

## Tesis de Posgrado

# Neuromodulación en el sistema nervioso de la Sanguijuela Hirudo medicinalis

Marín Burgin, Antonia

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Marín Burgin, Antonia. (2000). Neuromodulación en el sistema nervioso de la Sanguijuela Hirudo medicinalis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3257\\_MarinBurgin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3257_MarinBurgin.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Marín Burgin, Antonia. "Neuromodulación en el sistema nervioso de la Sanguijuela Hirudo medicinalis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3257\\_MarinBurgin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3257_MarinBurgin.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires**

**Tesis Doctoral**



**Neuromodulación en el Sistema Nervioso de la Sanguijuela  
*Hirudo medicinalis***

**Autora: Antonia Marín Burgin**

**Directora: Dra. Lidia Szczupak**

**Lugar de trabajo:**

**Laboratorio de Neurociencias - Facultad de Medicina, UBA  
(1996-1998)**

**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA  
(1998-1999)**

**-2000-**



3257

# **Neuromodulación en el Sistema Nervioso de la Sanguijuela**

## ***Hirudo medicinalis***

Tesis Doctoral de la Lic. Antonia Marín Burgin

Directora: Dra. Lidia Szczupak

### **RESUMEN**

La serotonina es un neuromodulador presente en diversos organismos, cuya regulación endógena es aún materia de investigación. En la sanguijuela *Hirudo medicinalis* 50% de la serotonina neuronal se encuentra en el par de células Retzius (Rz).

Los objetivos de este trabajo fueron analizar: I) los componentes que median la entrada de señales mecanosensoriales a las neuronas Rz y, II) la modulación colinérgica de las neuronas Rz.

Los resultados indican que:

**I.** La señal mecanosensorial provocó respuestas complejas en un par de interneuronas pasivas, las células 151, que mostraron una alta correlación temporal con las respuestas de las neuronas Rz. La hiperpolarización de las células 151 desacoplaron a las neuronas Rz de la entrada mecanosensorial. Los resultados sugieren que las señales mecanosensoriales que excitan a las neuronas Rz son pre-procesadas por el par de células pasivas.

**II.** Utilizando inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se estudiaron los efectos de fuentes endógenas de acetilcolina (ACh) sobre las neuronas Rz. Se reveló la existencia de una liberación espontánea de ACh que, en condiciones fisiológicas, generó un tono colinérgico capaz de regular el potencial de membrana de las neuronas Rz.

### **PALABRAS CLAVES**

*Hirudo medicinalis*, serotonina, neuromodulación, neuronas pasivas, neuronas sensoriales, acetilcolina.

# **Neuromodulation in the Nervous System of the Leech *Hirudo medicinalis***

Doctoral Thesis by Antonia Marín Burgin

Supervised by Dr. Lidia Szczupak

## **ABSTRACT**

Serotonin modulates motor behaviors in different organisms. In the leech *Hirudo medicinalis* more than 50% of the neuronal serotonin is contained in the pair of Retzius (Rz) cells.

The goals of this work were to analyze: I) the neuronal elements that mediate the mechanosensory input onto the Rz neurons and, II) the cholinergic modulation of the Rz neurons.

The results indicate that:

**I.** The sensory input produced complex responses in the pair of nonspiking neurons, cells 151, that were highly correlated with the responses of the Rz neurons. Hyperpolarization of the cells 151 uncoupled the responses of the Rz neurons from the mechanosensory input. The results suggest that the mechanosensory signals that excite the Rz neurons are pre processed by the pair of nonspiking neurons.

**II.** Using inhibitors of the acetylcholinesterase (AChE) activity we studied the effects of endogenous ACh on Rz cells. We found a spontaneous ACh release that, in physiological conditions, generated an ACh tonus that regulated the membrane potential of the Rz neurons.

## **KEY WORDS**

*Hirudo medicinalis*, serotonin, neuromodulation, nonspiking neurons, sensory neurons, acetylcholine.

## AGRADECIMIENTOS

A Lidia por todo lo que día a día me doy cuenta que aprendí de ella y con quien disfruté mucho del gustito de investigar.

A Pablo por que me dió fuerza y me ayudó en todo momento con amor.

A mis compañeros del laboratorio Irene, Oscar, Pedro por su afecto y por divertimos juntos en los días de trabajo.

A los del laboratorio de medicina Diego, Paola, Gabriela, Ruth, Inés, Dieguito y a los numerosos integrantes del nuevo laboratorio que alegraron mis últimos días de Tesis.

A mis amigos de la facu Fede, Carlos, Kari, Mariano, Mariajo, Marcelito y muchos otros por haberla pasado tan bien con ellos durante largos años en la UBA. Y al resto de mis amigos que me alegran la vida.

A mi familia Lito, Cristina, Guada, Leo, Teresita, Cacho, Leti por apoyarme siempre. Y a mi familia elegida Bruno, Nico, Mariana, Fede, Clea, Natalia, Pablo F., Kari, Norah, Malala, Ana, Tomás, Lucio, Santa.

A Daniel Goldstein por la pasión con que piensa la biología y con quien me encantó dar clases.

A mis compañeros más politiqueros con los que compartí largas horas de discusiones enriquecedoras en Impaciencia.

A Osvaldo Uchitel por los cursos de postgrado que organizó y disfruté.

A Oscar por los análisis de correlación.

A Paula por los trámites y a Gustavito por la escaneada.

Al laboratorio de Fisiología de Insectos por el uso de la impresora.

El presente trabajo recibió apoyo financiero de Human Frontier for Science Research, Strasburg, Francia.

Marín Burgin, A.

*A Pablo*

## ÍNDICE

Resumen en idioma español	2
Resumen en idioma inglés	3
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
Circuitos Neuronales	9
Neuromodulación	10
Neuromodulación Serotoninérgica	11
La Sanguijuela <i>Hirudo medicinalis</i>	12
Anatomía y Fisiología de su Sistema Nervioso	12
Comportamientos en la Sanguijuela	14
Neuromodulación Serotoninérgica en Sanguijuela	15
<b>OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS</b>	18
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Preparación biológica	20
Registros electrofisiológicos	21
Células estudiadas	22
Células Rz	22
Células P	22
Células 151	22
Otras células	23
Análisis de los resultados	24
Análisis de los resultados de la parte I	24
Análisis de los resultados de la parte II	25
Soluciones y drogas	25

<b><u>PARTE I. Rol de la interneurona pasiva 151 en la vía que conecta las células mecanosensoriales P con las neuronas serotoninérgicas Rz</u></b>	26
<b>CAPÍTULO 1. Conectividad sináptica entre las neuronas pasivas 151 y las neuronas serotoninérgicas Rz.</b>	26
Resultados	28
Interacción entre las neuronas 151 y Rz	28
Conectividad entre las neuronas 151 y Rz	32
Discusión	32
<b>CAPÍTULO 2. Interacción sináptica entre las neuronas 151 y las neuronas mecanosensoriales P</b>	35
Resultados	35
Interacción entre las neuronas mecanosensoriales P y las células 151	35
Análisis sobre la especificidad del campo de inervación	41
Conectividad entre las neuronas P y 151	42
Discusión	44
<b>CAPÍTULO 3. Procesamiento de las señales sensoriales en la neurona 151</b>	46
Resultados	46
Dependencia de la respuestas de las células 151 a la estimulación de células P con trenes de disparos de diferente duración	46
Dependencia de las respuestas de las células 151 a la estimulación de células P con trenes a diferente frecuencia de disparo	49
Discusión	53
<b>CAPÍTULO 4. La neurona 151 en el circuito P-Rz.</b>	
Resultados	56
Respuestas de las neurona 151 y Rz a la estimulación de la célula P	56
Papel de la neurona 151 en el circuito P-Rz	59
Discusión	63
Conclusiones	65

<b><u>PARTE II. ACh como modulador de la actividad de células Rz</u></b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 5. Caracterización fisiológica y farmacológica del efecto de inhibidores de la AChE sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz</b>	<b>72</b>
Resultados	72
Efecto de los inhibidores de la AChE sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz	72
Análisis de la dinámica de la respuesta de los inhibidores de la AChE	74
Dependencia de la despolarización inducida por inhibidores de AChE con la concentración de calcio extracelular	77
Características farmacológicas de la despolarización inducida por inhibidores de AChE	79
Discusión	80
Liberación basal de ACh en ganglios de sanguijuela	80
Perfil farmacológico de la respuesta inducida por inhibidores de AChE	82
<b>CAPÍTULO 6. Especificidad del efecto de inhibidores de AChE</b>	<b>83</b>
Resultados	83
Especificidad de segmento	83
Especificidad celular	84
Discusión	86
Especificidad de segmento de la respuesta	86
Especificidad celular de la respuesta	86
<b>CAPÍTULO 7. Efecto de antagonistas colinérgicos sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz</b>	<b>88</b>
Resultados	88
Discusión	90
<b>REFERENCIAS</b>	<b>92</b>

## INTRODUCCION GENERAL

### **Circuitos Neuronales**

Uno de los temas centrales en el campo de las Neurociencias es dilucidar los mecanismos por los cuales el sistema nervioso genera comportamientos complejos en base a las percepciones sensoriales. Esto significa entender la manera en que opera una compleja red de neuronas interconectadas, a través de la cual las señales captadas por las neuronas sensoriales son transmitidas a neuronas efectoras de distinto tipo (motoras, neurosecretoras, etc.) que finalmente determinan un patrón de comportamiento. Ya hacia 1960 se conocían en forma detallada los principios básicos sobre excitabilidad y transmisión sináptica dados por los experimentos realizados por Hodgking y Huxley (1952) en el axón gigante del calamar, por Katz (1966) en la placa neuromuscular y por Eccles (1964) en neuronas motoras espinales, entre otros. La idea básica que surgió a través de estos trabajos era que conociendo las conexiones entre los elementos de una red se podía conocer su rol funcional, es decir, de la conectividad emergía la función (Bentley & Konishi, 1978). Sin embargo si bien las redes pueden ser definidas en términos de las conexiones monosinápticas de las neuronas que las componen, los circuitos funcionales no son el producto de la suma algebraica de las operaciones posibles. El conocimiento de la conectividad entre las neuronas es esencial, pero las operaciones de las redes no pueden ser definidas, sin más, a partir de este conocimiento. El patrón de actividad de una red neuronal, está dado por la “fuerza relativa” de las conexiones sinápticas, su curso temporal, y las propiedades electrofisiológicas de cada neurona a lo largo de una vía. Además, las redes biológicas incluyen numerosas vías paralelas que convergen en un resultado conductual único. De esta manera, surgen “propiedades emergentes” de la actividad simultánea de las distintas conexiones que no pueden ser previstas a partir de la acumulación de datos puntuales.

En resumen, para entender cómo se implementa una función a través de una red neuronal, es importante identificar los “bloques de construcción” celulares, sinápticos y de conectividad y la manera en que los mismos interaccionan ante diversos estímulos y bajo diferentes condiciones (Getting, 1989; Bullock, 1993). Es aquí donde la utilización de modelos animales con sistemas nerviosos relativamente simples se hace fundamental, es decir, se requiere de sistemas nerviosos que posean un número pequeño

de neuronas reconocibles, en donde se puedan estudiar las interacciones entre las mismas en forma repetible.

## Neuromodulación

La dinámica de un circuito depende, entre otras cosas, de la interacción entre las propiedades intrínsecas y las propiedades sinápticas de las neuronas. Las propiedades intrínsecas resultan del ensamblaje de canales iónicos en la membrana celular y dan lugar a características fisiológicas tales como los disparos rítmicos, la capacidad de generar potenciales de tipo plateau, la excitación post-hiperpolarización y la capacidad de disparar sin necesidad de un entrada sináptica (Kandel & Spenser, 1961; Russel & Hartline, 1978; Deschenes *et al.*, 1984; Llinás & Yarom, 1986; Lopez-Barneo & Llinás, 1988). En el sistema nervioso se liberan sustancias que pueden modificar el tipo, número y/o propiedades cinéticas de estos canales iónicos y por lo tanto cambiar la relación entrada/salida (Kaczmarek & Levitan, 1987).

Por otro lado, estos neuromoduladores pueden también cambiar la cantidad de neurotransmisor liberado de terminales sinápticos y/o la respuesta post sináptica (Marder & Calabrese, 1996). Aminas como la serotonina modulan, por ejemplo, la amplitud de potenciales de placa de varios crustáceos a nivel de la placa neuromuscular (Kravitz, 1988; Dixon & Atwood, 1989). En este caso, la modulación en la eficacia sináptica lleva directamente a un cambio en el comportamiento. Esto implica que las redes neuronales no son funcionalmente rígidas; sus propiedades cambian por la acción de diferentes agentes neuromoduladores que alteran los parámetros antes mencionados. El efecto resultante de la modulación sináptica en una red asociada a un comportamiento equivale a un re-cableado (rewiring) de la red. Fortaleciendo unas interacciones y debilitando otras, las entradas neuromodulatorias pueden en esencia crear nuevos circuitos funcionales a partir del mismo circuito anatómico, y así generar diferentes comportamientos ante un mismo estímulo en diferentes contextos (Harris-Warrick & Marder, 1991; Marder y Calabrese, 1996; Marder, 1998). El concepto de reordenamiento de la conectividad funcional se ha aplicado para estudiar circuitos asociados al nado en *Tritonia* (Getting & Denkin, 1985), circuitos espinales (Baldissera *et al.*, 1981), y diferencias en la expresión de reflejos bajo distintos modos de locomoción en humanos (Capaday & Stein, 1986).

Existen efectos moduladores a distintos niveles del sistema nervioso. A nivel periférico, en músculos y placa neuromuscular (Calabrese, 1989; Belanger & Orchard, 1993; Church *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1993), órganos sensoriales (Dowling, 1989; Pasztor, 1989; Hayashi *et al.*, 1993; Thrombley & Shepherd, 1993); a nivel central, en neuronas motoras y neuronas centrales (Mulloney *et al.*, 1987; Dickinson, 1989; Sigvard, 1989).

Las sustancias moduladoras son de diversos tipos e incluyen a aminas (dopamina, octopamina, serotonina) y péptidos (proctolina), así como algunos neurotransmisores clásicos como la acetilcolina (Flamm & Harris-Warick, 1986; Beltz & Kravitz, 1987; Kaczmarek & Levitan, 1987; Harris-Warick, 1988; Marder & Meyrand, 1989; Marder & Calabrese, 1996). En general, en los circuitos motores centrales, las neuronas que producen efectos moduladores “residen” funcionalmente fuera del circuito al que modulan, es decir, la modulación es extrínseca (Harris-Warrick, 1988; Harris-Warrick & Marder, 1991; Jordan *et al.*, 1992; Woolston *et al.*, 1994). Existen casos, en cambio, en los que la neurona moduladora forma parte del circuito al que modula. Un ejemplo de éstas se da en *Tritonia diomedea* en donde la neurona serotoninérgica DSI (“dorsal swim interneuron”) es componente intrínseco del circuito generador del patrón motor que produce la natación y al mismo tiempo modula las propiedades de neuronas y sinapsis de la misma red. La acción fásica y moduladora de las neuronas DSI están mediadas por la serotonina, que actúa vía receptores con perfil farmacológico distinto (Katz & Frost, 1994).

### **Neuromodulación serotoninérgica**

La serotonina es una amina endógena que, como se describió brevemente en ejemplos anteriores, modula distintas conductas locomotoras, defensivas y alimentarias, afectando no sólo su ejecución sino también la probabilidad con que se llevan a cabo (Kupfermann & Weiss, 1981; Williard, 1981; Benjamin & Elliot, 1989; Hollister & Calghorn, 1993; Mangan *et al.*, 1994 a y b). El rol neuromodulador de la serotonina ha sido conservado a lo largo de la evolución y se manifiesta tanto en organismos invertebrados como en vertebrados (Mackey & Carew, 1983; Harris-Warrick & Cohen, 1985; Cazalets *et al.*, 1992; McClellan *et al.*, 1994; Woolston *et al.*, 1994). En humanos, se observa que drogas que afectan el metabolismo de la serotonina, incrementando su nivel en el espacio extracelular del sistema nervioso central, sirven como eficaz

tratamiento para diversos síndromes depresivos (Whitaker-Azmitia & Peroutka, 1990; Hollister & Calghorn, 1993).

La neuromodulación serotoninérgica ha sido estudiada mayormente en términos de las acciones producidas por aplicación exógena de serotonina y se conoce relativamente poco sobre la forma en que se regula su liberación de fuentes endógenas. La dificultad para clarificar el rol de la serotonina endógena reside, probablemente, en la alta complejidad de las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas en el sistema nervioso central y periférico de la mayoría de los organismos utilizados como modelo de estudio. Por ello, y dado el alto grado de conservación evolutivo de la serotonina como neuromodulador, es valioso enfocar el estudio en organismos invertebrados cuyos comportamientos están controlados por sistemas nerviosos relativamente simples. Tal es el caso de las sanguijuelas.

### **La sanguijuela *Hirudo medicinalis*.**

#### **Anatomía y Fisiología de su sistema nervioso**

La sanguijuela *Hirudo medicinalis* es un anélido cuyo organismo está dividido en 32 segmentos y un prostomium no segmental. La simplicidad de su esquema corporal se refleja en la estructura de su sistema nervioso. Este consiste en una cadena de ganglios que se comunican entre sí a través de guías de axones llamadas conectivos (Figura I.1). En los extremos del sistema nervioso se encuentran ganglios fusionados que forman el ganglio rostral o de la cabeza (R1-R4) y el ganglio caudal o de la cola del animal (C1-C7) (ver Payton, 1981).

Los ganglios medios (M1-M21) son muy similares entre sí y entre individuos, lo cual ha permitido trazar un mapa (ver Figura M.2) que grafica la ubicación y el tamaño de las neuronas que los componen (Muller *et al.*, 1981). Cada ganglio contiene alrededor de 200 pares bilaterales de neuronas y unas pocas neuronas impares. Se han identificado varias de las neuronas, en particular las neuronas sensoriales sensibles a estímulos mecánicos ejercidos sobre la pared corporal, las motoneuronas asociadas a los distintos grupos de fibras musculares, interneuronas intervinientes en diferentes circuitos motores y neuronas de acción modulatorias. Tal identificación se realiza en base a la ubicación del soma neuronal en el ganglio y a propiedades electrofisiológicas particulares.

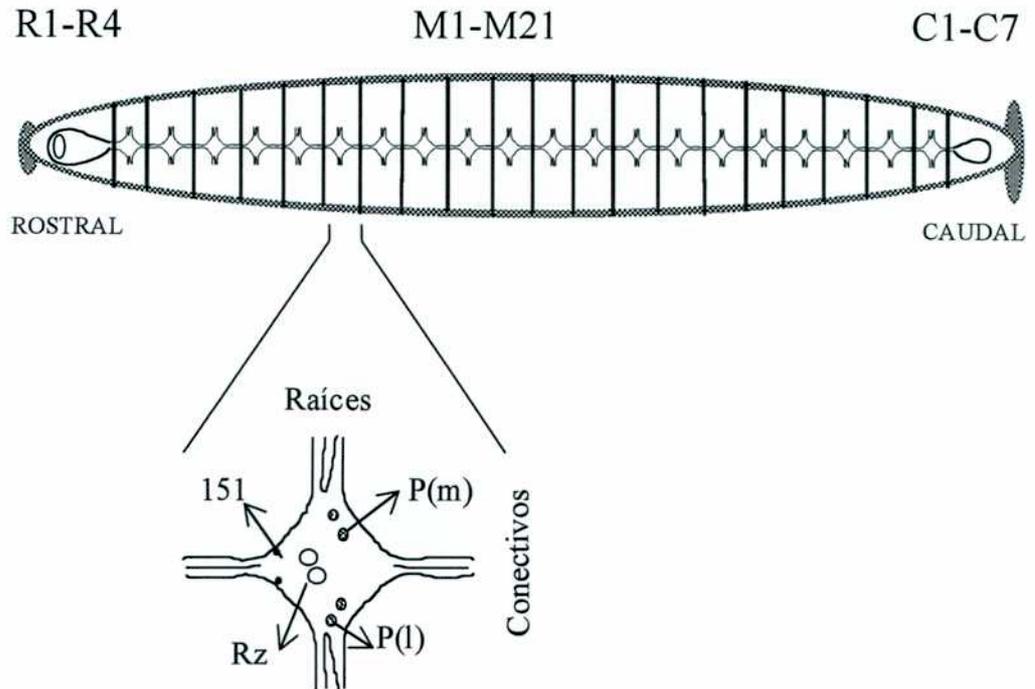


Figura I.1 Esquema del cuerpo del anélido *Hirudo medicinalis*. **R** segmentos rostrales, **M** segmentos medios y **C** segmentos caudales. Se observa el cordón nervioso con los ganglios correspondientes a cada segmento. La ampliación muestra un esquema de un ganglio en el que se observa la ubicación de las neuronas P, Retzius (Rz) y 151. Para los experimentos se utilizaron ganglios de los segmentos medios.

En cada ganglio existen tres tipos de neuronas mecanosensoriales que inervan la pared del cuerpo: las células T (responden a tacto), N (responden a estímulos nociceptivos) y P (responden a presión) (Nichols & Baylor, 1968). Cada una inerva una región definida (dorsal, ventral o lateral) de la pared corporal del segmento correspondiente, al que llegan a través de las raíces. Unas de las más estudiadas en asociación con diversos comportamientos son las células P. Existen cuatro células P por ganglio que tienen sus campos receptivos primarios ubicados en cada uno de los cuatro cuadrantes en que se divide la pared del cuerpo del animal: Pd, dorsal (derecho e izquierdo) y Pv, ventral (derecho e izquierdo) (Nichols & Baylor, 1968); estas tienen además campos receptivos secundarios en el cuadrante correspondiente de los dos segmentos adyacentes (Yau, 1976). Una presión aplicada en un punto de la pared del

cuerpo del animal puede activar hasta tres células P, una en su campo receptivo primario y dos en los secundarios, sin embargo los últimos tienen umbrales de activación mayores y por lo tanto con una presión débil se puede activar una única célula P.

Han sido descritos 17 pares de neuronas motoras que inervan grupos musculares definidos (Stuart, 1970). Los músculos están ubicados en 3 capas. Directamente debajo de la piel se encuentra la capa de fibras circulares que al contraerse constriñen el diámetro transversal y consecuentemente favorecen la elongación del animal. En la capa interna se encuentran las fibras longitudinales que al contraerse producen el acortamiento del animal. Y la capa intermedia esta compuesta por fibras oblicuas entrecruzadas que permiten una mayor ductilidad de los movimientos de elongación y acortamiento. Además, existen músculos dorso-ventrales que al contraerse achatan al animal. La piel de cada segmento se divide en cinco ámulos y estos están inervados por músculos que permiten su erección, tal que la piel cobra una apariencia de indentaciones profundas.

Han sido descritas dos grupos de neuronas con efectos neuromodulatorios. La activación de las neuronas Leydig modula la desviación lateral (Lockery & Kristan, 1991), mientras que la activación de las neuronas Rz modulan una serie de patrones motores que se detallarán más adelante.

## **Comportamientos en la sanguijuela**

El comportamiento en la sanguijuela consiste en un repertorio simple de movimientos llevados a cabo por grupos musculares bien definidos e inervados por motoneuronas identificadas. Al ser un organismo formado por una repetición de unidades funcionales (segmentos), la sanguijuela es capaz de producir comportamientos “locales”, que involucran un único segmento (acortamiento longitudinal local, desplazamiento lateral local), o “globales” que involucran varios segmentos (natación, acortamiento longitudinal, desplazamiento sobre ventosas). Así, su sistema nervioso contiene elementos segmentales e intersegmentales que funcionan en cada uno de estos comportamientos.

En la sanguijuela han sido descritas las redes de procesamiento asociadas a comportamientos tales como la natación (Stent *et al.*, 1978; Kristan & Weeks, 1983; Friesen, 1989 a y b, Brodfuehrer *et al.*, 1995), el desplazamiento lateral local (Kristan

1982, Lockeley & Kristan 1990 a y b, Kristan *et al.* 1995), el acortamiento longitudinal (Wittenberg & Kristan 1992 a y b, Kristan *et al.* 1995, Shaw & Kristan 1995), y el desplazamiento sobre ventosas (Baader & Kristan 1995, Baader 1997). El estímulo que desencadena dichos comportamientos es el mecanosensorial (Kristan *et al.*, 1982). Los circuitos neurales de estas respuestas han sido investigados en función de las neuronas sensoriales y las motoneuronas, y en menor medida, en términos de las interneuronas involucradas en el procesamiento de estos circuitos.

La mayoría de los comportamientos utiliza el mismo grupo de motoneuronas para generar el movimiento muscular apropiado, por ejemplo, las mismas motoneuronas que excitan los músculos longitudinales o los inhiben se usan con patrones temporales y espaciales diferentes durante el nado, la fase de contracción del desplazamiento sobre ventosas y durante el acortamiento ante un estímulo aversivo (Kristan *et al.*, 1982). Por lo tanto, la generación de los distintos comportamientos deberá estar dado en el procesamiento que realizan las interneuronas a partir de la entrada sensorial.

### **Neuromodulación serotoninérgica en sanguijuela**

En los ganglios medios de la sanguijuela existen tres pares de neuronas serotoninérgicas: las células Retzius (Rz) que son de gran tamaño y contienen más del 50% de la serotonina ganglionar y las interneuronas 21 y 61 (McAdoo & Coggeshall, 1976).

En la sanguijuela, la serotonina modula la natación (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989), el acortamiento defensivo (Wittenberg & Kristan, 1992a) y la alimentación (Dickinson & Lent, 1984; Lent & Dickinson, 1984b; Lent *et al.*, 1991). Dichos efectos han sido estudiados a distintos niveles: como mediciones de contenido de serotonina endógena en asociación con comportamientos, por depleción de serotonina, por aplicación de serotonina exógena observando sus efectos comportamentales y sobre el sistema nervioso central, o por estimulación de las neuronas serotoninérgicas Rz.

Los niveles de serotonina endógena, medidos en el sistema nervioso y en la sangre de la sanguijuela, mantienen una correlación directa con su nivel de actividad. Los animales que muestran una alta frecuencia de episodios de nado presentan mayores niveles de serotonina en sangre que los animales inactivos (Willard, 1981). Además,

existe una correlación entre el estado nutricional de los animales y los niveles de serotonina endógena, tal que animales hambrientos poseen niveles mayores de serotonina que animales recién alimentados (Lent *et al.*, 1991).

La depleción de serotonina inducida químicamente o el bloqueo de receptores de serotonina elimina los comportamientos de nado y alimentación (Glover & Kramer, 1982; Lent, 1984; Lent & Dickinson, 1984a; Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989; O'Gara *et al.*, 1991).

A nivel del sistema nervioso central, la aplicación de serotonina exógena aumenta tanto la frecuencia como la duración de los disparos de potenciales de acción de las motoneuronas involucradas en la respuesta de acortamiento longitudinal (Wittenberg & Kristan 1992a). En estudios realizados en preparaciones semi intactas o en cordón nervioso aislado el agregado de serotonina exógena facilita la evocación de episodios de “nado ficticio” (Williard, 1981). En ambos casos el registro de la actividad del nervio dorsal posterior de un ganglio de la cadena, permite evidenciar la evocación de ciclos de nado a través de la aparición de ráfagas de disparos periódicas, que se corresponden con la actividad de las motoneuronas que comandan el movimiento de natación (Debsky & Friesen, 1987). La serotonina evoca episodios espontáneos de nado ficticio en estas preparaciones, pero no afecta la duración de los episodios (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989). El aumento de la frecuencia de los episodios de nado inducidos por serotonina se debe a sus efectos sobre la interneurona iniciadora del nado, la célula 204 (Angstadt & Friesen, 1993). Además, la serotonina también afecta las propiedades de membrana y sinápticas de varias motoneuronas que participan de la red oscilatoria del nado (Friesen, 1989 a y b; Mangan *et al.* 1994 a y b).

Como se mencionó anteriormente, la fuente principal de serotonina en el sistema nervioso central de la sanguijuela son las neuronas Rz (McAdoo & Coggeshall, 1976). La estimulación intensa de las células Rz aumenta la tasa de relajación de los músculos de la pared del cuerpo del animal que le permiten una alteración más rápida de la tensión muscular, y también afecta directamente a motoneuronas específicas que inervan los músculos longitudinales, facilitando los eventos motores que llevan a las ondulaciones del nado (Mason *et al.*, 1979; Willard 1981; Mason & Kristan 1982).

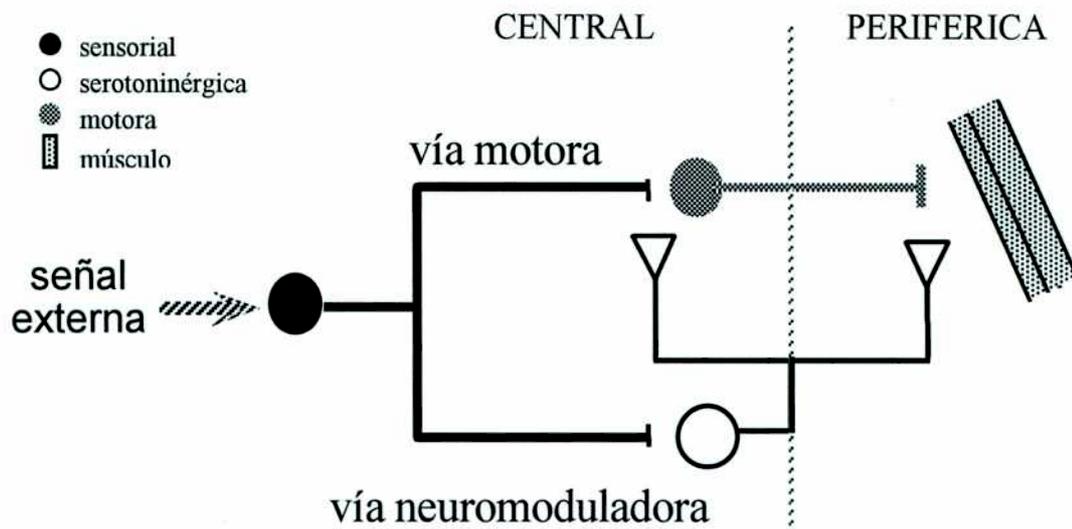
Además del acople eléctrico con su homóloga bilateral (Hagiwara & Morita, 1962; Eckert, 1963;), la célula Rz recibe estímulos excitatorios de las neuronas mecanosensoriales P (Wittenberg *et al.*, 1990). Esta señal es transmitida a través de una vía polisináptica que abarca toda la cadena ganglionar (Szczupak & Kristan, 1995).

Por lo tanto, la señal mecanosensorial es guiada en paralelo a dos vías: la vía motora, responsable directa de la generación del patrón de movimientos, y la vía moduladora serotoninérgica, capaz de regular a la vía motora. De la interacción entre ambas vías se generan los diversos comportamientos inducidos por estímulos mecanosensoriales. De esta manera, resulta importante conocer la capa interneuronal que vehiculiza la señal mecanosensorial a ambas vías. Las interneuronas que median la actividad motora han sido ampliamente descritas, mientras que se desconoce la capa interneuronal que transmite información a las neuronas serotoninérgicas. El objetivo general en que se enmarca el presente trabajo de tesis es la investigación de las aferencias sinápticas de las neuronas Rz.

## OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo el estudio de la regulación del sistema serotoninérgico en la sanguijuela, concentrándonos en mecanismos que pudiesen afectar a la actividad de las neuronas Rz.

En la sanguijuela, los estímulos mecanosensoriales son el principal desencadenante de respuestas motoras (Kristan *et al.*, 1982). Además, como fue mencionado anteriormente, la activación de células mecanosensoriales produce la activación del sistema serotoninérgico que modula al motor (Figura O.1).



**Figura O.1.** Esquema de la interacción entre las vías motora y modulatoria. En negro se esquematiza la neurona mecanosensorial, en gris la motoneurona y en blanco la neurona serotoninérgica Rz.

Resulta interesante estudiar la interacción que se produce entre ambas vías, esto significa ver si existen elementos neuronales compartidos por ambas, que permitan coordinar el circuito para generar una respuesta motora adecuada. Dado que la neurona pasiva 151 tiene la potencialidad de afectar en forma importante la vía motora, investigamos si jugaba alguna función en la vía sensorio-moduladora.

El objetivo de la Primera Parte fue el de estudiar el rol de la neurona 151 en la transmisión de señales mecanosensoriales hacia las neuronas Rz. Dicho trabajo se llevó a cabo en tres etapas:

En primer lugar, se estudió la interacción directa entre las neuronas 151 y Rz.

En segundo lugar, estudiamos los efectos de la señal mecanosensorial sobre la neurona 151, evaluando cómo procesa esta neurona pasiva dichas señales.

Por último, estudiamos si la neurona 151 formaba parte de la capa de interneuronas que une a las células P con las neuronas Rz.

El objetivo de la Segunda Parte fue el de estudiar la influencia del sistema colinérgico sobre las neuronas Rz. Trabajos previos demostraron que las neuronas Rz exhiben una amplia familia de receptores a la ACh (Kristan *et al.*, 1993; Szczupak *et al.*, 1993). En este trabajo investigamos la existencia de fuentes endógenas capaces de liberar ACh y afectar fisiológicamente la actividad de las neuronas serotoninérgicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación biológica

Los animales utilizados en el presente trabajo de tesis fueron sanguijuelas de la especie *Hirudo medicinalis*, con un peso entre 2 y 5 g. Las mismas fueron compradas a la compañía Leeches USA (Westbury, NY, USA) y mantenidas en solución marina artificial a 15 °C, con un ciclo de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. Los animales no fueron alimentados durante, por lo menos, un mes antes de la disección con el fin de garantizar un nivel mínimo de actividad motriz espontánea.

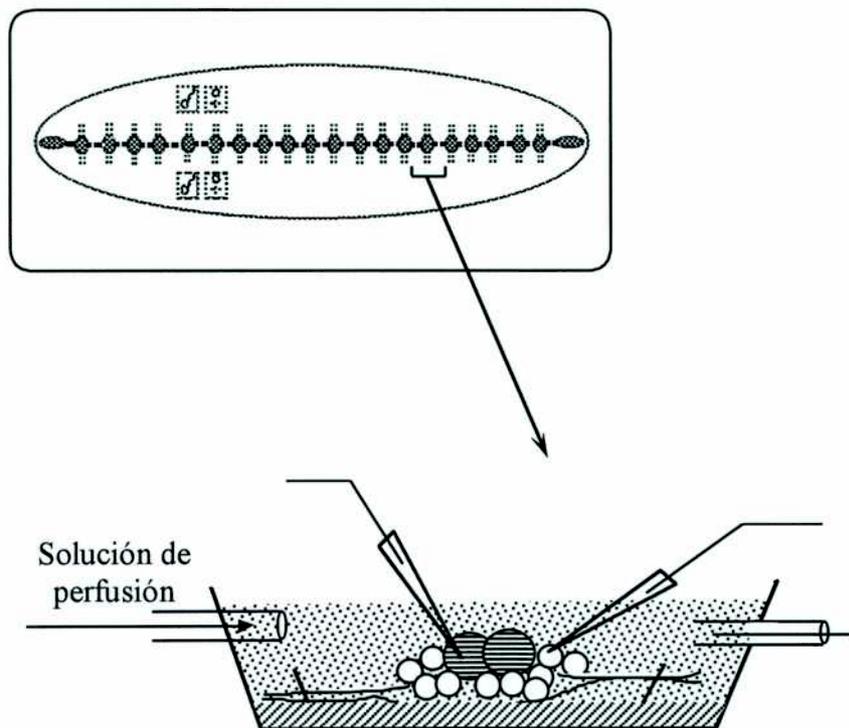


Figura M.1. Esquema de la cámara de registro utilizada.

El sistema nervioso de las sanguijuelas fue diseccionado en solución salina control (ver Soluciones). Para este trabajo de tesis se utilizaron ganglios aislados pertenecientes a segmentos medios estándar (Ver Figura 0.1). En algunos experimentos se utilizaron ganglios de los segmentos reproductivos (segmentos 5 y 6), según se indica en los casos en que corresponde. Los ganglios fueron montados con el lado ventral hacia arriba en

cámaras de registro cuya base contenía una capa de Sylgard (Dow Corning) sobre la cual se fijaron los ganglios utilizando minucias de acero inoxidable. Durante el experimento la preparación fue mantenida bajo perfusión constante con solución salina, a un flujo aproximado de  $50 \mu\text{l s}^{-1}$  (Figura M.1).

Los experimentos se realizaron en ganglios intactos salvo en casos específicos en los que se removió el tejido conectivo que recubre los ganglios.

### **Registros electrofisiológicos**

Las neuronas individualizadas fueron registradas mediante electrodos intracelulares impalados en el soma neuronal. Se utilizó un amplificador diferencial (Axoclamp 2B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) operando en la configuración de fijación de corriente. La caída de voltaje a través de los electrodos fue compensada mediante un “bridge balance”.

Los microelectrodos se fabricaron en base a capilares de biosilicato (FHC, Brunswick, ME, USA) utilizando un estirador de micropipetas horizontal y se llenaron con una solución de acetato de potasio 3 M. Su resistencia era de 20 - 60  $\text{M}\Omega$ .

Los registros fueron digitalizados mediante un conversor analógico-digital TL-1 DMA y adquiridos a frecuencias entre 1000 y 3200 Hz. en una PC con el programa Axoclamp 5 (Axon Instruments), utilizando los protocolos Clampex y Fetchex

La estimulación de las diversas neuronas se realizó inyectando corriente dc a través del electrodo de registro. La evocación de potenciales de acción en las neuronas P se realizó inyectando pulsos breves (5 ms) supraumbrales de corriente (2-4 nA) utilizando un estimulador activable por el programa de adquisición. Cuando se requirió llevar el potencial de membrana de las neuronas a valores distintos de su potencial de reposo, se inyectó corriente continua (dc) a través del electrodo de registro con la amplitud necesaria para alcanzar el potencial deseado. Dicha inyección se mantuvo durante el episodio de registro, subyacente a cualquier cambio de potencial que experimentara la neurona en respuesta a la entrada sináptica que recibiera.

La resistencia de entrada de las neuronas se midió inyectando pulsos de corriente hiperpolarizante de pequeña amplitud (-0.1 a -0.5 nA) con una duración suficiente para alcanzar un nuevo valor estable de potencial (100-500 ms) en el soma de las células. La resistencia de entrada se calculó como el cociente entre la diferencia de potencial experimentada por la neurona dividido la amplitud del pulso de corriente inyectado. En

algunos protocolos un único pulso se inyectó al principio del episodio de registro, mientras que en otros protocolos se inyectaron trenes de pulsos de baja frecuencia (0.5 Hz) a lo largo del registro.

### **Células estudiadas**

Teniendo en cuenta que la ubicación de los somas neuronales en los ganglios de la sanguijuela es altamente invariante (Figura M.2), las distintas neuronas estudiadas fueron reconocidas inicialmente por la ubicación de sus somas. Finalmente su identidad fue confirmada en base a sus características electrofisiológicas, *i. e.* forma del potencial de acción, la actividad electrofisiológica basal, presencia de potenciales sinápticos espontáneos, etc. Cabe aclarar que las características de los potenciales de acción se refieren a las registradas en el soma, que en la mayoría de los casos representa una propagación pasiva del fenómeno que tiene lugar a cierta distancia en el árbol neurítico.

#### *Células Rz*

Los somas de las neuronas Rz se encuentran en posición central dentro del ganglio (Figura M.2), su tamaño es de aproximadamente  $60\mu\text{m}$ . Su potencial de reposo es de aproximadamente  $-40\text{ mV}$ , y disparan espontáneamente potenciales de acción de una amplitud somática de alrededor de  $15\text{ mV}$  a una frecuencia de aproximadamente  $3\text{ Hz}$ .

#### *Células P*

Los somas de las neuronas mecanosensoriales P están ubicadas en los paquetes laterales posteriores. Existen 2 pares por ganglio: lateral y medio (Figura M.2), que inervan los cuadrantes ventrales y dorsales, respectivamente. En reposo su potencial de membrana es de aproximadamente  $-40\text{ mV}$ . Las neuronas P son silentes en reposo y se caracterizan por disparar un potencial de acción en la repolarización tras un pulso hiperpolarizante de aproximadamente  $-4\text{ nA}$  (rebound).

#### *Células 151*

Los somas de las neuronas 151 están ubicadas en el extremo anterior de los paquetes laterales anteriores (Figura M.2) y son las únicas en su entorno que son de tipo pasivo, es decir, no disparan potenciales de acción bajo ningún tipo de estimulación. Poseen, en cambio, potenciales post-sinápticos inhibitorios espontáneos de entre  $5\text{-}10\text{ mV}$  de amplitud y  $50\text{ ms}$  de duración (Waderpuhl, 1989). En todos los experimentos se

confirmó la identidad de la neurona 151 verificando dos características principales: la neurona no genera potenciales de acción, y la inyección de un pulso de corriente prolongado de  $-10$  nA inhibe el disparo espontáneo de potenciales de acción de las motoneuronas AE (Iscla *et al.* 1999).

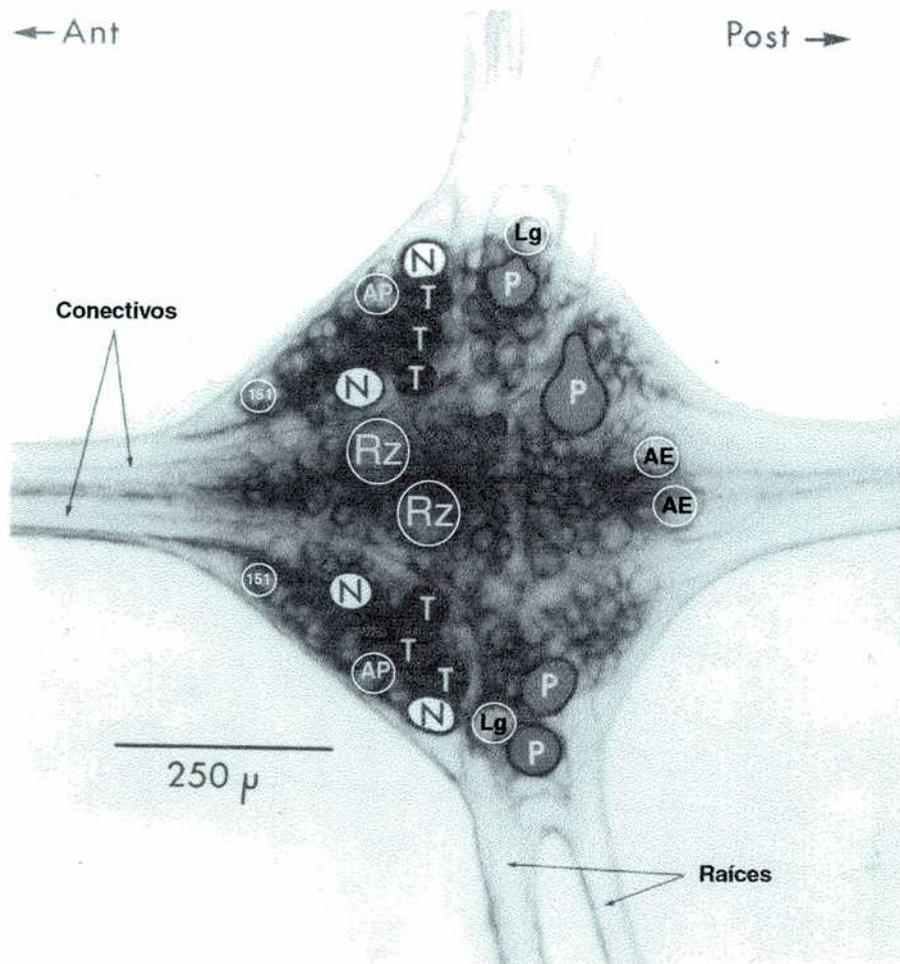


Figura M.2. Foto de un ganglio aislado de la sanguijuela. Los círculos muestran la ubicación de las neuronas en la superficie ventral de un ganglio medio. Neuronas 151, Retzius (Rz), antero pagodas (AP), Leydig (Lg), annulus-erector (AE), mecanosensoriales que responden a presión (P), a tacto (T) y nociceptivas (N).

#### *Otras células*

En los experimentos de especificidad celular del capítulo 6 se estudiaron, además, las neuronas mecanosensoriales N y T, las motoneuronas AE, las células

Leydig y las neuronas AP. En todos los casos, las células fueron identificadas por su ubicación en el ganglio y características electrofisiológicas conocidas. Los somas de las motoneuronas AE están ubicadas en el extremo posterior del paquete central posterior. Su potencial de membrana es de alrededor de  $-35$  mV y disparan potenciales de acción de alrededor de 2 mV de amplitud somática en forma espontánea.

Los somas de las neuronas Leydig se encuentran, como las neuronas P, en los paquetes laterales posteriores pero a diferencia de éstas, disparan potenciales de acción en forma espontánea. Los somas de las neuronas T y N, se encuentran en los paquetes laterales anteriores y se distinguen claramente entre sí en base a sus propiedades electrofisiológicas. Los potenciales de acción en las células N tienen una amplitud somática de aproximadamente 80 mV, seguida por una hiperpolarización post disparo de alrededor de 10 mV, mientras que las neuronas T disparan potenciales de acción de amplitud somática aproximada de 40 mV y su hiperpolarización postdisparo es de 2 mV. Las neuronas AP se encuentran ubicadas en el mismo paquete que las neuronas N y T, y se caracterizan por la forma de pagoda de sus potenciales de acción cuya amplitud somática es de aproximadamente 2 mV.

### **Análisis de los resultados**

El análisis de los registros se realizó en computadoras Macintosh (Quadra 650 y G3) usando los programas Axograph 6.0 (Axon Instruments) y Kaleidagraph (Abelbeck Software). Los resultados se expresaron como valores de media  $\pm$  error estándar (s.e.m.) y el número de preparaciones (n) se expresó entre paréntesis. El grado de significancia estadística de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se determinó usando el test *t* para muestras no pareadas.

### *Análisis de los resultados de la parte I*

La respuesta de la neurona Rz a los distintos estímulos se cuantificó midiendo el potencial de membrana, la frecuencia de disparo y la integral en el tiempo de la respuesta para un período específico de tiempo (800 ms después del primer potencial de acción en la neurona P). La respuesta de la neurona 151 a la estimulación de la neurona P se cuantificó midiendo la integral en el tiempo de la respuesta para el mismo período de tiempo que se utilizó en el caso de la neurona Rz, así como también midiendo la amplitud máxima de la despolarización y de la hiperpolarización (Ver Figura 2.1).

Para estudiar la coincidencia temporal entre las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de la célula P, se utilizó el programa Origin 5.0 con el módulo pClamp. Se procesaron las señales de las neuronas calculando la derivada de primer orden de las respuestas. Con el fin de evitar la alta sensibilidad al ruido que tiene esta variable, se tomó para cada punto el promedio de trece puntos adyacentes. Con esta maniobra, se conservaron las características principales de la señal, como la amplitud y el curso temporal, al mismo tiempo que se anularon las fluctuaciones rápidas debidas al ruido. Se realizó la correlación cruzada de la derivada de primer orden de los registros de ambas células, midiendo el desplazamiento del primer máximo.

### *Análisis de los resultados de la Parte II*

La respuesta de la neurona Rz a la aplicación de inhibidores de AChE se cuantificó en función de la amplitud y la latencia de la respuesta como se indica en la Figura 5.1 (Capítulo 5).

La respuesta de las distintas neuronas a la aplicación de inhibidores de AChE se clasificó como inhibitoria en los casos en los que se observó una hiperpolarización o una disminución en la frecuencia de disparos, y como excitatoria en los casos en los que se observó una despolarización o un aumento en la frecuencia de disparos.

### **Soluciones y Drogas**

La solución salina estándar utilizada tiene la siguiente composición (en mM): NaCl, 115; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; MgCl<sub>2</sub>, 1; Tris maleato, 4.6; Tris base, 5.4; y glucosa, 10; el pH de la solución fue de 7.4. Para bloquear la transmisión sináptica de tipo químico se utilizó una solución conteniendo 20 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Para distinguir entre conexiones mono o polisinápticas, se utilizó una solución conteniendo 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. En ambos casos la osmolaridad de la solución se mantuvo constante reduciendo la concentración de NaCl.

Eserina (Fisostigmina), neostigmina, carbacol, nicotina (sal de hemisulfato), *d*-tubocurarina (sal de cloruro, curare), mecamilamina, atropina, estrignina, picrotoxina y hexametonio (Sigma Co., St Louis, MO, USA) fueron disueltas en la solución salina y aplicadas a través del sistema de perfusión.

## PARTE I

### **Rol de la interneurona pasiva 151 en la vía que conecta las células mecanosensoriales P con las neuronas serotoninérgicas Rz**

En el sistema nervioso, las señales electrofisiológicas se codifican y transmiten de dos modos diferentes: mediante cambios graduales o mediante cambios de tipo todo o nada del potencial de membrana de las neuronas. La mayoría de las neuronas operan en ambos modos, procesando inicialmente las señales en forma gradual hasta alcanzar un umbral a partir del cual la amplitud de la señal deja de ser un parámetro de información. Los potenciales de acción, o cambios de tipo todo o nada, codifican las señales a través del período entre picos. Contrariamente a las neuronas que disparan potenciales de acción, las neuronas pasivas operan enteramente –de entrada a salida- en forma gradual (Shaw, 1979; Bialek, 1991; de Ruyter & Laughlin, 1996). Por lo tanto estas neurona codifican información tanto a través de la amplitud como del tiempo.

Las interneuronas pasivas juegan un papel importante en el procesamiento de información en redes neuronales de invertebrados y vertebrados. En insectos, se describió con gran detalle que neuronas pasivas actúan como elementos premotores mediando la entrada de señales sensoriales (Pearson & Fournier, 1975; Paul & Mulloney, 1985; Burrows 1992; Baba *et al.*, 1995; Juusola *et al.*, 1996). En vertebrados, las neuronas fotorreceptoras e interneuronas de la retina operan enteramente en un régimen de señales pasivas graduales (Wässle, 1991).

En las sanguijuelas las neuronas 151 son neuronas de tipo pasivo. Existen un par de neuronas por ganglio, ubicadas en el extremo anterior de la cara ventral del mismo. Son fácilmente reconocibles electrofisiológicamente porque son las únicas neuronas en su entorno que no disparan potenciales de acción, y presentan hiperpolarizaciones sinápticas espontáneas. Estas neuronas poseen extensas ramificaciones en el neuropilo del ganglio de origen y envían múltiples extensiones por las raíces que se proyectan hacia la pared del cuerpo y por los nervios conectivos. Ambas neuronas 151 de un mismo ganglio están acopladas a través de sinapsis eléctricas (Wadephul 1989). La inyección de corriente hiperpolarizante en las células 151 produce una disminución en la actividad electrofisiológica espontánea de las motoneuronas que excitan a las fibras musculares longitudinales, circulares y erectoras de los ámulos (Waderphul, 1989; Iscla

*et al.*, 1999). Las motoneuronas inhibitorias, sin embargo, aumentan su actividad al hiperpolarizar a la célula 151 (Wadephul, 1989). En preparaciones semi-intactas utilizadas para estudiar el comportamiento de "desplazamiento sobre ventosas" de la sanguijuela se ha encontrado que el potencial de membrana de las neuronas 151 fluctúa rítmicamente en coincidencia con ciertas fases del movimiento (Baader, 1997).

Las características electrofisiológicas de las células 151 de las sanguijuelas y su conectividad sináptica sugieren que estas neuronas pueden cumplir un rol importante en la regulación de conductas motoras (Iscla *et al.*, 1999).

## **Capítulo 1. Conectividad sináptica entre las neuronas pasivas 151 y las neuronas serotoninérgicas Rz.**

Dado el amplio grado de conectividad que poseen las neuronas pasivas 151 con el sistema motor, investigamos la conectividad que existe entre estas neuronas y las neuronas serotoninérgicas Rz, con la idea de buscar elementos compartidos entre el sistema motor y el modulador. En particular nos concentramos en la manera en que la neurona 151 afecta el patrón de actividad que presentan las neuronas Rz.

### **Resultados**

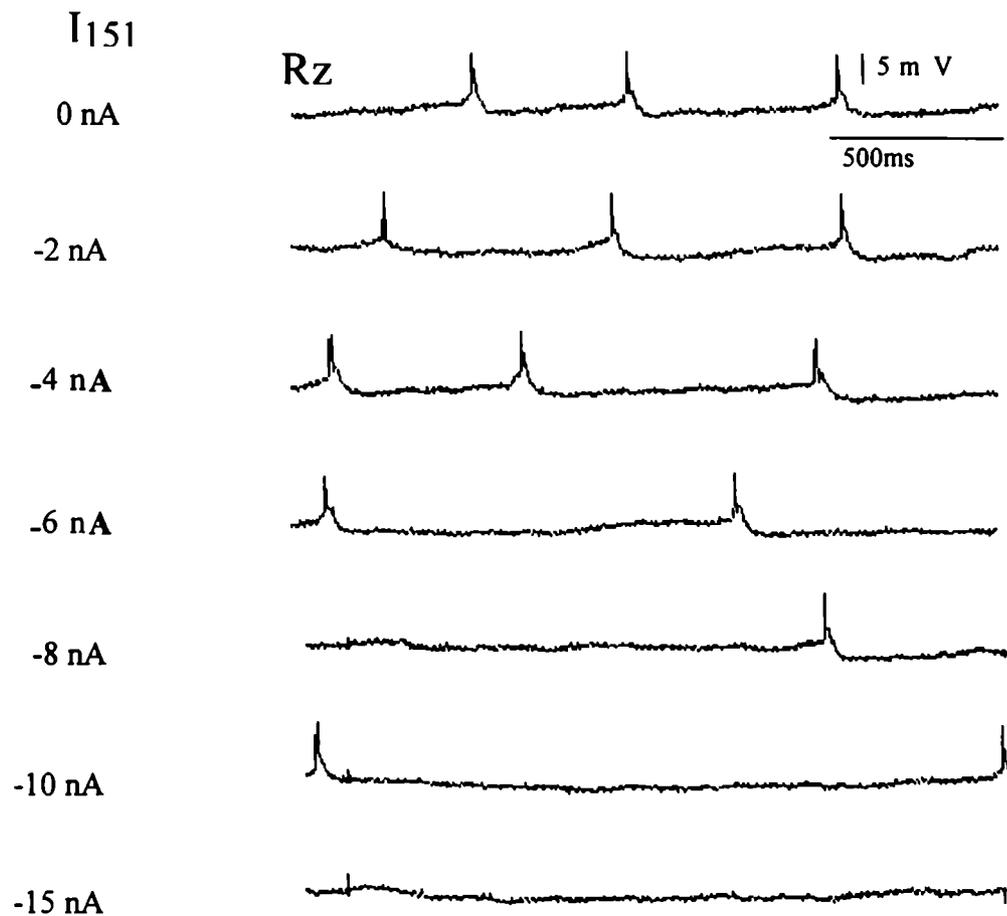
#### **Interacción entre las neuronas 151 y Rz.**

Con el fin de estudiar la interacción sináptica entre las neuronas 151 y Rz se realizaron registros intracelulares de la actividad electrofisiológica de ambas neuronas en ganglios medios aislados. Al ser impaladas, las neuronas Rz exhiben potenciales de membrana de alrededor de  $-40$  mV y disparan potenciales de acción a una frecuencia de alrededor de 3 Hz (Leake, 1986; Angstadt & Choo, 1996).

Las neuronas pasivas 151 presentan un potencial de membrana de aproximadamente  $-35$  mV, no disparan potenciales de acción y frecuentemente se observan potenciales sinápticos inhibitorios espontáneos de aproximadamente 5 mV de amplitud.

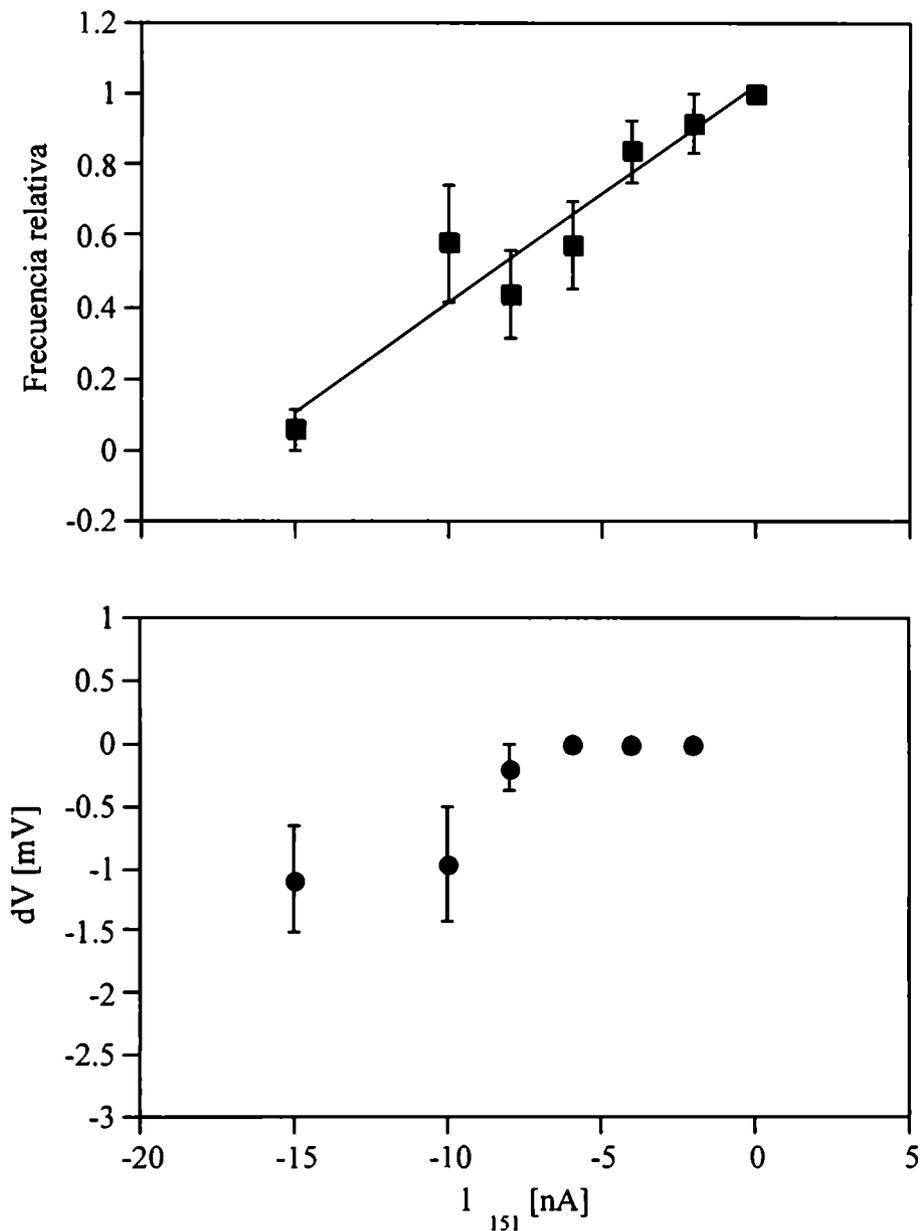
Se estimuló electrotónicamente a cada neurona en forma alternada mientras se registraban los cambios que esta maniobra producía en la actividad electrofisiológica de la otra neurona. La inyección de pulsos de corriente de  $-15$  a  $+10$  nA de 1-2 seg. de duración en el soma de las neuronas Rz no produjo ninguna alteración significativa en las neuronas 151; su potencial de membrana y los potenciales hyperpolarizantes espontáneos se mantuvieron inalterados.

En cambio, la inhibición de las neuronas 151 produjo una gradual modificación en la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz. En la Figura 1.1 se observan registros representativos en los cuales la inyección de pulsos de corriente negativa de distintas intensidades en una neurona 151 produjo una disminución en la frecuencia de disparo de una célula Rz.

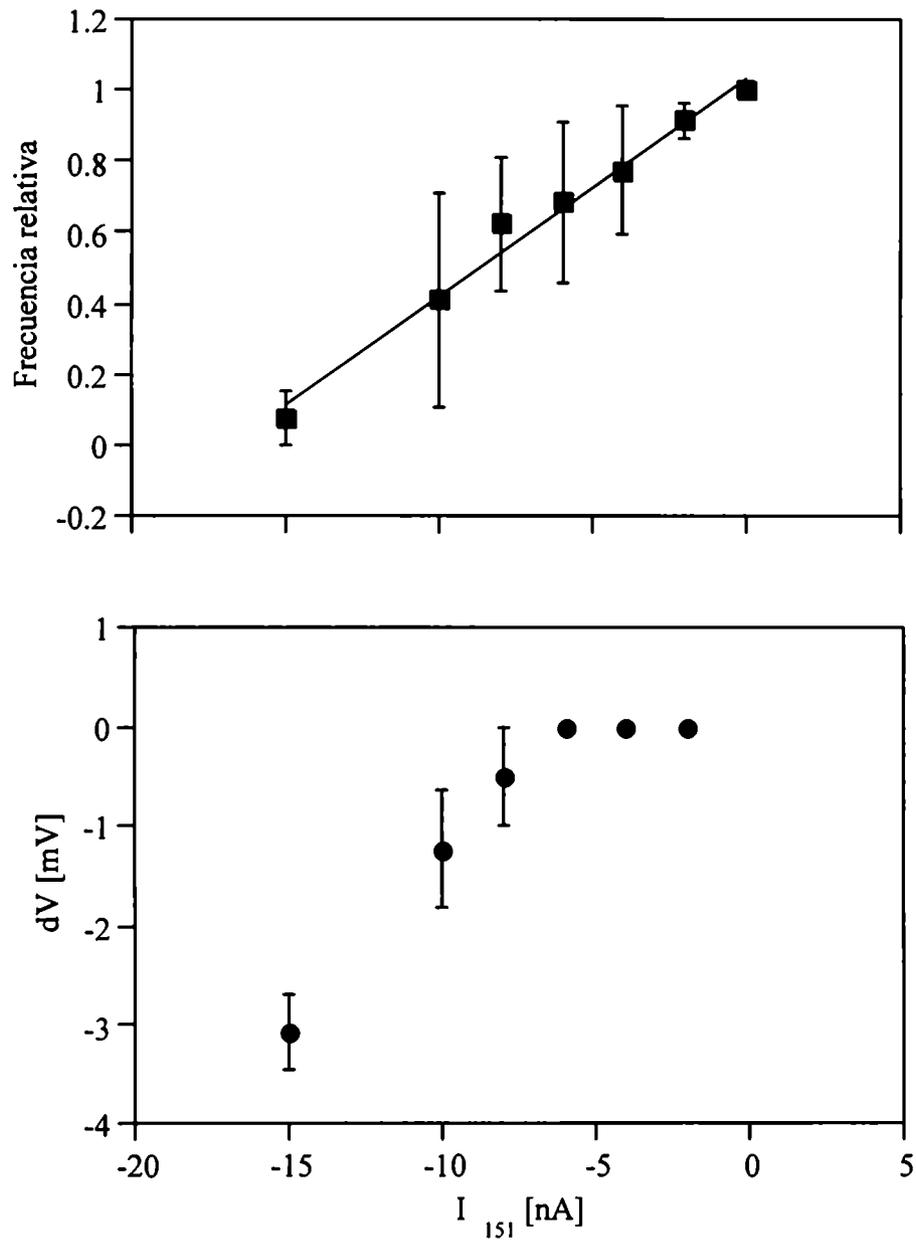


**Figura 1.1. Interacción entre las células 151 y las neuronas Rz.** Los registros muestran la actividad electrofisiológica de la neurona Rz durante la inyección de corriente hiperpolarizante de amplitud creciente a la célula 151. La intensidad de corriente inyectada en la célula 151 se indica a la izquierda de cada registro. La inyección se inició después de registrar a la neurona Rz en reposo durante 2 segundos. Luego de cada inyección, se retornó la célula 151 al estado de reposo por 15 s antes de aplicar el pulso siguiente (el orden en que se aplicaron los pulsos de distinta intensidad fue al azar).

La Figura 1.2. (superior) muestra que la relación entre la intensidad de corriente inyectada en las neuronas 151 y la frecuencia de disparo de las neuronas Rz sigue una función lineal. Este efecto se vio acompañado de una hiperpolarización de las neuronas Rz relativamente pequeña (Figura 1.2. inferior).



**Figura 1.2. Cuantificación de la respuesta de las neuronas Rz a la inyección de corriente en las neuronas 151.** Se analizaron cambios en la frecuencia de disparo y en el potencial de membrana de neuronas Rz como respuesta a pulsos de corriente de distinta intensidad inyectados en células 151. El cambio en la frecuencia de disparo de las células Rz se expresó como frecuencia relativa, ésto es la frecuencia de disparo de cada célula Rz durante el pulso de inyección de corriente en la neurona 151 sobre la frecuencia de disparo basal, antes del inicio de la inyección de corriente. El cambio de potencial de membrana se calculó como la diferencia entre el potencial registrado durante la inyección de corriente y el potencial registrado previo al inicio de la inyección de corriente. El experimento se realizó en solución control. Los valores indican la media  $\pm$  error estándar ( $n=7$ ). **Inserto.** Registro representativo de la neurona Rz en reposo ( $I_{151}=0$  nA) y al aplicar -15 nA en la célula 151 ( $I_{151}=-15$  nA).



**Figura 1.3.** Cuantificación de la respuesta de las neuronas Rz a la inyección de corriente en las neuronas 151 estudiadas en una solución con alto contenido de magnesio. Los gráficos muestran el promedio de la frecuencia relativa de disparo (calculada como se explica en la figura 2) y el promedio del cambio en el potencial de membrana de neuronas Rz en función de la intensidad de corriente inyectada en la neurona 151. Los experimentos fueron realizados en ganglios perfundidos con una solución que contenía 20 mM  $Mg^{++}$  y 1 mM  $Ca^{++}$ . Los valores indican media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ).

La inyección de corriente despolarizante en las neuronas 151 (2-15 nA) mediante pulsos cuadrados de duraciones entre 50-2000 ms de duración a frecuencias de 0.2-15 Hz, no afectó la actividad de las células Rz ni en su frecuencia de disparo ni en su potencial de membrana (datos no mostrados).

### **Conectividad entre las neuronas 151 y Rz**

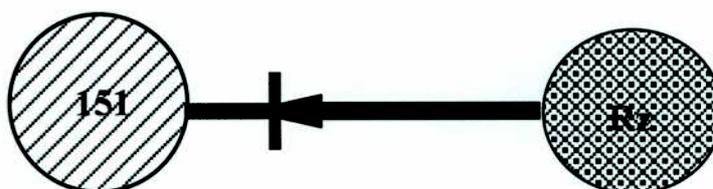
Con el objetivo de evaluar si la conexión entre las neuronas 151 y Rz era de tipo química o si se trataba de una sinapsis eléctrica, se registró la interacción entre ambas neuronas en una solución conteniendo 20 mM  $Mg^{++}$  y 1mM de  $Ca^{++}$ , condición en la cual se bloquean las sinapsis de tipo químicas en la sanguijuela. Como se observa en la Figura 1.3, en presencia de una alta relación  $Mg^{++}/Ca^{++}$ , la disminución en la frecuencia de disparo de las células Rz por efecto de la inyección de corriente negativa en las neuronas 151 fue similar a la observada en solución normal. Sin embargo, en esta condición la corriente inyectada en las células 151 produjo, una hiperpolarización de las células Rz de mayor amplitud que la observada en solución control.

### **Discusión**

Los resultados indican que, a diferencia de lo reportado por Wadehul (1989), las neuronas 151 ejercen una influencia sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz. La hiperpolarización de las neuronas 151, producida por la inyección de corriente en el soma, se transmitió a las neuronas Rz a través de sinapsis eléctricas, causando la disminución gradual de la frecuencia de disparo de estas células. De esta manera las neuronas 151 son capaces de modular la actividad basal de las neuronas Rz. La intensidad de corriente inyectada en las neuronas 151 para inhibir los disparos en las neuronas Rz, del orden de los 10-15 nA, fue similar a la utilizada por Wadehul (1989) para inhibir disparos de motoneuronas que reciben inervación eléctrica de las neuronas 151. Estos valores también son similares a los utilizados en trabajos con interneuronas pasivas de otros invertebrados (Burrows, 1979a). La necesidad de inyectar pulsos de corriente de alta intensidad se debe, probablemente, a que las células 151 son neuronas con un árbol neurítico profuso a lo largo del cual las señales eléctricas se transmiten en forma pasiva. La inyección de corriente se efectuó en el soma y hasta alcanzar los sitios de acción sináptica esta corriente puede sufrir una severa atenuación espacial.

En contraposición con el marcado efecto que la hiperpolarización de las neuronas 151 tuvo sobre la frecuencia de disparos de las neuronas Rz, el efecto sobre su potencial de membrana fue notablemente pequeño. La explicación a esta observación requiere nuevamente esgrimir las mismas consideraciones biofísicas esbozadas anteriormente. Los electrodos de registro son impalados en los somas neuronales, lejos de la zona en donde tiene lugar la interacción sináptica. La hiperpolarización de las neuronas Rz se debe propagar en forma pasiva, y por lo tanto, un cambio relativamente pequeño en el potencial de membrana en una zona distal puede sufrir una severa atenuación espacial hasta llegar al soma. Los potenciales de acción, en cambio, son señales de gran amplitud y se propagan activamente hasta regiones relativamente cercanas al soma y por lo tanto se detectan más nítidamente en los registros somáticos. En concordancia con esta interpretación se observó que en presencia de altas concentraciones de cationes divalentes, condición en la cual la resistencia membranal aumenta, *i.e.*, el cambio de potencial de membrana de las células Rz producido por la inyección de corriente en 151, se magnificó.

Las sinapsis eléctricas que transmiten las señales de las células 151 a las células Rz muestran una doble rectificación: las señales sólo se transmiten de 151 a Rz y sólo corriente negativa atraviesa la sinapsis (Figura 1.4). Este es el tipo de conexión más conspicua que las células 151 establecen con otras neuronas del ganglio y se ha observado en la interacción entre estas células y diversas motoneuronas (Wadephul 1989, Iscla *et al.*, 1999).



**Figura 1.4.** Esquema de la interacción entre las neuronas 151 y Rz. El símbolo entre ambas esquematiza la sinapsis de tipo eléctrica rectificante.

Dado que la liberación de serotonina depende del disparo de potenciales de acción en las células Rz (Burns & Jahn, 1995) las observaciones realizadas sugieren que las neuronas 151 están en condiciones de regular los niveles de serotonina en forma directa.

## **Capítulo 2. Interacción sináptica entre las neuronas 151 y las neuronas mecanosensoriales P.**

Las neuronas mecanosensoriales P despliegan un nivel de conectividad tal que la activación de una única célula P puede iniciar distintas salidas motoras (Kristan *et al.*, 1982). A su vez, dicho estímulo ejerce un fuerte efecto excitatorio sobre las células serotoninérgicas Rz (Wittenberg *et al.*, 1990; Szczupak & Kristan, 1995). Es por ello que se considera que la activación de las neuronas P es una entrada sensorial de alto impacto conductual en la sanguijuela.

Dados estos antecedentes, investigamos la conectividad entre las neuronas P y las neuronas pasivas 151 con el fin de evaluar de qué manera estas últimas pueden proveer al procesamiento de información sensorial en su recorrido hacia efectores motores y neuromoduladores.

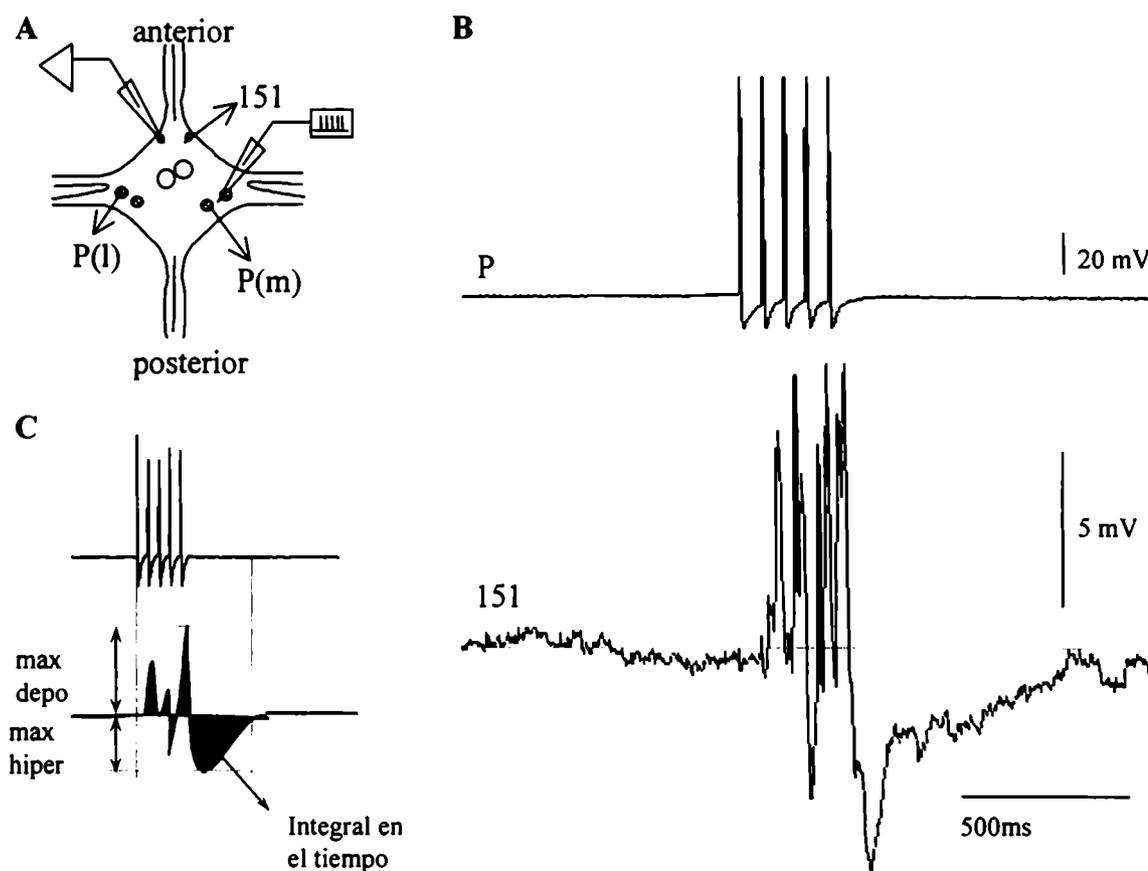
### **Resultados**

#### **Interacción entre las neuronas mecanosensoriales P y las células 151.**

En ganglios medios aislados se realizaron registros intracelulares simultáneos de las neuronas P y 151 (Fig. 2.1A). Las células P fueron estimuladas mediante la inyección de pulsos de corriente, tal que dispararan un tren de potenciales de acción a 15 Hz. La Figura 2.1.B muestra un registro representativo de la respuesta de la neurona 151 en su potencial de reposo. El tren de potenciales de acción evocados en la neurona P produjo una compleja respuesta en la célula 151 compuesta de fases despolarizantes e hiperpolarizantes.

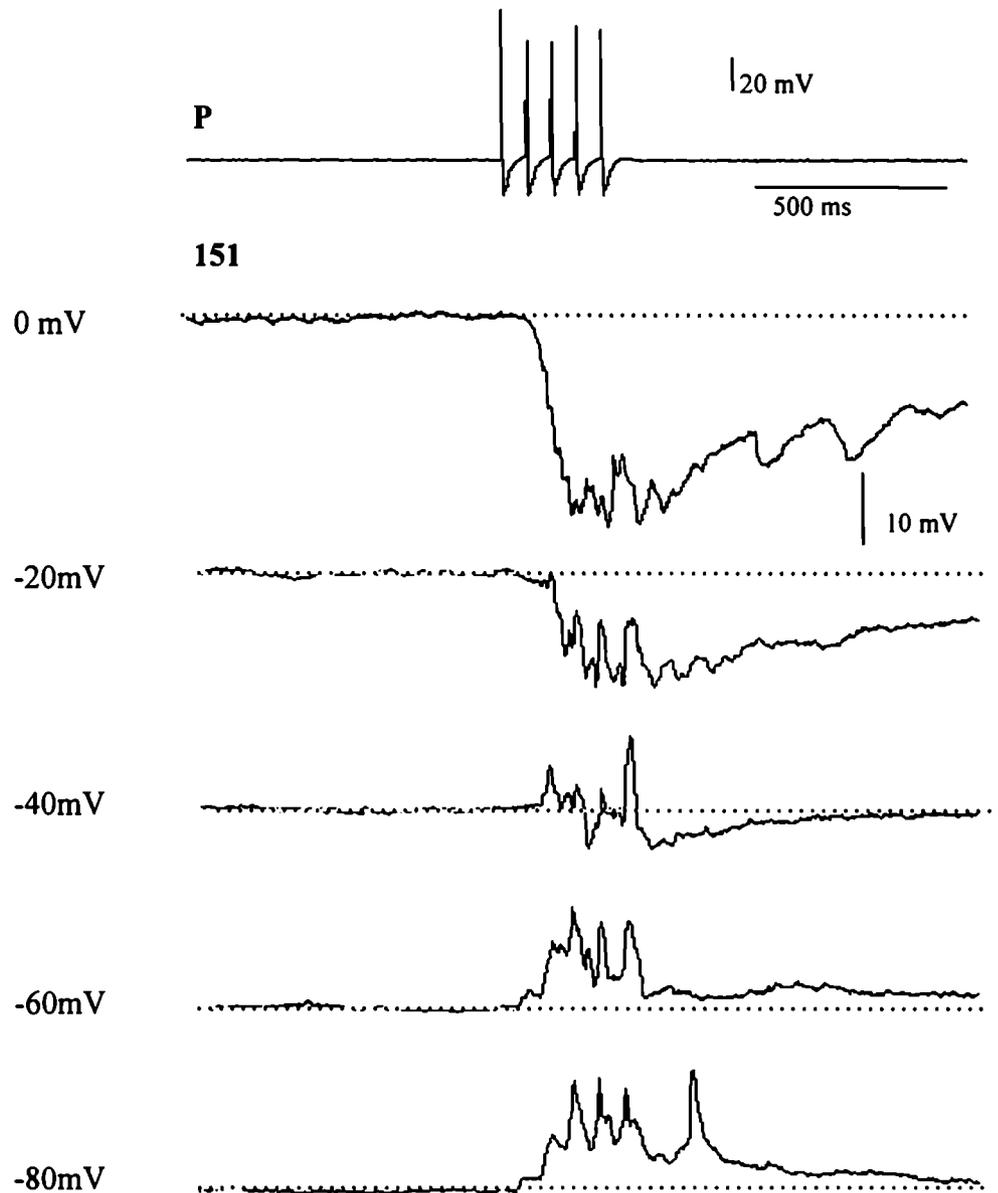
Con el fin de visualizar con más detalle los distintos componentes de las respuestas, éstas fueron estudiadas llevando a las neuronas 151 a diferentes potenciales de membrana, mediante la inyección de corriente continua.

La Figura 2.2 muestra registros representativos de esta maniobra experimental. Como se mostró anteriormente, a potenciales de membrana cercanos al potencial de reposo de la célula, alrededor de  $-40$  mV, la respuesta de la célula 151 a la estimulación de la neurona P mostró fases despolarizantes e hiperpolarizantes. A medida que el potencial de membrana fue llevado a valores más despolarizados, la amplitud de las hiperpolarizaciones aumentó y los picos despolarizantes se montaron sobre éstas.



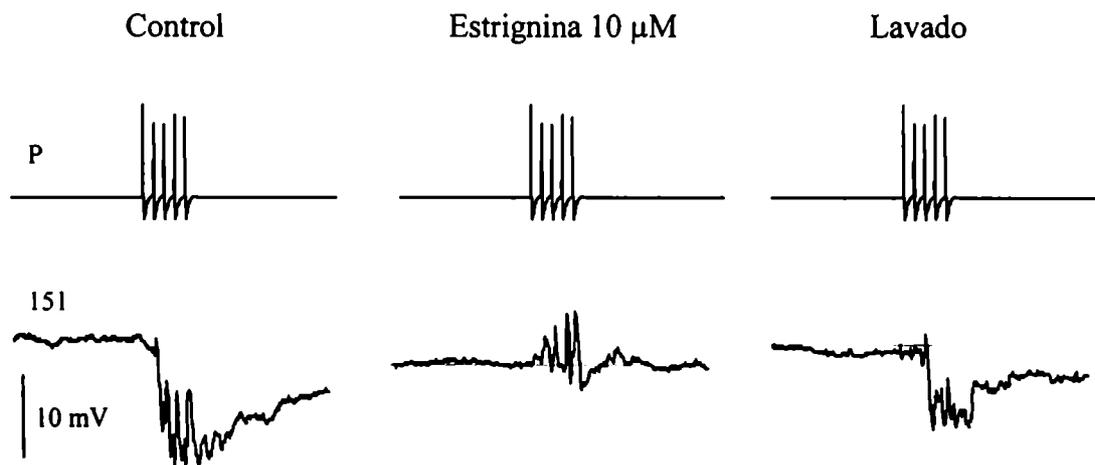
**Figura 2.1. Respuesta de la neurona 151 a la estimulación de la célula P.** A. Esquema de la configuración de registro utilizada para el experimento. Las neuronas P y 151 fueron registradas mediante electrodos intracelulares. Las células P fueron estimuladas a través del electrodo de registro mediante la inyección de pulsos de corriente (2nA, 5ms). B. Registros intracelulares de una célula P y de una neurona 151. La célula P fue estimulada tal que produjera un tren de 5 potenciales de acción a una frecuencia de 15 Hz. La célula 151 fue registrada en su potencial de reposo. C. El esquema muestra la manera en que se cuantificaron las respuestas de las neuronas 151 o Rz. El área sombreada representa la integral de la respuesta en el tiempo y los segmentos con doble flecha muestran cómo se midieron las amplitudes máximas de las depolarizaciones y las hiperpolarizaciones.

Contrariamente, a medida que el potencial de membrana fue llevado a valores más hiperpolarizados que el potencial de reposo, la amplitud de las fases despolarizantes aumentaron y la de los componentes hiperpolarizantes disminuyeron. La observación de una serie de registros similares ( $n = 15$ ) mostró que el componente hiperpolarizante revierte a un potencial de alrededor de  $-65$  mV.



**Figura 2.2.** Respuestas de la neurona 151 a la estimulación de la célula P, registrada en diferentes niveles de su potencial de membrana. El trazo superior muestra el registro intracelular de una célula P estimulada con un tren de 5 potenciales de acción (15Hz) y los trazos subsiguientes muestran los registros intracelulares de una neurona 151 llevada a diferentes potenciales de membrana (indicados a la izquierda de cada registro). Los diferentes potenciales fueron alcanzados mediante la inyección de corriente dc. El experimento fue realizado perfundiendo el ganglio con solución control. Resultados similares fueron obtenidos en otras 15 preparaciones.

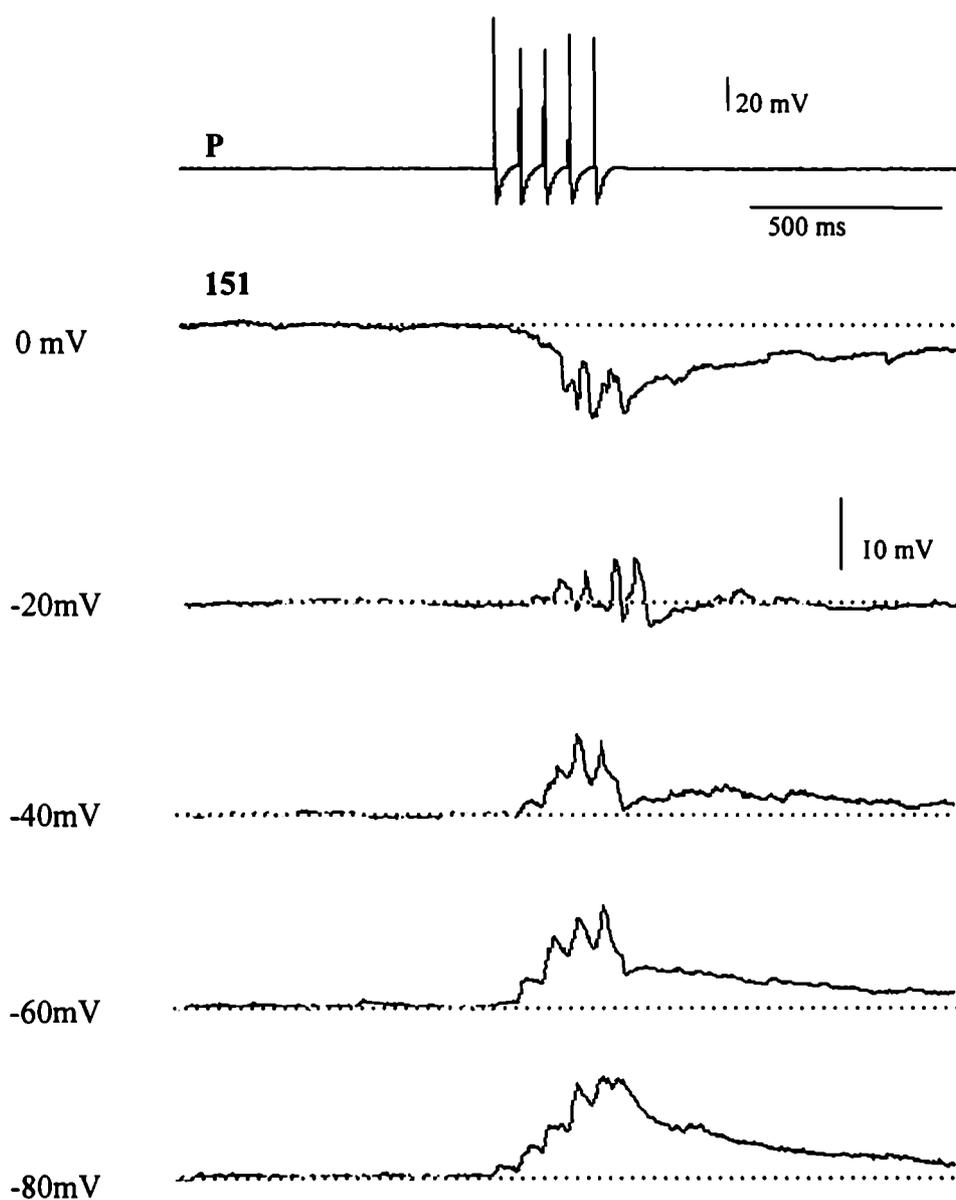
Dado que el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  en las neuronas del ganglio de la sanguijuela se encuentra alrededor de los  $-70$  mV, los resultados sugieren que las fases hiperpolarizantes están mediadas por la activación de una corriente de  $\text{Cl}^-$ . En base a esta hipótesis, y con el fin de discriminar ambos componentes de la respuesta de las neuronas 151, se buscó bloquear este componente de la respuesta utilizando antagonistas de receptores activadores de corrientes de  $\text{Cl}^-$ . Los dos receptores de este tipo más conspicuos en diferentes sistemas biológicos son los receptores al ácido gamma amino butírico (GABA) y a glicina, y las sustancias picrotoxina y estrignina son sus bloqueantes selectivos, respectivamente.



**Figura 2.3. Efecto de la estrignina sobre la respuesta de la neurona 151 a la estimulación de la célula P.** Los trazos superiores muestran los registros intracelulares de una célula P estimulada y los trazos inferiores las respuestas de una neurona 151. Las células P fueron estimuladas con pulsos supraumbrales de corriente (2 nA, 5 ms). Los ganglios fueron estudiados en tres condiciones: bajo perfusión con solución control, tras 5 min de iniciada la perfusión con una solución conteniendo  $10 \mu\text{M}$  estrignina y tras 20 min de lavado con solución control. Resultados similares fueron obtenidos en otras 6 preparaciones.

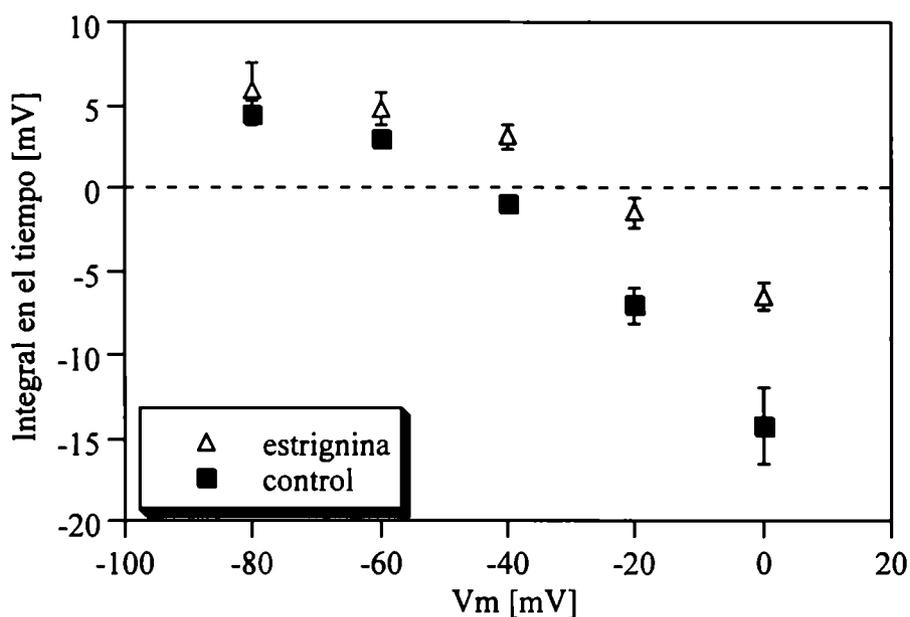
Se registraron las respuestas de células 151 ante la estimulación de neuronas P mientras los ganglios fueron perfundidos con una solución conteniendo  $10 \mu\text{M}$  de estrignina. Como se ejemplifica en los registros de la Figura 2.3, la presencia de estrignina en el medio bloqueó la expresión del componente hiperpolarizante de las respuestas en forma selectiva y reversible. Por su parte, las respuestas despolarizantes permanecieron. La presencia de estrignina  $10 \mu\text{M}$  no produjo diferencias significativas en la resistencia de entrada de la neurona 151 ( $p > 0.1$ ; test de  $t$ ,  $n=6$ ), indicando que la

droga no produjo modificaciones inespecíficas en la conductividad de la membrana neuronal.



**Figura 2.4** Respuestas de la neurona 151 a la estimulación de la célula P, registrada en diferentes niveles de su potencial de membrana en presencia de estrignina. El trazo superior muestra el registro intracelular de una célula P estimulada con un tren de 5 potenciales de acción (15Hz) y los trazos subsiguientes muestran los registros intracelulares de una neurona 151 llevada a diferentes potenciales de membrana (indicados a la izquierda de cada registro). Los diferentes potenciales fueron alcanzados mediante la inyección de corriente dc. El experimento fue realizado perfundiendo el ganglio con solución conteniendo estrignina 10  $\mu$ M. Resultados similares fueron obtenidos en otras 6 preparaciones.

Dado que en presencia de estrignina se elimina la fase hiperpolarizante, despejando la respuesta despolarizante, utilizamos esta condición para analizar la respuestas despolarizante en función del potencial de membrana. Como se ejemplifica en la Figura 2.4, en presencia de estrignina 10  $\mu\text{M}$ , la respuesta presentó una sola fase. Cerca del potencial de reposo la respuesta de las células 151 fue despolarizante. La amplitud de la despolarización aumentó a medida que las neuronas fueron hiperpolarizadas y disminuyó a medida que las neuronas fueron despolarizadas. Su polaridad revirtió entre -20 y 0 mV.



**Figura 2.5. Relación entre la magnitud de las respuestas promedio de células 151 y su potencial de membrana.** La magnitud de la respuesta se cuantificó como la integral en el tiempo (ver Materiales y Métodos y Figura 2.1.C). Se graficó la integral en el tiempo en función del potencial de membrana registrada en solución control (cuadrados) y en solución conteniendo estrignina 10  $\mu\text{M}$  (triángulos). Las barras muestran el error estándar (n=4).

Debido a la forma compleja de la respuesta de las células 151 la cuantificación de las mismas se hizo midiendo la integral de la respuesta en el tiempo, como se muestra en la Figura 2.1.C. En la Figura 2.5 se graficó la relación entre la integral en el tiempo de la respuesta con el potencial de membrana, en condición control y en presencia de estrignina. Dicha relación fue lineal ( $R=0.98$  control,  $R=0.97$  estrignina) en

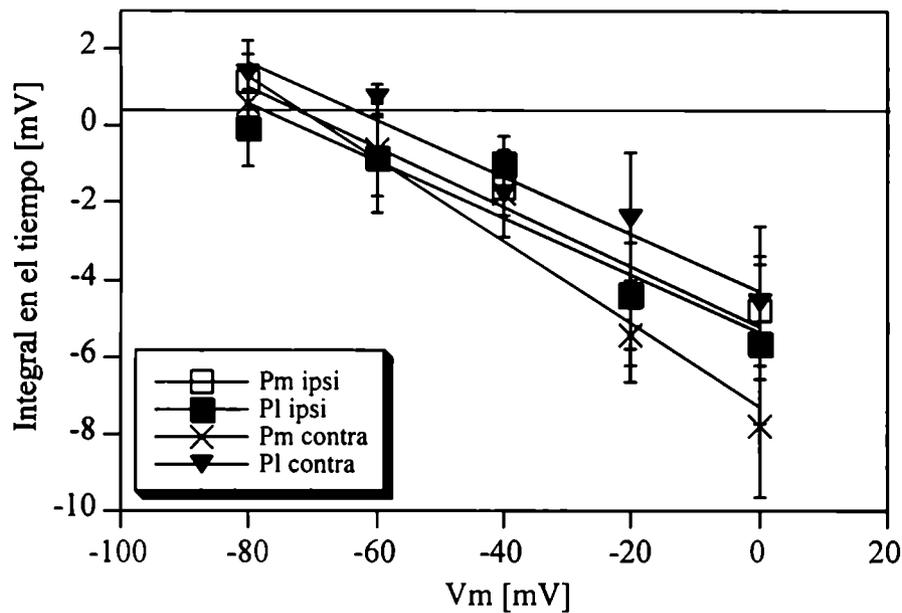
el rango entre 0 y  $-50\text{mV}$ , y mostró una marcada rectificación a potenciales más hiperpolarizados. En condición control el área revirtió su valor a un potencial de alrededor de  $-50\text{ mV}$  ( $-53.21\text{ mV} \pm 1.88$ ); en este potencial de membrana el área de los componentes hiperpolarizantes y despolarizantes de la respuesta son equivalentes. En presencia de estrignina  $10\ \mu\text{M}$  la integral en el tiempo revierte su signo a un potencial promedio de alrededor de  $-25\text{ mV}$  ( $-28.07\text{ mV} \pm 6.65$ ); este valor representa el potencial de reversión del componente despolarizante de la respuesta, que probablemente se debiera a la activación de una corriente catiónica inespecífica.

En contraposición a lo observado con estrignina, el agregado de picrotoxina ( $10\text{-}100\ \mu\text{M}$ ), no tuvo efecto sobre la respuesta de las neuronas 151 ( $n=6$ ), sugiriendo que el componente hiperpolarizante de la misma se debe a la activación de receptores de glicina.

### **Análisis sobre la especificidad del campo de inervación**

Los ganglios medios de la sanguijuela contienen dos pares de células P. Un par inerva los cuadrantes dorsales y el otro los ventrales. Como es de esperar ciertas respuestas motoras muestran un perfil diferente para señales de origen ventral o dorsal (Gu *et al.*, 1991; Iscla *et al.*, 1999).

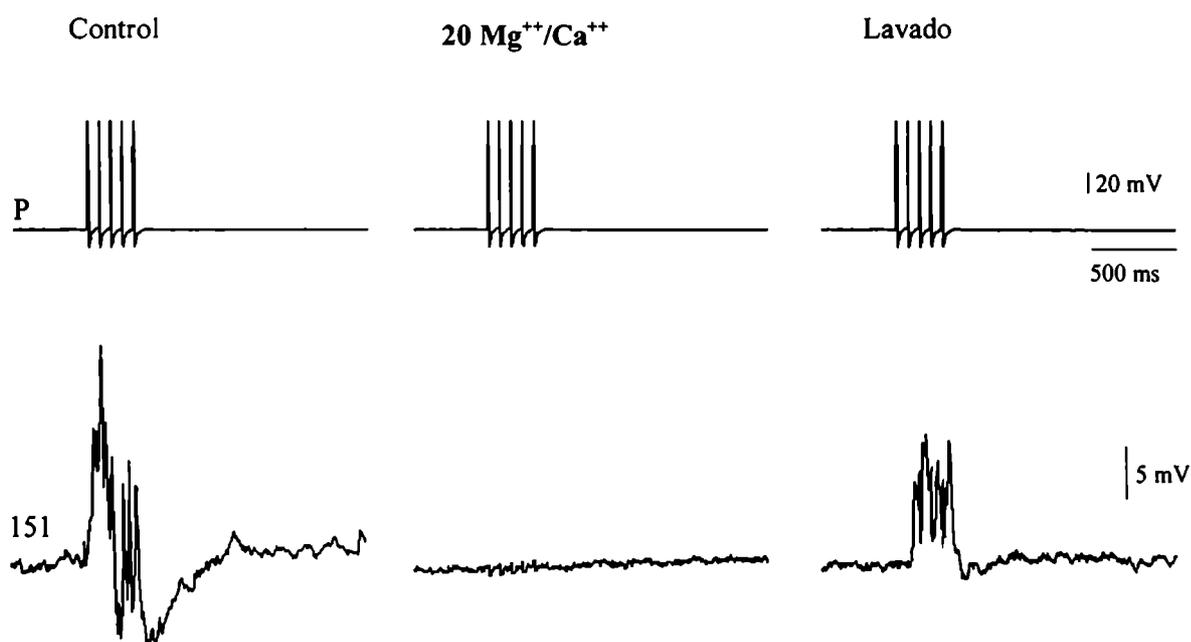
Con el fin de estudiar si las neuronas 151 exhibían selectividad entre las neuronas P que inervan los diferentes cuadrantes, analizamos la respuesta de distintos pares de neuronas P-151. Específicamente se estimularon las P dorsales y ventrales, ipsilaterales y contralaterales a las neuronas 151 (Ver Figura MyM.2). Como se observa en la Figura 2.6, la relación de la integral en el tiempo de la respuesta de las neuronas 151 con el potencial de membrana fue similar para los cuatro tipos de pares de células. El potencial de reversión de la integral no mostró diferencias significativas entre las distintas células P analizadas ( $p > 0.1$ ,  $n=4$ ). Esto indica que las células 151 responden a señales táctiles en los cuatro cuadrantes de la piel en forma equivalente.



**Figura 2.6. Respuestas de las neuronas 151 a las distintas células P.** El gráfico muestra la relación entre la integral en el tiempo de las respuestas de las neuronas 151 y su potencial de membrana. Cada símbolo del gráfico representa un tipo de neurona P estimulada: P laterales (Pl) y P medias (Pm) contra e ipsilaterales a la neurona 151 ( $n = 4$  para cada par).

### Conectividad entre las neuronas P y 151

Con el fin de estudiar la naturaleza de la interacción sináptica P-151, se analizó la interacción entre ambas perfundiendo el ganglio con una solución conteniendo 20 mM  $Mg^{++}$  y 1 mM  $Ca^{++}$  (ver Materiales y Métodos). Tanto los componentes despolarizantes como hiperpolarizantes de la respuesta fueron inhibidos, de manera reversible, con esta proporción de cationes divalentes (Figura 2.7). Estos resultados sugieren que la conexión entre las células P y las neuronas 151 está mediada por sinapsis de tipo química, tanto para la transmisión de la respuesta despolarizante como para la hiperpolarizante.

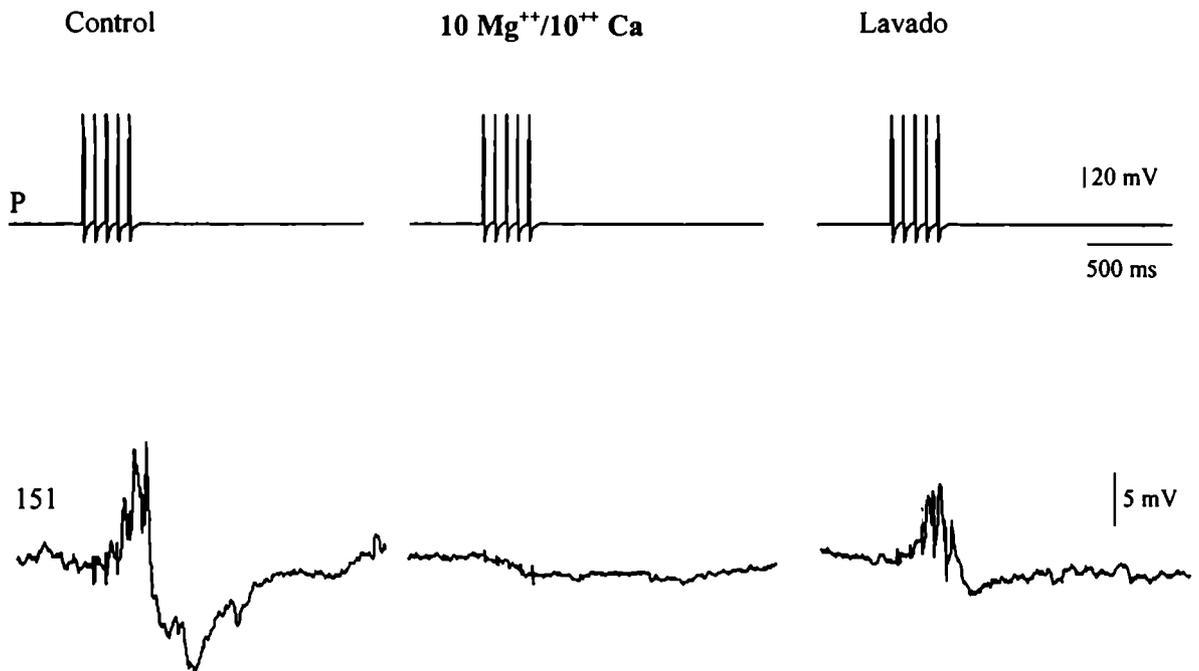


**Figura 2.7. Respuesta de la neurona 151 a la estimulación de la célula P en una solución con alta concentración de Mg<sup>++</sup>.** Registros intracelulares de las respuestas de una neurona 151 (trazos inferiores) a la estimulación de una neurona P (trazos superiores) con un tren de 5 potenciales de acción a 15 Hz en solución control, luego de perfundir 3 minutos con una solución conteniendo una relación 20/1 de Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> y luego de lavar 10 minutos con solución control. Resultados similares se obtuvieron en otras 8 preparaciones.

Para examinar si las respuestas de las neuronas 151 están mediadas por conexiones mono o polisinápticas, se analizó la interacción entre las neuronas P y 151 en una solución conteniendo 10 mM Mg<sup>++</sup> y 10 mM Ca<sup>++</sup> (ver Materiales y Métodos). Esta proporción de cationes divalentes inhibe la expresión de las interacciones polisinápticas, pues aumenta el umbral de disparo de potenciales de acción de las neuronas. Así, la célula P que recibe un estímulo suficiente para disparar potenciales de acción, es capaz de liberar neurotransmisor. Si la conexión entre la célula P y la neurona 151 es monosináptica, dicha liberación será registrada como un cambio en el potencial de membrana de la neurona 151. Si, en cambio, la conexión es polisináptica, la(s) interneurona(s) entre ambas no alcanzarán el umbral de disparo y por lo tanto no se registrará un cambio en el potencial de membrana de la neurona 151.

En presencia de 10 mM Mg<sup>++</sup> y 10 mM Ca<sup>++</sup>, tanto los componentes despolarizantes como los hiperpolarizantes de la respuesta de las células 151 se

anularon de manera reversible (Figura 2.8). Este resultado indica que la conexión entre las neuronas P y 151 involucra una capa interneuronal, tanto para las fases despolarizantes como hiperpolarizantes. Además, el resultado implica que las interneuronas transmiten información mediante el disparo de potenciales de acción.



**Figura 2.8.** Respuesta de la neurona 151 a la estimulación de la célula P en una solución con alta concentración de Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup>. Registros intracelulares de las respuestas de una neurona 151 (trazos inferiores) a la estimulación de una neurona P (trazos superiores) con un tren de 5 potenciales de acción a 15 Hz en solución control, luego de perfundir 3 minutos en solución conteniendo una relación 10/10 de Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> y luego de lavar 10 minutos con solución control. Resultados similares se obtuvieron en otras 7 preparaciones.

## **Discusión**

Los resultados de este capítulo indican que la respuesta de las neuronas 151 a la estimulación de las células mecanosensoriales P está formada por dos componentes independientes entre sí, uno despolarizante que se debe probablemente a la activación de una corriente catiónica inespecífica y otro hiperpolarizante llevado a cabo por una corriente de Cl<sup>-</sup> a través de un receptor de glicina. La interacción está mediada a través

de interneuronas que disparan potenciales de acción, y la transmisión entre las neuronas de este circuito es de naturaleza química.

Que un mismo estímulo sensorial produzca una combinación de señales excitatorias e inhibitorias al nivel de una misma célula blanco es un fenómeno en apariencia contradictorio, pero que ha sido reportado en otros estudios. En langostas (*Locusta migratoria*) y en bicho palo (*Carausius morosus*), se ha observado la convergencia de entradas sinápticas excitatorias e inhibitorias en una misma interneurona pasiva desencadenadas por un único estímulo sensorial a través de interneuronas excitatorias e inhibitorias. Dichas interneuronas pasivas tienen a su vez, al igual que las neuronas 151 en sanguijuela, la capacidad de inhibir o excitar a motoneuronas (Burrows, 1979b; Burrows, 1987 a y b; Burrows *et al.*, 1988; Laurent & Burrows, 1989a y b; Büschges & Schmitz, 1990; Büschges & Wolf, 1995).

La explicación a esta interacción funcional se da en términos de la capacidad de las interneuronas pasivas de generar circuitos locales. Diferentes áreas del árbol neurítico pueden funcionar como compartimentos independientes en los cuales un cambio en la conductancia en una ramificación no necesariamente afecte a otra electrotónicamente distante (Laurent & Burrows, 1989b). De esta manera, las interneuronas pasivas podrían distribuir las salidas excitatorias e inhibitorias en diferentes ramas actuando con cierta independencia y modificando vías diferentes.

### **Capítulo 3. Procesamiento de las señales sensoriales en la neurona 151.**

Los datos presentados en el capítulo anterior, mostraron que un tren de potenciales de acción evocados en las neuronas P, produjo respuestas de efecto antagónico en las neuronas 151. Con el fin de evaluar cómo procesan señales sensoriales las neuronas 151, examinamos en qué medida la expresión de las distintas fases de la respuesta dependía de parámetros específicos del estímulo. Se investigaron dos variables: el número de potenciales de acción en un tren a una frecuencia fija, y la frecuencia en un tren con un número fijo de potenciales de acción. A una frecuencia fija, el número de potenciales de acción indica la duración del estímulo, mientras que para un número fijo de potenciales de acción la frecuencia indica la intensidad del estímulo.

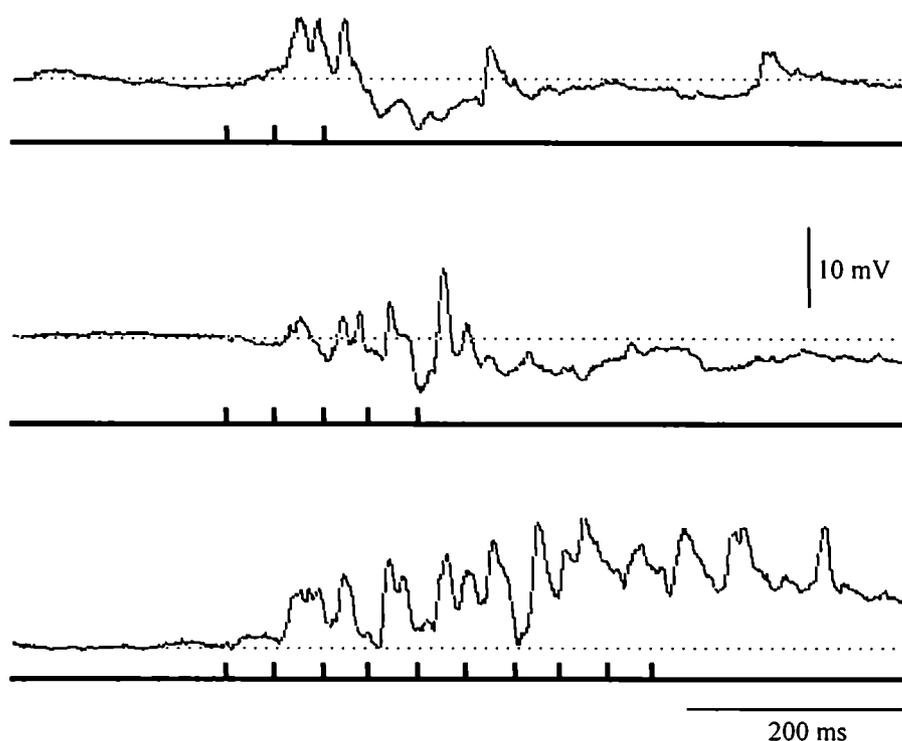
#### **Resultados**

##### **Dependencia de la respuesta de las células 151 a la estimulación de células P con trenes de disparos de diferente duración.**

En ganglios aislados, neuronas P fueron estimuladas con trenes de potenciales de acción de duración variable a una frecuencia de 15 Hz. Trenes cortos (< 400 ms), compuestos de 1-6 potenciales de acción produjeron respuestas en las neuronas 151 en las que se observaron despolarizaciones fásicas montadas en una hiperpolarización. Las despolarizaciones se mantuvieron durante el período de estimulación, mientras que la hiperpolarización se extendió mucho más allá del período del estímulo. Trenes largos (> 500 ms) de potenciales de acción produjeron una sucesión de despolarizaciones fásicas, sin que se evidencie la fase hiperpolarizante. La Figura 3.1 muestra registros representativos en los cuales 3 y 5 potenciales de acción en las células P produjeron respuestas despolarizantes en las neuronas 151 superpuestas a una hiperpolarización prolongada de pequeña amplitud, mientras que un tren de 10 potenciales de acción produjo una respuesta despolarizante en la cual la hiperpolarización no se observó.

Con el fin de cuantificar la expresión de las diferentes fases de la respuesta de las neuronas 151 en función de la duración del tren de disparos en las neuronas P, se midió en cada registro la amplitud máxima de cada fase de la respuesta. La Figura 3.2 muestra la relación que guarda la expresión de cada fase con el número de potenciales

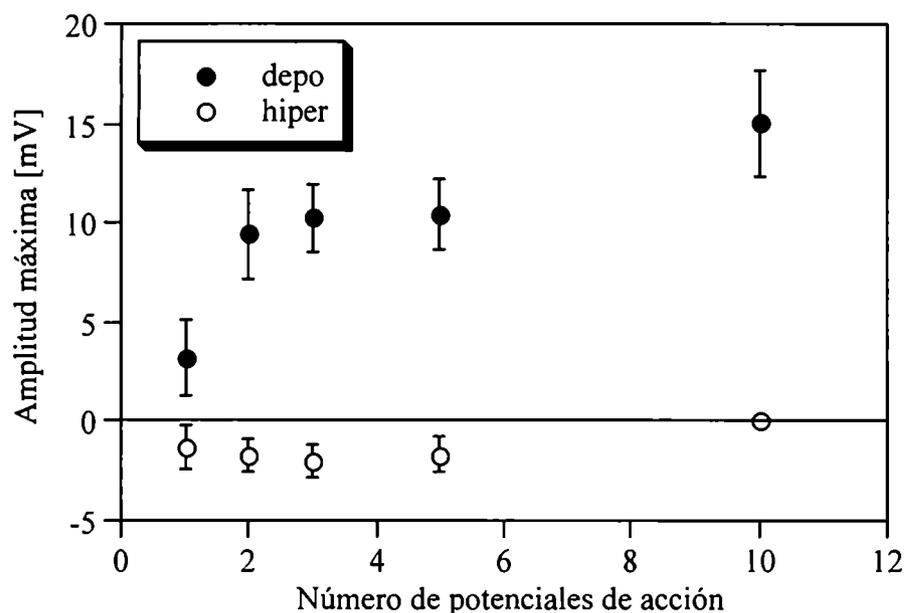
de acción disparados por las células P. La amplitud de la despolarización aumentó marcadamente (alrededor de 300%) entre el primer y segundo potencial de acción del tren y permaneció a ese nivel en los trenes cortos mientras que la máxima amplitud de la hiperpolarización aumento levemente (24%) entre el primer y segundo potencial de acción del tren. Con la aplicación de trenes largos, la máxima amplitud de la despolarización experimentó un incremento adicional mientras que la hiperpolarización dejó de observarse.



**Figura 3.1. Respuestas de las células 151 a la evocación de distinto número de potenciales en una neurona P.** Los tres registros muestran las respuestas de una neurona 151 a 3, 5 y 10 potenciales de acción evocados en la célula P; las líneas verticales debajo de los registros indican la temporalidad de los disparos de la célula P .

Los datos de la Figura 3.2 sugieren que la hiperpolarización en las neuronas 151 alcanzó su máximo desarrollo, en amplitud y duración, alrededor del tercer potencial de acción del tren. Esta observación induce a pensar que en respuesta a trenes largos de estimulación la hiperpolarización está presente, pero enmascarada por la fase despolarizante. Para verificar esta interpretación, se compararon las respuestas de

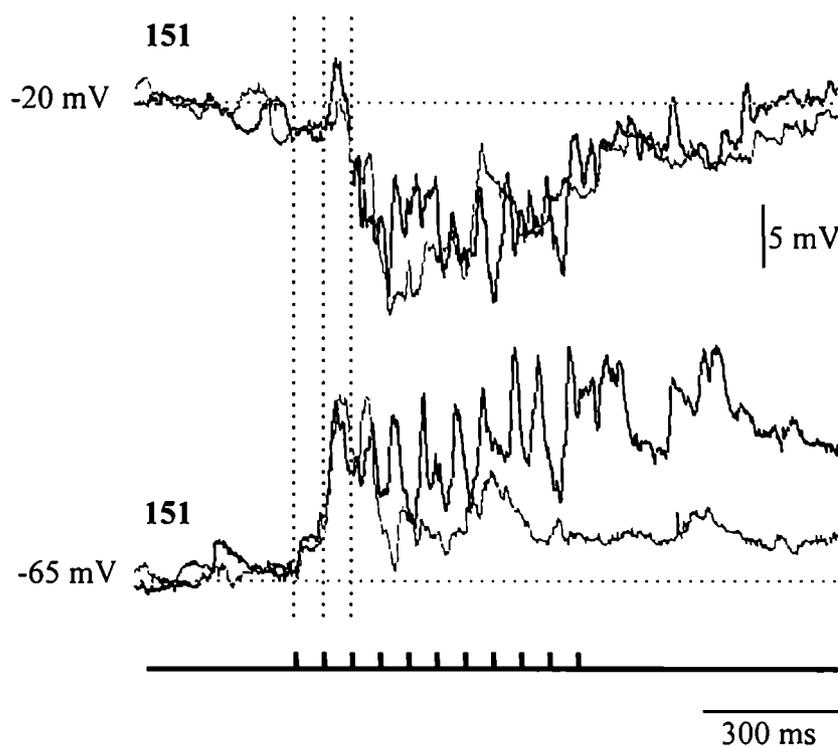
células 151 producidas por la estimulación de células P con trenes cortos y largos manteniendo su potencial de membrana a un valor en el cual se prima la expresión de la hiperpolarización por sobre la despolarización. A  $-20$  mV, debido a las fuerzas electromotrices relativas de cada fase de la respuesta, la hiperpolarización es la respuesta predominante (ver Figura 2.2).



**Figura 3.2. Relación de la amplitud de la despolarización y la hiperpolarización de la neurona 151 con el número de potenciales de acción evocados en la célula P.** El gráfico muestra el promedio de la amplitud máxima de las respuestas despolarizantes e hiperpolarizantes de las células 151 (ver Figura 2.1) en función del número de potenciales de acción en la neurona P. Las barras indican error estándar de la media ( $n = 5$ ).

Como se observa en la Figura 3.3, a  $-20$  mV, los cursos temporales de las hiperpolarizaciones de la neurona 151 evocados por trenes de estimulación de 3 y 11 potenciales de acción fueron altamente similares. Esto confirma que la hiperpolarización producida por 11 potenciales de acción no produjo un incremento en la amplitud o en la duración de la hiperpolarización evocada por 3 potenciales de acción. Por otra parte, las respuestas de la misma célula sostenida a  $-65$  mV, potencial en el cual priman las respuestas despolarizantes (ver Figura 2.2), coincidieron en el

tramo inicial, correspondiente a los 3 primeros potenciales de acción. Al final del tren corto, la célula 151 retornó cerca de su nivel basal, mientras que en respuesta al tren largo, la célula mostró la típica sucesión de despolarizaciones (Figura 3.3).

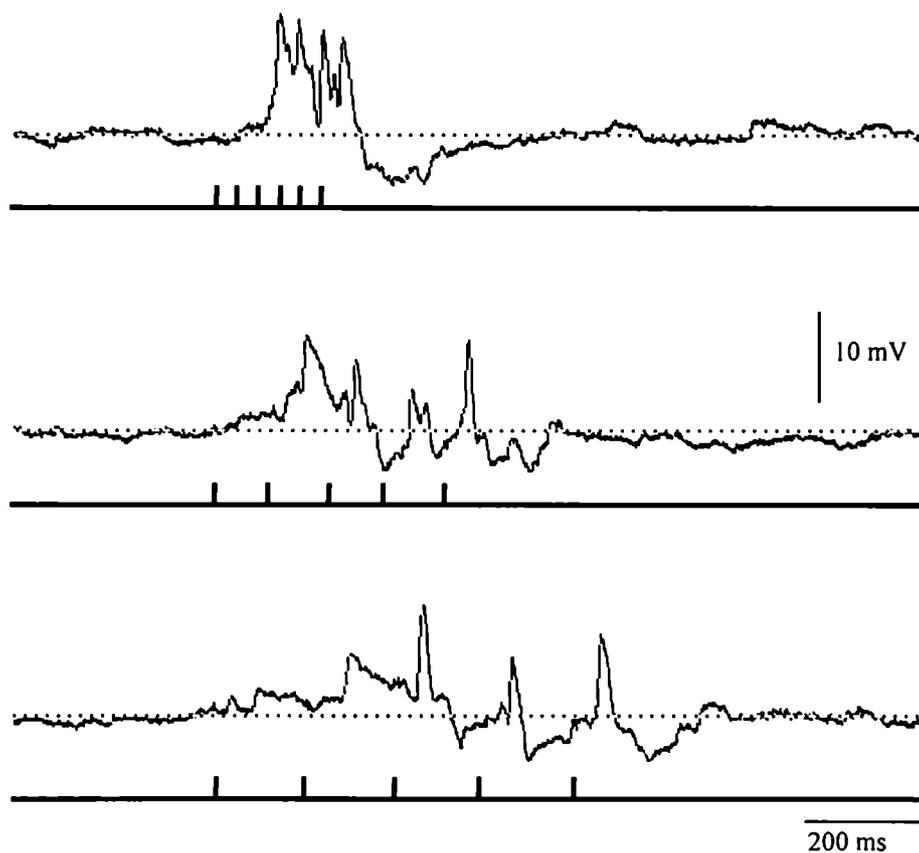


**Figura 3.3.** Comparación entre las respuestas de la neurona 151 a la estimulación de la célula P con trenes cortos y largos. Los registros muestran las respuestas de una neurona 151 a trenes de 3 (gris) y 11 (negro) potenciales de acción a 15 Hz en la célula P, obtenidos cuando la neurona 151 fue llevada a  $-20$  y  $-65$  mV (indicados a la izquierda). Los registros obtenidos en un mismo potencial de membrana fueron superpuestos. Las líneas punteadas verticales indican la temporalidad de los tres primeros potenciales de acción en la neurona P, y las líneas verticales debajo de los registros indican la temporalidad de los 11 disparos de la célula P. Resultados similares se obtuvieron en otras 6 preparaciones.

### **Dependencia de las respuestas de las células 151 a la estimulación de células P con trenes a diferente frecuencia de disparo.**

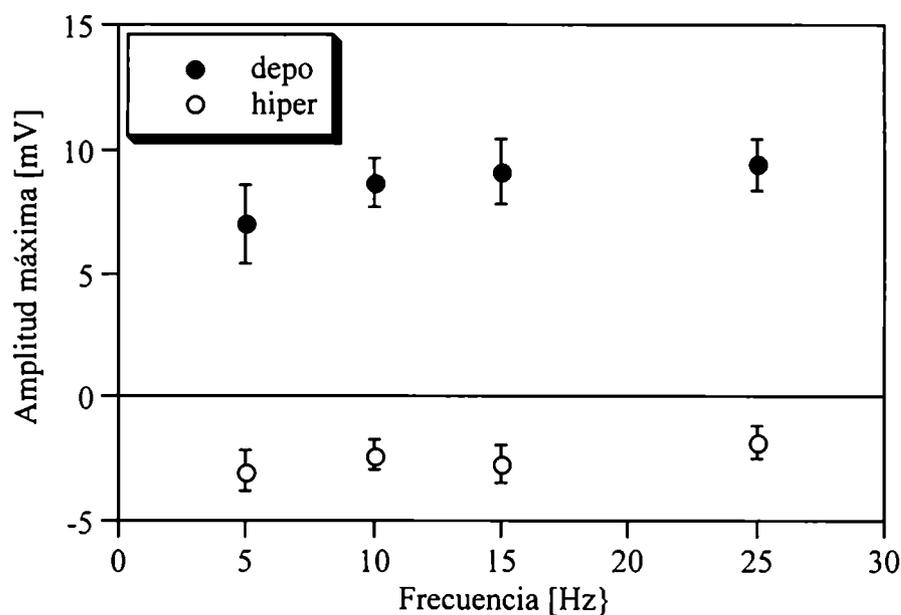
Para investigar el efecto de la frecuencia de estimulación, se analizó la respuesta de las células 151 a trenes de 5 potenciales de acción en las células P disparados a diferentes frecuencias (5-25 Hz). La Figura 3.4 muestra registros representativos. En

todos los casos se observó la superposición de las despolarizaciones sobre la fase hiperpolarizante.



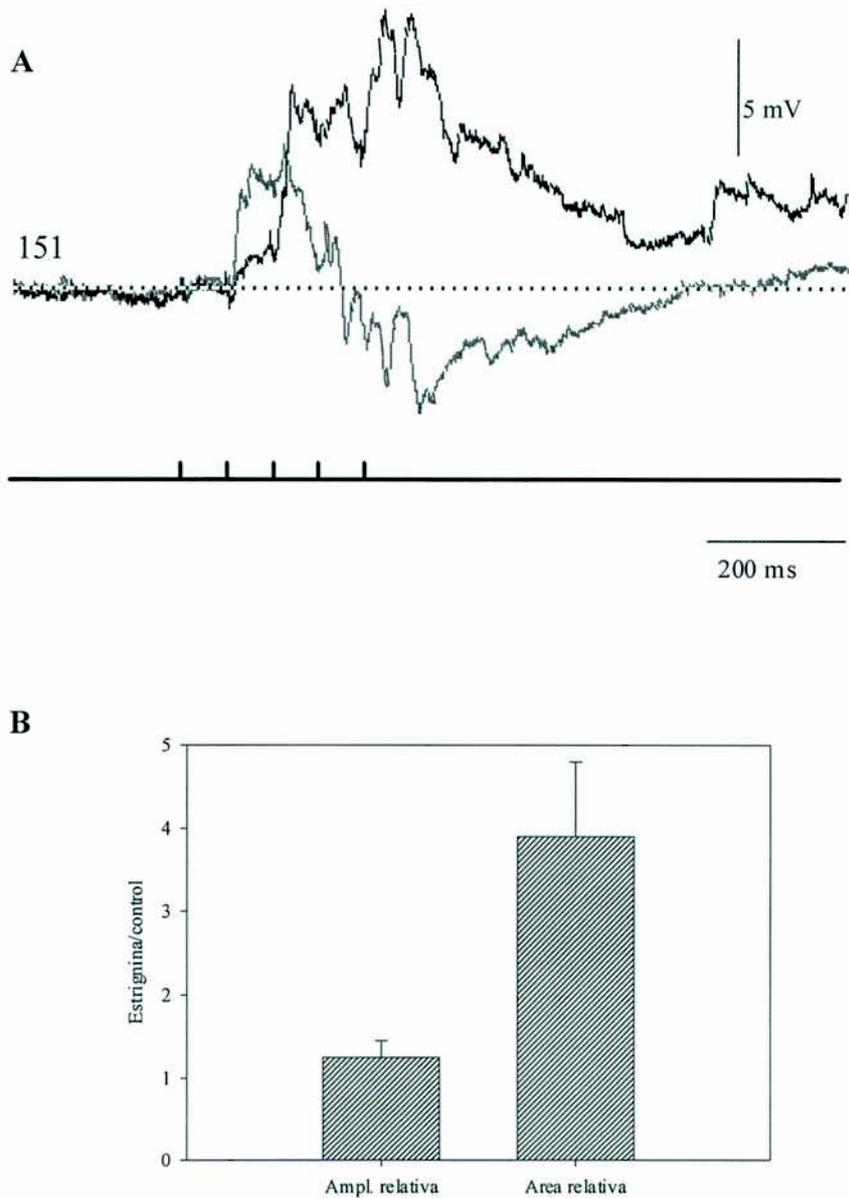
**Figura 3.4. Respuestas de las células 151 a la evocación de cinco potenciales de acción en la célula P a diferentes frecuencias.** Los tres registros muestran las respuestas de una neurona 151 a la estimulación de la célula P con cinco potenciales de acción aplicados a 25, 10 y 5 Hz; las líneas verticales debajo de los registros indican el momento en que la célula P disparó potenciales de acción.

El período de las despolarizaciones se correspondió con el período del estímulo y no se observó un efecto significativo de la frecuencia de estimulación sobre la amplitud alcanzada por esta fase (Figura 3.5). La amplitud alcanzó un plateau a una frecuencia de 10 Hz, indicando que un período entre disparos de 100 ms fue suficiente para producir la sumación temporal causada por los sucesivos potenciales de acción que se observan en la Figura 3.2.. La amplitud de las hiperpolarizaciones no mostró dependencia respecto de las distintas frecuencias de estimulación estudiadas (Figura 3.5).



**Figura 3.5. Relación de la amplitud de la despolarización y la hiperpolarización de la neurona 151 con la frecuencia de disparo de potenciales de acción en la célula P.** El gráfico muestra el promedio de la amplitud máxima de las respuestas despolarizantes e hiperpolarizantes de las células 151 (ver Figura 2.1) en función de la frecuencia de estimulación de la neurona P. Las barras indican error estándar de la media (n = 12).

Estos resultados sugieren que la fase hiperpolarizante de la respuesta de las células 151 a la estimulación de la neurona P fue mayormente efectiva en configurar el desarrollo de la despolarización producida por trenes cortos. En virtud de su desarrollo relativamente lento, la hiperpolarización fue efectiva una vez que la despolarización alcanzó una amplitud sustancial, y entonces redujo el crecimiento de la misma. Esta interpretación, se ve confirmada al comparar las respuestas en condiciones control con las obtenidas en presencia de estrignina 10  $\mu\text{M}$ , la cual bloqueó eficientemente la fase hiperpolarizante.



**Figura 3.6. Comparación de las respuestas de células 151 en presencia y en ausencia del componente hiperpolarizante. A.** Los registros superiores superpuestos muestran las respuestas de una neurona 151 a la estimulación de la célula P con un tren de cinco potenciales de acción a 15 Hz, obtenidos cuando el ganglio fue perfundido con solución control (gris) o con una solución conteniendo estrignina 10  $\mu$ M (negro). Ambos registros fueron obtenidos cuando la neurona 151 se encontraba en su potencial de reposo. Las líneas verticales debajo de los registros indican la temporalidad de los disparos de la célula P. **B.** Las barras muestran el promedio de la relación entre la amplitud y el área positiva, medida en los registros de ganglios perfundidos con estrignina sobre los medidos en solución control. Las barras verticales indican error estándar de la media. (n = 8).

La Figura 3.6 muestra la superposición de registros obtenidos en condiciones control y en presencia de estrignina. En ausencia de la respuesta hiperpolarizante, la despolarización se desarrolló en forma monotónica y, en promedio, la amplitud de la despolarización creció solamente alrededor de un 22%, pero la integral en el tiempo experimentó un incremento de alrededor de 4 veces (Figura 3.6 inferior).

## **Discusión**

En este capítulo se analiza la manera en que las células 151 procesan la información proveniente de las neuronas mecanosensoriales P. En el capítulo 2 se demostró que la estimulación de las células P generaba en las neuronas 151, una respuesta compuesta por fases excitatorias e inhibitorias que pueden expresarse en forma independiente. La fase hiperpolarizante mostró un desarrollo monotónico que alcanzó su máxima amplitud y duración en el curso de los primeros 3 potenciales de acción. Es particularmente notable que esta fase de la respuesta fue insensible a la acción de disparos adicionales, como si la interneurona que media esta señal indicase solamente el “on” o comienzo de la señal sensorial, pero fuese insensible a la duración del estímulo.

En contraposición, el componente despolarizante se expresó a lo largo de todo el estímulo como deflexiones fásicas, pudiéndose desarrollar varias deflexiones en respuesta a cada potencial de acción en la célula P. Es decir, la respuesta despolarizante no siguió uno a uno los potenciales de acción en la célula P. Esto sugiere que la vía polisináptica excitatoria que media el circuito P-151 se compone de varias neuronas. De esta manera se infiere que las neuronas 151 son depositarias de la acción convergente de varias neuronas excitatorias activadas por el estímulo mecanosensorial.

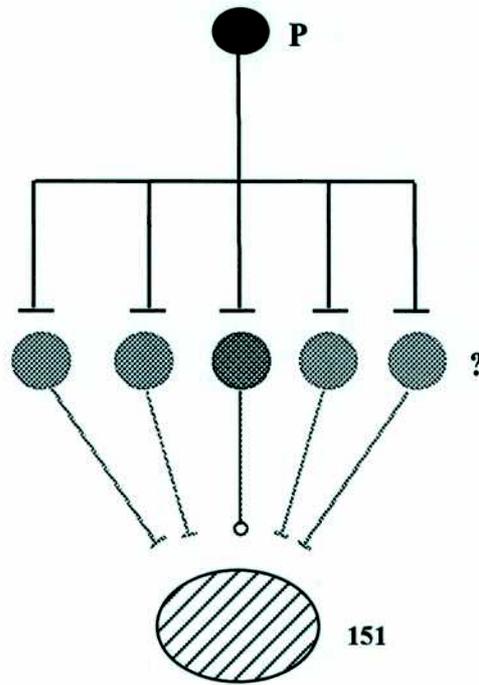
La interacción entre los dos componentes antagónicos de la respuesta en las neuronas 151 indica que, a nivel de registros somáticos, la fase hiperpolarizante fue más efectiva en los estímulos mecanosensoriales cortos, es decir, las despolarizaciones fueron sesgadas por la fase negativa. Como se evidencia en los experimentos en los cuales la hiperpolarización fue farmacológicamente bloqueada, la fase negativa tenía un fuerte efecto en el desarrollo temporal de la despolarización producida por trenes cortos. En lugar de eso, los trenes largos que se extendieron más allá del pico máximo de la hiperpolarización produjeron una sumación neta sostenida de las deflexiones

despolarizantes. Este fenómeno fue relativamente insensible a la frecuencia de disparo en la célula P.

Estos resultados indican que en la red P-151 los estímulos mecanosensoriales cortos no fueron versiones concisas de estímulos largos, sino que llevan información que se minimiza durante la estimulación prolongada. Este hecho es interesante ya que si bien la activación de las neuronas mecanosensoriales P desencadena muchos de los comportamientos de la sanguijuela, las diferentes respuestas comportamentales dependen de diferentes formas de estimulación (Kristan *et al.*, 1982).

En resumen, los resultados se representan en el modelo de la figura 3.8. Este modelo propone que las neuronas P están sinápticamente conectadas con varias interneuronas activas (disparan potenciales de acción) en el ganglio las cuales se conectan con la neurona 151. De acuerdo a este modelo, varias interneuronas excitatorias producen las respuestas despolarizantes fásicas en la neurona 151 y una interneurona glicinérgica produce una respuesta hiperpolarizante lenta. Esta única neurona inhibitoria puede representar a varias interneuronas con efectos indistinguibles entre si. Las células P producen respuestas excitatorias en una variedad de interneuronas en la sanguijuela, en particular han sido descritas 7 interneuronas que reciben la señal sensorial proveniente de la neurona P y están ubicadas en la superficie ventral del ganglio (interneuronas 157, 159, 161, 162, 169, 212 y 218) y 2 en la dorsal (interneuronas 115 y 125) (Lockerey & Kristan, 1990b). Las mismas podrían representar posibles interneuronas en la vía que conecta las células P y 151.

Los resultados muestran que la célula 151 es un sensor en el que converge la actividad interneuronal iniciada por un estímulo mecanosensorial, y, debido a su conectividad con neuronas motoras y modulatorias, puede producir un efecto significativo en la integración sensorio-motora.



**Figura 3.8.** Esquema de la conectividad entre las neuronas P y 151. Las interneuronas excitatorias están representadas en gris y la inhibitoria en negro.

## Capítulo 4. La neurona 151 en el circuito P-Rz.

Los resultados de los capítulos anteriores mostraron por un lado la capacidad de las neuronas 151 de afectar la actividad de las células serotoninérgicas Rz y por otro de recibir y procesar la señal mecanosensorial.

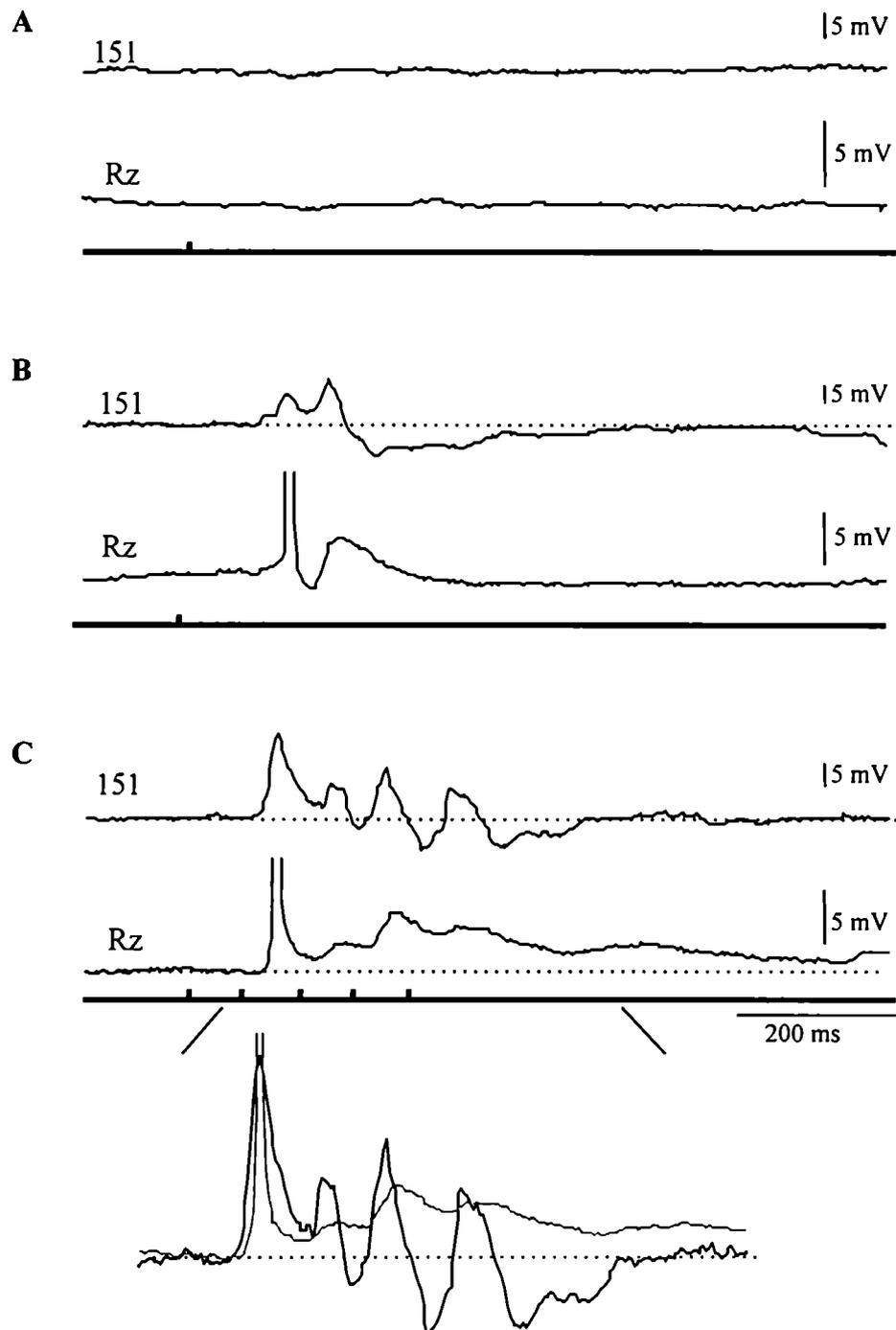
Como fue descrito anteriormente, tanto las células 151 como las Rz reciben la señal sensorial proveniente de las neuronas P a través de una capa de interneuronas. Con el objetivo de analizar el papel que juegan las neuronas 151 en la vía que conecta las células P con las Rz, se realizaron registros intracelulares de las tres células en simultáneo. Esta estrategia nos permitió, por un lado, comparar las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de las células P. Por otro lado, estudiamos cómo modificaciones del potencial de membrana de las neuronas 151 podrían modificar la llegada de la información sensorial a las células Rz.

### **Resultados**

#### **Respuestas de las neurona 151 y Rz a la estimulación de la célula P**

Se realizaron experimentos en ganglios medios aislados en donde se aplicaron trenes de diferente número de potenciales de acción en las neuronas P mientras se registró en forma simultánea a las neuronas 151 y Rz. En la Figura 4.1 se observan registros intracelulares de las respuestas de las neuronas 151 y Rz ante la estimulación con uno(A), tres (B) y cinco (C) potenciales de acción en la neurona P. Como se observa, un solo potencial de acción en la neurona P no produjo respuesta en la célula 151, así como tampoco en la neurona Rz. Los trenes de tres y cinco potenciales de acción en la célula P produjeron la típica respuesta en la neurona 151 compuesta por fases despolarizantes e hiperpolarizantes, y en la neurona Rz una despolarización monofásica previamente descrita (Szczupak & Kristan, 1995). Como se observa en la ampliación de la Figura 4.1.C, ambas células muestran una marcada coincidencia temporal en sus fases despolarizantes, a pesar de la diferencia que impone la fase hiperpolarizante de la respuesta de la neurona 151. En todos los registros observados ( $n > 20$ ), la fases positivas de la respuesta de las neuronas 151 a la estimulación de las células P se correlacionaron con despolarizaciones del potencial de membrana de las

neuronas Rz. Sin embargo, no se observó una relación entre las amplitudes de las respuestas de ambas células.



**Figura 4.1. Respuestas de las neuronas Rz y 151 a la estimulación de la célula P.** Los registros muestran las respuestas de una célula 151 y una neurona Rz (indicadas sobre cada registro) a la estimulación de la neurona P. La célula P fue estimulada de manera que disparara 1 (A), 3 (B) y 5 (C) potenciales de acción. Las barras verticales debajo de cada registro indican el momento en que disparó un potencial de acción la célula P. En C se muestra una amplificación y superposición de los dos registros.

Con el objetivo de evaluar cuantitativamente esta correlación entre las fases despolarizantes, se analizó la respuesta de ambas a la estimulación de las neuronas P con solo 1 y 2 potenciales de acción. En esta condición, las células 151 presentan 4 tipos de respuestas: pueden no responder, responder con una despolarización, responder con una hiperpolarización o responder con ambas fases. La tabla 4.1 resume los resultados, la probabilidad de que ocurran cada una de estas 4 respuestas es distinta para estímulos con un solo potencial de acción en las neuronas P que para dos. Básicamente, ante un estímulo con dos potenciales de acción, la probabilidad de que la célula 151 no responda decrece, y aumenta la probabilidad de que ocurra una despolarización, sola o en combinación con hiperpolarización. En todos los casos analizados, las células Rz expresaron una despolarización, únicamente cuando las neuronas 151 presentaron la fase despolarizante de la respuesta independientemente de la presencia o ausencia de la hiperpolarización. No se observó respuesta en las neuronas Rz cuando las neuronas 151 mostraron únicamente la fase hiperpolarizante de la respuesta o cuando no respondieron.

<b>Respuesta en 151</b>	<b>1 pot. de acción en P</b>	<b>2 pot. de acción en P</b>	<b>Respuesta en Rz</b>
Ninguna	50 %	17 %	Ninguna
Hiperpolarizante	17 %	17 %	Ninguna
Despolarizante	8 %	25 %	Despolarizante
Despo/Hiper	25 %	41 %	Despolarizante

**Tabla 4.1. Respuestas de las neuronas 151 y Rz a estímulos breves de la célula P.** Se registraron las respuestas de las células 151 y Rz a la estimulación de la neurona P con 1 o 2 potenciales de acción. Se clasificó la respuesta de la célula 151 en cuatro clases. La cuarta columna indica la respuesta simultánea de las neuronas Rz (n=12).

La marcada coincidencia temporal entre las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de las células P llevó a pensar en dos posibles circuitos de interacción entre estas células (Fig. 4.2): una opción sería que las células 151 fuesen presinápticas a las neuronas Rz en el circuito que conecta P-Rz, y en ese caso la despolarización de las neuronas 151 produciría la liberación gradual de neurotransmisor capaz de afectar el potencial de membrana de las células Rz (Fig. 4.2A). La otra opción sería que ambas

células reciban señales provenientes de las mismas interneuronas, produciendo respuestas con un curso temporal similar (Fig. 4.2B).

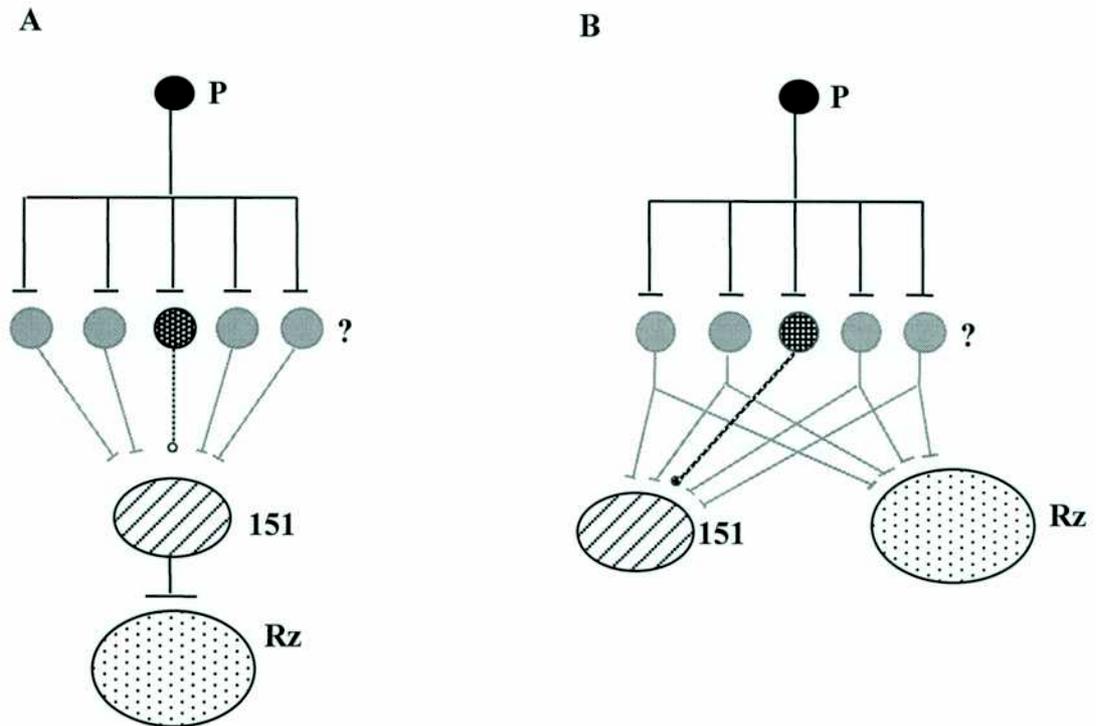
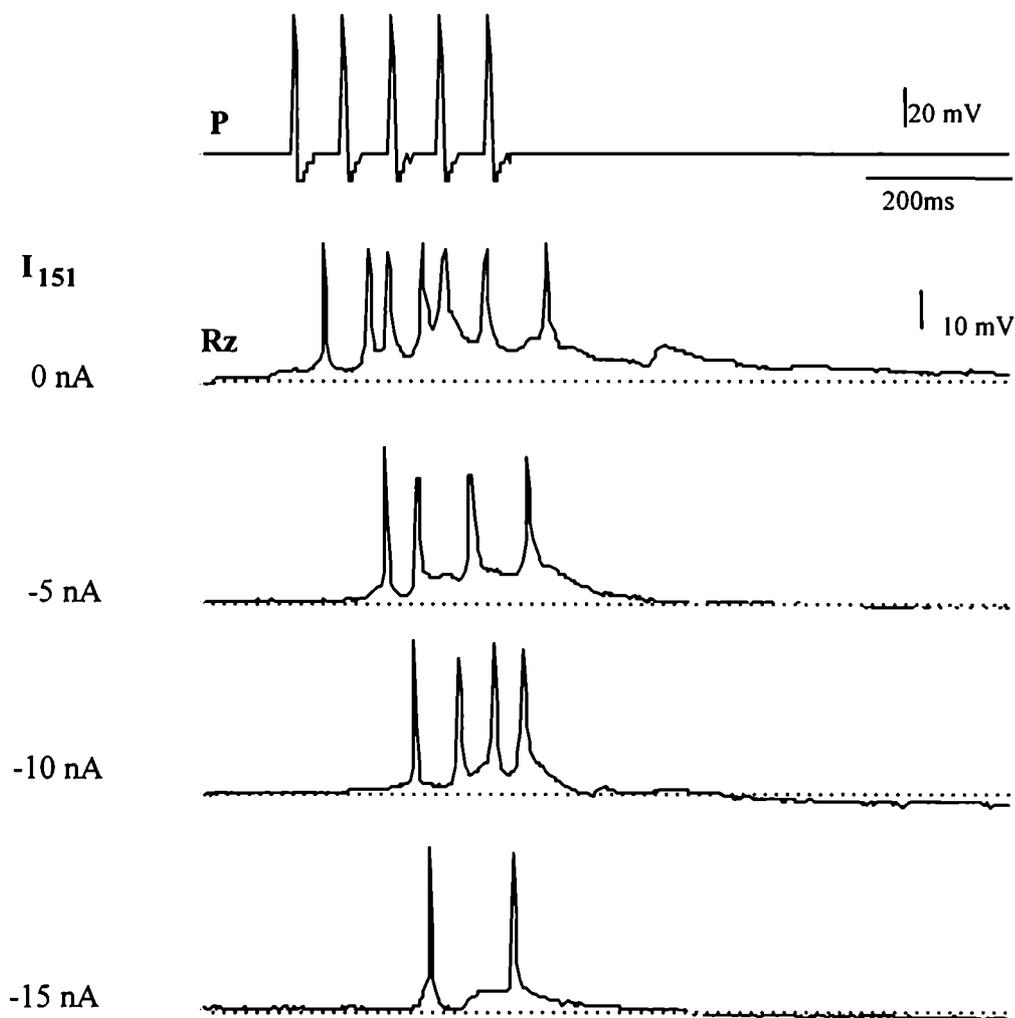


Figura 4.2. Esquemas de los dos posibles circuitos que conectan a las neuronas P, 151 y Rz.

### Papel de la neurona 151 en el circuito P-Rz

Con el fin de distinguir entre los dos circuitos posibles se analizaron, en primer lugar, las latencias de las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de la célula P. Si las células 151 fueran presinápticas a las neuronas Rz, el comienzo de sus respuestas debería preceder siempre al de las células Rz. Para realizar este análisis consideramos únicamente las respuestas en que las neuronas expresaron una despolarización ante el primer potencial de acción en la neurona P y medimos el período entre el pico del potencial de acción en P y el comienzo de la respuesta de ambas células. La latencia sináptica para la interacción entre las células P-Rz fue de  $32 \pm 10$  ms, y para P-151 fue de  $18 \pm 9$  ms ( $n = 12$ ). En todos los pares, las respuestas de las células Rz se retrasaron respecto de las de las células 151 en aproximadamente 12 ms ( $12 \pm 2.5$  ms). Estos resultados apoyan la hipótesis que postula que las neuronas Rz son postsinápticas a las células 151. Si este fuera el caso, la salida de la neurona 151

debería ser regulada de manera gradual por su potencial de membrana. De esta manera, es

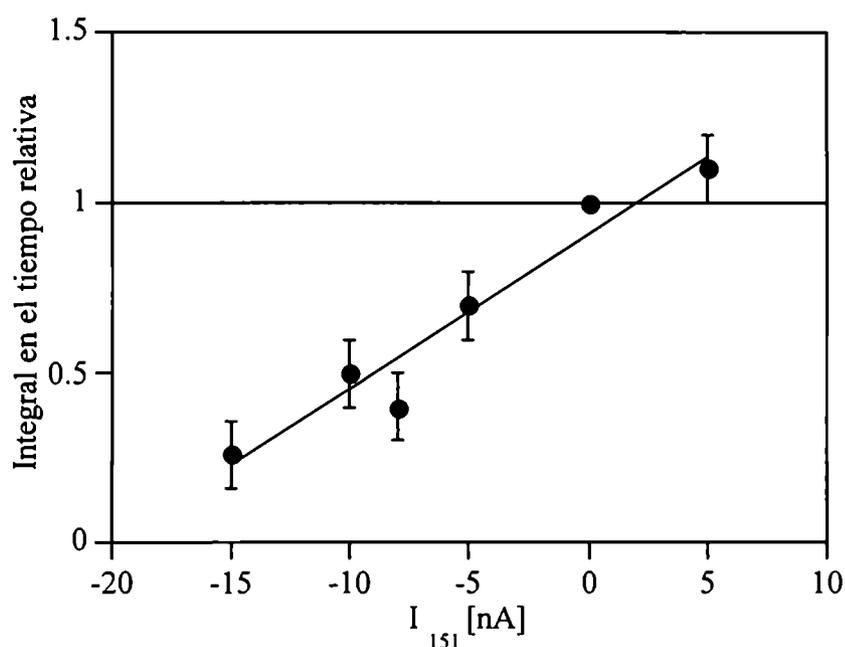


**Figura 4.3.** Respuestas de la neurona Rz a estímulos en la célula P durante la hiperpolarización de la célula 151. Registros representativos de las respuestas de una neurona Rz (trazos inferiores) a la estimulación de la célula P con cinco potenciales de acción a 15 Hz (trazo superior) durante la inyección de corriente hiperpolarizantes de distintas intensidades en la célula 151. La intensidad de dicha corriente se indica a la izquierda de cada trazo. El orden con que se inyectaron las corrientes de diferente intensidad fue al azar. Los sucesivos episodios se tomaron cada 2 minutos para evitar el decaimiento de la respuesta en la célula. La neurona Rz fue llevada a un potencial de membrana de  $-65$  mV con el fin de evitar disparos espontáneos.

esperable que el máximo cambio en el potencial de membrana de las neuronas 151, en su fase despolarizante, precediera al máximo cambio en el potencial de membrana de las neuronas Rz. Para estudiar esto, calculamos las derivadas de primer orden de las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de la célula P con un tren de cinco

potenciales de acción. Se compararon los tiempos de la derivada máxima para ambas neuronas y se observó que la correspondiente a las neuronas Rz estaba siempre retrasada respecto a la correspondiente a las células 151 en alrededor de 4 ms ( $4.2 \pm 0.9$  ms,  $n = 8$ ). Estos resultados, si bien son correlaciones, apoyan la idea de que la respuesta en las células Rz sigue los cambios en el potencial de membrana de las neuronas 151.

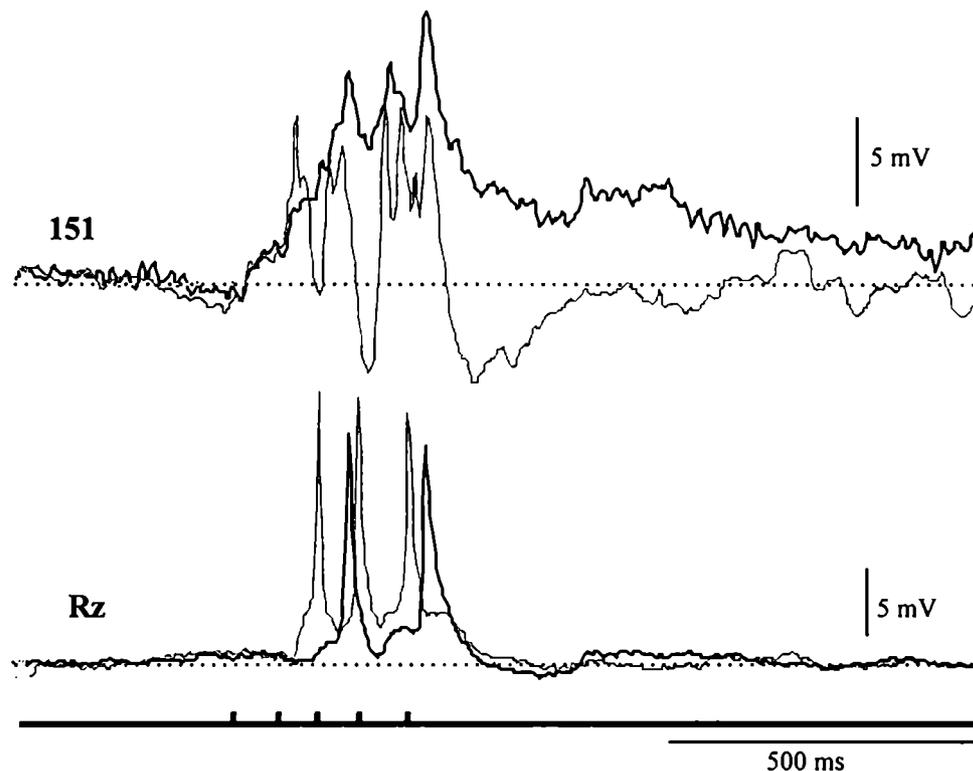
Como segunda aproximación para estudiar si las neuronas 151 formaban parte de la capa de interneuronas que separa las células P de las Rz, realizamos experimentos en los que causamos la 'ablación' reversible de la neurona 151. La maniobra experimental que usualmente se emplea para tal fin es hiperpolarizar electrotónicamente a la neurona que se intenta descartar del circuito.



**Figura 4.4. Relación entre la corriente inyectada en la neurona 151 y las respuestas de la célula Rz a estímulos en la neurona P.** En experimentos ( $n=6$ ) como el mostrado en la Figura 4.3 se midió la integral en el tiempo de las respuestas de neuronas Rz a la estimulación de la neurona P. La integral en el tiempo se midió como se muestra en la Figura 2.2.C y se expresó como medida relativa a la obtenida en condición control ( $I_{151}=0$ ). El gráfico muestra el promedio de la integral en el tiempo de la respuesta de la neurona Rz en función de la corriente inyectada en la neurona 151. Las barras indican error estándar de la media.

El efecto de la hiperpolarización es alejar a la neurona del umbral de liberación del neurotransmisor por parte de la misma, siendo éste un efecto reversible al retornar a la membrana a su potencial normal. Si la neurona 151 es presináptica a las células Rz, la respuesta de las neuronas Rz a la estimulación de la neurona P debería modificarse al hiperpolarizar a la neurona 151.

Se registró la respuesta de las neuronas Rz a la estimulación de la neurona P mientras la neurona 151 recibía una inyección de corriente hiperpolarizante. El experimento se realizó inyectando corrientes de distintas intensidades.



**Figura 4.5. Comparación de las Respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de la célula P durante la inyección de corriente en la célula 151.** Superposición de registros representativos mostrando las respuestas de las células 151 y Rz (indicadas en los trazos) a la estimulación de la neurona P en condiciones control (gris) y durante la inyección de  $-8$  nA en la neurona 151 (negro). Las barras verticales debajo de los registros indican el momento en que disparó un potencial de acción la célula P. Las respuestas de la neurona Rz fueron registradas en el mismo potencial de membrana; sin embargo, las dos respuestas de la neurona 151 corresponden a potenciales de membrana diferentes. El trazo gris se registró en reposo, mientras que el potencial de membrana del trazo negro corresponde a un potencial por debajo de los  $-100$  mV.

Como se observa en el ejemplo de la Figura 4.3 la inyección de corriente negativa en la neurona 151 produjo una disminución gradual de la respuesta de la célula Rz a la estimulación de la neurona P. La respuesta en las neuronas Rz se cuantificó midiendo su integral en el tiempo durante 800 ms después de primer potencial de acción en la neurona P. La Figura 4.4 muestra la magnitud de las respuestas de las neuronas Rz en función de la intensidad de corriente negativa inyectada en la célula 151. Dicha función cumple con una relación lineal ( $R= 0.97$ ).

La inyección de corriente positiva en la neurona 151 no afectó la respuesta de la célula Rz: mientras que la inyección de  $-5$  nA en la célula 151 produjo un cambio significativo en la integral en el tiempo de la respuesta de las neuronas Rz ( $p < 0,05$ ), la inyección de  $+5$  nA no produjo cambios significativos ( $p > 0.1$ ).

En la Figura 4.5 se observa que la inyección de corriente negativa en la neurona 151, que redujo marcadamente la respuesta en las células Rz, no redujo su propia respuesta a la estimulación de la célula P. Nótese que la inyección de corriente negativa en las células 151 lleva su potencial de membrana a valores debajo del potencial de reversión de la fase hiperpolarizante y por lo tanto la respuesta que se observa es monotónica despolarizante. La respuesta de las neuronas Rz durante la hiperpolarización de la célula 151 mostró, además, un retardo en el comienzo (Figura 4.5) . Esto también podría explicarse por el hecho de que la hiperpolarización de la neurona 151 la aleja del umbral de liberación de neurotransmisor en forma gradual y por lo tanto se produce un retraso y un decremento en la amplitud del efecto postsináptico sobre la neurona Rz.

## **Discusión**

La alta correlación entre las respuestas de las neuronas 151 y Rz a la estimulación de las neuronas mecanosensoriales P, sugiere que ambas neuronas están conectadas a un mismo circuito neuronal. Los diferentes análisis realizados en este capítulo estuvieron dirigidos a evaluar si las neuronas 151 y Rz son blancos de la acción en paralelo de una misma capa de interneuronas activadas por el estímulo sensorial (Fig. 4.2B) o si existe una relación causal entre las respuestas de las neuronas 151 y las de las neuronas Rz (Fig. 4.2.A). En apoyo a la hipótesis esbozada en la Figura 4.2.A observamos que:

1) La despolarización de las neuronas 151 siempre precedió la despolarización en las neuronas Rz.

2) Sólo se observó despolarización en las neuronas Rz en los casos en que el estímulo sensorial produjo una respuesta con componentes despolarizantes en las neuronas 151 y no cuando solo produjo respuesta compuesta por fase hiperpolarizante únicamente.

3) La ablación reversible de la neurona 151, por hiperpolarización de la misma, produjo una disminución gradual de la respuesta de las neuronas Rz a la estimulación de las células P. La hiperpolarización aleja a la neurona 151 de su umbral de liberación del neurotransmisor y por lo tanto disminuye la eficacia de las despolarizaciones en la transmisión sináptica. La intensidad de las corrientes inyectadas en las neuronas 151 fueron similares a las que resultaron efectivas en disminuir la frecuencia de disparos de las neuronas Rz a través del acople eléctrico existente entre ambas (Capítulo 1).

De esta manera la neurona 151 tiene la capacidad de desacoplar la llegada de la señal sensorial a las neuronas serotoninérgicas Rz. Este efecto de desacople de la llegada sensorial, es decir de presentar la capacidad de afectar la ganancia de reflejos locales por modificaciones en su potencial de membrana, se observó también en interneuronas pasivas de vías sensorio-motoras en langostas (Laurent & Burrows, 1989b). Más aún, la hiperpolarización de la célula 151 desacopla también la entrada sensorial a motoneuronas específicas (Iscla *et al.*, 1999).

La hipótesis que postula que la despolarización de las neuronas Rz es consecuencia directa de la despolarización de las neuronas 151 se contradice con que la inyección de corriente despolarizante en las neuronas 151 no produjo un cambio en el potencial de membrana de la neurona Rz (Capítulo 1). El análisis de esta contradicción requiere considerar la configuración experimental. Los registros y la inyección de corriente se llevan a cabo en el soma, cuando las interacciones sinápticas eléctricas o químicas tienen lugar en regiones distales en el neuropilo. Por lo tanto la distancia relativa de estos sitios respecto del soma puede tener una influencia importante en cuanto a la eficiencia de las maniobras experimentales que se ejecuten en el cuerpo neuronal. Entonces, la contradicción entre los resultados que apoyan o niegan una interacción excitatoria directa entre las neuronas 151 y Rz puede explicarse en términos geométricos. Si las uniones eléctricas entre las neuronas 151 y Rz se encuentran en sitios más cercanos al soma que los terminales de donde se libera neurotransmisor, entonces la inyección de corriente en el soma puede no alcanzar dichos terminales. Más

aún, el alto nivel de conectividad eléctrica de la neurona 151 puede formar una franja de baja resistencia entre el soma y los terminales sinápticos. Sin embargo, es altamente probable que las señales despolarizantes producidas por la estimulación de la célula P afecten a la célula 151 en sitios del árbol neurítico intermedios entre el soma y el terminal sináptico. Por lo tanto, estas señales pueden ser detectables en el soma y al mismo tiempo efectivas en los terminales sinápticos. Estudios realizados en langostas, mostraron que, en algunos casos, la estimulación de una única interneurona pasiva premotora no alcanza para producir un efecto postsináptico en las motoneuronas y se requiere en cambio de la estimulación de más de una para generar respuesta postsináptica (Burrows, 1979 a). En otros casos si bien generan respuesta postsináptica, la misma sólo se pone en evidencia con mediciones de modificaciones en la resistencia de entrada de la célula postsináptica (Laurent & Burrows, 1989 b).

### **Conclusiones**

La interpretación de los resultados se resume en la red neuronal que se esquematiza en la Figura 4.6. En esta red, la señal sensorial es canalizada en paralelo a dos blancos efectores, las neuronas motoras y las células modulatorias Rz. Las neuronas mecanosensoriales P transmiten su señal a las interneuronas pasivas 151 a través de neuronas que disparan potenciales de acción, tanto excitatorias como inhibitoria (Capítulos 2 y 3). Las neuronas 151 poseen conexiones eléctricas rectificantes con motoneuronas (Waderpuhl, 1989; Iscla *et al.*, 1999) así como también con las células Rz (Capítulo 1). El modelo sugiere que, además de la conexión eléctrica entre las neuronas 151 y Rz, existe una conexión excitatoria química que se encuentra en regiones más lejanas al soma de las neuronas 151 que la conexión eléctrica, y que es responsable de generar la respuesta observada en las neuronas Rz ante la estimulación de las neuronas mecanosensoriales (Capítulo 4). Por su parte, las neuronas motoras reciben señales de las neuronas P por vías directas y mediadas por interneuronas (Iscla *et al.*, 1999). La célula 151 está acoplada eléctricamente a estas interneuronas afectando la llegada de la señal mecanosensorial a las motoneuronas (Iscla *et al.*, 1999).

Analizando el papel que las neuronas 151 juegan en este circuito, uno debe considerar por un lado su conectividad directa con las células Rz y con las motoneuronas y, por otro lado, su capacidad de afectar la llegada de la señal sensorial a las mismas. En base a sus sinapsis eléctricas rectificantes, las neuronas 151 podrían

actuar como depresores globales del sistema motor, inhibiendo tanto a las neuronas motoras como a las serotoninérgicas. Sin embargo, considerando que las señales hiperpolarizantes se transmiten en forma pasiva, es probable que las hiperpolarizaciones sean efectivas sólo en regiones cercanas al locus de entrada sináptica. Por lo tanto, la transmisión de las señales hiperpolarizantes que reciben las neuronas 151 puede estar acotada al rango de neuronas conectadas con la región neurítica afectada.

Por otra parte, la acción excitatoria directa que se propone entre las neuronas 151 y Rz por estimulación sensorial sugieren un rol integrador para las neuronas 151. En virtud de sus propiedades pasivas las neuronas 151 pueden actuar como integradoras graduales de la actividad interneuronal desencadenada por la entrada sensorial. Al transmitir estas señales a las neuronas Rz, hacen que la liberación de serotonina se ajuste a esta integración. De esta manera la liberación de serotonina se torna una función de la reacción del sistema nervioso a la señal sensorial más que de la señal misma.

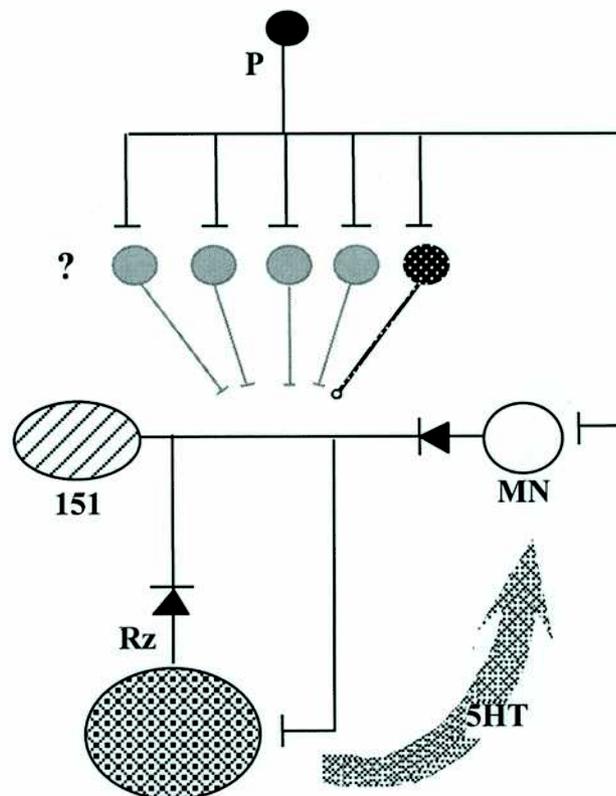


Figura 4.6. El esquema muestra el posible circuito de interacción entre las vías serotoninérgica y motora desde el estímulo mecanosensorial.

La señal mecánica, a nivel de la neurona sensorial, se representa como disparos de potenciales de acción. Su temporalidad está dada por el número de potenciales de acción y su intensidad por la frecuencia de disparos. La señal se codifica entonces en términos temporales, la amplitud es una constante. La señal no se transmite preservando estos parámetros de codificación sino que adquiere complejidad a medida que llega a los blancos. Dicha complejidad se expresa tanto en términos temporales como de amplitud. Las interneuronas no disparan en forma sincrónica y por lo tanto sus salidas llegan al blanco con un patrón temporal diferente al de la señal sensorial. La capa interneuronal comprende neuronas excitatorias e inhibitorias, y los resultados mostraron que la acción concomitante de ambos tipos de señales se expresa mayormente ante estímulos sensoriales breves, restringiendo el impacto de la excitación sensorial sobre la neurona pasiva. En cambio estímulos sensoriales prolongados incrementaron la actividad de las interneuronas excitatorias pero no el de las inhibitorias, y por ello la acción de estas últimas se vió completamente enmascarada por la excitación.

## PARTE II

### ACh como modulador de la actividad de células Rz

En 1921, Otto Loewi mostró la primera evidencia de que una molécula, la ACh, que se liberaba desde un terminal nervioso que era estimulado, producía un efecto a distancia sobre la contracción del músculo cardíaco. Años más tarde, el primer compuesto que fue identificado como neurotransmisor en el sistema nervioso central fue también la ACh, que se liberaba de sinapsis colaterales de motoneuronas espinales a interneuronas llamadas células de Renshaw (Eccles *et al.*, 1956). Las funciones de la ACh como neurotransmisor son diversas e involucran desde la contracción muscular hasta la modulación mediante receptores presinápticos de la liberación de otros neurotransmisores en el sistema nervioso central. Estos efectos se producen mediante la interacción de esta molécula con diversos tipos de receptores que se agrupan en dos familias: los receptores muscarínicos y los nicotínicos, cuya primera clasificación se basó en la actividad farmacológica de dos alcaloides: la nicotina y la muscarina (Dale, 1914). Con la existencia de nuevos agonistas y antagonistas se encontraron diversos subtipos de receptores en cada uno de estos grupos que se diferenciaban en sus características bioquímicas. En los últimos años, las técnicas de biología molecular han permitido la clasificación de los receptores de acuerdo a su estructura primaria.

Ambos grupos de receptores, si bien son activables por la misma molécula, son estructuralmente muy distintos. Los receptores muscarínicos pertenecen a un grupo de receptores que poseen 7 segmentos transmembrana. Se han clonado 5 tipos de receptores muscarínicos que van del m1 al m5. Estos receptores transmiten su señal interactuando con proteínas membranales que unen GTP (proteínas G) y dependiendo del tipo de proteína G, la activación del receptor puede llevar la regulación del metabolismo del AMP cíclico, a una estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos o a la regulación de canales de potasio (Bonner, 1992; Caulfield, 1993). Es decir, la acción de estos receptores sobre la excitabilidad de una célula es indirecta.

A diferencia de estos, los receptores nicotínicos están formados por 5 subunidades proteicas que determinan un canal iónico, y su activación genera un cambio directo en la conductancia de la célula. De las 5 subunidades, 2 poseen el sitio de unión a ACh y son denominadas  $\alpha$ , y las otras 3 pueden ser  $\beta, \gamma, \delta$ . En algunos casos

el canal es un homómero constituido por 5 subunidades  $\alpha$ . Existen 2 grandes grupos de receptores nicotínicos: los musculares, que se encuentran en la zona de la placa neuromuscular en el músculo esquelético; y los neuronales presentes en ganglios periféricos y en el sistema nervioso central. Se han encontrado al menos 11 genes que codifican para las subunidades del receptor nicotínico neuronal, que van de  $\alpha 2$  hasta  $\alpha 9$  y de  $\beta 2$  hasta  $\beta 4$  (Sargent, 1993; McGehee & Role, 1995).

Si bien la función de los receptores nicotínicos en la placa neuromuscular se conoce bien (Van der Kloot & Molgo, 1994), el rol de los receptores nicotínicos neuronales es menos claro. Las evidencias existentes sugieren que los receptores nicotínicos neuronales actúan a nivel presináptico regulando la liberación de diversos neurotransmisores en el sistema nervioso central (McGehee & Role, 1995; Role & Berg, 1996). Se ha observado que la aplicación de nicotina sobre terminales nerviosos modula la liberación de dopamina (Rapier *et al.*, 1988; Sacaan *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1997; Kaiser *et al.*, 1998), de noradrenalina (Clarke & Reuben, 1996), de ACh (Wilkie *et al.*, 1996), de serotonina (Schwartz *et al.*, 1984), de glutamato (McGehee *et al.*, 1995) y de GABA (Nisell *et al.*, 1994).

A pesar de la abundancia de receptores para ACh en el sistema nervioso central, ha sido difícil estudiar los efectos de la liberación endógena de ACh. En general, sus efectos se conocen por aplicación exógena de la misma (Clarke, 1993). Una de las estrategias de estudio para detectar fuentes endógenas de ACh implica la inhibición de la actividad de la enzima que la degrada, la acetilcolinesterasa (AChE) de manera de evidenciar sus efectos por acumulación. En las distintas especies existen isoformas diferentes de la enzima AChE cuyas características farmacológicas difieren (Taylor & Radic, 1994), pero existen inhibidores clásicos que afectan a la mayor parte de ellas (Taylor, 1996).

En la sanguijuela, la aplicación de agonistas colinérgicos por pulsos de presión sobre el soma de las neuronas serotoninérgicas Rz produce una compleja respuesta compuesta de fases despolarizantes e hiperpolarizantes. Cada una de estas fases está mediada por receptores nicotínicos con propiedades farmacológicas diferentes. La aplicación de pulsos cortos de ACh (<1seg.) en el soma de las neuronas Rz, produce una despolarización rápida, seguida de una hiperpolarización lenta. La despolarización fásica inicial está mediada por receptores nicotínicos de tipo neuronal que activan una corriente catiónica inespecífica. La hiperpolarización está mediada por receptores con

un perfil farmacológico mixto, nicotínico y muscarínico, que activan una corriente de Cl<sup>-</sup> (Szczupak *et al.*, 1993). La aplicación de pulsos de ACh de mayor duración (>1 seg.) produce una tercer fase, una despolarización prolongada (Kristan *et al.*, 1993) mediada por receptores nicotínicos con características farmacológicas similares a las del tipo  $\alpha 9$  (Szczupak *et al.*, 1998). Las propiedades farmacológicas de dichas fases de las respuestas colinérgicas se resumen en la Tabla II.1.

**Tabla II.1**

	Despolarización rápida	Hiperpolarización	Despolarización tardía
<b>Agonistas</b>			
Ach	+	+	+
Carbacol	+	+	+
Nicotina	+	+	+
DMPP	+	+	+
Muscarina	-	+	-
McN A-343	-	+	-
<b>Antagonistas</b>			
d-Tubocurarina	+	+	+
Mecamilamina	+	-	-
Hexametonio	+	-	
$\alpha$ -Bungalotoxina	-	+	
Atropina		-	+
Estrignina			+
<b>Ubicación</b>			
Soma	+	+	-
Neuritas			+

\*Modificada de Szczupak *et al.*, 1998.

**Tabla II.1\*.** Resumen de las propiedades farmacológicas y fisiológicas de las tres respuestas colinérgicas de neuronas Rz pertenecientes a segmentos estándar. La tabla compara las respuestas en términos de los agonistas que las producen, los antagonistas que las bloquean y la ubicación aparente de los receptores que las producen. Los espacios en blanco indican la ausencia de datos.

Las respuestas a ACh guardan especificidad segmental. Como mencionamos anteriormente los ganglios medios de la sanguijuela son altamente similares entre si, con excepción de los ganglios correspondientes a los segmentos 5 [Rz(5)] y 6 [Rz(6)]. Estos segmentos contienen a los órganos reproductivos y las neuronas Rz de sus ganglios son morfológica y fisiológicamente diferentes a las de los ganglios estándar

[Rz(X)]. Una diferencia fundamental reside en que las neuronas Rz(X) inervan la pared corporal y las Rz(5,6) inervan los órganos sexuales (Glover & Mason, 1986). La aplicación de pulsos de ACh sobre el soma de las neuronas Rz(5) y Rz(6) produce únicamente una respuesta hiperpolarizante seguida de una pequeña despolarización tardía de menor amplitud (Szczupak *et al.*, 1993; Szczupak *et al.*, 1998).

Se ha demostrado síntesis de ACh en algunas neuronas de los ganglios de la sanguijuela, en particular en neuronas motoras excitatorias como las células L, AE, HE entre otras, en las neuronas antero pagodas (AP) y en las células “nut”.

El objetivo de la Segunda Parte de este trabajo fue el de evidenciar fuentes endógenas de ACh dentro de los ganglios de la sanguijuela, capaces de afectar fisiológicamente a las neuronas Rz.

## **Capítulo 5. Caracterización fisiológica y farmacológica del efecto de inhibidores de la AChE sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz.**

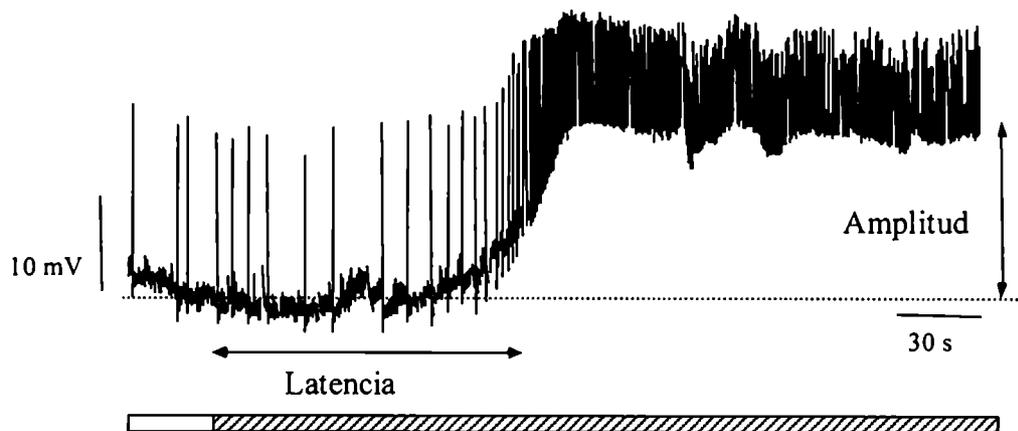
Con el objetivo de investigar la existencia de fuentes endógenas de ACh que regularan la actividad de las neuronas Rz estudiamos los efectos de la inhibición de la hidrólisis enzimática de la ACh sobre la actividad electrofisiológica de dichas neuronas.

En los ganglios de la sanguijuela existe una alta actividad de la enzima AChE de donde dos enzimas AChE distintas fueron purificadas (Talesa *et al.*, 1995). Ambas enzimas son susceptibles a la aplicación de inhibidores clásicos como la neostigmina y la fisostigmina (eserina).

### **Resultados**

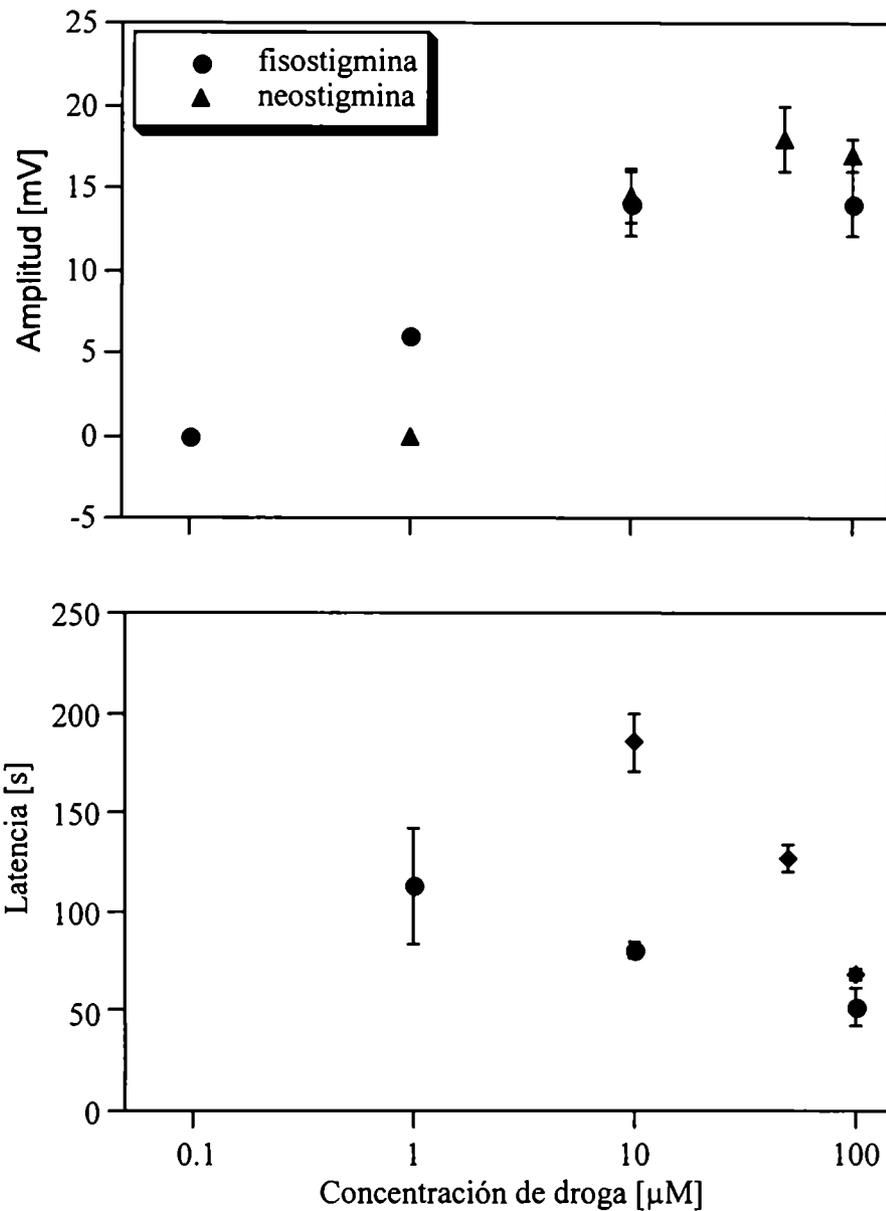
#### **Efecto de los inhibidores de la AChE sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz.**

Ganglios medios aislados fueron perfundidos con solución conteniendo a los inhibidores de la AChE, neostigmina o fisostigmina, mientras se registró la actividad de la neurona Rz mediante electrodos intracelulares. La Figura 5.1 muestra un registro típico y describe el curso temporal del experimento y los parámetros electrofisiológicos analizados. La aplicación de los inhibidores produjo una despolarización importante de las neuronas Rz que indujo el disparo de potenciales de acción a muy alta frecuencia. Este cambio en la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz se cuantificó midiendo la amplitud máxima y la latencia de la respuesta. Tanto la amplitud como la latencia de la respuesta fueron dependientes de la concentración de los inhibidores de la AChE: un aumento en la concentración produjo un aumento en la amplitud y una disminución en la latencia de la despolarización (Figura 5.2). Ambos inhibidores actuaron de manera similar, produciendo su máximo efecto en términos de la amplitud a una concentración de 10 $\mu$ M. A la concentración de 100 $\mu$ M ambos inhibidores de la AChE produjeron una despolarización similar a la causada por 10 $\mu$ M, pero con una latencia significativamente menor. La actividad evocada por los inhibidores de la AChE persistió aún luego de perfundir los ganglios durante 20 minutos con solución control.



**Figura 5.1. Respuesta de la neurona Rz a la aplicación de inhibidores de AChE.** Registro representativo de la respuesta de una neurona Rz, llevada a un potencial inicial de membrana de  $-60$  mV, a la aplicación de neostigmina  $10 \mu\text{M}$ . La barra horizontal inferior describe el curso temporal del experimento: el ganglio fue perfundido con solución control (segmento blanco) y luego de 30 seg. con solución conteniendo neostigmina (segmento gris). Las flechas indican la manera en que se midió la amplitud y latencia de la respuesta: la amplitud se midió desde la línea de base hasta el nivel de máxima despolarización (ignorando los potenciales de acción), y la latencia se midió desde el comienzo de la perfusión con droga hasta el tiempo en que el potencial alcanzó el 50% de su máxima despolarización.

Este efecto de la neostigmina y la fisostigmina fue interpretado como el resultado de la acumulación de ACh en el medio externo producida por la inhibición de su degradación enzimática. La prolongada latencia de la despolarización avala esta interpretación. Este podría corresponderse con el período necesario para generar un aumento de la concentración extracelular suficiente para despolarizar la membrana de las neuronas Rz.

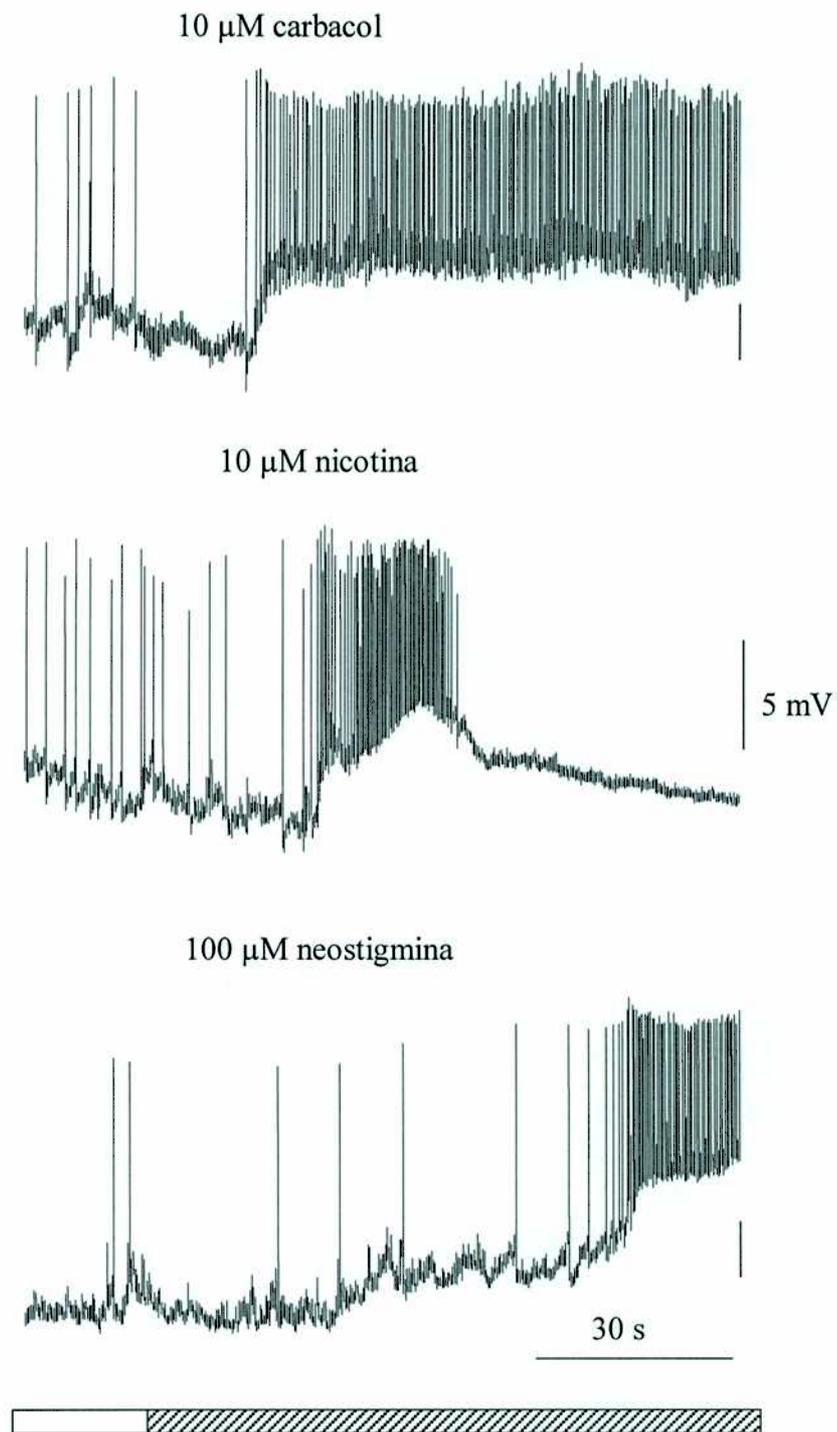


**Figura 5.2. Amplitud y latencia de la respuesta de la neurona Rz en función de la concentración de bloqueantes de la AChE.** Los gráficos muestran la relación entre la amplitud (superior) y la latencia (inferior) promedio de las despolarizaciones producidas por la aplicación de fisostigmina (círculo) o neostigmina (triángulo), y la concentración de droga utilizada. Los valores indican la media  $\pm$  error estándar ( $n=3$  y  $5$ , respectivamente).

### **Análisis de la dinámica de la respuesta de los inhibidores de la AChE.**

Con el objetivo de verificar que lo prolongado de la latencia de las respuestas se debió al mecanismo de acción de los inhibidores de la ACh y no era inherente al sistema

de perfusión, se evaluó la cinética de acción de agonistas colinérgicos no hidrolizables por la AChE introducidos de igual manera que los inhibidores de AChE.



**Figura 5.3. Comparación de las respuestas de neuronas Rz a la aplicación de agonistas colinérgicos y de inhibidores de AChE.** Registros representativos de las respuestas de tres neuronas Rz, llevadas inicialmente a un potencial de membrana de -60 mV, a la perfusión con soluciones conteniendo carbacol 10  $\mu$ M, nicotina 10  $\mu$ M y neostigmina 100  $\mu$ M durante el período indicado por la barra rayada al pie de los registros.

La Figura 5.3 muestra registros representativos de los efectos del carbacol y la nicotina, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . La perfusión con estas sustancias produjo la despolarización de las neuronas Rz con una latencia marcadamente menor que la observada para los inhibidores de la AChE.

La despolarización producida por 10  $\mu\text{M}$  carbacol o nicotina alcanzo el 50% de su valor máximo 35 seg. antes que ( $34,7 \pm 3,1$  seg.  $n=4$ ) que la despolarización producida por 100  $\mu\text{M}$  neostigmina. Más aún, las respuestas a agonistas colinérgicos alcanzaron su amplitud máxima antes de que se iniciara la despolarización producida por neostigmina.

Por otra parte, pudo observarse que mientras que la despolarización inducida por carbacol alcanzó un plateau que persistió durante su aplicación en el baño, la inducida por nicotina tuvo una duración de aproximadamente 35 seg. ( $35 \pm 7$  seg.  $n=3$ ). Tras este período el potencial de membrana retornó a un nivel cercano al de su línea de base a pesar que el agonista aún estaba presente en el baño. Este patrón de respuesta se debió, probablemente, a que la nicotina, tras activar la corriente despolarizante, estabiliza al receptor en su estado desensibilizado (Schrattenholz *et al.*, 1993). Estos resultados indican que el retraso observado en la respuesta de las neuronas Rz a la aplicación de inhibidores de AChE no se debe al sistema de perfusión sino a un mecanismo intrínseco de acción de la droga.

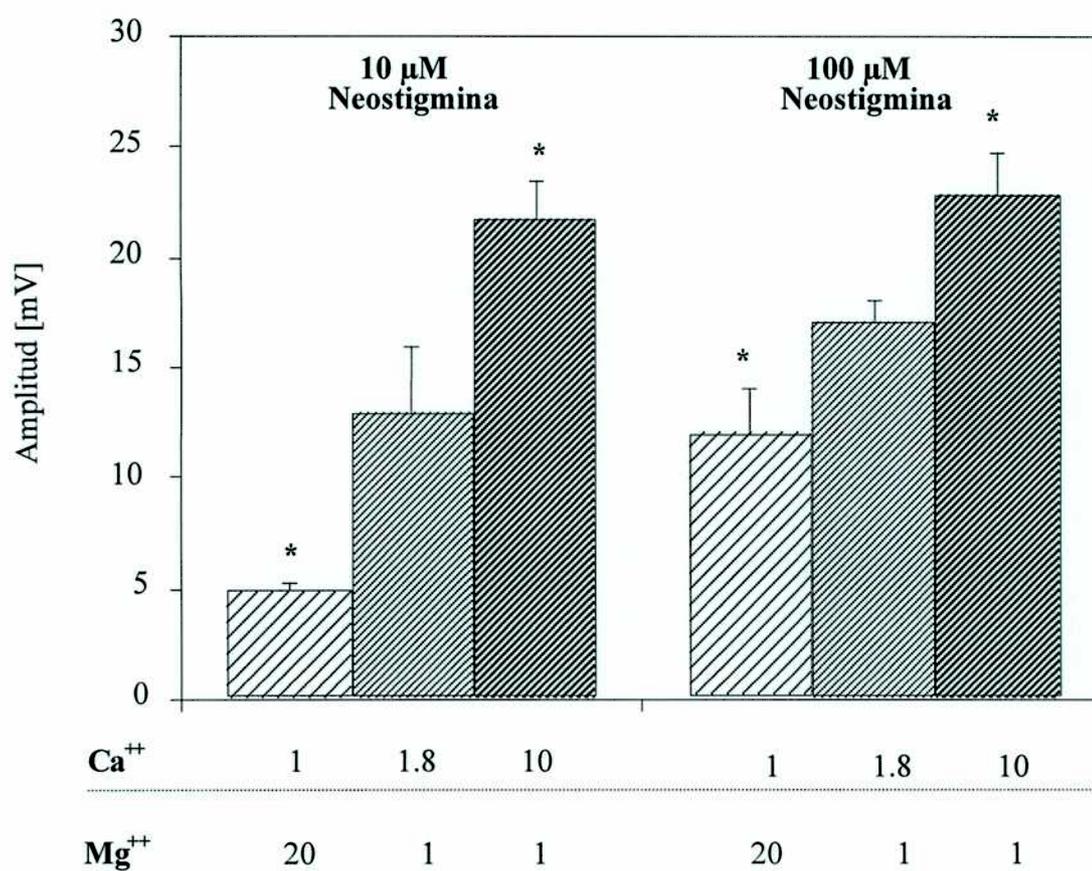
Por otro lado, para descartar la posibilidad que el epitelio de células gliales que recubre al ganglio impusiera una barrera de difusión a los inhibidores de AChE, se realizaron experimentos en donde se removió dicho epitelio, dejando los somas en directo contacto con el baño. En estos ganglios, la amplitud y la latencia de la despolarización producida por la aplicación de 100  $\mu\text{M}$  neostigmina fueron altamente similares a los registrados en ganglios intactos (Tabla 5.1).

Tabla 5.1

Ganglio	Amplitud (mV)	Latencia (seg.)
Intacto	$16,6 \pm 1$	$68 \pm 3$
Sin epitelio glial	$18,9 \pm 5$	$65,3 \pm 2$

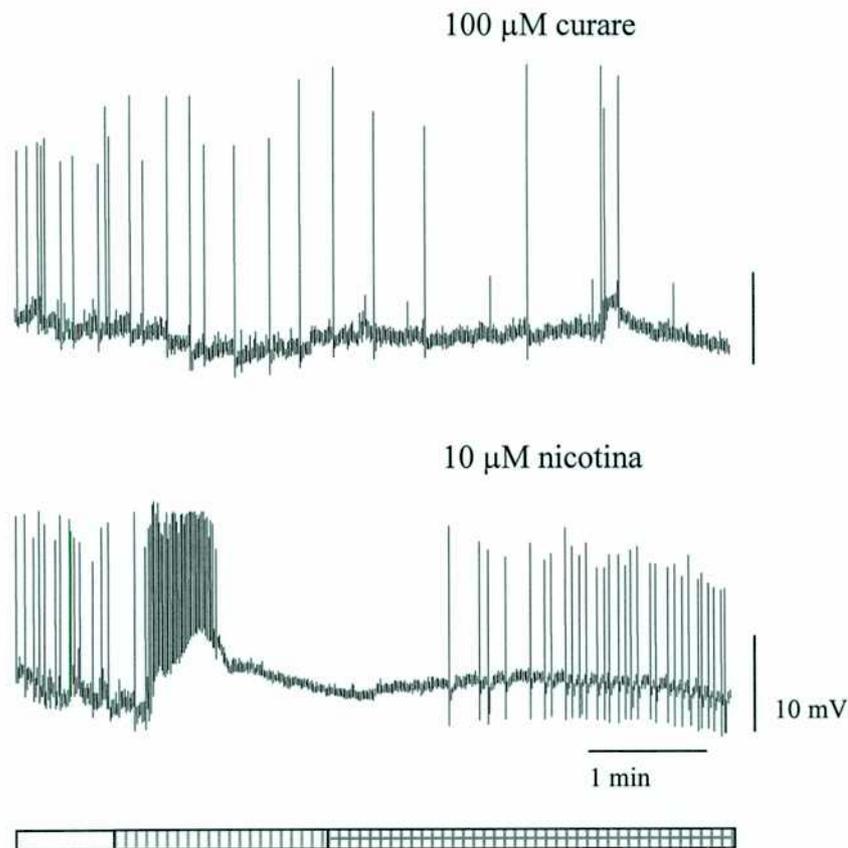
### Dependencia de la despolarización inducida por inhibidores de AChE con la concentración de calcio extracelular.

Los resultados previos indican la respuesta de las neuronas Rz a la aplicación de inhibidores de AChE se debió, probablemente, a la acumulación de ACh liberada espontáneamente en el ganglio. Dado que la liberación de neurotransmisor depende de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{++}$  se estudió el efecto de los inhibidores de la AChE sobre las neuronas Rz en presencia de soluciones conteniendo distintas proporciones de los iones  $[\text{Mg}^{++}] / [\text{Ca}^{++}]$  (Figura 5.4).



**Figura 5.4. Dependencia de la despolarización inducida por neostigmina respecto del calcio extracelular.** Las columnas indican la amplitud promedio de las respuestas de neuronas Rz a neostigmina disuelta en soluciones conteniendo diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (en mM), como se indica debajo de cada columna. Se utilizaron dosis de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de neostigmina ( $n=3$  y 4, respectivamente). Las barras indican error estándar de la media y \* indica que la media es significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) de la condición control (1.8 mM  $\text{Ca}^{++}$  y 1 mM  $\text{Mg}^{++}$ ).

La amplitud promedio de las respuestas inducidas por la aplicación de  $10\mu\text{M}$  de neostigmina en presencia de una solución conteniendo una relación  $20/1$  de  $[\text{Mg}^{++}] / [\text{Ca}^{++}]$  fue significativamente menor (aproximadamente un 40 % del valor control) que la amplitud promedio en solución control, que contiene una relación  $[\text{Mg}^{++}] / [\text{Ca}^{++}]$  de  $1/1.8$ . Por el contrario, la presencia de un alto contenido de  $[\text{Ca}^{++}]$  extracelular ( $10\text{ mM}$ ), produjo un aumento significativo en la amplitud promedio de las respuestas (aproximadamente un 70 % del valor control). La amplitud promedio de las respuestas a la aplicación de neostigmina  $10\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$  fueron similares entre si en solución control. Sin embargo, las respuestas producidas por  $100\mu\text{M}$  neostigmina fueron menos sensibles a los cambios en la concentración de calcio extracelular (Figura 5.4).



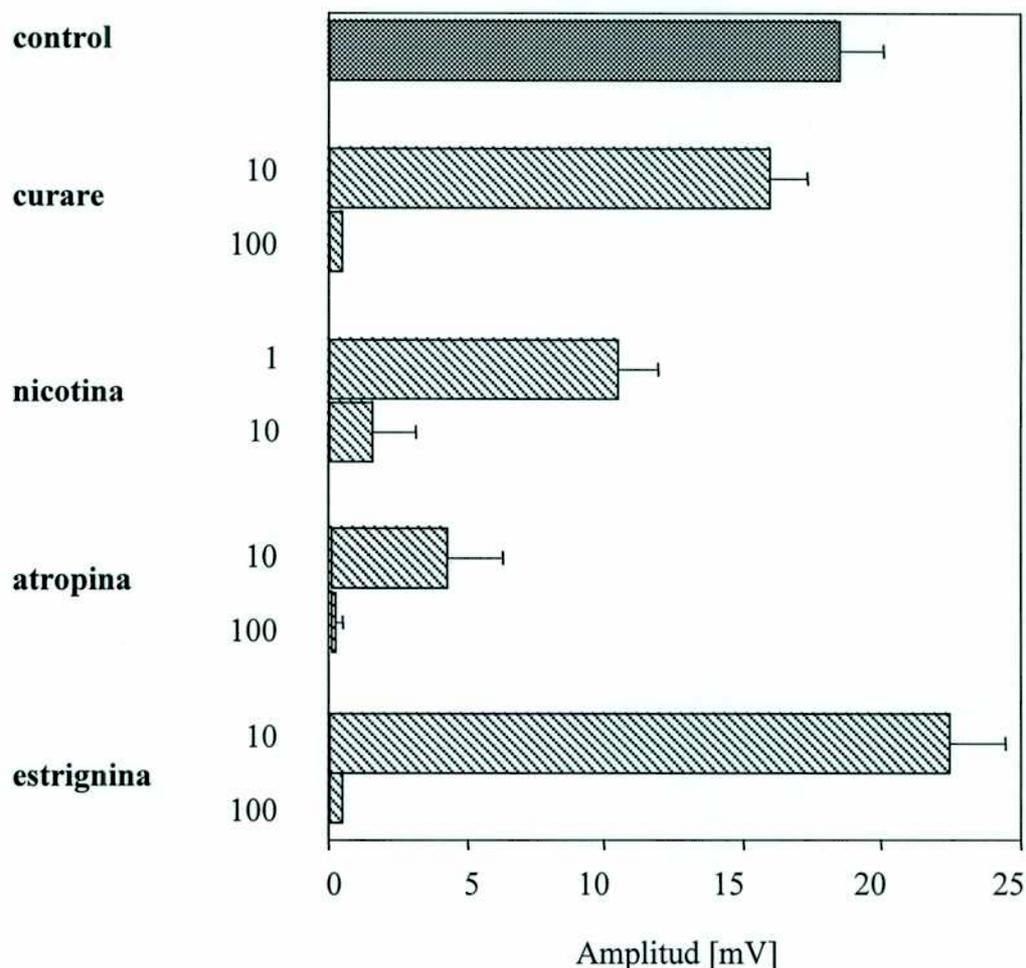
**Figura 5.5. Efecto de antagonistas nicotínicos sobre la despolarización inducida por neostigmina.** Registros representativos de neuronas Rz, llevadas inicialmente a un potencial de membrana de  $-60\text{ mV}$ , a las que se les aplicó  $50\mu\text{M}$  neostigmina en presencia de curare  $100\mu\text{M}$  y nicotina  $10\mu\text{M}$ . La barra horizontal al pie de los registros muestra el curso temporal del experimento: el segmento de patrón vertical indica el momento en el que se agregaron los antagonistas; el segmento con los patrones superpuestos indica la aplicación de la solución conteniendo la mezcla de neostigmina y el antagonista.

Estos resultados avalan la idea de que la despolarización que se produce por aplicación de inhibidores de AChE es el resultado de la acumulación de ACh que se libera de terminales sinápticos. Sin embargo, se debe evaluar si las diferentes concentraciones extracelulares de calcio podían afectar la respuesta de las células Rz a la acción de la acetilcolina. Para ello se aplicaron pulsos de carbacol en solución control y en presencia de una proporción 20/1 de  $[Mg^{++}] / [Ca^{++}]$ . La despolarización inducida por carbacol fue similar en ambos casos. El cociente entre las amplitudes medidas en las dos condiciones fue de  $1,1 \pm 0,2$  (n=4). Esto indica que las respuestas colinérgicas de las neuronas Rz fueron insensibles a la concentración extracelular de cationes divalentes.

### **Características farmacológicas de la despolarización inducida por inhibidores de AChE.**

Para caracterizar los receptores que mediaron el efecto producido por los inhibidores de AChE, la acción de éstos fue ensayada en presencia de diversos inhibidores colinérgicos que fueron efectivos en bloquear las diferentes fases de las respuestas colinérgicas de las neuronas Rz (ver tabla 5.1, Szczupak *et al.*, 1998). Los ganglios fueron preincubados durante 2 min. en presencia de los agentes nicotínicos curare, mecamilamina, hexametonio o nicotina, y luego perfundidos junto con neostigmina.

El curare produjo una inhibición de la despolarización inducida por neostigmina en las neuronas Rz, en forma dosis dependiente (Figuras 5.5 y 5.6), mientras que el hexametonio y la mecamilamina (100 $\mu$ M) no tuvieron efecto (n=3). La respuesta a neostigmina se estudió en presencia de nicotina una vez que la misma produjo su efecto como agonista. En presencia de nicotina la despolarización inducida por neostigmina disminuyó de manera dependiente de la dosis. Dado que el perfil farmacológico que presenta la respuesta a neostigmina es similar al de la despolarización tardía inducida por carbacol (Ver Tabla II.1; Szczupak *et al.*, 1998), evaluamos el efecto de dos antagonistas de la misma: atropina y estrignina. Ambas drogas inhibieron la despolarización inducida por neostigmina en forma dosis dependiente (Figura 5.6).



**Figura 5.6. Cuantificación de los efectos de diversos antagonistas sobre la despolarización inducida por neostigmina.** Las columnas representan las amplitudes promedio ( $n=4$ ) de las respuestas a neostigmina  $50 \mu\text{M}$  cuando el ganglio fue preincubado con solución control y con soluciones conteniendo curare, atropina, nicotina y estrignina en las concentraciones indicadas en la izquierda (en  $\mu\text{M}$ ). Las barras indican error estándar de la media y \* indica que la media es significativamente diferente del control ( $p < 0.05$ ).

## **Discusión**

### **Liberación basal de ACh en ganglios de sanguijuela**

Los datos presentados en este capítulo muestran que la aplicación de neostigmina o fisostigmina, inhibidores clásicos de la actividad de la enzima AChE (Taylor, 1996) que son efectivos sobre la enzima de sanguijuela (Talesa *et al.*, 1995), produjo una marcada despolarización de las neuronas serotoninérgicas Rz. Este efecto

estuvo mediado por receptores con un perfil farmacológico correspondiente al receptor nicotínico. La explicación más plausible de los efectos de la neostigmina y fisostigmina es que inhibiendo la hidrólisis de ACh, estas drogas generan un incremento en la concentración extracelular de ACh, la cual es tónicamente liberada desde fuentes endógenas y es mantenida normalmente en niveles bajos por la alta actividad de la enzima AChE detectada en los ganglios de la sanguijuela (Wallace, 1981; Talesa *et al.*, 1995).

De acuerdo con esta interpretación, observamos que la amplitud de la despolarización inducida por neostigmina fue parcialmente dependiente de los niveles extracelulares de  $[Ca^{++}]$ . El grado de dependencia fue el esperado para un fenómeno que involucra una liberación basal de neurotransmisor; esto es, la amplitud de la respuesta decreció pero no se anuló en presencia de una proporción alta de  $[Mg^{++}] / [Ca^{++}]$ , y aumentó al incrementar la concentración extracelular de  $Ca^{++}$  (Landau, 1969; Matthews & Wickelgren, 1977).

Dado que los receptores nicotínicos tienen un sitio de unión específico para inhibidores de AChE (Lena & Changeaux, 1993) es necesario descartar que los efectos sobre las neuronas Rz se debieran a una acción directa de éstos como agonistas. Sin embargo, varias observaciones descartaron esa posibilidad:

(i) La despolarización de las neuronas Rz inducida por neostigmina fue inhibida por el efecto de desensibilización producido por la nicotina. En cambio, el efecto directo de la neostigmina como agonista es insensible a la estabilización del receptor en su estado desensibilizado (Maelicke *et al.*, 1993; Schrattenholz *et al.*, 1993).

(ii) La despolarización de las neuronas Rz inducida por neostigmina fue inhibida por curare, mientras que la acción directa de los inhibidores de AChE sobre los receptores a ACh no es sensible a este antagonista (Lena & Changeaux, 1993).

(iii) La latencia de la respuesta a los inhibidores de AChE fue relativamente larga y dependiente de la dosis. Estas observaciones son incompatibles con el efecto agonista de estas sustancias (Storch *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1996).

Estas consideraciones, desestiman que la fisostigmina y la neostigmina hayan actuado como agonistas directos del receptor nicotínico y apoyan la hipótesis que su acción se debió mayormente a su papel clásico como inhibidores de la enzima AChE.

### **Perfil farmacológico de la respuesta inducida por inhibidores de AChE**

El perfil farmacológico del receptor involucrado en la despolarización inducida por los bloqueantes de la AChE es similar al exhibido por los receptores que median la despolarización tardía generada por la aplicación de agonistas colinérgicos en las neuronas Rz (ver Tabla II.1; Szczupak *et al.*, 1998). Sin embargo, la respuesta evocada por los inhibidores de AChE fue sensible a la aplicación de curare, mientras que la despolarización tardía no lo fue. La despolarización tardía es evocada solamente cuando se aplican pulsos prolongados de ACh (>3s) o cuando se utilizan agonistas no hidrolizables por la AChE. Los estudios farmacológicos de dicha fase de la respuesta colinérgica se realizaron utilizando como agonista al carbacol. Es posible, entonces, que la diferencia en la eficiencia del curare como antagonista de la despolarización tardía y de la despolarización inducida por neostigmina o fisostigmina resida en la competencia con diferentes agonistas. En el primer caso el curare compitió con carbacol, mientras que en el segundo caso con la ACh endógena. Probablemente el curare sea menos efectivo en desplazar al carbacol que a la ACh.

El receptor involucrado en la despolarización tardía tiene un perfil farmacológico semejante al receptor nicotínico de tipo  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 1994). Resulta notable que la despolarización prolongada haya sido mediada por un receptor con un perfil farmacológico nicotínico. Esta no es una función clásica de los receptores nicotínicos pues generalmente han sido asociados a despolarizaciones fásicas (David & Sattelle, 1984; Egan & North, 1986; Lipton *et al.*, 1987; McCormick & Prince, 1987; Trimmer & Weeks, 1989; Mulle & Changeaux, 1990).

## Capítulo 6. Especificidad del efecto de inhibidores de AChE.

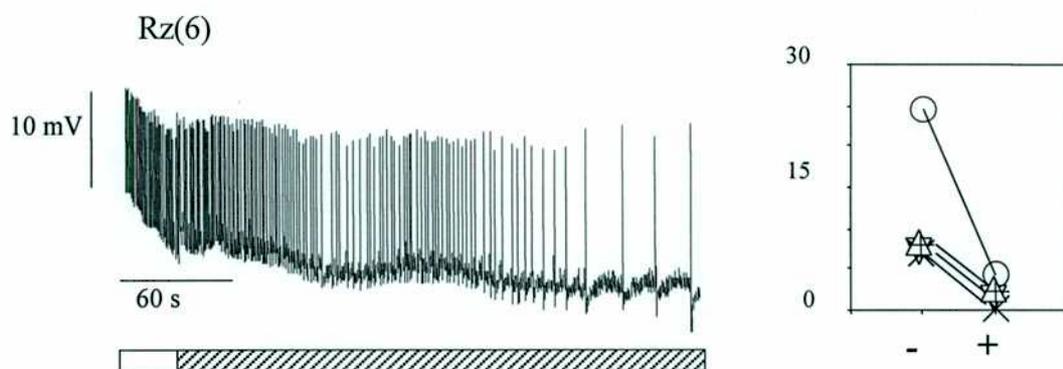
Con la idea de distinguir si la respuesta despolarizante observada en las neuronas Rz como consecuencia de la aplicación de inhibidores de la AChE era un efecto generalizado sobre el ganglio como un todo, o presentaba especificidad celular, estudiamos las respuestas de distintas células identificadas del ganglio.

En primer lugar, y dado que las neuronas Rz pertenecientes a los segmentos reproductivos 5 [Rz(5)] y 6 [Rz(6)] presentan un patrón de respuestas diferencial a agonistas colinérgicos, evaluamos el efecto de inhibidores de la AChE sobre las neuronas Rz de estos ganglios. En segundo lugar se registraron las respuestas de distintos tipos celulares pertenecientes a segmentos estándar o reproductivos.

### Resultados

#### Especificidad de segmento

Ganglios pertenecientes a los segmentos reproductivos 5 y 6, fueron perfundidos con inhibidores de la enzima AChE. La perfusión de los mismos con neostigmina 100 $\mu$ M produjo efectos diferentes en las neuronas Rz de ambos ganglios.



**Figura 6.1. Respuesta de la célula Rz (6) a la aplicación de inhibidores de AChE.** Respuesta representativa de una célula Rz(6) a la aplicación de neostigmina 100  $\mu$ M, en el período indicado por el segmento rayado de la barra horizontal inferior. Inicialmente la neurona se hallaba en su potencial de reposo, en el cual se registraron disparos espontáneos. El gráfico inserto muestra el número de potenciales de acción en un período de 10 seg. del registro en solución control (-) y luego de perfundir por 3 min. con neostigmina (+). Se estudiaron 4 células Rz(6), y los resultados de cada una están representados por un símbolo distinto.

Las células Rz(5) no mostraron ningún cambio en su potencial de membrana o en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (n=4) (Tabla 6.1), mientras que las neuronas Rz(6) sufrieron una leve hiperpolarización y su frecuencia de disparo disminuyó (n=4) (Figura 6.1, Tabla 6.1).

### Especificidad celular

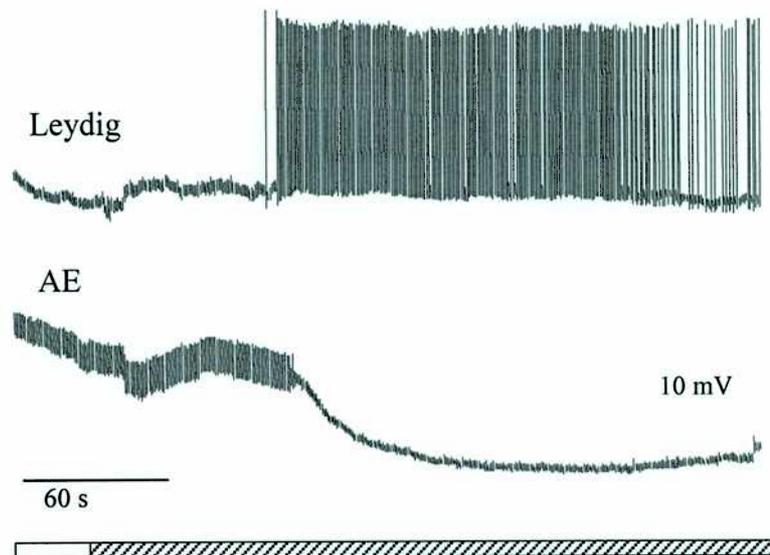
Con el fin de evaluar el efecto de los inhibidores de la AChE sobre otras neuronas, perfundimos segmentos estándar y reproductivos con neostigmina 100 $\mu$ M mientras registramos su actividad electrofisiológica. Se estudió la respuesta en diversos tipos neuronales: las neuronas modificadoras Leydig, las neuronas mecanosensoriales T, P y N, las motoneuronas AE, las interneuronas pasivas 151 y las neuronas AP (anteropagoda) de función aún desconocida. La Tabla 6.1 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 6.1**

<b>CÉLULA</b>	<b>GANGLIO</b>	<b>n</b>	<b>RESPUESTA</b>
Rz	X	34	Excitatoria
Rz	5	3	-
Rz	6	4	Inhibitoria
Leydig	X	3	Excitatoria
Leydig	5	1	Excitatoria
Leydig	6	3	Excitatoria
AP	X	3	-
N	X	3	-
T	X	2	-
P	X	3	-
AE	X	4	Inhibitoria
AE	5	1	Inhibitoria
151	X	4	Inhibitoria

**Tabla 6.1. Especificidad celular de la respuesta a inhibidores de AChE.** La tabla muestra los tipos neuronales estudiados; el tipo de segmento, estándar (X) o reproductivos (5 y 6); el número de células estudiadas (n); y el tipo de respuesta obtenida al aplicar neostigmina 100  $\mu$ M, clasificada como excitatoria, inhibitoria o sin respuesta (-).

En los ganglios pertenecientes a segmentos estándar, las células Leydig respondieron con un gran incremento en la frecuencia basal de disparos, sin que se registrara un cambio significativo en su potencial de membrana. Las células mecanosensoriales y las neuronas AP no fueron afectadas por la aplicación de neostigmina 100 $\mu$ M. Las interneuronas pasivas 151 se hiperpolarizaron. Estas neuronas exhiben potenciales inhibitorios postsinápticos espontáneos, que desaparecieron ante el agregado de neostigmina aún cuando las neuronas fueron despolarizadas electrotónicamente a su potencial de reposo inicial. Las neuronas motoras AE se hiperpolarizaron y cesaron su descarga espontánea de potenciales de acción (Figura 6.2), los cuales se recuperaron despolarizando a la célula mediante la inyección de corriente dc. A diferencia de lo ocurrido con las neuronas Rz, todas estas neuronas, mostraron las mismas respuestas cuando fueron estudiadas en los ganglios correspondientes a los segmentos reproductivos (Tabla 6.1).



**Figura 6.2. Respuestas de dos neuronas del ganglio medio de la sanguijuela a la aplicación de inhibidores de AChE.** Respuestas representativas de las células Leydig y AE a la aplicación de neostigmina 100  $\mu$ M durante el período indicado por el segmento rayado de la barra horizontal inferior. Los registros se realizaron partiendo del potencial de reposo de las neuronas. El grosor de la línea de base del registro de la motoneurona AE se debe a la alta frecuencia de disparo de estas motoneuronas que exhiben potenciales de acción de baja amplitud en registros somáticos.

## **Discusión**

### **Especificidad de segmento de la respuesta**

Dado que los inhibidores de la AChE produjeron respuestas similares en las células Leydig y AE de segmentos estándar y reproductivos, se deduce que la liberación de ACh en ganglios reproductivos y estándar tiene características similares. Por lo tanto el patrón de respuestas diferencial mostrado por las neuronas Rz pertenecientes a diferentes segmentos se debe únicamente a la distribución de receptores colinérgicos en sus membranas.

La expresión de receptores colinérgicos en las neuronas Rz es específica del tipo de segmento al que pertenece la neurona (Kristan *et al.*, 1993; Szczupak *et al.*, 1998) y el patrón de respuesta a la aplicación de inhibidores de AChE en segmentos estándar o reproductivos fue compatible con esa especificidad. La amplia distribución de los receptores que median la despolarización tardía en las neuronas Rz(X), esta de acuerdo con la fuerte excitación inducida por los inhibidores de la AChE. En cambio, la expresión de dichos receptores en las células Rz(5) fue muy baja, y aún menor en las células Rz(6) (Szczupak *et al.*, 1998). Más aún, la aplicación de agonistas colinérgicos sobre las neuronas Rz(5) y Rz(6) produce, principalmente, su hiperpolarización (Kristan *et al.*, 1993). Por lo tanto, la falta de respuesta de las neuronas Rz(5) fue compatible con la moderada activación concomitante de corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes en éstas células, mientras que la respuesta de las neuronas Rz(6) se corresponde con la activación de una moderada corriente hiperpolarizante y una muy débil despolarización dando como resultado neto una leve hiperpolarización.

### **Especificidad celular de la respuesta**

Las respuestas evocadas por los inhibidores de la AChE en las distintas neuronas del ganglio de la sanguijuela mostraron una marcada coincidencia con las respuestas obtenidas al estimular las mismas con pulsos de carbacol (Szczupak *et al.*, 1998). Las células Leydig, al igual que las Rz, son excitadas por el carbacol y por la aplicación de inhibidores de la AChE. Las motoneuronas AE fueron inhibidas tanto por el agonista colinérgico como por los inhibidores de la AChE. Las neuronas mecanosensoriales mostraron una despolarización transiente cuando el carbacol fue aplicado en el soma, pero no respondieron cuando fue aplicado en las inmediaciones de su árbol neurítico indicando una distribución muy acotada de los receptores colinérgicos. Esto se condice

con la insensibilidad a la acción de los inhibidores de la AChE. Las células AP no exhibieron ninguna respuesta a los inhibidores de la AChE, sin embargo muestran una respuesta hiperpolarizante a la aplicación de carbacol en el soma y una pequeña despolarización tardía cuando se aplica carbacol en otros sitios de su árbol dendrítico. La incapacidad de los inhibidores de la AChE de inducir la respuesta hiperpolarizante en las neuronas AP puede deberse a la ubicación de los receptores que la median, un incremento en la concentración de ACh en el neuropilo podría no afectar a la región somática. La inhabilidad de generar la despolarización tardía podría deberse a una expresión restringida de los receptores en la membrana de las células AP.

Estos resultados indican que los inhibidores de AChE no produjeron una acción generalizada inespecífica sobre los ganglios. La alta concordancia entre las respuestas obtenidas mediante la aplicación de inhibidores de AChE y la de pulsos de carbacol (Szczupak *et al.*, 1998) (con la única excepción de las neuronas AP), convalida la hipótesis de que la acción de los inhibidores de la AChE se debe al desenmascaramiento de una liberación basal de ACh, normalmente regulada por una eficiente actividad acetilcolinesterásica.

## Capítulo 7. Efecto de antagonistas colinérgicos sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz.

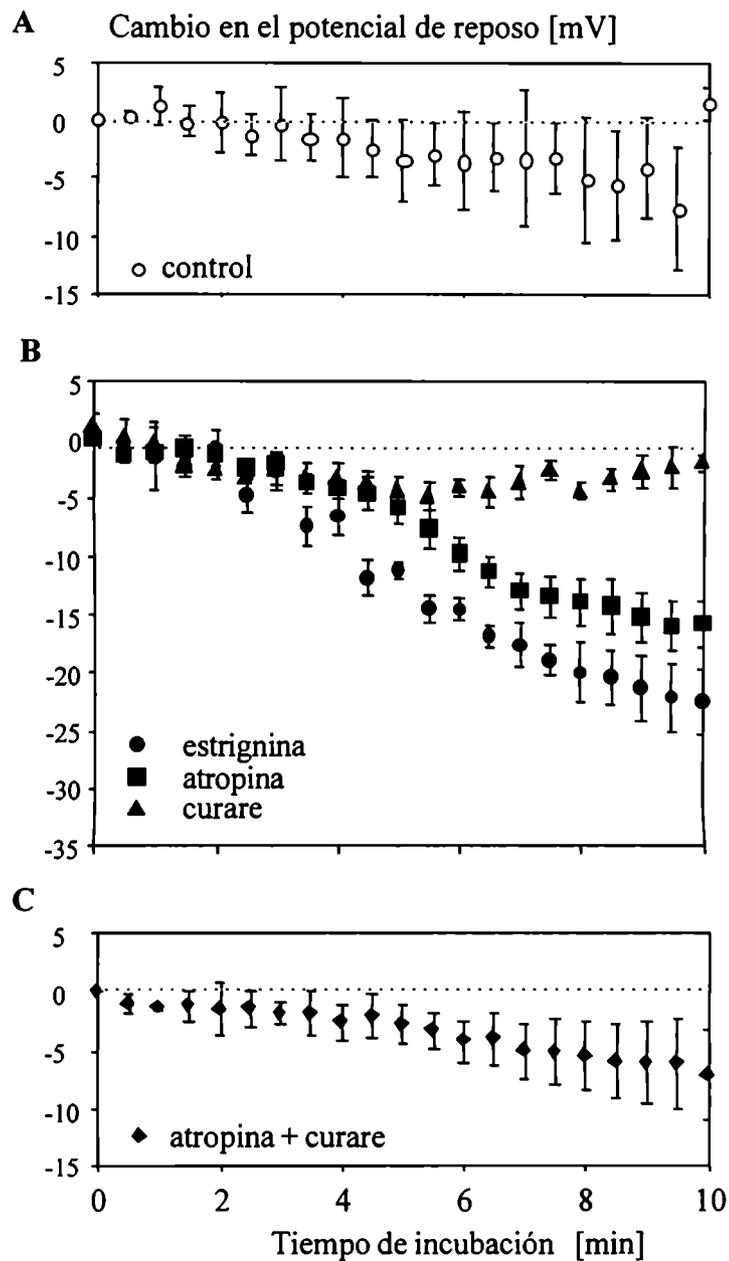
Los resultados descriptos demuestran la existencia de una liberación basal de ACh en los ganglios de sanguijuela que se pone en evidencia al bloquear a la enzima AChE. Con el fin de evaluar de qué manera afecta esta liberación basal de ACh a las neuronas Rz, investigamos la respuesta electrofisiológica de las mismas en presencia de inhibidores de despolarización inducida por bloqueantes de la AChE.

### Resultados

Se evaluaron dos parámetros de la actividad de las neuronas Rz, por un lado el potencial de membrana y por otro la resistencia de entrada de las neuronas, mientras se perfundió el ganglio durante 10 min. con solución salina control o conteniendo los antagonistas curare, atropina y estrignina, que fueron efectivos en bloquear la despolarización inducida por inhibidores de AChE. Como muestra la Figura 7.1.A, la perfusión con solución control no produjo ningún cambio significativo en el potencial de membrana de las células Rz. Sin embargo, la resistencia membranal aumentó significativamente con el tiempo de registro ( $150 \pm 2$  % del valor al tiempo cero), lo cual se debió probablemente a la recuperación de la célula del daño producido al ser impalada con el electrodo intracelular.

La perfusión con soluciones conteniendo  $100\mu\text{M}$  atropina o estrignina produjo una progresiva hiperpolarización de las células Rz (Figura 7.1.B), sin observarse un cambio significativo en la resistencia membranal respecto de la observada con solución control ( $152 \pm 2\%$  del valor al tiempo cero). Por su parte, la aplicación de  $100\mu\text{M}$  curare no produjo cambios en el potencial de membrana de las neuronas Rz (Figura 7.1.B) ni en el valor de la resistencia membranal que, tras 10 min., fue de  $150 \pm 1\%$  del valor al tiempo cero.

El curare, al igual que la atropina y la estrignina, bloqueó la despolarización inducida por neostigmina y sin embargo no produjo ningún efecto sobre el potencial de membrana de las células Rz. Este hecho se podría deber a que el curare, a diferencia de la atropina y la estrignina, es también inhibidor de la hiperpolarización inducida por ACh en las neuronas Rz (Szczipak *et al.*, 1993).



**Figura 7.1. Efecto de antagonistas colinérgicos sobre el potencial de reposo de las neuronas Rz.** Los gráficos muestran el valor promedio de la diferencia en el potencial de las neuronas Rz en función del tiempo de perfusión con: solución control (A, n=6); con solución salina conteniendo 100  $\mu\text{M}$  de estrigina, curare o atropina (B, n=4) y con solución salina conteniendo 100  $\mu\text{M}$  de atropina y curare (C, n=3). La perfusión fue cambiada de solución control a solución test 30 seg. después del comienzo del registro (tiempo 0). La diferencia de potencial se calculó sustrayendo el potencial de reposo registrado a tiempo 0 de los valores registrados a cada tiempo. Las barras indican error standard de la media.

En ese caso, la aplicación de curare afectaría tanto al receptor responsable de la despolarización como al de la hiperpolarización, por lo cual su efecto neto resultaría nulo. Para examinar esta hipótesis, investigamos el efecto combinado del curare con la atropina, que carece de efecto sobre la fase hiperpolarizante de la respuesta colinérgica (Szczupak *et al.*, 1993).

Como se observa en la Figura 7.1.C, en presencia de curare, la atropina no fue capaz de producir su efecto hiperpolarizante sobre las neuronas Rz y el potencial de membrana de las neuronas fue similar al observado en condiciones control.

Sabiendo que la aplicación de agonistas colinérgicos sobre las neuronas Rz de segmentos reproductivos sólo evoca su hiperpolarización (Szczupak *et al.*, 1993), se estudió el efecto del agregado de atropina o estrignina sobre dichas neuronas. La presencia de 100µM estrignina o atropina produjo un cambio muy pequeño en el potencial de membrana de las células Rz(6) ( $-4 \pm 3$  mV luego de 8 min. de incubación, n=3), similar al observado en las mismas células perfundidas con solución control ( $-4 \pm 4$  mV) en ese período.

## **Discusión**

La gran despolarización de las neuronas Rz inducida por la exposición de los ganglios a inhibidores de la AChE es un fenómeno que probablemente no se produzca en condiciones fisiológicas. Sin embargo esta observación permitió revelar la existencia de una liberación basal de ACh capaz de generar un tono colinérgico en los ganglios de sanguijuela.

Los resultados presentados indican que el tono colinérgico basal activa a los receptores que median la hiperpolarización lenta (Szczupak *et al.*, 1993) y la despolarización tardía (Szczupak *et al.*, 1998) de las neuronas Rz. La aplicación de inhibidores de estos receptores revelaron que, en condiciones de actividad acetilcolinesterásica normal, el tono colinérgico existente sería suficiente para afectar la actividad electrofisiológica de las neuronas Rz. Los bloqueantes selectivos de la despolarización tardía, la atropina y la estrignina, causaron una marcada hiperpolarización de las neuronas Rz(X), llevando su potencial de membrana a valores cercanos al potencial de reversión (-65 mV) de la hiperpolarización evocada por ACh en estas células, mediada por Cl<sup>-</sup> (Szczupak *et al.*, 1993). El curare, que inhibe ambas fases

de la respuesta a la aplicación de ACh, fue incapaz de producir un efecto neto por sí mismo.

Estos resultados indican, entonces, que el potencial de membrana de las neuronas Rz se halla en un equilibrio entre los efectos despolarizantes e hiperpolarizantes del tono colinérgico basal. Las neuronas Rz pueden sostener altas tasas de disparo de potenciales, que dependen en forma directa del potencial de membrana. Dado que los potenciales de acción evocan la liberación de serotonina de estas neuronas (Bruns & Jahn, 1995) el tono basal de ACh podría considerarse como un regulador de la liberación basal de serotonina en el sistema nervioso de la sanguijuela. Aún resta identificar la fuente de liberación de ACh.

La hipótesis de que el espacio extracelular almacena bajos niveles de neurotransmisores, los cuales pueden actuar tónicamente en neuronas, ha sido demostrada para el glutamato, que actúa a través de receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) para regular la actividad electrofisiológica de neuronas piramidales de hipocampo (Sah *et al.*, 1989), y para la ACh, que actúa en forma parácrina activando receptores nicotínicos presinápticos de interneuronas gabaérgicas en el núcleo interpeduncular de ratas (Lena *et al.*, 1993).



Lidia Szupak



ANTONIA MARIN BURGIN

## REFERENCIAS

- Angstadt, J.D., Choo, J.J. (1996) Sodium dependent plateau potentials in cultures Retzius cells of the medicinal leech. *J. Neurophysiol.* 76: 1491-1502.
- Angstadt, J.D., Friesen, W.O. (1993) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. I Effects of serotonin on the electrical properties of swim-gating cell 204 *J. Comp. Physiol. A* 172, 223-234.
- Baader, A.P. (1997) Interneuronal and motor patterns during crawling behavior of semi intact leeches. *J. Exp. Biol.* 200: 1369-1381.
- Baader, A.P., Kristan, W.B.Jr. (1995) Parallel pathways coordinate crawling in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Comp. Physiol. A* 176: 715-726.
- Baba, Y., Hirota, K., Shimozawa, T., Yamaguchi, T. (1995). Differing afferent connections of spiking and non spiking wind-sensitive local interneurons in the terminal abdominal ganglion of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* 176: 17-30.
- Baldissera, F., Hultborn, H., Illert, M. (1981) Integration in spinal neuronal system. *In Handbook of Physiology: The Nervous System*. Ed. J.M. Brookhart, V.B. Mouncastle, V.B. Brooks. Baltimore: Williams & Wilkins. Pp. 509-596.
- Belanguer J.H., Orchard, I. (1993) The locust ovipositor opener muscle: properties of neuromuscular system. *J. Exp. Biol.* 174: 321-342.
- Beltz, B.S., Kravitz, E.A. (1987) Physiological identification, morphological analysis, and development of identified serotonin-proctolin containing neurons in the lobster ventral nerve cord. *J. Neurosci.* 7: 533-546.
- Benjamin, P.R., Elliot, C.J.H. (1989) Snail feeding oscillator: the central pattern generator and its control by modulatory interneurons. *J. Neurosci.* 9: 173-214.
- Bentley, D., Konishi, M. (1978) Neural control of behavior. *Ann. Rev. Neurosci.* 1: 35-59.
- Bialek, W., Rieke, F., de Ruyter van Steveninck, R.R., Warland, D. (1991) Reading a neural code. *Science* 252, 1854-1857.
- Bonner, T.I. (1992) Domains of muscarinic acetylcholine receptors that confer specificity of G protein coupling. *Trends Pharm. Sci.* 13: 48-50.
- Broduehrer, P.D., Debski, E.A., O'Gara, B.A., Friesen, W.O. (1995) Neural control of leech swimming. *J. Neurobiol.* 27: 403-418.

- Bullock, T.O. (1993) *How do brains work*. Boston. Birkäuser.
- Burns, D., Jahn, R. (1995) Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377: 62-65.
- Burrows, M. (1979a) Graded synaptic interactions between local premotor interneurons of the Locust. *J. Neurophysiol.* 42: 1108-1123.
- Burrows, M. (1979b) Synaptic Potentials Effect the Release of Transmitter from locust nonspiking interneurons. *Science* 204: 81-83.
- Burrows, M. (1987a) Parallel processing of proprioceptive signals by spiking local interneurons and motor neurons in the locust. *J. Neurosci.* 7, 1064-1080.
- Burrows, M. (1987b) Inhibitory interaction between spiking and non spiking interneurons in the locust. *J. Neurosci.* 7, 3282-3292.
- Burrows, M. (1992) Local circuits for the control of leg movements in an insect. *Trends Neurosci.* 15: 226-232.
- Burrows, M., Laurent, G.J. & Field, L.H. (1988) Proprioceptive inputs to nonspiking local interneurons contribute to local reflexes of a locust hindleg. *J. Neurosci.* 8, 3085-3093.
- Büschges, A., Schmitz, J. (1990) Nonspiking pathways antagonize the resistance reflex in the Thoraco-Coxal joint of Stick insects. *J. Neurobiol.* 22: 224-237.
- Büschges, A., Wolf, H. (1995) Nonspiking local interneurons in insect leg motor control I. Common Layout and species-specific response properties of femur-tibia joint control pathways in stick insect and locust. *J. Neurophysiol.* 5:1843-1860.
- Calabrese, R.L. (1989) Modulation of muscle and neuromuscular junction in invertebrates. *Semin. Neurosci.* 1: 25-34.
- Capaday, C., Stein, R.B. (1986) Amplitud modulation of the soleus H-reflex in the human during walking and standing. *J. Neurosci.* 6: 1308-1313.
- Caulfield, M.D. (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* 58: 319-379.
- Cazalets, J.R., Squalli-Houssaini, Y., Clarac, F. (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory aminoacids in neonatal rat. *J. Physiol. (London)* 455: 187-204.
- Church, P.J., Whim, M.D., Lloyd, P.E. (1993) Modulation of neuromuscular transmission by conventional and peptide transmitters released from excitatory and inhibitory motor neurons in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 13: 2790-2800.

- Clarke, P.B.S. (1993) Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation. *Progr. Brain Res.* 98: 77-83.
- Clarke, P.B.S., Reuben, M. (1996) Release of [<sup>3</sup>H]-noradreneline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [<sup>3</sup>H]-dopamine release. *Br. J. Pharmacol.* 117: 595-606.
- Cooper, O., Gutbrod, J.C., Witzemann, V., Methfessel, C. (1996). Pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor from fetal rat muscle expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 309, 287-298.
- David, J.A., Sattelle, D.B. (1984). Actions of cholinergic pharmacological agents on the cell body membrane of the fast coxal depressor motoneurone of the cockroach (*periplaneta americana*). *J. Exp. Biol.* 108, 119-136.
- Dale, H.H. (1914) The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol.* 6: 147-190.
- de Ruyter van Steveninck, R.R., Laughlin, S.B. (1996) The rate of information transfer at graded potential synapses. *Nature* 379, 642-645.
- Debsky, E.A., Friesen, W.O. (1987) Intracellular stimulation of sensory cells elicits swimming activity in the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 160: 447-457.
- Deschenes, M., Paradis, M., Roy, J.P., Steriade, M. (1984) Electrophysiology of neurons of lateral thalamic nuclei in cat: Resting properties and burst discharges. *J. Neurophysiol.* 51: 1196-1219.
- Dickinson, M.H., Lent, C.M. (1984) Feeding behavior of medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L. *J. Comp. Physiol. A* 154: 449-455.
- Dickinson, P. (1989) Modulation of simple motor patterns. *Semin. Neurosci.* 1:15-24.
- Dixon, D., Atwood, H.L. (1989) Conjoint action of phosphatidylinositol and adenylate cyclase systems in serotonin-induced facilitation at the crayfish neuromuscular junction. *J. Neurophysiol.* 62: 1251-1259.
- Dowling, J.E. (1989) Neuromodulation in the retina: the role of dopamine. *Semin. Neurosci.* 1: 35-43.
- Eccles, J.C., Eccles, R.M., Fatt, P. (1956) Pharmacological investigations on a central synapse operated by acetylcholine. *J. Physiol.* 131: 154-169.
- Eccles, J.C. (1964) *The Physiology of Synapses*. Berlin: Springer-Verlag.
- Eckert, R. (1963) Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J. Gen. Physiol.* 46: 573-587.

- Egan, T.M., North, R.A. (1986). Actions of acetylcholine and nicotine on rat locus coeruleus neurons *in vitro*. *Neurosci.* 19, 565-571.
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S. (1994)  $\alpha 9$ : An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715.
- Flamm, R.E., Harris-Warick, R.M. (1986) Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. II. Target neurons of dopamine, octopamine, and serotonin within the piloric circuit. *J. Neurophysiol.* 55: 866-881.
- Friesen, W.O. (1989a) Neuronal control of leech swimming movements. I. Inhibitory interactions between motor neurons *J. Comp. Physiol. A* 166: 195-203.
- Friesen, W.O. (1989b) Neuronal control of leech swimming movements. II. Motor neuron feedback to oscillator cells 115 and 28. *J. Comp. Physiol. A* 166: 205-215.
- Getting, P.A. (1989) Emerging principles governing the operation of neural networks. *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 185-204.
- Getting, P.A., Denkin, M.S. (1985) Mechanism of pattern generation underlying swimming in *Tritonia*. IV. Gating of a central pattern generator. *J. Neurophysiol.* 53: 446-480.
- Glover, J.C., Kramer, A.P. (1982) Serotonin analog selectively ablates identified neurons in the leech embryo. *Science* 216: 317-319.
- Glover, J.C., Mason, A. (1986) Morphogenesis of an identified leech neuron: segmental specification of axonal outgrowth. *Dev. Biol.* 115: 256-260.
- Gu, X., Muller, K.J., Young, S.R. (1991) Synaptic integration at a sensory-motor reflex in the leech. *J. Physiol. (Lond)* 441: 733-754.
- Hagiwara, S., Morita, H. (1962) Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion. *J. Neurophysiol.* 25: 721-731.
- Harris-Warick (1988) Chemical modulation of central pattern generators. In *Neural Control of Rhythmic Movements in Vertebrates*, ed. A.H. Cohen, S. Rosignol, S. Grillner, pp. 285-331. New York: Wiley & Sons.
- Harris-Warick, R.M., Cohen, A.H. (1985) Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *J. Exp. Biol.* 116: 27-46.
- Harris-Warick, R.M., Marder, E. (1991) Modulation of neural networks for behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 39-57.

- Hashemzadeh-Gargari, H., Friesen, W.O. (1989) Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamin. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C, 295-302.
- Hayashi, Y., Momiyama, A., Takahashi, T., Ohishi, H., Ogawa-Meguro, R., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1993) Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature* 366: 687-690.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. London* 117: 417-427.
- Hollister, L.E., Calghorn, J.L. (1993) New antidepressants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 165-177.
- Iscla, I., Arini, P.D., Szczupak, L. (1999) Differential channeling of sensory stimuli onto a motor neuron in the leech. *J. Comp. Physiol. A* 184: 233-241.
- Jordan, L.M., Brownstone, R.M., Noga, B.R. (1992) Control of functional systems in the brainstem and spinal cord. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 794-801.
- Juusola, M., French, A.S., Uusitalo, R.O., Weckström, M. (1996) Information processing by graded potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neurosci.* 19: 292-297.
- Kaczmarek, L.K., Levitan, I.B. (1987) *Neuromodulation*. New York: Oxford Univ. Press 286 pp.
- Kaiser, S.A., Soliakov, L., Harvey, S.C., Luetje, C.W., Wonnacott, S. (1998) Differential inhibition by  $\alpha$ -conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. *J. Neurochem.* 70: 1069-1076.
- Kandel, E.R., Spenser, W.A. (1961) Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *J. Neurophysiol.* 24: 243-259.
- Katz, B. (1966) *Nerve, Muscle, and Synapse*, pp. 97-141. New York: McGraw-Hill.
- Katz, P.S., Frost, W.N. (1994) Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CPG: serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons. *J. Neurophysiol.* 74: 2281-2293.
- Kravitz, E.A. (1988) Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science* 241: 1775-1781.

- Kristan, W.B.J, French, K.A., Szczupak, L. (1993). Developmental Regulation of Segment-Specific Cholinergic Receptors on Retzius Neurons in the Medicinal Leech. *J. Neurosci.* 13, 1577-1587.
- Kristan, W.B.Jr, McGirr, S.J., Simpson, G.V. (1982) Behavioural and mechanosensory neurone responses to skin stimulation in leeches. *J. Exp. Biol.* 96: 143-160.
- Kristan, W.B.Jr. (1982) Sensory and motor neurones responsible for the local bending response in leeches. *J. Exp. Biol.* 96:161-180.
- Kristan, W.B.Jr., Lockery, S.R., Lewis, J.E. (1995). Using reflexive behaviors of the medicinal leech to study information processing. *J. Neurobiol.* 27: 380-389.
- Kristan, W.B.Jr, Weeks, J.C. (1983) Neurons controlling the initiation, generation and modulation of leech swimming. En: *Neural Origin of Rhythmic Movements*. A. Roberts and B. Roberts, eds.
- Kupfermann, I. (1991) Functional studies of co-transmission. *Physiol. Rev.* 71: 683-732.
- Kupfermann, I., Weiss, K.R. (1981) The role of serotonin in arousal of feeding behavior of *Aplysia*. In *Serotonine Neurotransmission and Behavior*, ed. A. Gelperin, B. Jacobs. Cambridge: MIT press, pp. 255-287.
- Landau, E.M. (1969). The interaction of presynaptic polarization with calcium and magnesium in modifying spontaneous transmitter release from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (London)*. 203: 281-299.
- Laurent, G.J., Burrows, M. (1989a) Distribution of intersegmental inputs to nonspiking local interneurons and motor neurons in the Locust. *J. Neurosci.* 9: 3019-3029.
- Laurent, G.J., Burrows, M. (1989b) Intersegmental interneurons can control the gain of reflexes in adjacent segments of the Locust by their action on nonspiking local interneurons. *J. Neurosci.* 9:3030-3039.
- Leake, L.D. (1986) Leech Retzius cells and 5-hydroxytryptamine. *Comp. Biochem. Physiol.* 83: 229-239.
- Lena, C., Changeux, J-P., Mulle, C. (1993) Evidence for “preterminal” nicotinic receptors of GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J. Neurosci.* 13: 2680-2688.#
- Lent, C.M. (1984) Quantitative effects of a neurotoxin upon serotonin levels within tissue compartments of the medicinal leech. *J. Neurobiol.* 15: 309-323.
- Lent, C.M., Dickinson, M.H. (1984a) Retzius cells retain functional membrane properties following ablation by the neurotoxin, 5,7-DHT. *Brain Res.* 300, 167-171.

- Lent, C.M., Dickinson, M.H. (1984b). Serotonin integrates the feeding behavior of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* 154, 457-471.
- Lent, C.M., Zundel, D., Freedman, E., Groome, J.R. (1991). Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. *J. Comp. Physiol. A* 168: 191-200.
- Lipton, S.A., Aizenman, E., Loring, R.H. (1987). Neural nicotinic acetylcholine responses in solitary mammalian retinal ganglion cells. *Pflugers Arch.* 410, 37-43.
- Llinás, R., Yarom, Y. (1986) Oscillatory properties of guinea pig olivary neurons and their pharmacological modulation: An *in vitro* study. *J. Physiol.* 376: 163-182.
- Lockeley, S.R., Kristan, W.B.Jr. (1990a) Distributed processing of sensory information in the leech. I Input-output relations of the local bending reflex. *J. Neurosci.* 10: 1811-1815.
- Lockeley, S.R., Kristan, W.B.Jr. (1990b) Distributed processing of sensory information in the leech. II Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J. Neurosci.* 10: 1816-1829.
- Lockery, S.R., Kristan, W.B.Jr. (1991) Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* 168: 165-177.
- Lopez-Barneo, J., Llinás, R. (1988) Electrophysiology of mammalian tectal neurons in vitro: I. Transient ionic conductances. *J. Neurophysiol.* 60: 853-868.
- Mackey, S., Carew, T.J. (1983). Locomotion in *Aplysia*: triggering by serotonin and modulation by bag cell extract. *J. Neurosci.* 3: 1469-1477.
- Maelicke, A., Coban, T., Schrattenholz A; Schroder B; Reinhardt-Maelicke S; Storch, A., Godovac-Zimmermann, J., Methfessel, C., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X. (1993). Physostigmine and neuromuscular transmission. *Ann. NY Acad. Sci.* 681, 140-154.
- Mangan, P.S., Curran, G.A., Hurney, C.A., Friesen, W.O. (1994a). Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. III. Control of cellular properties in motor neurons by serotonin. *J. Comp. Physiol. A* 175: 709-722.
- Mangan, P.S., Cometa, A.K., Friesen, W.O. (1994b). Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. IV. Serotonin-induced alteration of synaptic interactions between neurons of the swim circuit. *J. Comp. Physiol. A* 175: 723-736.

- Marder, E. (1998) From biophysics to models of network funktion. *Ann. Rev. Neurosci.* 21: 25-45.
- Marder, E., Meyrand, P. (1989) Chemical modulation of an oscillatory neural circuit. See Jacket 1989 pp. 317-338.
- Marder, E., Calabrese, R.L. (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol. Rev.* 76: 687-717.
- Marshall, D.L., Redfern, P.H., Wonnacott, S. (1997) Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. *J. Neurochem.* 68: 1511-1519.
- Mason, A., Sunderland A.J., Leake, L.D. (1979) Effects of leech Retzius cells on body wall muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* [C] 63: 359-361.
- Mason, A., Kristan, W.B.Jr. (1982) Neuronal excitation, inhibition and modulation of leech longitudinal muscle. *J. Comp. Physiol.* A 175: 723-736.
- Matthews, G., Wickelgren, W.O. (1977). On the effect of calcium on the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 266, 91-101.
- McAdoo, D.J., Coggeshall, R.E. (1976). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of biogenic amines in identified neurons and tissue of *Hirudo medicinalis*. *J. Neurochem.* 26: 163-167.
- McClellan, A.D., Brown, G.D., Getting, P.A. (1994) Modulation of swimming in *Tritonia*: excitatory and inhibitory effects of serotonin. *J. Comp. Physiol.* A. 174: 257-266.
- McCormick, D.A., Prince, D.A. (1987). Acetylcholine causes rapid nicotinic excitation in the medial habenular nucleus of guinea pig, *in vitro*. *J. Neurosci.* 7, 742-752.
- McGehee, D.S., Heath, M., Gelber, S., Devay, P., Role, L.W. (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269: 1692-1696.
- McGehee, D.S., Role, L.W. (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 521-546.
- Mulle, C., Changeaux, J.P. (1990). A novel type of nicotinic receptor in the rat central nervous system characterized by patch-clamp techniques. *J. Neurosci.* 10, 169-175.

- Muller, K.J., Nicholls, J.G., Stent, G.S. (1981) *Neurobiology of the Leech*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mulloney, B., Acevedo, L.D., Bradbury, A.G. (1987) Modulation of the crayfish swimmeret rhythm by octopamine and the neuropeptide proctolin. *J. Neurophysiol.* 58: 584-597.
- Nicholls, J.G., Baylor, D.A. (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J. Neurophysiol.* 31: 740-756.
- Nisell, M., Nomikos, G.G., Svensson, T.H. (1994) Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Synapse* 16: 36-44.
- O'Gara, B.A., Chae, H., Latham L.B., Friesen W.O. 1991. Modification of leech behavior patterns by reserpine-induced amine depletion. *J. Neurosci.* 11, 96-110.
- Pasztor, V.M. (1989) Modulation of sensitivity in invertebrate sensory receptors. *Semin. Neurosci.* 1: 5-14.
- Paul, D.H., Mulloney, B. (1985) Non spiking local interneuron in the motor pattern generator for the Crayfish swimmeret. *J. Neurophysiol.* 54: 28-39.
- Payton, B.W. (1981) Structure of the leech nervous system. In: *Neurobiology of the Leech*, edited by K.J. Muller, J.G. Nicholls and G.S. Stent. Cold Spring Harbor. p. 35-50.
- Pearson, K.G., Wong R.K.S., Fournier, C.R. (1976) Connexions between hair-plate afferents and motoneurons on cockroach leg. *J. Exp. Biol.* 64: 261-266.
- Rapier, C., Lunt, G.G., Wonnacott, S. (1988) Stereoselective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J. Neurochem.* 50: 1123-1130.
- Role, L.W., Berg, D.K. (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16: 1077-1085.
- Russell, D.F., Hartline, D.K. (1978) Bursting neural networks: A reexamination. *Science* 200: 453-456.
- Sacaan, A.I., Dunlop, J.L., Lloyd, G.K. (1995) Pharmacological characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat-brain slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 224-230.
- Sah, P., Hestrin, S., Nicoll, R.A. (1989) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate enhances excitability of neurons. *Science* 246, 815-818.

- Sargent, P.B. (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 403.
- Sawyer, R.T. (1986) *Leech Biology and Behaviour*. Clarendon Press. Oxford.
- Schrattenholz, A., Coban, T., Schroder, B., Okonjo, K.O., Kuhlmann, J., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. (1993) Biochemical characterization of a novel channel-activating site on nicotinic acetylcholine receptors. *J. Rec. Res.* 13, 393-412.
- Schwartz, R.D., Lehmann, J., Kellar, K.J. (1984) Presynaptic cholinergic receptors labeled by <sup>3</sup>H-acetylcholine on catecholamine and serotonin axons in brain. *J. Neurochem.* 42: 1495-1498.
- Shaw, B.K., Kristan, W.B.Jr. (1995) The whole-body shortenin reflex of the medicinal leech: motor pattern, sensory basis, and interneuronal pathways. *J. Comp. Physiol. A* 177: 667-681.
- Shaw, S.R. (1979) *The Neurosciences, Fourth Study Program* (Schmitt, F.O. and Worden, F.G., eds), pp. 275-295, MIT Press.
- Sigvardt, K.A. (1989) Modulation of properties of neurons underlying rhythmic movements in vertebrates. *Semin. Neurosci.* 1: 55-65.
- Stent-Tomlinson, W., Nusbaum, M.P., Perez, L.E., Kristan, W.B.Jr. (1986) A kinematic study of crawling behavior in the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Comp. Physiol. A* 158: 593-603.
- Storch, A. , Schrattenholz, A. , Cooper, J. C. , Abdel Ghani, E. M. , Gutbrod, O. , Weber, K. H. , Reinhardt, S. , Lobron, C. , Hermsen, B. and Soskic, V. (1995). Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 290, 207-219.
- Stuart, A.E. (1970) Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J Physiol. London* 209:627-646.
- Szczupak, L., Edgar, J. Peralta, M., Kristan, B.W.Jr. (1998) Long-lasting depolarization of leech neurons mediated by receptors with a nicotinic binding site. *J. Exp. Biol.* 201: 1895-1906.
- Szczupak, L., Jordan, S., Kristan, B.W.Jr. (1993) Segment specific modulation of the electrophysiological activity of Retzius neurons by acetylcholine. *J. Exp. Biol.* 183: 115-135.

- Szczupak, L., Kristan, W.B.Jr. (1995) Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *J. Neurophysiol.* 74: 2614-2624.
- Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E., Rosi, G., Toutant, J. P. (1995). Solubilization, molecular forms, purification and substrate specificity of two acetylcholinesterases in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Biochem. J.* 306, 687-692.
- Taylor, P., Radic, Z. (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Ann. Rev. Toxicol.* 34: 281-320.
- Taylor, P. (1996). Anticholinesterase agents. In *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, ed. J. G. Hardman and L. E. Limbird, pp. 161-176. New York: McGraw-Hill.
- Trimmer, B.A., Weeks, J.C. (1989). Effects of nicotinic and muscarinic agents on an identified motoneurone and its direct afferent inputs in larval *manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 144, 303-337.
- Trombley, P.Q., Shepherd, G.M. (1993) Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 540-547.
- Van der Kloot, W., Molgo, J. (1994) Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 74: 898-991.
- Wadephul, M. (1989) Depression of excitatory motoneurons by a single neurone in the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* 143: 509-527.
- Wallace, B. G. (1981). Distribution of AChE in cholinergic and non-cholinergic neurons. *Brain Res.* 224, 321-328.
- Wässle, H. (1991) Functional architecture of the retina. *Phys. Rev.* 71: 447-480.
- Weiss, K.B., Bresina, V., Cropper, E.C., Hooper, S.L., Miller, M.W., Probst, W.C., Vilim, F.S., Kupfermann, I. (1992) Peptidergic co-transmission in *Aplysia*: functional implications for rhythmic behaviors. *Experientia* 48: 456-463.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Peroutka, S.J. (1990) *The neuropharmacology of serotonin*, New York Academy of Science, New York.
- Wilkie, G.I., Hutson, P., Sullivan, J.P., Wonnacott, S. (1996) Pharmacological characterisation of a nicotinic autoreceptor in rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem. Res.* 21: 1147-1154.
- Williard, A.L. (1981) Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* 1, 936-944.

- Wittenberg, G., Kristan, W.B.Jr. (1992a) Analysis and modeling of the multisegmental coordination of shortening behavior in the medicinal leech. I. Motor output pattern. *J. Neurophysiol.* 68: 1683-1692.
- Wittenberg, G., Kristan, W.B.Jr. (1992b) Analysis and modeling of the multisegmental coordination of shortening behavior in the medicinal leech. II. Role of identified interneurons. *J. Neurophysiol.* 68: 1693-1707.
- Wittenberg, G., Loer, C.M., Adamo, S.A., Kristan, W.B.Jr. (1990) Segmental specialization of neuronal connectivity in the leech. *J. Comp. Physiol. A* 167: 453-459.
- Woolston, A.-M., Wedderburn, J.F.S., Sillar, K.T. (1994) Descending serotonergic spinal projections and modulation of locomotor rhythmicity in *Rana temporaria* embryos. *Proc. R. Soc. Lond. B* 255: 73-79.
- Yau, K.W. (1976) Receptive fields, geometry and conduction block of sensory neurons in the central nervous system of the leech. *J. Physiol. Lond.* 263: 513-538.