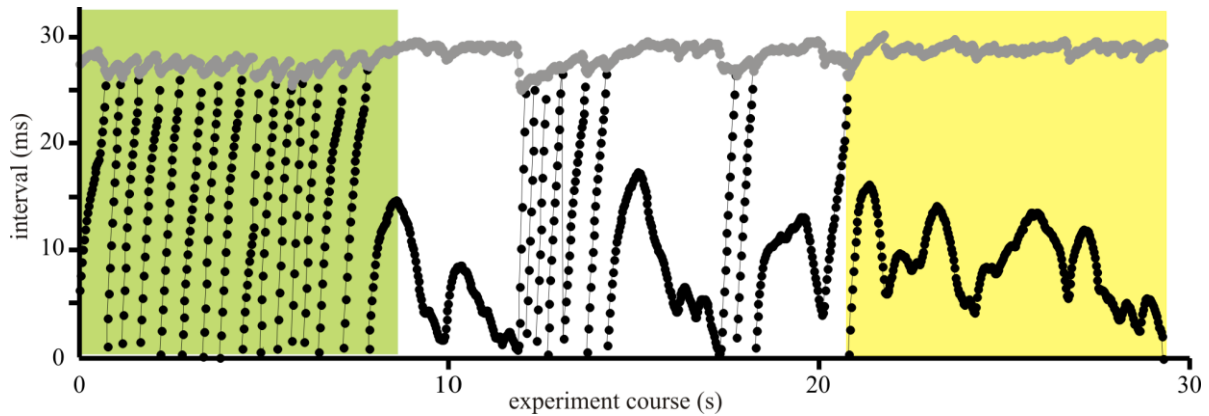


Figura 26. Modulación de la descarga del núcleo marca-paso en presencia de interferencia. El intervalograma muestra el comportamiento típico de un pez en presencia de un tren de pulsos aplicados a la frecuencia media de descarga de la DOE. Los puntos grises representan los intervalos sucesivos de la DOE, y los puntos negros representan la fase de los pulsos interferentes en cada intervalo inter-DOE. En un periodo de 30 s de registro identificamos dos comportamientos diferentes: a) el comportamiento de abolición de interferencia se caracteriza por un barrido del intervalo inter-DOE por el estímulo interferente y aceleraciones cortas que ocurren cuando el pulso interferente coincide con los componentes de onda inicial de la DOE, y b) sincronizaciones en las cuales la fase se mantiene limitada a la porción inicial del intervalo inter-DOE.

El núcleo marcapaso de los gymnótidos es un oscilador muy regular, acelerado tónicamente por la actividad convergente de entradas excitatorias descendentes, provenientes de estructuras motoras y sensoriales (Kawasaki y cols., 1988; Curti y cols., 1999). Eventos sensoriales puntuales como cambios en la impedancia de un objeto (Caputi y cols., 2003), estímulos vibratorios (Barrio y cols., 1991), o comandos motores (Bullock, 1969) generalmente causan aceleraciones drásticas seguidas de su relajación lenta. La suma de múltiples entradas descendentes ejerce un nivel de excitación tónico pero no constante, observándose como consecuencia picos de aceleración. Esos picos de aceleración generan una distribución asimétrica de los intervalos, desplazada en sentido de los intervalos cortos. Las aceleraciones del núcleo marcapaso también pueden ser provocadas por estímulos electrosensoriales artificiales, ya sea que coincidan con la descarga propia o que barran el intervalo entre una DOE y la siguiente. Bullock (1969) describió dicho fenómeno como un "phase sensitivity shortening of the interval" (Westby, 1974). En una serie de artículos, Westby (1981, 1979) desarrolló con mayor profundidad esa idea y describió dos patrones principales de interacción entre co-específicos (Fig. 26): a) Sincronizaciones, en las cuales la frecuencia de ambos peces es la misma por varios segundos, y la fase (definida como el intervalo entre la DOE de un pez y la DOE de otro pez) varía muy lentamente cambiando de dirección; b) Evitación de interferencia de los peces de pulso, que ocurre cuando las frecuencias de descarga son ligeramente diferentes. En ese caso, la fase del pez descargando a menor frecuencia crece con el tiempo; en consecuencia su DOE se aproxima al tiempo de ocurrencia de la siguiente DOE del pez que se encuentra descargando a mayor frecuencia. Cuando la coincidencia es inminente, el pez descargando a mayor

frecuencia o ambos, aceleran cambiando la fase, evitando así la ocurrencia de coincidencias múltiples.

Westby propuso un modelo conceptual para explicar este fenómeno, postulando la existencia de una “ventana de detección” que precede a la DOE (Westby, 1979). En la JAR, cuando la DOE de un pez descargando a menor frecuencia que otro vecino precede la DOE auto-generada dentro de la ventana de detección, el pez detecta que la coincidencia es inminente y acelera para evitar la secuencia de coincidencias. En las sincronizaciones, el pez evita la interferencia manteniendo la diferencia de fase, de forma de que la DOE generada por el coespecífico caiga siempre lejos de la ventana de detección (Westby, 1979; 1881). El modelo conceptual propuesto por Westby fue implementado computacionalmente por Capurro y colaboradores demostrando su viabilidad (Capurro y cols., 1998). Sin embargo, las bases neurales de estos comportamientos todavía no se conocen. Se han propuesto dos explicaciones complementarias: Westby relaciona la JAR con cambios en la capacidad de respuesta de las estructuras centrales del sistema electrosensorial (Westby, 1979), mientras Baker y colaboradores proponen que la JAR depende de la adaptación de los electroreceptores de la vía electrosensorial lenta (Baker, 1980).

Si bien la alternativa propuesta por Baker (1980), de que la respuesta de abolición de interferencia es desencadenada por la modulación ejercida por los estímulos interferentes de la actividad de los receptores codificadores de pulso, los resultados experimentales muestran que este efecto es fuertemente dependiente de la polaridad del pulso interferente, mientras que la respuesta de abolición de interferencia no se modifica por la inversión de la señal interferente. Así, el efecto de la interferencia en la frecuencia de descarga del núcleo marcapaso es independiente de su efecto en los receptores codificadores de ráfaga. Para explicar este hallazgo paradójico Baker (1980) postuló la existencia de un complejo mecanismo de integración central.

A diferencia de los receptores codificadores de ráfaga, los codificadores de pulso no modifican su respuesta a la DOE auto-generada cuando esta es precedida por un pulso interferente (pez curarizado; Baker, 1980). En animales en libre movimiento, los codificadores de pulso codifican tanto las señales electrosensoriales auto-generadas como las generadas externamente, sin interferencia, excepto en una ventana temporal de un milisegundo (Castelló y cols., 1998). Esos hallazgos implican que en presencia de otros peces que se encuentran descargando, en la periferia de la vía electrosensorial rápida existe un flujo de señales autogeneradas que coexiste con los flujos de señales generadas por la descarga de los órganos eléctricos de co-específicos. La pregunta crucial que surge es: ¿Son los peces capaces de extraer el flujo de información propia de la mezcla combinada de señales propias y ajenas que ingresa a los primeros niveles del sistema electrosensorial?

La presencia de eventos eléctricos alo-generados que ocurran de forma regular, como las DOEs de co-específicos vecinos, pueden causar ambigüedad. Las imágenes eléctricas autogeneradas pueden ser modificadas por coincidencia con eventos eléctricos externos o confundidas con imágenes alo-generadas intercaladas que activan la misma vía electrosensorial. *Gymnotus omarorum* evita la coincidencia repetitiva de las EODs auto-generadas y las generadas por un co-específico mediante el control del ciclo del marcapaso que comanda el órgano eléctrico (Westby, 1974; Westby, 1979; Westby, 1981; Capurro y cols., 1988). Sin embargo, evitar las coincidencias no elimina la interferencia porque ambas imágenes (auto-generadas y co-específico-generadas) son codificadas de forma simultánea en el mismo canal físico. Las espigas intercaladas, disparadas por una neurona de la vía electrosensorial rápida en respuesta a señales auto- y alo-generadas, deben ser separadas, para segmentar las imágenes generadas de forma activa de las generadas por objetos pasivos, y las señales de comunicación generadas de forma activa por co-específicos.

Castelló y cols. (1998) han demostrado que existe una ventana de baja respuesta de la vía electrosensorial rápida en *Gymnotus omarorum*. En el capítulo IV demostramos que este fenómeno causado por la activación de la vía y que no depende de una descarga corolario, es generado principalmente en las neuronas esféricas del Lóbulo Electrosensorial (Nogueira y cols., 2006). El “acortamiento de la fase dependiente del intervalo” (Bullock, 1969) o la “abolición de interferencia de los peces de pulso” (Heiligenberg, 1980) proporcionan una clave para interpretar el papel de la ventana de baja respuesta. Se ha propuesto aquí que la segmentación de las señales auto- y alo-generadas se podría implementar a través de un comportamiento motor que adapta el patron temporal de las señales autogeneradas a las propiedades de filtro de las estructuras sensoriales (sin la ayuda de una referencia interna del tiempo de ocurrencia de descarga del núcleo marcapaso, Castelló y cols., 1998; Nogueira y cols., 2006). Es así que teniendo en mente algunas de las características de las ramas sensorial (Nogueira y cols., 2006) y motora (Westby 1974; Westby 1979; Westby 1981; Capurro y cols., 1988) del sentido eléctrico activo, diseñamos experimentos con tres objetivos: a) caracterizar la relación de fase entre los eventos propios y los generados externamente durante despliegues comportamentales; b) caracterizar la excitabilidad de las neuronas esféricas ante la aplicación de estímulos cuya estructura temporal es similar al patrón de actividad sináptica observado *in vivo*; y c) mostrar que las características mencionadas en a y b se pueden combinar para clasificar señales de diferente origen.

En primer lugar se reprodujeron los experimentos de Westby utilizando pulsos cuadrados a una frecuencia cercana a la del pez (Fig. 27). Los histogramas elaborados utilizando las latencias entre la descarga del EOD y el siguiente pulso interferente, muestran diferencias notables cuando se

seleccionan fragmentos de registro donde predomina el patrón de abolición de interferencia (Fig. 27A) o el de sincronización (Fig. 27B). Para el patrón de sincronización se observa un pico en la primera mitad del intervalo entre EODs (Fig. 27B inferior), mientras que para el patrón de abolición de interferencia el pico se localiza en la segunda mitad del intervalo entre EODs (Fig. 27A inferior). Cuando comparamos los histogramas obtenidos para ambos patrones de comportamiento motor, con el curso temporal de la ventana de baja respuesta de las células esféricas, representada por el promedio de varios registros de pulsos pareados a diferentes latencias, observamos que para el comportamiento de sincronización el pico del histograma de latencias cae dentro de la ventana de baja respuesta, mientras que para el patrón de abolición de interferencia cae fuera de esta (Fig. 27C). Estos resultados sugieren que ambos comportamientos podrían determinar diferencias en la transferencia de información para la vía rápida, dada la relación entre los picos de los histogramas y la ventana de baja respuesta. Y podrían implicar que durante la evitación de interferencia las señales propias e interferentes compartirían la vía, mientras que en la sincronización se optimizarían las señales propias.

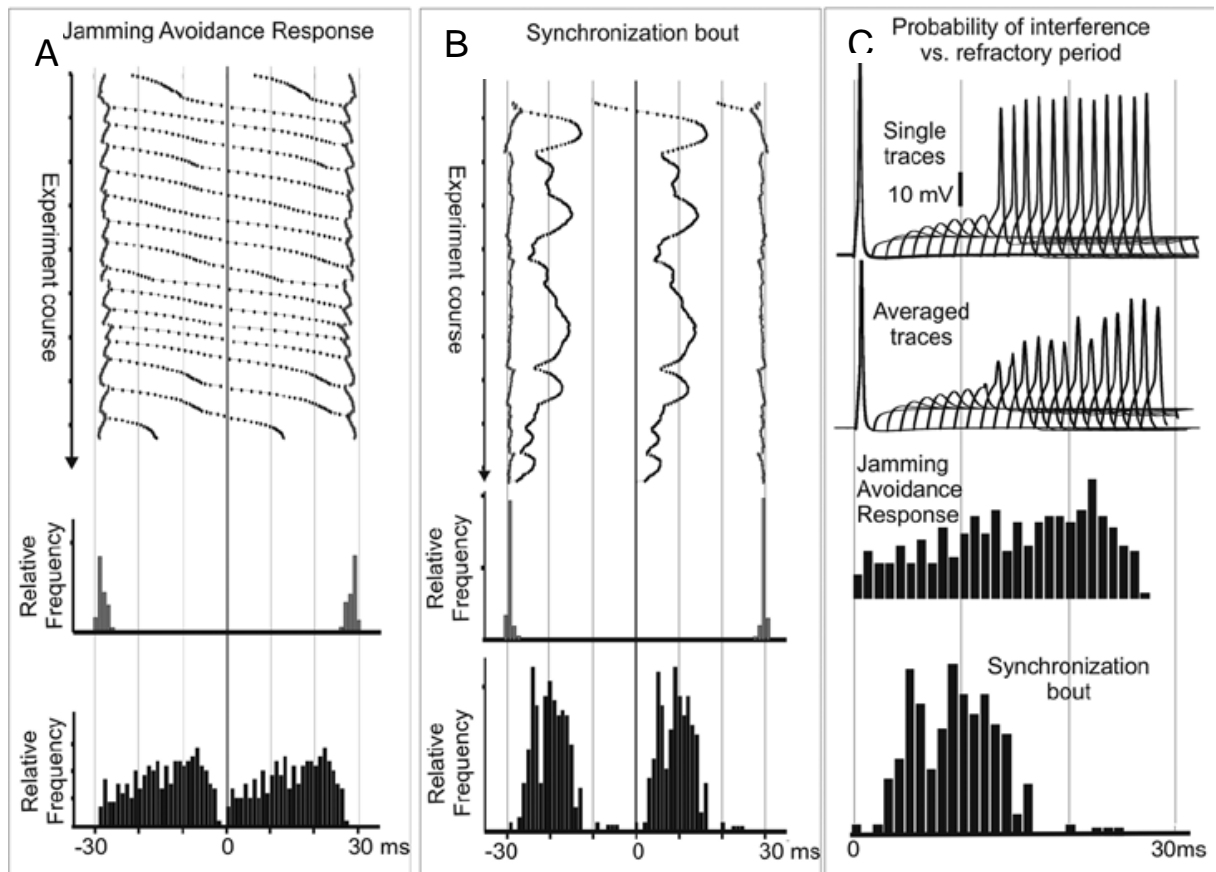


Figura 27. A,B) Rasters peri-EOD y sus histogramas correspondientes (medio: DOE, inferior: pulso interferente). C) La comparación del periodo refractario de las células esféricas observado al aplicar pulsos pareados a diferentes intervalos, entre trazos simples (superior) y el promedio de 10 respuestas celulares a cada intervalo entre pulsos (medio superior), muestra que además de una disminución de la probabilidad de descarga a latencias cortas, existe un incremento progresivo de la variabilidad de la latencia del potencial de acción. Note que mientras que en la respuesta de abolición de interferencia clásica, el pico de probabilidad de ocurrencia del estímulo interferente se localiza en la región de mayor capacidad de respuesta (histograma superior), la respuesta de sincronización presenta un pico de probabilidad en la región con peor capacidad de respuesta del intervalo inter-DOE (histograma inferior).

Resultados

Relación de fase entre los eventos auto y alo-generados durante los despliegues comportamentales: Como se mencionó en la sección anterior, los despliegues de modulación de fase observados en presencia de co-específicos se deben a incrementos repentinos de la frecuencia de descarga del núcleo marcapaso. La aplicación en el agua de un tren de estímulos artificiales (estímulos interferentes) a una frecuencia constante, similar a la frecuencia de descarga del pez, ha sido capaz de reproducir el patrón electromotor observado en condiciones naturales (Fig. 28 y 29). Los “graficos raster” de la figura 28 comparan la secuencia de intervalos entre DOEs en presencia y ausencia de interferencia. Bajo interferencia, aparecen aceleraciones transitorias de la frecuencia de descarga de las EODs. Estas aceleraciones se encuentran representadas como un segundo pico en el histograma inter-EOD de primer orden (Fig. 28C parte inferior, flecha roja).

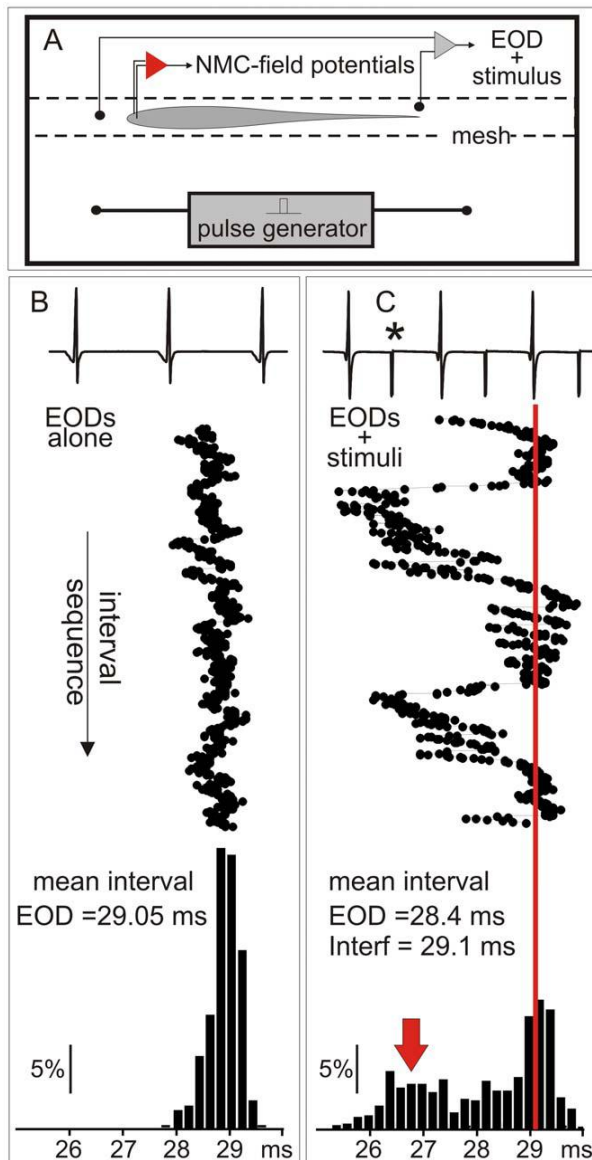


Figura 28. Series temporales de la DOE en reposo y bajo interferencia en *G. omarorum*. A) La estación experimental para experimentos comportamentales consiste en una pecera pequeña donde el pez fue restringido en una red. Los estímulos interferentes fueron pulsos cuadrados aplicados a una frecuencia constante. Se adquirieron de forma simultánea el registro cabeza-cola y el artefacto del estímulo interferente. En algunos experimentos se registró el potencial de campo del cerebro a nivel del núcleo magnocelular mesencefálico (representado por el amplificador en rojo). En B (condición de reposo) y en C (bajo interferencia) se comparan las secuencias de intervalos inter-DOE. B) Superior: datos crudos obtenidos de los registros cabeza-cola en reposo. Medio: Gráfico raster de los intervalos inter-DOE. Inferior: Histograma de los intervalos inter-DOE de primer orden. C) Superior: datos crudos obtenidos de los registros cabeza-cola muestran la DOE y el artefacto interferente (asterisco). Medio: gráfico raster que muestra el acortamiento transitorio del intervalo inter-DOE en presencia de la interferencia. Inferior: Histograma de los intervalos inter-DOE de primer orden mostrando dos picos, uno que corresponde a los intervalos más largos y el otro (flecha roja) las aceleraciones mayores.

La Figura 29 ilustra un experimento comportamental típico. Para casi todos los intervalos inter-EOD hay un estímulo interferente intercalado (Fig. 29A). El gráfico raster combinado muestra como el pez alterna entre el régimen de evitación de interferencia (segmentos verdes, Fig. 29B) y de sincronización (segmentos azules, Fig. 29B). El gráfico se encuentra centrado en el tiempo de ocurrencia de la DOE (la serie vertical de puntos rojos). La siguiente DOE se encuentra representada por la serie de puntos rojos del lado derecho. El intervalo entre la DOE de referencia y el siguiente estímulo interferente (fase) y el previo (cofase, puntos negros) varían como consecuencia del cambio en el intervalo inter-EOD instantáneo. Los despliegues comportamentales de los peces provocan una distribución despareja de la fase de los eventos alo-generados en torno a la DOE, como se muestra en el histograma peri-evento (Fig. 29C). Este resultado es diferente de lo que se podría esperar de dos relojes independientes. Como consecuencia del despliegue comportamental del pez, el número de eventos alo-generados a fases cortas luego de la DOE aumenta a expensas del número de eventos alo-generados a fases más largas. Un segundo pico menos marcado aparece alrededor de los 15-20 ms luego de la DOE auto-generada. Mientras que el primer pico es generado durante las sincronizaciones, el segundo se asociado a la respuesta de evitación de interferencia. Ambos despliegues combinados causan una disminución de la probabilidad de ocurrencia de estímulos interferentes antes de la siguiente DOE auto-generada (Fig. 29B). Considerando que el intervalo entre pulsos interferentes es constante, este resultado indica que la probabilidad de ocurrencia de la interferencia a diferentes fases a lo largo del intervalo inter-DOE es controlada por el comportamiento electromotor de pez.

Considerando que en todos nuestros experimentos los intervalos entre estímulos alo-generados fueron constantes, los histogramas peri-estímulo indican que la probabilidad de ocurrencia del estímulo interferente a diferentes fases a lo largo del intervalo inter-EOD depende fuertemente (y en cierta medida es controlada) del comportamiento electromotor del pez. El comportamiento electromotor observado cuando el pez es interferido por un co-específico se caracteriza por incrementos repentinos de la frecuencia de descarga del núcleo marcapaso. Estas respuestas son desencadenadas tanto por estímulos sensoriales que coinciden con la DOE propia, o por estímulos que preceden en menos de 5 ms la DOE propia (Westby, 1974; Westby, 1979; Westby, 1981; Capurro y cols., 1988). El despliegue electromotor producido por dos peces interactuando fue reproducido al sustituir uno de ellos por un pulso artificial aplicado al agua a frecuencia constante (Fig. 29A-B). La frecuencia del pulso artificial fue similar a la frecuencia media de descarga del pez interferido. Los histogramas peri-evento indican que la probabilidad de interferencia es mayor tempranamente dentro del ciclo entre DOEs y en consecuencia, es menor antes de la siguiente DOE (Fig. 29C).

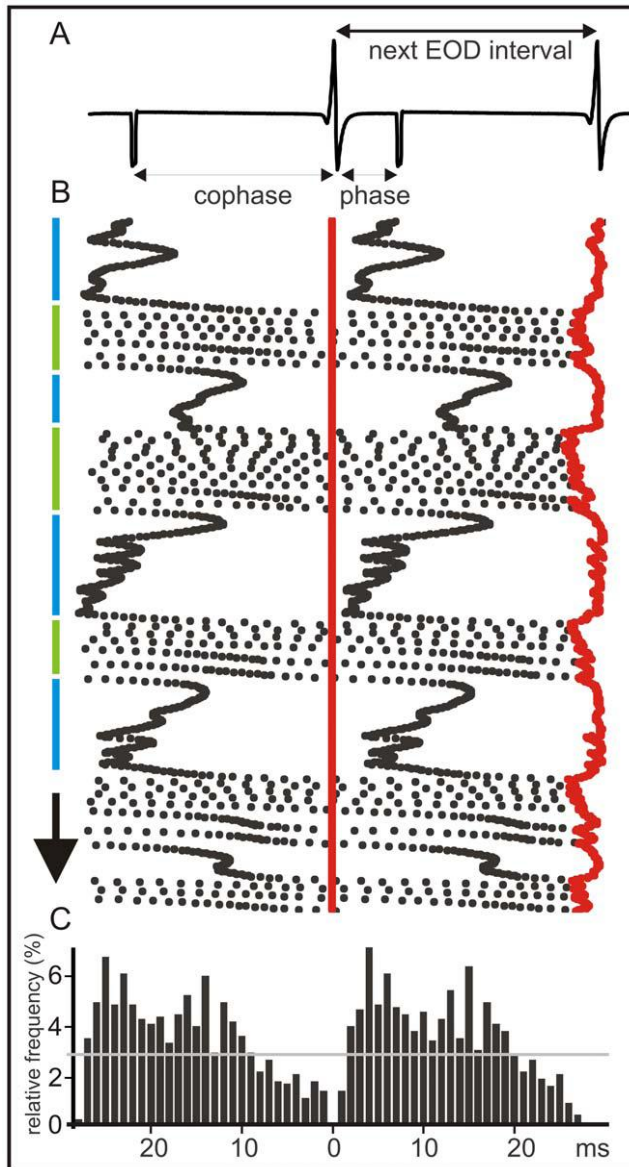


Figure 29. Comportamiento de evitación de interferencia de *G. omarorum*. El ejemplo muestra un despliegue típico desencadenado por estímulos eléctricos interferentes (1 ms de duración) aplicados a una frecuencia constante cercana a la frecuencia media de descarga de la DOE. El "raster plot" está referido al tiempo de ocurrencia de la DOE (la serie vertical de puntos rojos). A) Datos crudos mostrando los artefactos correspondientes a las DOEs y los estímulos artificiales. Se definen los siguientes términos: a) intervalo inter-DOE (tiempo entre DOEs sucesivas), b) intervalo inter-estímulos interferentes (tiempo entre estímulos interferentes sucesivos) quien es la suma de c) la fase (tiempo entre la DOE y el siguiente estímulo interferente) y d) la co-fase (tiempo entre el estímulo interferente y la siguiente DOE). B) "Raster plots" mostrando el curso temporal del intervalo inter-DOE (puntos rojos) y el curso temporal de la fase (puntos negros a la derecha de la DOE) y cofase (puntos negros a la izquierda de la DOE). La flecha indica el curso del experimento (duración total 30 s).

La excitabilidad de las neuronas esféricas: El filtro sensorial de la vía electrosensorial rápida se encuentra determinando por las propiedades intrínsecas de las neuronas esféricas. En estas células, la descarga de un potencial de acción es seguida por la activación de una corriente de K de bajo umbral, no inactivante, que previene la ocurrencia de descargas repetitivas independientemente de la duración o intensidad del estímulo intracelular (Nogueira y cols., 2006). Dicha conductancia dota a las neuronas esféricas de uno de los más elementales y poderosos filtros neurales: una reducción post-espiga de la excitabilidad de entre 10 a 15 ms de duración. Para mostrar la expresión funcional de este fenómeno de membrana, estudiamos el efecto de pulsos depolarizantes idénticos (1.5 ms, 5-50 % por encima del umbral) que reproducen respectivamente el efecto de las DOEs, y de los estímulos interferentes intercalados de acuerdo a patrones comportamentales previamente registrados (Fig. 30).

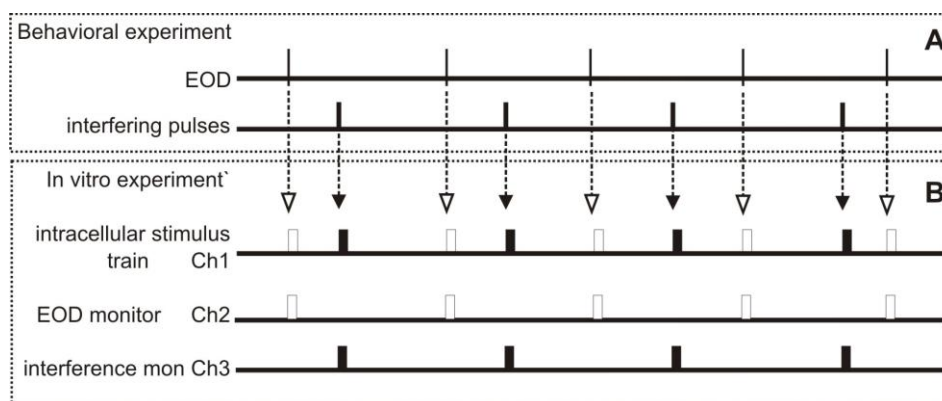


Figura 30. Construcción del tren de estímulos intracelulares. A) Los tiempos relativos de ocurrencia de las DOEs y de los pulsos interferentes fueron seleccionados de registros de experimentos comportamentales utilizando una resolución temporal de 20 μ s. A partir de estos datos se construyó un archivo conteniendo tres canales (software casero): Canal 1) tren de estímulos intracelulares rectangulares de 1.5 ms de duración que inician al tiempo de ocurrencia de la DOE (rectángulos vacíos), y estímulos similares a los anteriores que inician al tiempo de ocurrencia de los estímulos interferentes (rectángulos negros); Canal 2) el monitor de la DOE, donde solo se representan los estímulos que ocurren a los tiempos de la DOE; y Canal 3) el monitor de la interferencia donde solo se representan los estímulos que ocurren a los tiempos de los estímulos interferentes. El Canal 1 se utilizó para comandar el puerto de activación de pulsos del Axoclamp 2B. La intensidad fue controlada mediante los controles del puerto activador de pulsos del Axoclamp 2B. Los canales 2 y 3 fueron registrados en simultáneo con las salidas de voltaje y de corriente del Axoclamp 2B.

La respuesta neuronal obtenida bajo una secuencia de estimulación natural, reprodujo los resultados obtenidos, *in vitro*, mediante la aplicación de pulsos pareados a intervalos variables (Nogueira y cols., 2006). En este caso, el período refractario prolongado fue caracterizado graficando la tasa de falla (Fig. 31A) y el coeficiente de variación de la latencia de las espigas (CV, Fig. 31B), en función del intervalo inter estímulos. Independientemente de su identidad (estímulos que ocurren al tiempo de la DOE o del estímulo interferente) cuando un estímulo se encuentra precedido de una espiga por menos de 12 ms, la respuesta es bloqueada (Fig. 31A), o la latencia de la respuesta evocada presenta una alta variabilidad (100 μ s de desvío estándar en un sistema capaz de resolver diferencias de 400ns, Carr y cols., 1986; Fig. 31B) que decrece en función del intervalo entre espigas consecutivas. Cuando el tren de estímulos estuvo compuesto únicamente por estímulos a los tiempos de ocurrencia de las DOEs, los intervalos fueron siempre mayores de 25 ms y en consecuencia la tasa de falla fue nula. Cuando el tren de estímulos estuvo compuesto por estímulos reproduciendo los tiempos de las DOEs y de los estímulos interferentes intercalados, cualquier estímulo precedido por una espiga ocurrida entre 10 y 14 ms antes, no provocó la descarga de un potencial de acción (Fig. 31A) o experimentó un incremento de la variabilidad de la latencia del mismo (Fig. 31B). Basados en la reducción de la capacidad de respuesta de las neuronas esféricas al mismo protocolo de estimulación, en presencia y ausencia de interferencia, concluimos que el límite superior de toda la información mutua entre la entrada y la salida de las neuronas individuales debería reducirse en presencia de interferencia (Reike y cols., 1999).

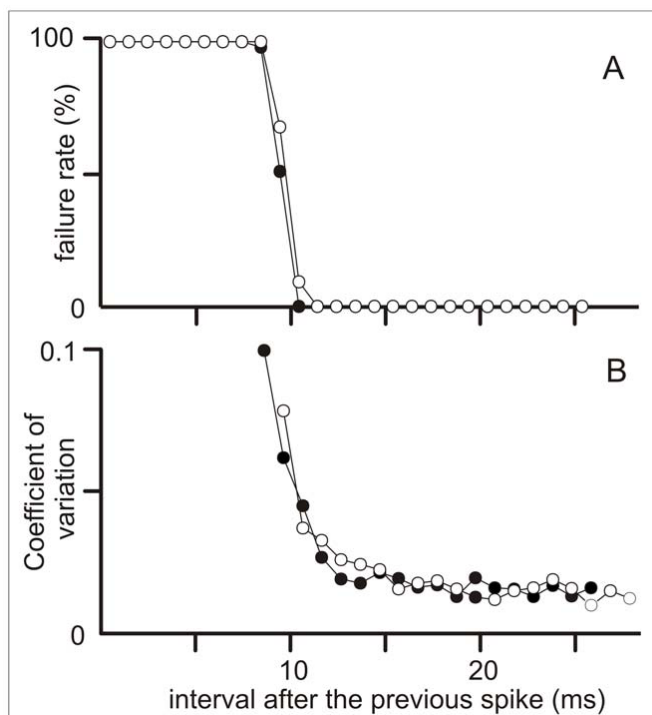


Figura 31. Refracteriedad de las neuronas esféricas bajo patrones naturales de estimulación. Cuando la célula recibe patrones de estímulos conteniendo la serie de intervalos obtenida durante experimentos comportamentales, el periodo refractario luego de cualquier potencial de acción (tanto los provocados por los estímulos-DOE, símbolos vacíos, o por los estímulos-I, símbolos negros) es idéntico: A) período refractario absoluto (tasa de falla del potencial de acción en función del intervalo con el estímulo interferente previo); B) período refractario relativo (coeficiente de variación en función del intervalo con el estímulo interferente previo).

La hipótesis del filtro dinámico: Las características detalladas del proceso de decodificación de la imagen que ocurre a nivel del núcleo magnocelularis aún no se conocen. Sin embargo, es importante responder la pregunta de si las neuronas esféricas responden de manera diferente a cada uno de los patrones de estimulación intercalados. Por lo tanto, analizamos la capacidad de respuesta tanto de las células individuales como de la vía electrosensorial rápida a cada una de las series de estímulos (estímulos que ocurren al tiempo de la DOE y de los estímulos interferentes). Teniendo en cuenta los cambios en la secuencia de las DOEs ocurridas en presencia de interferencia (Fig. 28), el patrón de probabilidad peri-DOE de los estímulos interferentes causado por estos despliegues comportamentales (Fig. 29), y el período refractario prolongado de las neuronas esféricas (Nogueira y cols., 2006), inferimos que la respuesta del núcleo marcapaso a la interferencia sensorial causa diferencias significativas en la respuesta de las neuronas esféricas a las DOEs y a los estímulos interferentes.

La respuesta de las neuronas esféricas depende del patron temporal de estimulación: Nueve neuronas esféricas, identificadas visualmente en las rodajas coronales de cerebro, fueron registradas en modo “whole-cell”, en condiciones de fijación de corriente. Para reproducir el patron de aferencia sináptica que la neurona habría recibido *in vivo* durante un despliegue comportamental de abolición de coincidencias, utilizamos un régimen de estimulación reconstruido a partir de experimentos comportamentales previos (Fig. 30). Luego del experimento, se seleccionaron períodos peri-stimulo (desde 1ms antes y hasta 5 ms después de cada estímulo) a partir de los trazos continuos de potencial de membrana. Los períodos así establecidos fueron clasificados y separados en dos grupos, correspondientes a la respuesta obtenida por la aplicación de los estímulos ocurridos al tiempo de las DOEs (estímulos-DOE) y los ocurridos al tiempo de los estímulos interferentes (estímulos-I). A partir de estos datos comparamos la probabilidad de respuesta y el coeficiente de variación de la latencia de las espigas (CV) evocados por ambas series de estímulos.

La tasa de falla fue menor para los estímulos-DOE que para los estímulos-I en todos los experimentos (14 ± 3.7 % and 36.7 ± 4.1 % para estímulos-DOE y estímulos-I respectivamente, Wilcoxon signed-rank test $p < 0.01$, $N=11$ series de estimulación en 9 células estudiadas, utilizando una intensidad de estimulación de 1.1 ± 0.02 umbrales). Además, la latencia de las espigas evocadas por estímulos-DOE fue menos variables que la latencia de las espigas evocadas por estímulos-I (CV 0.043 ± 0.01 vs. 0.069 ± 0.015 para estímulos-DOE y estímulos-I respectivamente, Wilcoxon signed-

rank test $p < 0.01$, $N=11$ series de estimulación). Los histogramas de latencia de las espigas muestran una mayor probabilidad de las latencias cortas para las espigas evocadas por estímulos DOE (Fig. 32A and B).

Teniendo en cuenta que todos los estímulos fueron idénticos, el efecto diferencial observado en la transferencia de información obtenida para los estímulos-DOE y los estímulos-I solo puede ser atribuido a la modulación de fase del núcleo marcapaso. La dependencia de la respuesta de la secuencia de los eventos, fue confirmada mediante experimentos control (trazos negros, Fig. 32). En 6 neuronas, la respuesta a estímulos ordenados en secuencia natural fueron comparados con secuencias control compuestas por el mismo grupo de intervalos inter-estímulo-DOE pero cuyo orden fue barajado. La diferencia en los histogramas obtenidos para las espigas evocadas por estímulos-DOE y por estímulos-I desaparecieron en las corridas en que los intervalos inter-DOE fueron barajados. Estos experimentos mostraron: a) una tasa de falla y una variabilidad de la latencia de las espigas significativamente menor para los estímulos-DOE en la secuencia natural de estimulación que en la barajada (Wilcoxon ranked-sum test, $p=0.0022$, 8 epochs, 6 cells); b) una tasa de falla significativamente mayor para los estímulos-I en los patrones naturales de estimulación que en los barajados (Wilcoxon ranked-sum test, $p=0.0022$, 8 epochs, 6 cells); c) no se encontraron diferencias significativas para ambos tipos de estímulo en los patrones de estimulación con la secuencia de intervalos inter-DOE barajada (tasa de fallas= $28.9 \pm 7.5\%$ vs. $28.8 \pm 4.8\%$; y $CV = 0.062 \pm 0.014$ vs. 0.059 ± 0.009 respectivamente; Wilcoxon signed-rank test, $p > 0.1$, 8 epochs, 6 cells).

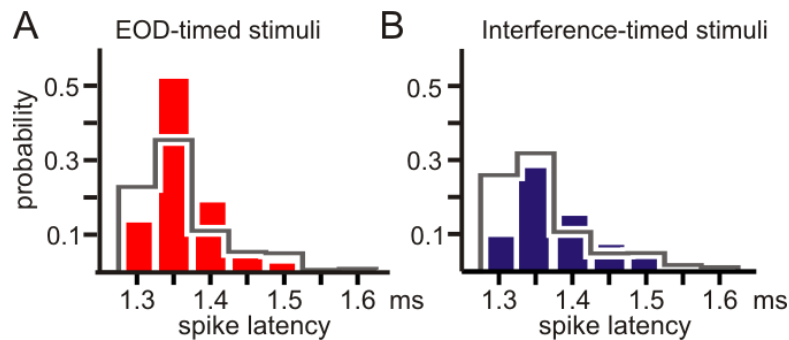


Figura 32. Probabilidad de ocurrencia del potencial de acción en función de la latencia post-estímulo. Comparación de la respuesta de las neuronas esféricas a estímulos idénticos aplicados de acuerdo a los siguientes regímenes: i) un tren de pulsos aplicados siguiendo un ritmo que reproduce la DOE natural e intercalado, una señal interferente de frecuencia constante (los resultados se muestran como histogramas de barras); ii) trenes de pulsos conteniendo los mismos intervalos inter-DOE pero barajados, junto con las señales interferentes intercaladas a frecuencia constante (trazos negros). Los histogramas muestran la probabilidad de la latencia de los potenciales de acción calculada para cada uno de los cuatro tipos de estímulos. A) Estímulos-DOE en la secuencia natural (barras rojas) y su pareja con la secuencia barajada (trazos negros). B) Estímulos-I en la secuencia natural (barras azules) y su pareja con la secuencia barajada (trazos negros). En los experimento con secuencia natural el area (efectividad del estímulo) y lo picudo (precisión) de los histogramas de latencia de las espigas fue mayor par a las respuestas a los estímulos-DOE (A) que para los estímulos-I (B). Los histogramas obtenidos de las parejas con los intervalos inter-DOE barajados no mostraron diferencias significativas (trazos negros en A y en B).

Las diferencias en la tasa de fallas y en la variabilidad de la latencia pueden ser fácilmente explicadas si ponderamos el efecto del período refractario con la probabilidad del estímulo. La modulación de la actividad del núcleo marcapaso determina que la probabilidad de ocurrencia de los estímulos-I dentro de la ventana de 12 ms siguientes al estímulo-DOE sea siempre mucho mayor que la probabilidad para los estímulos-DOE de caer en la misma ventana de tiempo luego de los estímulos-I (Fig. 33A-B). Como consecuencia la probabilidad de provocar la descarga de un potencial de acción a una latencia constante para una determinada intensidad de estimulación aplicada es mayor para el tren de estímulos-EOD que para el estímulo interferente (Fig. 33C-D). Además, los histogramas peri-evento muestran que la probabilidad de ocurrencia de espigas evocadas por estímulos-I a intervalos largos luego de los estímulos-DOE (y con el potencial de interferir la respuesta del siguiente estímulo-DOE) es menor que la probabilidad observada para los mismos intervalos en los experimentos control (compare las barras rojas con los trazos negros). Esto es debido a que el pez modula su propia tasa de descarga evitando de esta forma el período refractario de las espigas evocadas por los estímulos-I.

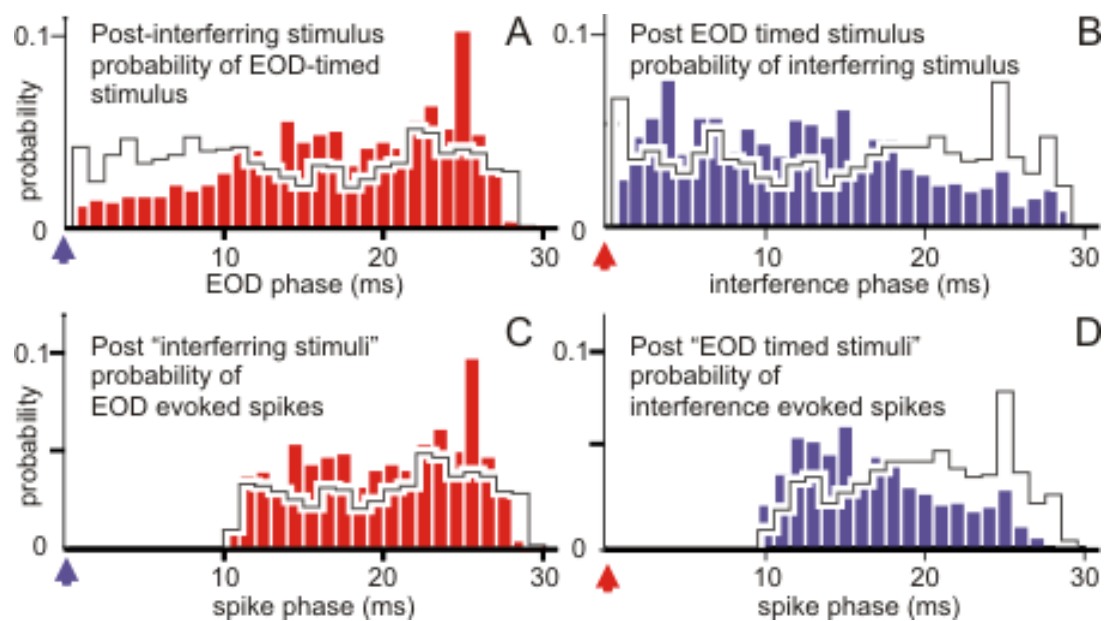


Figura 33. Las diferencias en la tasa de falla y la variabilidad de la latencia de los potenciales de acción se deben a la combinación del periodo refractario y de la probabilidad post estímulo. Fila superior: Histogramas post-estímulo que muestran en A) la probabilidad de ocurrencia de la DOE (barras rojas) luego de la interferencia (flecha azul a tiempo 0) y en B) la probabilidad de ocurrencia de la interferencia (barras azules) luego de la DOE (flecha roja a tiempo 0). La probabilidad de ocurrencia de la DOE a fases cortas luego de la interferencia es menor mientras la interferencia ocurre más frecuentemente a fases cortas luego de la DOE. Estos histogramas se encuentran superpuestos a aquellos obtenidos a partir de experimentos control en los cuales se barajó la secuencia de intervalos inter-DOE (escaleras). Fila inferior: Histogramas post-estímulo que muestran en C) la probabilidad de ocurrencia de las espigas provocadas por los estímulos-DOE (barras rojas) luego de los estímulos-I (flecha azul a tiempo 0), y en D) la probabilidad de ocurrencia de las espigas provocadas por los estímulos-I (barras azules) luego de los estímulos-DOE (flecha roja a tiempo 0). Los histogramas en A) y C) muestran que los estímulos-DOE fueron más eficientes porque las modulaciones naturales de la frecuencia de descarga del núcleo marca-pasos los mantienen fuera de la ventana de refractariedad que sucede a las respuestas de los estímulos-I. Por el contrario, los histogramas B) y D) muestran que las modulaciones del núcleo marca-paso mantiene a la mayoría de los estímulos interferentes en la ventana de refractariedad que sucede a la DOE. Entonces, una mayor porción de los estímulos-I resultan bloqueados o provocan espigas con mayor variabilidad de latencia. Las escaleras negras representan los histogramas post-evento obtenidos cuando la secuencia de intervalos inter-DOE fueron barajados.

La consistencia de este fenómeno fue puesta a prueba mediante la aplicación a la misma neurona de: a) diferentes trenes de estímulos reconstruidos a partir de dos experimentos comportamentales independientes (2 células), y b) el mismo tren de estímulos a diferentes intensidades (4 células). La intensidad del estímulo intracelular, y los diferentes registros del despliegue comportamental de evitación de interferencia, presentaron diferencias cualitativamente similares en el efecto de la secuencia de intervalos de los pulsos que reproducen las señales auto-generadas en la información transferida por la neurona (Fig. 34).

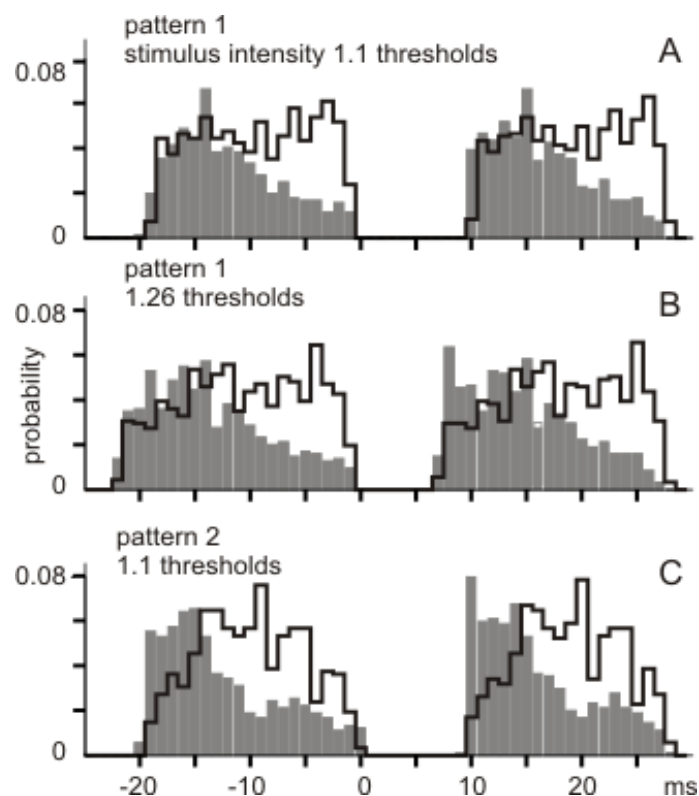


Figura 34. Las diferencias observadas en la respuesta a estímulos-DOE e interferentes son similares para diferentes secuencias de estimulación e intensidades de las mismas. El histograma post-estímulo de las espigas evocadas muestra uno de los experimentos en los que la misma neurona fue estimulada con diferentes intensidades (1.1 y 1.26 umbrales en A y B respectivamente), y con dos secuencias de estimulación obtenidas de experimentos comportamentales diferentes (compare los histogramas peri-evento A y C obtenidos con una intensidad de estimulación de 1.1 umbrales). Las barras grises corresponden a la probabilidad de ocurrencia de las espigas evocadas por la interferencia luego de los estímulos-DOE. Las escaleras corresponden a la probabilidad de las espigas evocadas por estímulos-DOE luego de los estímulos interferentes.

La respuesta de la vía electrosensorial rápida a las señales autogeneradas se encuentra facilitada en peces que descargan libremente: El potencial de campo evocado en la vía electrosensorial rápida en respuesta a la aplicación de un estímulo eléctrico de corta duración es un potencial de acción compuesto, cuya amplitud y duración se encuentran determinadas por el grado de coincidencia de todas las espigas disparadas por el total de la población de neuronas esféricas. Por lo tanto, dado que la latencia de la espiga es la variable de codificación, la estabilidad de la espiga compuesta ante la aplicación de un estímulo constante constituye un buen índice de la transferencia de información a través de la vía.

Los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que los potenciales de campo obtenidos en respuesta a la DOE deberían ser menos variables (y por lo tanto contener más información sobre la entrada) que los potenciales de campo obtenidos en respuesta a los estímulos interferentes. Esta predicción fue confirmada en dos peces implantados de forma crónica con electrodos de registro a nivel del núcleo de proyección de las neuronas esféricas. Los animales implantados desplegaron patrones de abolición de coincidencia cuando un tren de estímulos de frecuencia constante fue aplicado al agua a una frecuencia cercana a la media de la descarga del órgano eléctrico del pez registrado (Fig. 35A). En períodos en los que el pez se encontraba en relación espacial constante con los electrodos de registro y el tanque, la espiga compuesta provocada por la DOE se mantuvo relativamente estable en duración y amplitud, pero la espiga compuesta provocada por el estímulo interferente fue varias veces más variable en ambos animales (Fig. 35B-C). Los resultados y argumentos previos nos llevan a concluir que este mecanismo sirve para aumentar la transferencia de información autogenerada en detrimento de la interferente, haciendo posible distinguir el origen de las señales aferentes.

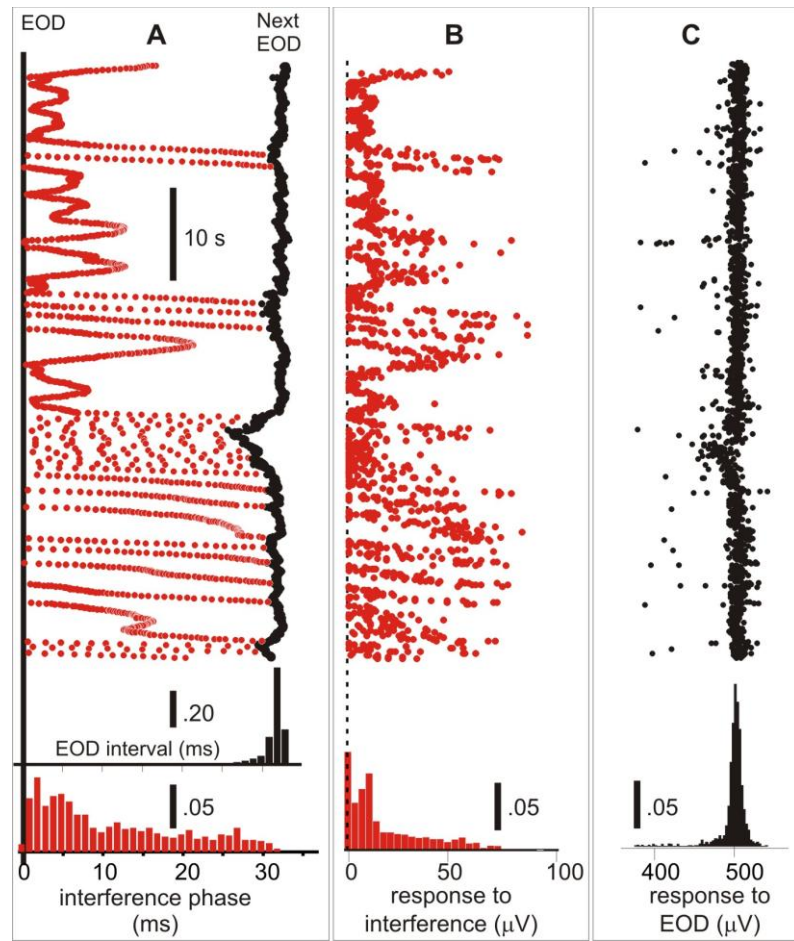


Figura 35. Potencial de campo en respuesta a señales auto- y alo-generadas en un pez desacrgando libremente. Los gráficos raster en A) muestran el curso temporal de la fase del estímulo interferente (rojo) y el intervalo inter-DOE (negro), en B) la amplitud de los potenciales de campo evocados por los estímulos interferentes, y en C) la amplitud de los potenciales de campo evocados por las DOEs. El curso del experimento va de arriba hacia abajo. Los rasters B y C están a la misma escala temporal. Los histogramas inferiores muestran en A) la probabilidad de interferencia luego de la DOE (rojo) y el histograma de intervalos de primer orden de la DOE (negro). Los histogramas de amplitud en B y C muestran la amplia dispersion de la amplitud de la respuesta a la interferencia (B inferior, rojo) en contraste con la relativa constancia de la respuesta a la DOE (C inferior, negro) Esto indica el mayor grado de confianza en la transferencia de información para las señales auto-generadas a través de la vía.

Discusión

En muchos sistemas sensoriales la segmentación de las señales autogeneradas se encuentra mediada por mecanismos de expectativa implementados por comandos internos que facilitan las señales deseadas o inhiben las señales no deseadas. Estos mecanismos se implementan mediante el control sináptico de la respuesta de las neuronas sensoriales. Aquí se muestra que los mecanismos de compuerta sensorial, también pueden ser implementados por las propiedades neuronales intrínsecas si los actos motores ocurren en una secuencia temporal apropiada. Estos resultados enfatizan el papel clave de estas propiedades neuronales en el procesamiento sensorial, y en la identificación y segmentación de señales por parte de redes neurales. Además, este constituye un ejemplo adicional de la regla general propuesta por Llinas (1998): “las propiedades eléctricas autorítmicas de las neuronas centrales y sus conexiones forman la base de un sistema funcional coordinado que provee de un contexto interno a la entrada sensorial”.

En particular, este trabajo muestra un filtro dinámico con un componente sensorial, basado en las propiedades intrínsecas (particularmente en la expresión de una corriente de potasio de bajo umbral resonante) de una neurona electrosensorial de tipo “onset”, y un componente motor basado en las aceleraciones reflejas de un núcleo comando formado por neuronas marcapaso que se encuentran estrechamente acopladas. En este sistema, las propiedades neuronales y el comportamiento electromotor son condiciones mínimas y suficientes, cuya combinación basta para identificar y segregar las señales autogeneradas presentes en una secuencia que contenga una mezcla de eventos sensoriales auto- y alo-generados. El filtrado sensorial por parte del patrón temporal de actividad electromotora constituye un mecanismo alternativo al corrimiento tónico en la frecuencia de la DOE observada en peces de onda (jamming avoidance response) (Heiligenberg, 1991; Kawasaki 1993). A pesar de la amplia similitud entre los gymnótidos de onda y de pulso, los mecanismos de evitación de interferencia parecen ser diferentes. Mientras que el corrimiento tónico de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico que presentan los peces de onda reduce la modulación de fase y amplitud experimentada por la señal auto-generada, las aceleraciones transitorias del núcleo marcapaso presentadas por los gymnótidos de pulso son utilizadas por el pez para forzar las señales alo-generadas a ocurrir dentro del período refractario generado por las señales propias a nivel de las neuronas “onset” de segundo orden. Estas aceleraciones transitorias del núcleo marcapasos son desencadenadas por eventos eléctricos alo-generados que ocurren en proximidad temporal de la descarga del pez. Como resultado de las aceleraciones, las señales auto-generadas son facilitadas, en detrimento de las señales alo-generadas.

A pesar de que las propiedades del decodificador aún no han sido bien caracterizadas, nuestros hallazgos sugieren que la precisión con que el tiempo de ocurrencia de la espiga es capaz de

representar la intensidad del estímulo es menor para las señales alo- que para las auto-generadas. Esto sugiere un efecto diferencial del comportamiento del pez sobre la transmisión de información para las señales auto- y alo-generadas. Las diferencias observada en la tasa de fallas y en el coeficiente de variación de la latencia de la espiga parecen ser pequeñas al nivel de células individuales (22% tasa de falla y 2.5% en variabilidad). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la imagen de un co-específico está compuesta por estímulos locales de menor amplitud, y distribuidos sobre un área de piel menor que la estimulación basal autogenerada. Como consecuencia solo una fracción de la población de las células “onset” recibe el efecto de los estímulos alo-generados. Además, en general se piensa que las señales son decodificadas en el núcleo magnocellularis por detección de coincidencia (Carr y cols., 1986b, 1986c; Schlegel, 1977). Este mecanismo es afectado negativamente tanto por la ausencia de arribo o por la llegada fuera de tiempo de un estímulo aferente. El incremento en las diferencias de la capacidad de respuesta por un efecto de población debe aumentar el poder del filtro sensorial. Esto es compatible con los resultados obtenidos en los animales crónicamente implantados.

Una interpretación del mecanismo descrito es que el pez cambia su frecuencia para mantener a las señales alo-generadas dentro una “sombra refractaria” de sus propias respuestas. Este despliegue comportamental llamado “eco-response” ocurre verdaderamente en *Mormíridos*, cuya frecuencia de descarga de la DOE es mas lenta y usa una descarga corolario para segmentar las señales auto-generadas (Bell y cols., 1974). En este comportamiento la mejor estrategia es descargar a la misma frecuencia que la DOE externa. En cambio, en *Gymnotus omarorum*, la reducción del efecto de la interferencia es consecuencia de la respuesta del núcleo marcapaso a la interferencia sensorial. De hecho, estudios teóricos y experimentales (Capurro y cols., 2001; Lorenzo y Macadar, 2005; Bell y cols., 1974) sugieren que para el pez no es necesario identificar una señal “auto-generada” real para generar el comportamiento de evitación de interferencia. Estos estudios (Capurro y cols., 2001; Lorenzo y Macadar, 2005; Bell y cols., 1974) indican que la detección de unos pocos estímulos novedosos es suficiente para desencadenar el comportamiento de evitación de interferencia. Las aceleraciones también son desencadenadas por estímulos que preceden cercanamente o que coinciden con un sustituto de la DOE en animales curarizados (Lorenzo y Macadar, 2005). Se puede asumir que el mismo mecanismo sensorial usado para la detección de novedad también puede servir para desencadenar las aceleraciones necesarias para establecer un mecanismo de filtrado sensorial basado en la regulación del tiempo de ocurrencia de los actos motores. A pesar de ser un mecanismo menos eficiente que la predicción precisa del tiempo de ocurrencia de la interferencia, la reacción ante la novedad es un mecanismo eficaz y seguro. Las aceleraciones transitorias en respuesta a cambios en las senales auto-generadas son un tipo de

respuesta común en los peces eléctricos (llamadas respuesta de novedad) (Lissmann, 1958; Caputi y cols., 2003). Esas respuestas corresponden a la detección de diferencias entre la imagen eléctrica presente y el promedio móvil de entre 100 y 1000 imágenes previas (Caputi y cols., 2003). Es probable que la interferencia por coincidencia o por la modificación de la capacidad de respuesta de la vía electrosensorial lenta se encuentren involucradas en la activación de las aceleraciones del núcleo marca paso.

En muchos sistemas soriales la latencia de la primera espiga acarrea información importante de la identidad (auto- o alo-generadas) de las señales sensoriales (Bell y Grant, 1989; Heiligenberg y cols., 1978). El código de latencia de la primera espiga también ha sido descrita como un posible mecanismo de transferencia de información en sistemas sensoriales, aún cuando no existe una referencia interna con la cual comparar (Heiligenberg y cols., 1978). Además, este mecanismo podría ser complementario de los mecanismos de percepción ligados a la acción provistos por descargas corolario presentes en la electrorecepción (Bell, 1981; Bell y Grant, 1989; Bell y Grant, 1992) y en otros sistemas sensoriales (Sperry, 1950; Bell, 1981; Poulet y Hedwig, 2006; Sommer y Wurtz, 2002).

En presencia de períodos refractarios prolongados el control del tiempo relativo de ocurrencia de las señales auto- y alo-generadas podría ser un mecanismo simple y eficiente para facilitar (o para bloquear) tanto las señales auto- como alo-generadas. De hecho, todos los elementos parecen encontrarse presentes por lo menos en el sistema somatosensorial. Ha sido propuesto que control motor del tiempo de ocurrencia de las acciones auto-generadas podría encontrarse regulado centralmente a través de comandos descendentes discretos (Llinas, 1991), y también se ha demostrado que este ritmo de auto-estimulación puede ser transmitido a las aferentes sensoriales (Wessberg y Vallbo, 1995, 1996), y que algunas neuronas del asta dorsal de la médula espinal expresan una conductancia de potasio de bajo umbral (Prescott y De Konink, 2002). Por lo tanto, predecir ventanas de refractoriedad sensorial tanto para evitarlas o hacerlas coincidir con comandos descendentes o actos motores podría ser un principio general de procesamiento sensorial a ser explorado.

PARTE VI: DISCUSIÓN GENERAL

Potencial papel funcional de las “single spiking cells”; consideraciones comparativas: La presencia de “single spiking cells” en sub-sistemas sensoriales que se especializan en la preservación y el análisis de la información temporal no es exclusiva de la vía electrosensorial rápida de gimnótidos de pulso. Neuronas con características y significado funcional similares se encuentran en los sistemas electrosensoriales de los gimnótidos de onda (Szabo y cols., 1975; Heiligenberg, 1991; Mehaffey y cols., 2006), pulso (Bell y Grant, 1989; Xu-Friedman y Hopkins, 1999) y mormíridos de onda (Kawasaki, 2005), así como en el sistema auditivo (Carr et al., 2005) y somatosensorial (Prescott y De Koninck, 2002) de vertebrados superiores. La vía electrosensorial rápida parece ser un sub-sistema electrosensorial presente en todos los peces que con electrorecepción activa (Szabo y cols., 1975). Las neuronas de segundo orden de estas vías también son neuronas esféricas y carentes de dendritas. Aunque la vía electrosensorial rápida en mormíridos de pulso y de onda ha sido bien descritas a nivel de sistema y circuital, el conocimiento detallado de las propiedades intrínsecas de las neuronas de segundo orden todavía permanece inexplorada en la mayoría de los peces. En gimnótidos, la caracterización del fenotipo de las neuronas esféricas es incompleta. Sin embargo, las neuronas esféricas parecen estar adaptadas para implementar la tarea de procesamiento de información que la organización de los sistemas electromotor y electrosensorial imponen. Las células esféricas de *Eigenmannia* difieren de las de *G. carapo* en que no establecen sinapsis dendrosomáticas y en que proyectan a través del lemnisco lateral a la lámina VI del torus contralateral (Carr y cols., 1981). Como en gimnótidos de pulso, la DOE genera una activación sincronizada de la vía electrosensorial rápida de *Eigenmannia* (Szabo y cols., 1975). Por lo que sabemos, las propiedades funcionales de las neuronas esféricas del ELL de *Eigenmannia* se mencionan únicamente en el libro de Heiligenberg (Heiligenberg, 1991) donde se dice que no son capaces de seguir 1:1 un estímulo de 170 Hz. En *Apteronotus*, las neuronas esféricas proyectan al núcleo magnocellular mesencefálico (único y medial como en gimnótidos de pulso).

Mientras que en peces de onda la respuesta de abolición de interferencia consiste en cambios duraderos de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico, los peces de pulso presentan aceleraciones transitorias (Bullock, 1969). Eso implica diferencias tanto en el procesamiento de las señales como en las propiedades intrínsecas de las neuronas esféricas. De hecho, la existencia de un periodo refractario prolongado en las neuronas esféricas podría ser inadecuado para el procesamiento de las señales reaferentes en los peces de onda que descargan a alta frecuencia. Esto concuerda con el hecho de que la inmunohistoquímica para canales de potasio de alto alto

umbral da positiva para las neuronas esféricas de *Apteronotus* (Mehaffey, 2006), donde podrían facilitar la repolarización de la espiga sin generar un período refractario prolongado, como se muestra para otros tipos neuronales del lóbulo electrosensorial de *Apteronotus* (Rashid, 2001; Fernandez y cols., 2005).

“One-spike-neurons” que expresan rectificaciones de salida y de entrada similares también fueron descritas en el asta dorsal de la medula espinal de mamíferos (Prescott y De Koninck, 2002), pero su papel funcional en la computación de las imágenes somatosensoriales todavía permanece oscuro (Graham y cols., 2004). Finalmente, las células esféricas de peces de pulso tienen mucho en común con células auditivas de aves y mamíferos (Carr, 2004). La combinación de conductancias descrita es similar a la presentada por las células octopus y bushy del núcleo coclear ventral de mamíferos (Golding y cols., 1999; Manis y Marx, 1991; Wu y Oertel, 1984; Brew y Forsythe, 1995; Oertel y cols., 2000), y el núcleo angularis, núcleos magnocellular y lemniscal de aves, que comparten con las células esféricas la capacidad de transmitir de forma precisa la información usando un código de latencia (Trussell, 1999; Rathouz y Trussell, 1998; Reyes y cols., 1994; Soares y cols., 2002). Estos datos comparativos sugieren que las “one-spike-neurons” y las propiedades estructurales que las determinan evolucionaron de forma convergente en el sistema electrosensorial y auditivo (Carr, 2004; Carr y cols., 2005). Sin embargo, las variaciones observadas entre especies deben corresponder a adaptaciones recíprocas entre la estructura celular y las funciones específicas. La conductancia de potasio de bajo umbral descrita para células esféricas de peces de pulso se desactiva lentamente, al igual que el canal de potasio de bajo umbral observado en células auditivas de cobayo (constante de tiempo 12.5 ms) (Manis y Marx, 1991). Esta conductancia de potasio parece ser la misma que da forma a la respuesta de las células octopus de ratón (Golding y cols., 1999). En otras células auditivas, la conductancia de potasio de bajo umbral es suplementada por la presencia de una conductancia de potasio de alto umbral (Carr y cols., 2005). Como en las células piramidales del ELL de *Apteronotus* donde la corriente de potasio de alto umbral facilita la repolarización de la espiga y acelera la deactivación de la corriente de potasio de bajo umbral (Rashid, 2001; Fernandez y cols., 2005).

PARTE VII: CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten confirmar la hipótesis general para el caso particular de las neuronas esféricas de la vía rápida. En primer lugar se demuestra que las neuronas esféricas tienen capacidad de transmitir de forma rápida y precisa el tiempo de ocurrencia del estímulo. Entre los rasgos estructurales que podrían contribuir a dichas propiedades funcionales de las neuronas esféricas se encuentran: a) Un soma esférico, pausidendrítico, compacto desde el punto de vista eléctrico que se comunica con un axón de gran calibre a través de un segmento inicial angosto. b) La presencia de una sinapsis axosomática mixta capaz de transmitir de forma rápida, precisa, y a alta frecuencia, la información que viene desde la periferia a través de las fibras aferentes primarias. c) Una combinación particular de conductancias de membrana especialmente adaptada para favorecer la precisión temporal en la codificación y transmisión de los estímulos. Este último aspecto ha sido el objeto de estudio del presente trabajo donde se demuestra que la expresión de una conductancia de potasio de bajo umbral, determina que la célula descargue un único potencial de acción en relación de fase precisa con el estímulo. Al no presentar inactivación esta conductancia es capaz de encontrarse parcialmente abierta en reposo, contribuyendo al mantenimiento del potencial de reposo y determinando que la membrana se comporte como un filtro pasa alto. Por lo tanto, las propiedades estructurales de las neuronas esféricas son determinantes de la capacidad de la vía rápida de codificar de forma precisa el tiempo de descarga del órgano eléctrico, y de la ventana de baja respuesta descrita al estudiar *in vivo* el potencial de acción compuesto que caracteriza a la vía rápida.

Segundo, desde el punto de vista funcional las propiedades descritas determinan que las neuronas esféricas se encuentren adaptadas para responder a variaciones rápidas y de corta duración del potencial de membrana. Tanto la amplitud como la pendiente de la variación de voltaje producen cambios en la latencia y la variabilidad del tiempo de ocurrencia de la espiga. Teniendo en cuenta esto último es interesante destacar como la geometría neuronal, a pesar de ser una simple esfera, podría constituir un factor importante dentro las propiedades neuronales. El hecho de la espiga se genere probablemente en un sitio alejado del soma, y que las propiedades de filtro descritas radican en el soma, nos permite pensar que el soma funcionaría como un filtro regulable interpuesto entre la entrada sináptica y el sitio de generación de la espiga, permitiendo una regulación aún más fina de la codificación del estímulo en la latencia de la espiga (Ashida y cols., 2007).

La capacidad de responder a un estímulo con una sola espiga de temporalidad precisa y seguida de un período refractario prolongado, puede tener varios significados computacionales dependiendo

de la existencia o no de convergencia de varias fibras aferentes sobre una misma célula esférica y de su peso sináptico respectivo. La activación rápida de la corriente de potasio de bajo umbral, que no presenta inactivación, determina que la célula actúe como una compuerta “Y” de breve duración para estímulos sub-umbrales (McCulloch y Pitts, 1943; Arbib y cols., 1988). En efecto, la presencia de una depolarización facilita la respuesta en los 2 ms siguientes a su inicio; luego, la excitabilidad celular se reduce muy rápidamente. Esta propiedad, junto con la existencia de un soma eléctricamente compacto, convierte a las neuronas esféricas en un buen dispositivo de detección de coincidencias, en el cual la descarga de un único potencial de acción se produciría únicamente como consecuencia de la suma de varios estímulos sinápticos sub-umbrales en una ventana temporal estrecha. Otras tres alternativas son posibles: i) en el caso de que la actividad sináptica tardía fuese supra-umbral, la activación precoz de una entrada sub-umbral podría causar un bloqueo de la respuesta celular a la DOE; ii) la activación de dos sinapsis de efecto supra-umbral causarían la oclusión de la respuesta a la más tardía; y iii) en el caso de no existir convergencia (fibra única) la neurona funcionaría como un transmisor altamente preciso de la información desde las fibras aferentes a los centros superiores.

Tercero, dentro de los objetivos planteados en este trabajo se encuentra establecer la pertenencia de las neuronas esféricas al fenotipo “one-spike-neuron” y determinar si este grupo de neuronas es definible como un “fenotipo funcional”. De acuerdo a lo establecido para el sistema auditivo las “one spike neurons” (Soares y cols., 2002) se caracterizan por: a) ser compactas desde el punto de vista eléctrico; presentar un soma relativamente esférico con poca arborización dendrítica, b) responder con una única espiga en relación precisa con la fase del estímulo; y c) mantener un potencial de reposo estable aumentando de esta forma la precisión temporal de la respuesta. Tienen además un papel importante en la codificación de atributos sensoriales a través de un código temporal (Carr, 1993 y 1986). Estas características neuronales se encuentran presentes en las neuronas esféricas de la vía rápida del Lóbulo Electrosensorial, por lo que se puede decir que estas neuronas pertenecen al fenotipo “one spike neuron”. Este es uno de los fenotipos de neurona que no ha sido claramente identificado aún como “fenotipo funcional” (ver Migliore y Shepherd, 2005).

Por otra parte, el análisis del papel funcional de dichas neuronas en los diferentes circuitos en los que han sido descritas muestra diferencias importantes. Se han definido dos papeles funcionales para estas neuronas: a) Codificador temporal, con la capacidad de codificar y transmitir de forma precisa el tiempo de ocurrencia de un estímulo sensorial. Ejemplos de esto son las neuronas del sistema auditivo (Hackett y cols., 1992; Reyes y cols., 1994; Koyano y cols., 1996; Raman y Trussell,

1992), y las neuronas esféricas de los segmentos más mediales (que establecen contacto con una única fibra aferente) del lóbulo electrosensorial de *G. omarorum* (Castelló y cols., 1998). b) Detector de coincidencia, con la capacidad de sumar entradas sinápticas en una ventana temporal muy estrecha. Ejemplo de este tipo son las neuronas del núcleo laminaris de aves y el núcleo medial de la oliva superior (Moiseff y Konishi, 1983; Carr y Konishi, 1990; Reyes y cols., 1996; Grothe, 2003; Carr y cols., 2001), y posiblemente las neuronas esféricas de los segmentos laterales del Lóbulo Electrosensorial de *G. omarorum* (Castelló y cols., 1998) y las neuronas del núcleo magnocelular mesencefálico de la misma especie.

Es interesante destacar que la presencia o ausencia de corrientes de potasio de alto umbral, que generan una importante hiperpolarización post-espiga, pueden jugar un papel importante en las capacidades computacionales de este tipo de célula (Manis y Marx, 1991; Brew y Forsythe, 1995; Wang y cols., 1998; Rathouz y Trussell, 1998; Parameshwaran y cols. 2001; Nogueira y cols., 2006; Johnston y cols., 2010). En las células del lóbulo eléctrico la repolarización es dominada por la inactivación de la corriente de sodio y la activación de la corriente de potasio de bajo umbral, lo que le da características especiales y por lo cual podrían sub-clasificarse como “one-spike and pause-neurons”

Cuarto, ¿es posible establecer la existencia de “fenotipos funcionales de neuronas” teniendo en cuenta únicamente la combinación de propiedades estructurales? Si bien las “one-spike-neurons” comparten sus principales rasgos estructurales, su papel funcional y la sintonía fina de sus propiedades varían dependiendo del sistema y su posición dentro del circuito en el que se encuentran insertas. Con respecto a este último aspecto, el presente trabajo demuestra la existencia de un nuevo papel funcional para las “one-spike and pause-neurons”, funcionando como un filtro neuronal estereotipado puede formar parte de un filtro sensorial dinámico capaz de segmentar las señales auto- y alo-generadas.

Por último, este trabajo de tesis sugiere las siguientes preguntas a ser abordadas en el futuro:

- 1) ¿Que diferencias estructurales y que papel funcional tienen las células esféricas de los distintos mapas somatotopicos?
- 2) ¿Cuales son las propiedades estructurales de las neuronas esféricas de otras especies de peces eléctricos de onda y de pulso con diferentes frecuencias de descarga del órgano eléctrico?
- 3) ¿Como se decodifican las señales a nivel del núcleo magnocelularis?
- 4) ¿Cual es la consecuencia funcional de la segmentación de señales propias e interferentes producida a nivel de las neuronas esféricas?
- 5) ¿Cuales son los mecanismos que explican la modulación de la descarga del núcleo marcapasos en presencia de una señal interferente?
- 6) ¿Que otros ejemplos de temporización de acciones propias determinan una segmentación de las señales sensoriales reaferentes?
- 7) ¿Existe corregulación entre las corrientes resonantes subumbrales expresadas por las neuronas esféricas?
- 8) ¿Existe un período refractario prolongado en las neuronas equivalentes presentes en la vía auditiva? ¿De ser así, que función cumple?
- 9) ¿Que tipos moleculares de canales de potasio son expresados en las neuronas esféricas, y cual es la localización subcelular de estos y de otros tipos de canales?

PARTE VIII: MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados en animales de la especie *Gymnotus Omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) de una longitud comprendida entre 12 y 18 cm. Los especímenes fueron colectados en la Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay (latitud 35.5°, longitud 55°). El cuidado de los animales y los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de Universidad de la República (ordenanza 4332-99) y la International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia profunda inducida por (0.5 mg i.p.).

Registro de potenciales de campo in vivo: La actividad evocada a nivel del núcleo magnocellular mesencefálico por la descarga del órgano eléctrico o por estímulos artificiales, fue registrada con dos alambres unidos (80 μm de diámetro, aislados excepto en sus puntas) introducidos a través de un pequeño agujero, en sentido descendente, hasta 1000-1200 micras de profundidad con respecto a la superficie. Una vez finalizado el descenso los alambres fueron fijados con cemento dental sellando el orificio de ingreso. Luego de ser implantados los animales fueron inmovilizados durante unas horas en una malla plástica hasta que el efecto de la anestesia desapareció. Las señales fueron amplificadas diferencialmente (ganancia-1000), filtradas con un filtro pasa-banda (10–10 000 Hz), y digitalizadas con un Digidata 1322A.

Registros intracelulares: El cerebro fue cortado en rodajas de 200 μM , de forma perpendicular al eje anteroposterior, utilizando un vibrátomo. Una vez obtenidas, las rodajas fueron incubadas en solución con bajo sodio ($\text{mMol}\cdot\text{l}^{-1}$): KCl (2), CaCl_2 (2.6), KHPO_4 (1.25), NaHCO_3 (24), MgSO_4 (1.6), glucosa (20), NaCl (0) y sucrosa (201), pH 7.4. Luego de un período de entre 30 y 60 min, las rodajas fueron transferidas a una solución de registro normal, de la misma composición que la anterior pero conteniendo NaCl ($120 \text{ mMol}\cdot\text{l}^{-1}$) en sustitución de la sacarosa. La identificación primaria de las células se realizó bajo microscopio, utilizando como referencia la organización laminar del Lóbulo Electrosensorial, bajo óptica de Nomarski en iluminación infrarroja. Los registros se realizaron en modo “whole cell” utilizando microelectrodos de entre 5-12 $\text{M}\Omega$ cargados con una solución conteniendo ($\text{mMol}\cdot\text{l}^{-1}$): gluconato de potasio (122), MgCl_2 (2.5), gluconato de magnesio (5.6), CaCl_2 (0.3), Na_2ATP (5), K-Hepes (5), H-Hepes (5), EGTA (1) y biocitina (10); a pH 7.4. Las propiedades intrínsecas de las células esféricas fueron estudiadas en modo de fijación de corriente, bajo diferentes protocolos de estimulación. En algunos casos, con el objetivo de mejorar el marcado intracelular, aplicamos corriente constante depolarizante e hiperpolarizante de forma alternada durante algunos minutos para favorecer la inyección de biocitina. Una vez finalizado el

experimento el tejido fue fijado mediante la inmersión de las rodajas en buffer fosfato (PH 7,4) conteniendo 4% de paraformaldehído. La biocitina contenida en las células registradas fue revelada utilizando un protocolo estándar de avidina-biotina-peroxidasa–diaminobenzidina (Horikawa y Armstrong, 1988).

Experimentos comportamentales: El comportamiento de abolición de interferencia descrito por Westby (1974, 1979, 1981) fue reproducido en tres peces que se encontraban inmobilizados por una malla plástica y descargaban libremente. Los estímulos interferentes (pulsos cuadrados de 1ms de duración) fueron generados mediante un estimulador eléctrico, acoplado ópticamente con una unidad aisladora de estímulos alimentada a batería, que a su vez alimentó dos electrodos localizados a 10 cm en una línea parasagital al pez. En cada experimento, la frecuencia del estímulo fue fijada a la tasa media de descarga del órgano eléctrico y mantenida constante durante todo el período de registro. La intensidad del estímulo fue ajustada manualmente hasta que el pez desplegó el comportamiento. Las DOEs y los estímulos artificiales fueron separadas electrónicamente usando un "trigger Schmidt" y sus tiempos fueron grabados independientemente en canales separados. Los datos fueron analizados mediante la elaboración de "graficos raster" referidos a la DOE y los pulsos interferentes, y calculando los histogramas peri-DOE y peri-estímulo interferente.

Estimulación intracelular con secuencias de estímulos construidas a partir de patrones naturales de actividad aferente: Las células esféricas fueron estimuladas intracelularmente con trenes de estímulos rectangulares idénticos. Para la construcción de estos trenes se utilizaron fragmentos de un banco de registro de experimentos comportamentales (30 s de duración). El archivo de estimulación consistió en una serie de estímulos idénticos (1.5 ms de duración, Fig. 30) aplicados al tiempo de ocurrencia de la DOE (rectángulos vacíos) o al tiempo de ocurrencia de los estímulos interferentes (rectángulos llenos), obtenidos a partir registros de experimentos comportamentales. Se registraron 4 canales simultáneamente: la salida de a) corriente y b) voltaje del Axoclamp 2B correspondientes a la corriente utilizada para estimular intracelularmente y al potencial de membrana registrado, y dos imágenes separadas correspondientes a cada grupo de estímulos, los que ocurren al tiempo de la DOE (estímulos-DOE) y los que ocurren al tiempo de la interferencia (estímulos-I). Estas señales fueron digitalizadas con un Digidata 1322A y posteriormente procesadas utilizando MATLAB. Luego del experimento, se seleccionaron períodos peri-estímulo (de 1 ms antes hasta 5 milisegundos después de cada estímulo) de los registros continuos de potencial de membrana utilizando un programa ad hoc. Estos períodos fueron clasificados en dos grupos correspondientes a las respuestas a los estímulos-I y a los estímulos-DOE. En los pocos casos donde

ocurrió coincidencia entre estímulos de ambos tipos la respuesta le fue asignada al pulso que ocurrió primero. Para cada estímulo, adjudicamos la presencia de un potencial de acción cuando un transitorio rápido del potencial de membrana causado por el estímulo alcanza un nivel de depolarización de -20 mV. La latencia de la espiga fue definida como el intervalo entre el inicio del pulso de corriente y tiempo en que la espiga cruza el punto de detección. Para cada fragmento periespiga de 6 ms, corroboramos que el nivel de detección fuese adecuado para seleccionar todas las espigas identificadas visualmente. Se calcularon la probabilidad de respuesta y la distribución de las latencias de las espigas para cada una de las series de fragmentos de 6 ms. Medimos y comparamos la transferencia de información utilizando dos índices: la tasa de falla y el coeficiente de variación de la latencia de las espigas (CV) cuando la célula fue sometida a estímulos idénticos. Así, diferencias en estos índices indican (cuanto más bajos mejor) diferencias en la confiabilidad de la representación neural de las imágenes eléctricas. Con el fin de precisar aún más el papel de la secuencia de intervalos entre estímulos pertenecientes a una y a otra serie (estímulos-I y estímulos-DOE), realizamos 8 parejas de experimentos control en 6 células (2 patrones en dos células y 1 patrón en otras 4 células, intensidad de estimulación 1.1 umbrales en todos los casos) en los cuales los patrones naturales obtenidos de los experimentos comportamentales fueron seguidos por series control con los intervalos inter-DOE barajados. Estas 6 células fueron estimuladas con dos trenes de estímulos basados en datos experimentales: a) un tren de pulsos idénticos puestos en los tiempos de ocurrencia de la DOE registrada, intercalados con un tren de pulsos aplicados en los tiempos de ocurrencia de los estímulos interferentes de frecuencia constante; y b) un tren de pulsos conteniendo los mismos intervalos inter-DOE pero barajados, junto con la señal interferente de frecuencia constante intercalada. Para probar si los resultados obtenidos fueron dependientes del patrón comportamental utilizado utilizamos tres patrones diferentes obtenidos de experimentos comportamentales distintos (patrón 1= 4 células; patrón 2 = 4 células, y patrón 3 =3 células; los patrones 1 y 2 fueron ejecutados en la misma célula en dos ocasiones). Para probar si el efecto diferencial de los intervalos de secuencia era válido para diferentes intensidades de estimulación aplicamos el mismo patrón natural a diferentes intensidades de estimulación (que van desde 1.05 a 1.5 umbrales) en cuatro células. En otras 2 células comparamos los efectos de 2 intensidades diferentes (1.1 y 1.26 umbrales) para cada uno de los dos patrones naturales diferentes que tocamos dentro de cada célula.

Procedimientos estadísticos: Comparamos la respuesta a la aplicación de estímulos de igual intensidad y duración localizados en los tiempos de ocurrencia de la descarga del órgano eléctrico o de un estímulo interferente, puestos en un mismo tren de estimulación que reproduce la secuencia temporal de los experimentos comportamentales. Para ello utilizamos el Wilcoxon signed-rank test

(datos pareados) o el Wilcoxon rank-sum test. Se compararon dos indicadores: tasa de falla, estimada por el porcentaje en que no hubo respuesta, y la variabilidad de la latencia, estimada como el coeficiente de variación de la latencia. Los histogramas se compararon utilizando el test de χ^2 .

REFERENCIAS

- Aguilera, P. A., Castelló, M. E. and Caputi A. A.** (2001). Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific generated signal carriers. *J. Exp. Biol.* **204**, 185-198.
- Arbib, M. A., Erdi, P. and Szentagothai, J.** (1998). *Neural Organization: Structure, Function, and Dynamics*. Cambridge (MA): MIT Press.
- Ashida, G., Abe, K., Funabiki, K. and Konishi, M.** (2007). Passive soma facilitates submillisecond coincidence detection in the owl's auditory system. *J. Neurophysiol.* **97**, 2267-2282.
- Bacelo, J., Engelmann, J., Hollmann, M., von der Emde, G. and Grant, K.** (2008). Functional foveae in an electrosensory system. *J. Comp. Neuro.* **511**, 342-359.
- Baker, C. L.** (1980). Jamming avoidance behavior in Gymnotoid electric fish with pulse-type discharges: sensory encoding for a temporal pattern discrimination. *J. Comp. Physiol. A.* **136**, 336-344.
- Bal, R. and Oertel, D.** (2000). Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I(h)) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* **84**, 806-817.
- Bal, R. and Oertel, D.** (2001). Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* **86**, 2299-2311.
- Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L. and Buño, W. Jr.** (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. *Comp. Biochem. Physiol.* **100**, 555-562.
- Bastian, J.** (1986). Gain control in the electrosensory system mediated by descending inputs to the electrosensory lateral line lobe. *J. Neurosci.* **6**, 553-562.
- Bastian, J., Courtright, J. and Crawford, J.** (1993). Commissural neurons of the electrosensory lateral line lobe of *Apteronotus leptorhynchus*: morphological and physiological characteristics. *J. Comp. Physiol. A.* **173**, 257-274.
- Bekkers, J. M.** (2000). Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J. Physiol.* **525**, 611-620.
- Bell, C. C. and Grant, K.** (1989). Corollary discharge inhibition and preservation of temporal information in a sensory nucleus of mormyrid electric fish. *J. Neurosci.* **9**, 1029-1044.
- Bell, C. C. and Grant, K.** (1992). Sensory processing and corollary discharge effects in mormyromast regions of mormyrid electrosensory lobe II Cell types and corollary discharge plasticity. *J. Neurophysiol.* **68**, 859-875.
- Bell, C. C. and Maler, L.** (2005). Central neuroanatomy of electrosensory systems in fish. In: Bullock TH, Hopkins CD, Popper AN, Fay RR, editors. *Electroreception*. New York: Springer. pp. 68-111.
- Bell, C. C. and Szabo, T.** (1986). Electroreception in mormyrid fish. Central anatomy. In *Electroreception* (ed. T. H. Bullock and W. Heiligenberg), pp. 375-421. New York: Wiley-Interscience.
- Bell, C. C., Caputi, A., Grant, K. and Serrier, J.** (1993). Storage of a sensory pattern by anti-Hebbian synaptic plasticity in an electric fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 4650-4654.

- Bell, C. C., Mayers, J. P. and Russell, C. J.** (1974). Electric organ discharge patterns during dominance related behavioral displays in *Gnathonemus petersii* Mormyridae. *J. Comp. Physiol. A.* **92**, 201–228.
- Bell, C.C.** (1981). An efference copy which is modified by reafferent input. *Science.* **214**, 450-453.
- Bell, C.C.** (2002). Evolution of cerebellum-like structures. *Brain. Behav. Evol.* **59**, 235-239.
- Bell, C. C., Grant, K. and Serrier, J.** (1992). Sensory processing and corollary discharge effects in the mormyromast regions of the mormyrid electrosensory lobe. I. Field potentials, cellular activity in associated structures. *J. Neurophysiol.* **68**, 843-858.
- Black Cleworth, P.** (1969). Social behavior in *Gymnotus carapo* (Pisces; Gymnotidae). PhD thesis, University of California, Los Angeles, USA.
- Brew, H. M. and Forsythe, I. D.** (1995). Two voltage-dependent K⁺ conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J. Neurosci.* **15**, 8011-8022.
- Budelli, R., Torres, J., Catsigeras, E. and Enrich, H.** (1991). Two-neurons network. I. Integrate and fire pacemaker models. *Biol. Cybern.* **66**, 95-101.
- Bullock, T. H.** (1969). Species differences in effect on electroreceptor input on electric organ pacemakers and other aspects of behavior in electric fish. *Brain Behav. Evol.* **2**, 85-118.
- Bullock, T. H. and Heiligenberg, W.** (1986). (eds) Electroreception. New York Wiley
- Bullock, T. H., Hagiwara, S., Kusano, K. and Negishi, K.** (1961). Evidence for a category of electroreceptors in the lateral line of gymnotid fishes. *Science.* **134**, 1426-1427.
- Capurro, A., Longtin, A., Bagarinao, E., Sato, S., Macadar, O. and Pakdaman, K.** (2001). Variability of the electric organ discharge interval duration in resting *Gymnotus carapo*. *Biol. Cybern.* **84**, 309–321.
- Capurro, A., Macadar, O., Perrone, R. and Pakdaman, K.** (1998). Computational model of the jamming avoidance response in the electric fish *Gymnotus carapo*. *Biosystems.* **48**, 21-27.
- Caputi, A. A.** (2004). Contributions of electric fish to the understanding of sensory processing by reafferent systems. *J. Physiol. Paris.* **98**, 81-97.
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A. and Castello, M. E.** (2003). Probability and amplitude of the novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*. *J. Exp. Biol.* **206**, 999-1010.
- Caputi, A. A., Castelló, M. E., Aguilera, P. and Trujillo-Cenóz, O.** (2002). Electrolocation and electrocommunication in pulse gymnotids: signal carriers, pre-receptor mechanisms and the electrosensory mosaic. *J. Physiol. Paris.* **96**, 493-505.
- Carr, C. E.** (1986). Time coding in electric fish and Barn Owls. *Brain Behav. Evol.* **28**, 122-133.
- Carr, C. E.** (1993). Processing of Temporal Information in the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 223-243.
- Carr, C. E. and Friedman, M. A.** (1999). Evolution of time coding systems. *Neural Comput.* **11**, 1-20. Review.

- Carr, C. E. and Konishi, M.** (1990). A circuit for detection of interaural time differences in the brain stem of the barn owl. *J. Neurosci.* **10**, 3227-3246.
- Carr, C. E. and Maler, L.** (1986). Electroreception in gymnotiform fish. Central anatomy and physiology. In *Electroreception* (ed. T.H. Bullock and W. Heiligenberg), pp. 319–373. New York: Wiley.
- Carr, C. E., Heiligenberg, W. and Rose, G. J.** (1986). A time comparison circuit in the electric fish midbrain I. Behavior and physiology. *J. Neurosci.* **6**, 107–119.
- Carr, C. E., Iyer, S., Soares, D., Kalluri, S. and Simon, J. Z.** (2005). Are neurons adapted for specific computations? Examples from temporal coding in the auditory system. In *23 problems in systems neuroscience* (ed. J. L. van Hemmen and T.J. Sejnowski), pp. 245-265. New York: Oxford University Press, USA.
- Carr, C. E., Maler, L. and Taylor, B.** (1986). A time comparison circuit in the electric fish midbrain II. Functional morphology. *J. Neurosci.* **6**, 1372–1383.
- Carr, C. E., Soares, D., Parameshwaran, S. and Perney, T.** (2001). Evolution and development of time coding systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 727-733.
- Castelló, M. E., Aguilera, P. A., Trujillo-Cenóz, O. and Caputi, A. A.** (2000). Electroreception in *Gymnotus carapo*: prereceptor processing and the distribution of electroreceptor types. *J. Exp. Biol.* **203**, 3279-3287.
- Castello, M. E., Caputi, A. and Trujillo-Cenoz, O.** (1998). Structural and functional aspects of the fast electrosensory pathway in the electrosensory lateral line lobe of the pulse fish *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Neurol.* **401**, 549-63.
- Chase, S. M. and Young, E. D.** (2007). First-spike latency information in single neurons increases when referenced to population onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 5175-5180.
- Coombs, J. S., Eccles, J. C. and Fatt, P.** (1955). The electrical properties of the motoneurone membrane. *J. Physiol.* **130**, 291-325.
- Crapse, T. B. and Sommer, M. A.** (2008). Corollary discharge across the animal kingdom. *Nature Reviews Neuroscience.* **9**, 587-600.
- Curti, S., Falconi, A., Morales, F. R. and Borde, M.** (1999). Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *J. Neurosci.* **19**, 9133-9140.
- Dayan, P., & Abbott, L. F.** (2001). *Theoretical neuroscience* (Vol. 31). Cambridge, MA: MIT press.
- Doroshenko, P. A., Kostiuk, P. G. and Tsyndrenko, Ala.** (1978). Separation of potassium and calcium channels in the nerve cell soma membrane. *Neurofiziologia.* **10**, 645-653.
- Engelmann, J., Nöbel, S., Röver, T. and Emde Gv.** (2009). The Schnauzenorgan-response of *Gnathonemus petersii*. *Front. Zool.* **6**, 21.
- Golding, N. L., Ferragamo, M. J. and Oertel, D.** (1999). Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J. Neurosci.* **19**, 2897-905.
- Golgi C.** (1903 y 1929). Opera omnia. Vol. 1,2 y3. Milano, Hoepli Editore, 1903. Vol. 4 editado por Golgi y colaboradores (L. Sala, E. Veratti, G. Sala).

- Grothe, B.** (2003). New roles for synaptic inhibition in sound localization. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 540-550.
- Hackett, J. T., Jackson, H. and Rubel, E. W.** (1982). Synaptic excitation of the second and third order auditory neurons in the avian brain stem. *Neuroscience.* **7**, 1455–1469.
- Heiligenberg, W.** (1991). *Neural Nets in Electric fish*. Cambridge: The MIT Press.
- Heiligenberg, W., Baker, C. and Bastian, J.** (1978). The jamming avoidance response in gymnotoid pulse species: a mechanism to minimize the probability of pulse-train coincidences. *J. Comp. Physiol. A.* **124**, 211–224.
- Henneman, E.** (1957). Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science.* **126**, 1345-1347.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. and Katz, B.** (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 424-448.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M. and Johnston, D.** (1997). KC channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature.* **387**, 869–875.
- Johnston, D. and Wu, S. M. S.** (1995). Functional diversity of voltage-gated conductances. In *Foundations of cellular neurophysiology* (ed. D. Johnston, and S. M. S. Wu), pp. 183-214. Cambridge: MIT press.
- Johnston, D., Hoffman, D. A., Magee, J. C., Poolos N.P., Watanabe, S., Colbert, C. M. and Migliore, M.** (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.* **525**, 75–81
- Johnston, J., Forsythe, I. D., Kopp-Scheinflug, C.** (2010). Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J. Physiol.* **588**, 3187-3200.
- Kalmijn, A. J.** (1974). *The detection of electric fields from inanimate and animate sources other than electric organs*. In: *Handbook of Sensory Physiology*, vol. III/3 (ed. A. Fessard), pp. 147-200. Berlin: Springer-Verlag.
- Kandel, E. R.** (1976). *Cellular basis of behavior: An introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco: Freeman.
- Kawasaki, M.** (1993). Independently evolved jamming avoidance responses employ identical computational algorithms: a behavioral study of the African electric fish, *Gymnarchus niloticus*. *J. Comp. Physiol. A.* **173**, 9-22.
- Kawasaki, M.** (1996). Comparative analysis of the jamming avoidance response in African and South American wave-type electric fishes. *Biol. Bull.* **191**, 103-108.
- Kawasaki, M., Maler, L., Rose, G. J. and Heiligenberg, W.** (1988). Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. *J. Comp. Neurol.* **276**, 113-131.
- Koch, C. and Segev, I.** (2000). The role of single neurons in information processing. *Nat Neurosci.* **3**, 1171-1177. Review.

- Korngreen, A. and Sakmann, B.** (2000). Voltage-gated KC channels in layer 5 neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients. *J. Physiol.* **525**, 621-639.
- Koyano, K., Funabiki, K. and Ohmori, H.** (1996). Voltage-gated ionic currents and their roles in timing coding in auditory neurons of the nucleus magnocellularis of the chick. *Neurosci. Res.* **26**, 29-45.
- Lemon, R. and Turner, W.** (2000). Conditional Spike Backpropagation Generates Burst Discharge in a Sensory Neuron. *J. Neurophysiol.* **84**, 1519-1530.
- Lissmann, H. W.** (1951). Continuous electrical signals from the tail of a fish. *Gymnarchus niloticus* Cuv. *Nature.* **167**, 201-202.
- Lissmann, H. W.** (1958). On the function and evolution of electric organ in fish. *J. Exp. Biol.* **35**, 156-191.
- Lissmann, H. W. and Machin, K. E.** (1958). The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *J. Exp. Biol.* **35**, 451-486.
- Llinás, R.** (1990). «Intrinsic Electrical Properties of Mammalian Neurons and CNS Function». *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures, 1988-1989* (Raven Press) 4: p. 175.
- Llinas, R. R.** (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science.* **242**, 1654-1664.
- Llinas, R. R.** (1991). The noncontinuous nature of movement execution. In: *Motor control: Concepts and issues* (ed. D. R. Humphrey and H. J. Freund), pp. 223-242. New York: John Wiley & Sons.
- Lloyd, D. P.** (1959). Temperature and Dendritic Response of Spinal Motoneurons. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **45**, 589-592.
- Lorente De No, R. and Condouris, G. A.** (1959). Decremental Conduction in Peripheral Nerve. Integration of Stimuli in the Neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **45**, 592-617.
- Lorenzo, D. and Macadar, O.** (2005). Influence of temperature and reproductive state upon the jamming avoidance response in the pulse-type electric fish *Brachyhyppomus pinnicaudatus*. *J. Comp. Physiol. A.* **191**, 85-94.
- MacLeod, K. M., Soares, D. and Carr, C. E.** (2006). Interaural timing difference circuits in the auditory brainstem of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *J. Comp. Neurol.* **495**, 185-201.
- Maler, L.** (1979). The posterior lateral line lobe of certain gymnotoid fish: quantitative light microscopy. *J. Comp. Neurol.* **183**, 323-363.
- Maler, L. and Mugnaini, E.** (1994). Correlating gamma-aminobutyric acidergic circuits and sensory function in the electrosensory lateral line lobe of a gymnotiform fish. *J. Comp. Neurol.* **345**, 224-252.
- Manis, P. B. and Marx, S. O.** (1991). Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J. Neurosci.* **11**, 2865-2880.
- Marder, E.** (2002). Non-mammalian models for studying neural development and function. *Nature.* **417**, 318-321. Review.
- Marr, D.** (1982). *Vision*. New York: Freeman.

- McCulloch, W. S. and Pitts, W.** (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull. Math. Biophys.* **5**, 115-133.
- Migliaro, A., Caputi, A. A. and Budelli, R.** (2005). Theoretical analysis of prereceptor image conditioning in weakly electric fish. *PLoS Comput. Biol.* **1**, 123-131.
- Migliore, M. and Shepherd, G. M.** (2005). An integrated approach to classifying neuronal phenotypes. *Nature Reviews Neuroscience.* **6**, 810-818.
- Mohres, F. P.** (1957). Elektrische Entladungen im Dienste der Revierabgrenzung bei Fischen. *Naturwissenschaften.* **44**, 431-432.
- Moiseff, A. and Konishi, M.** (1983) Binaural characteristics of units in the owl's brainstem auditory pathway: precursors of restricted spatial receptive fields. *J. Neurosci.* **3**, 2553-2562.
- Moller, P.** (1995). *Electric Fishes: History and Behavior.* London: Chapman & Hall.
- Moody, W. J. and Bosma, M. M.** (2005). Ion Channel Development, Spontaneous Activity, and Activity-Dependent Development in Nerve and Muscle Cells. *Physiol. Rev.* **85**, 883-894.
- Nogueira, J., Castelló, M.E. and Caputi, A.A.** (2006). The role of single spiking spherical neurons in a fast sensory pathway. *J. Exp. Biol.* **209**, 1122-1134.
- Oertel, D., Bal, R., Gardner, S. M., Smith, P. H. and Joris, P. X.** (2000). Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11773-11779.
- Parameshwaran, S., Carr, C.E. and Perney, T.M.** (2001). Expression of the Kv3.1 potassium channel in the avian auditory brainstem. *J. Neurosci.* **21**, 485-494.
- Paz, J. T., Christian, C. A., Parada, I., Prince, D. A. and Huguenard, J. R.** (2010). Focal cortical infarcts alter intrinsic excitability and synaptic excitation in the reticular thalamic nucleus. *J. Neurosci.* **30**, 5465-5479.
- Pereira, A. C. and Caputi, A. A.** (2010). Imaging in electrosensory systems. *Interdiscip. Sci.* **2**, 291-307.
- Pereira, A. C., Centurion, V. and Caputi, A. A.** (2005). Contextual effects of small environments on the electric images of objects and their brain evoked responses in weakly electric fish. *J. Exp. Biol.* **208**, 961-972.
- Poulet, J. F. and Hedwig, B.** (2006). The cellular basis of a corollary discharge. *Science.* **311**, 518-522.
- Prescott, S. A., De Konink, Y.** (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the pinal dorsal horn of the adult rat. *J. Physiol.* **539**, 817-836.
- Rall, W.** (1957). Membrane time constant of motoneurons. *Science.* **126**, 454.
- Raman, I. M. and Trussell, L. O.** (1992). The kinetics of the response to glutamate and kainate in neurons of the avian cochlear nucleus. *Neuron.* **9**, 173-186.
- Ramón y Cajal, S.** (1899-1905). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.* Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya.
- Randall, A. D., Booth, C. and Brown, J. T.** (2012). Age-related changes to Na(+) channel gating contribute to modified intrinsic neuronal excitability. *Neurobiol. Aging.* **33**, 2715-2720.

- Rathouz, M. and Trussell, L.** (1998). A characterization of outward currents in neurons of the nucleus magnocellularis. *J. Neurophysiol.* **80**, 2824–2835.
- Réthelyi, M. and Szabo, T.** (1973). Neurohistological analysis of the lateral lobe in a weakly electric fish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Exp. Brain. Res.* **18**, 323-339.
- Reyes, A.** (2001). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 653–675.
- Reyes, A. D., Rubel, E. W., Spain, W. J.** (1996) In vitro analysis of optimal stimuli for phase-locking and time-delayed modulation of firing in avian nucleus laminaris neurons. *J. Neurosci.* **16**, 993–1007.
- Reyes, A. D., Rubel, E.W. and Spain, W.J.** (1994). Membrane properties underlying the firing of neurons in the avian cochlear nucleus. *J. Neurosci.* **14**, 5352-5364.
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R. and Albert, J. S.** (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a model species in neurophysiological research. *Copeia.* **3**, 538–544.
- Schlegel, P. A.** (1973). Perception of objects in weakly electric fish *Gymnotus carapo* as studied in recordings from rhombencephalic neurons. *Exp. Brain. Res.* **18**, 340-354.
- Schlegel, P. A.** (1977). Electrosensitive single units in the mesencephalic magnocellular nucleus of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Exp. Brain. Res.* **29**, 201-218.
- Scott, L. L., Mathews, P. J. and Golding, N. L.** (2005). Posthearing developmental refinement of temporal processing in principal neurons of the medial superior olive. *J. Neurosci.* **25**, 7887-7895.
- Sjöström, P. J., Rancz, E. A., Roth, A. and Häusser, M.** (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* **88**, 769-840.
- Soares, D., Chitwood, R. A., Hyson, R. L. and Carr, C. E.** (2002). Intrinsic Neuronal Properties of the Chick Nucleus Angularis. *J. Neurophysiol.* **88**, 152-162.
- Sommer, M. A. and Wurtz, R. H.** (2002). A pathway in primate brain for internal monitoring of movements. *Science.* **296**, 1480-1482.
- Sperry, R.W.** (1950). Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visual inversion. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **43**, 482-489.
- Storm, J. F.** (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog. Brain. Res.* **83**, 161-187.
- Sullivan, W. E. and Konishi, M.** (1986). Neural map of interaural phase difference in the owl's brainstem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8400-8404.
- Svirskis, G., Kotak, V., Sanes, D. H. and Rinzel, J.** (2004). Sodium along with lowthreshold potassium currents enhance coincidence detection of subthreshold noisy signals in MSO neurons. *J. Neurophysiol.* **91**, 2465–2473.
- Szabo, T.** (1967). Activity of peripheral and central neurons involved in electroreception. In *Lateral line detectors* (ed. P. Cahn), pp. 295–311. Indiana University Press.

- Szabo, T.** (1974). Central processing of messages from tuberous electroreceptors in Teleosts. In *Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates. Handbook of Sensory Physiology, Vol. III/3* (ed. A. Fessard), pp. 95-124., New York: Springer.
- Szabo, T. and Fessard, A.** (1974). Physiology of electroreceptors. In: Fessard, A. (Ed.), *Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates. Handbook of Sensory Physiology*, vol. III/3. Springer, New York, pp. 95–124.
- Szabo, T., Sakata, H. and Ravaille, M.** (1975). An electrotonically coupled pathway in the central nervous system of some teleost fish, Gymnotidae and Mormyridae. *Brain. Res.* **95**, 459-474.
- Trussell, L. O.** (1997). Cellular mechanisms for preservation of timing in central auditory pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 487-492. Review.
- Trussell, L. O.** (1999). Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons. *Annu Rev Physiol.* **61**, 477-496. Review
- Turner, R. W., Maler, L., Deerinck, T., Levinson, S. R. and Ellisman, M. H.** (1994). TTX-sensitive dendritic sodium channels underlie oscillatory discharge in a vertebrate sensory neuron. *J. Neurosci.* **14**, 6453-6471
- von der Emde, G. and Schwarz, S.** (2002). Imaging of objects through active electrolocation in *Gnathonemus petersii*. *J. Physiol. Paris.* **96**, 431-444.
- von Holst, E. and Mittelstaedt, H.** (1950). Das Reafferenzprinzip. *Naturwissenschaften.* **37**, 464-467.
- Wagner, H., Brill, B., Kempter, R. and Carr, C. E.** (2005). Microsecond Precision of Phase Delay in the Auditory System of the Barn Owl. *J. Neurophysiol.* **94**, 1655-1658.
- Wang, L.Y., Gan, L., Forsythe, I.D. and Kaczmarek, L.K.** (1998). Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *J. Physiol. (Lond).* **509**, 183–194.
- Wessberg, J. and Vallbo, A. B.** (1995). Coding of pulsatile motor output by human muscle afferents during slow finger movements. *J. Physiol.* **485**, 271-282.
- Wessberg, J. and Vallbo, A. B.** (1996). Pulsatile motor output in human finger movements is not dependent on the stretch reflex. *J. Physiol.* **493**, 895-908.
- Westby, G. W. M.** (1974). Assessment of the signal value of certain discharge patterns in the electric fish *Gymnotus carapo* by means of playback. *J. Comp. Physiol. A.* **92**, 327-341.
- Westby, G. W. M.** (1975). Has the latency dependent response of *Gymnotus carapo* to discharge triggered stimuli a bearing in electric fish communication? *J. Comp. Physiol. A.* **96**, 307-341.
- Westby, G. W. M.** (1979). Electrical communication and jamming avoidance between resting *Gymnotus carapo*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **4**, 381-393.
- Westby, G. W. M.** (1981). Communication and jamming avoidance in electric fish. *Trends in Neurosci.* **4**, 205-210.
- Xu-Friedman, M. A. and Hopkins, C. D.** (1999). Central mechanisms of temporal analysis in the knollenorgan pathway of mormyrid electric fish. *J. Exp. Biol.* **202**, 1311-1318.
- Zakon, H. H.** (1986). The electroreceptive periphery. In *Electroreception* (ed. T. H. Bullock and W. Heiligenberg), pp. 577–612. New York: Wiley.

PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DE ESTA TESIS

Artículos

Nogueira, J., Castelló, M.E. and Caputi, A.A. (2006). The role of single spiking spherical neurons in a fast sensory pathway. *J. Exp. Biol.* **209**, 1122-1134.

Nogueira J., Caputi Á.A. Timing actions to avoid refractoriness: a simple solution for streaming sensory signals. *PLoS One*. 2011;6(7):e22159.

Revisiones

Castelló M.E., Nogueira J., Trujillo-Cenóz O., Caputi A.A. Sensory processing in the fast electrosensory pathway of pulse gymnotids studied at multiple integrative levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008 Nov;151(3):370-80. Epub 2007 Apr 22. Review.

Caputi A.A., Castelló M.E., Aguilera P.A., Pereira C., Nogueira J., Rodríguez-Cattaneo A., Lezcano C. Active electroreception in *Gymnotus omari*: imaging, object discrimination, and early processing of actively generated signals. *J Physiol Paris*. 2008 Jul-Nov;102(4-6):256-71.

Capítulos de libro:

Caputi A.A., Nogueira J. Identifying self- and nonself-generated signals: lessons from electrosensory systems. *Adv Exp Med Biol*. 2012;739:107-25.

Artículos en preparación:

Nogueira J., Caputi A.A. Pharmacological study of the one-spike-spherical neuron phenotype in the electrosensory lobe of *Gymnotus omarorum*.