

Tesis de Posgrado

Modulación serotoninérgica de un circuito sensorio-motor en la sanguijuela *Hirudo medicinalis*

Iscla, Irene

2001

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Iscla, Irene. (2001). Modulación serotoninérgica de un circuito sensorio-motor en la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3328_Iscla.pdf

Cita tipo Chicago:

Iscla, Irene. "Modulación serotoninérgica de un circuito sensorio-motor en la sanguijuela *Hirudo medicinalis*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3328_Iscla.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

**“Modulación Serotoninérgica de un Circuito
Sensoro-Motor en la sanguijuela *Hirudo
medicinalis*”**

Autora: Licenciada Irene Iscla

Directora: Doctora Lidia Szczupak

№ 33232

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UBA. (1996-1998)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, UBA. (1999-2001)

"Modulación Serotoninérgica de un Circuito Sensoro-Motor en la sanguijuela *Hirudo medicinalis*"

Tesis Doctoral de la Lic. Irene Iscla
Dirigida por la Dra. Lidia Szczupak

Resumen

El rol neuromodulador de la serotonina ha sido conservado a lo largo de la evolución y se ha observado en invertebrados y en vertebrados. Los invertebrados han sido utilizados como modelos de estudio de la modulación por serotonina, ya que la simpleza de sus sistemas nerviosos, permite correlacionar alteraciones comportamentales con modificaciones en los circuitos neuronales subyacentes a dichos comportamientos. La posibilidad de identificar inequívocamente a las neuronas serotoninérgicas, permite correlacionar su actividad con los efectos atribuidos a la serotonina.

La serotonina es un importante neuromodulador en la sanguijuela: interviene en la modulación de varios comportamientos tales como la alimentación, el acortamiento defensivo y la natación. Las neuronas serotoninérgicas Retzius constituyen su fuente principal de liberación. La estimulación mecánica de la piel del animal produce la activación de las células mecanosensoriales P. Dicha activación es suficiente para evocar diversas respuestas motoras y a su vez, en paralelo, activar a las neuronas Retzius. Este trabajo de tesis tuvo como objetivo el estudio de la modulación serotoninérgica de un circuito sensoro-motor en el sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, basándose en la hipótesis de que la salida motora final estará determinada por la interacción de la vía sensoro-motora y la vía sensoro-moduladora.

En la primera parte del trabajo se caracterizó la vía sensoro-motora entre las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (P) y las motoneuronas *annulus erectus* (AE), que inervan los músculos responsables de la erección de los anillos en que se divide la pared corporal del animal. Los resultados muestran que:

- ♦ La motoneurona AE recibe dos señales simultáneas ante la activación de la neurona mecanosensorial P: una excitatoria y otra inhibitoria. La fase excitatoria está mediada por una sinápsis directa y la inhibitoria por una interacción polisináptica.
- ♦ La interneurona pasiva 151 ejerce un rol modulador sobre la sinápsis P-AE, interactuando con la motoneurona AE y con la(s) interneurona(s) que media(n) la fase inhibitoria de la conexión P-AE.

En la segunda parte del trabajo se analizó el efecto de la serotonina exógena y de antagonistas serotoninérgicos sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas P y AE y sobre la interacción P-AE.

- ♦ La aplicación de serotonina exógena produjo la hiperpolarización de las neuronas AE, por activación de una conductancia a cloro sensible a los antagonistas metiotepina y mianserina.
- ♦ La serotonina exógena causó una disminución de la amplitud de la fase inhibitoria de la interacción P-AE, y los antagonistas metiotepina y mianserina bloquearon este efecto.
- ♦ La serotonina endógena ejercería una inhibición sobre la interacción P-AE.

Palabras claves: Neuromodulación, sanguijuela *Hirudo medicinalis*, serotonina, circuito sensoro-motor.

"Serotonergic modulation of a sensory-motor circuit in the leech *Hirudo medicinalis*"

Doctoral Thesis by Lic. Irene Iscla
Directed by Dr. Lidia Szczupak

Abstract

The role of serotonin as neuromodulator has been conserved along evolution, being observed in vertebrates as well as in invertebrates. Invertebrates have been extensively used as models to study serotonin modulation because their simple nervous systems allow correlating behavioral changes with changes in the pattern of activity of the neural circuits that underlie specific behaviors. The precise identification of serotonin-containing neurons allows correlating their activity with the effects attributed to this amine.

Serotonin is an important neuromodulator in the leech: it is responsible for the expression of feeding behavior and modulates shortening and swimming. Retzius neurons contain approximately half of the total ganglionic serotonin. Mechanical stimulation of the skin activates mechanosensory cells sensitive to pressure, P cells. This activation is capable to evoke several motor responses and in parallel to activate the serotonin-containing Retzius cells. The goal of this thesis work has been to evaluate the serotonin modulation of a sensory-motor circuit in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*, based on the hypothesis that the final motor output results of the interaction between a sensory-modulatory and a sensory-motor pathways.

The aim of the first part of this work was to characterize the interaction between a pair of specific sensory and motor neurons: the P mechanosensory neurons and the AE (annulus erector) cells, a pair of motor neurons that innervate the muscles responsible for erecting the annuli into sharp ridges. The results show that

- ◆ The response of the AE neurons was composed of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) and of inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs). The EPSPs were transmitted via a monosynaptic pathway, and the IPSPs via a polysynaptic one.
- ◆ The non-spiking neuron 151 is able to modulate the P-AE interaction, by means of rectifying electrical synapses with AE motoneuron and with the interneuronal layer that mediates the inhibitory response.

In the second part of this work we studied the effects of serotonin and serotonin receptor antagonists on the P-AE interaction and on the intrinsic properties of the neurons involved.

- ◆ Exogenously applied serotonin produced the hyperpolarization of AE motoneurons, due to the activation of a chloride conductance that was sensitive to methiothepine and mianserin.
- ◆ Exogenously applied serotonin specifically diminished the amplitude of the inhibitory response to P cell stimulation, and this effect was also sensitive to methiothepine and mianserin.
- ◆ Endogenous serotonin would exert an inhibitory modulation on this sensory-motor circuit.

Keywords: neuromodulation, leech *Hirudo medicinalis*, sensory-motor circuit, serotonin.

Indice

Resumen en español	2
Resumen en inglés.....	3
Introducción	6
Modulación de circuitos.....	6
Modulación serotoninérgica	8
Neuroanatomía de la sanguijuela.....	9
Comportamientos en la sanguijuela.	11
Modulación serotoninérgica en la sanguijuela.	12
Objetivos del trabajo de tesis	17
Materiales y métodos	19
Preparación biológica	19
Soluciones y Drogas.....	22
Eyección de drogas por pulsos de presión.	23
Registros electrofisiológicos.....	23
Manipulaciones experimentales.....	24
Análisis de los resultados	25
Parte I: Caracterización de la interacción sináptica entre la neurona mecanosensorial P y la motoneurona AE.....	26
Capítulo 1: Conectividad sináptica entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE.	27
Cuantificación de la respuesta de AE a la estimulación de P	28
Análisis de la interacción entre las neuronas P y AE.	29
Discusión.....	32
Capítulo 2: Integración de Señales por la motoneurona AE.	34
¿Cómo la motoneurona AE procesa información sobre la intensidad, duración y dirección del estímulo mecanosensorial?.	34
Expresión de las fases hiperpolarizante y despolarizante de la respuesta motora en función de la duración del tren de estímulos.	34
Expresión de las fases hiperpolarizante y despolarizante de la respuesta motora en función de la frecuencia del tren de estímulos.	37

Discriminación espacial del estímulo.....	40
Discusión.....	42
Capítulo 3: Estudio de las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE.....	44
Conductancias iónicas responsables de cada una de las fases de las respuesta.	44
Propiedades intrínsecas de la motoneurona AE en función de su potencial de membrana.....	47
Discusión.....	50
Capítulo 4: Modulación del circuito sensorio-motor P- AE por la interneurona pasiva 151.	54
Modulación graduada del potencial de membrana y la frecuencia de disparo espontánea de la motoneurona AE por la interneurona 151.	54
Regulación de la interacción P-AE por la interneurona 151.....	56
Discusión.....	59
 Parte II: Modulación serotoninérgica de la interacción P-AE.....	61
Capítulo 5: Efecto de pulsos de serotonina sobre las neuronas P y AE.....	62
Efectos de pulsos de 5-HT sobre la motoneurona AE.....	62
Efectos de los pulsos de serotonina sobre la neurona mecanosensorial P.....	63
Efecto de distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre la respuesta de la motoneurona AE a los pulsos de 5-HT.....	64
Discusión.....	67
Capítulo 6: Efecto de la perfusión de serotonina sobre las propiedades intrínsecas de las motoneuronas AE y las neuronas sensoriales P.	69
Efecto de la perfusión de 5-HT sobre la motoneurona AE.....	69
Efectos de la perfusión 5-HT sobre la neurona P.	69
Efecto de los distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE.	70
Discusión.....	72
Capítulo 7: Efectos de la perfusión de 5-HT sobre la interacción P-AE.	75
Efecto de distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre la interacción P-AE.	77
Discusión.....	82
 Conclusiones Generales	84
Bibliografía.....	86

Introducción

Los animales adaptan sus comportamientos a los requerimientos que le imponen los medios externo e interno. El deseo de entender cómo el sistema nervioso produce dichos comportamientos ha llevado a los investigadores a lo largo de los años a estudiar las propiedades biofísicas de neuronas individuales y de sus interacciones sinápticas durante la ejecución de los mismos. Para esto ha sido necesario utilizar preparaciones simples en las cuales la actividad de neuronas individuales y de circuitos generadores de patrones de movimiento pudieran ser directamente correlacionados con el comportamiento. Dichas preparaciones necesitaban, idealmente, ser accesibles a registros electrofisiológicos (especialmente registros intracelulares) y permitir una identificación inequívoca de las neuronas individuales para el estudio de interacciones en forma repetible mientras todavía pudieran producir un patrón motor reconocible. Los invertebrados han mostrado ser modelos ideales para el estudio de circuitos neuronales al permitir una caracterización bastante completa de las neuronas involucradas en distintos comportamientos y en su modulación.

Los circuitos neuronales que subyacen a los distintos comportamientos han sido clasificados según su arquitectura en circuitos dedicados, reordenados y distribuidos. En los circuitos dedicados, cada respuesta comportamental está generada una red neuronal anatómicamente separada, con especificidad sensorial y una salida motora única. En un momento determinado un único circuito ejerce control sobre la periferia y esto se logra por una interacción inhibitoria entre circuitos. Los circuitos que subyacen a los comportamientos de nado y retracción de las aletas en el molusco *Clione limacina* son un ejemplo de este tipo de arquitectura (Arshavsky *et al.*, 1993). Los circuitos reordenados surgen de la reorganización de un circuito preexistente por incorporación de uno o más elementos neuronales y/o de la interacción entre dos o más circuitos para formar un nuevo circuito generador de patrones de movimiento (Simmers *et al.*, 1995). Por último un circuito distribuido es aquel que tiene capacidad de generar un rango amplio de salidas motoras, según el tipo de población sensorial activada, la contribución de las distintas interneuronas y neuronas motoras (Lockery & Kristan, 1990a; Lockery & Kristan, 1990b).

Modulación de circuitos

El conocimiento de las interacciones anatómicas entre neuronas no es suficiente para predecir la actividad resultante de un circuito, ya que ésta puede ser alterada por neuromodulación. La reconfiguración de circuitos resulta de la acción

de neuromoduladores como péptidos y monoaminas, y puede ser inducida por estimulación de neuronas modificadoras identificadas que liberan dichas sustancias. Los neuromoduladores tienen la capacidad de cambiar esencialmente a todos los componentes de un circuito, creando un gran número de circuitos funcionales a partir de un único circuito anatómicamente definido (Harris-Warrick & Marder, 1991). Los neuromoduladores pueden alterar la salida de un circuito neuronal mediante dos mecanismos distintos: modificando las propiedades intrínsecas de las neuronas que los componen o cambiando la eficacia sináptica dentro del circuito.

El tipo y distribución de canales iónicos que se encuentran en la membrana de cada tipo neuronal le confieren propiedades intrínsecas características, que se manifiestan en propiedades electrofisiológicas como la capacidad de generar disparos rítmicos (osciladores), de disparar potenciales de acción post-hiperpolarización (Calabrese *et al.*, 1989), de generar potenciales de tipo plateau (Hounsgaard *et al.*, 1988; Hounsgaard & Kiehn, 1989) y de tener actividad espontánea en ausencia de entradas sinápticas (Lopez-Barneo & Llinás, 1988). La regulación de estas propiedades por sustancias capaces de alterar la sensibilidad al voltaje o la cinética de los canales iónicos es importante para la formación dinámica y la función de distintos circuitos en vertebrados e invertebrados (Katz & Frost, 1996).

Los neuromoduladores también pueden modificar la eficacia sináptica alterando la liberación de neurotransmisor por la neurona presináptica o/y la respuesta de la neurona postsináptica (Marder & Calabrese, 1996). Esta modulación se ha observado a distintos niveles del sistema nervioso. A nivel periférico en músculos y en la placa neuromuscular (Calabrese, 1989; Hurwitz *et al.*, 2000; Wegener & Nassel, 2000), en sinapsis químicas y eléctricas del sistema nervioso central (Chiel *et al.*, 1988) y en retina (Dowling, 1989). Estos cambios en la eficacia sináptica llevan a un reordenamiento de la red, la creación de un nuevo circuito a partir de un mismo circuito anatómico, resultando en un cambio comportamental. Así pues en distintos contextos la respuesta a un mismo estímulo puede ser diferente (Harris-Warrick & Marder, 1991; Marder & Calabrese, 1996; Marder, 1998).

Existen sustancias modificadoras de diversos tipos incluyendo aminas (dopamina, serotonina, octopamina), péptidos (proctolina, FMSH) y neurotransmisores clásicos como la acetilcolina. Según las neuronas liberadoras del neuromodulador pertenezcan o no al circuito modulado, la neuromodulación puede ser extrínseca o intrínseca. En el primer caso elementos neuronales ajenos al circuito activado producen la sustancia neuromoduladora que puede a su vez puede

modular a un conjunto de circuitos y coordinarlos para generar un determinado estado, por ejemplo en el sueño, o el hambre (Groome *et al.*, 1993). En la modulación intrínseca la neuromodulación se activa siempre que el circuito es estimulado, así que la modulación refleja el grado de activación del circuito más que un estado general interno. Este tipo de neuromodulación se ha descrito en circuitos sensoriales (Dowling, 1989) y en circuitos generadores de patrones de movimiento (Katz *et al.*, 1994).

Modulación serotoninérgica

La serotonina es una amina endógena cuya importancia ha sido demostrada en una gran variedad de funciones, actuando a nivel del sistema nervioso central y de la musculatura. Por ejemplo, ha sido sugerido que la serotonina juega un papel importante en la formación de memoria (Dale *et al.*, 1996; Kandel *et al.*, 1987), en la percepción del dolor (Leung & Mason, 1999), en la alimentación (Rosen *et al.*, 1983; Schachetner & Braunig, 1993; Yeoman *et al.*, 1996), en aflicciones afectivas como la depresión (Stockmeier *et al.*, 1998), en agresión (Edwards & Kravitz, 1997). 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; Day, 2000).

A pesar de su importancia en todas las especies, el número de neuronas serotoninérgicas es pequeño comparado con el número total de neuronas en el sistema nervioso, pero su área de influencia es grande porque casi todas las zonas del sistema nervioso reciben procesos de estas pocas células. A menudo en las zonas de contacto entre dendritas y las terminaciones de neuronas serotoninérgicas no se observan las especializaciones sinápticas típicas (Descarries *et al.*, 1990). De estas observaciones ha surgido el concepto de que la serotonina actúa como una hormona local, en la cual la especificidad está dada principalmente por la distribución selectiva de subtipos de receptores en distintas células en la proximidad de las terminaciones serotoninérgicas. En algunas especies como en crustáceos y en sanguijuelas la serotonina es liberada por células neurosecretorias a la circulación general actuando como una neurohormona (Kravitz, 2000; Williard, 1981).

La existencia de un gran número de receptores de 5-HT acoplados a distintas vías de señalización y con distintos patrones de expresión permite que una única sustancia como la 5-HT pueda generar simultáneamente diferentes efectos en varias estructuras del SNC. En mamíferos han sido descritos hasta el momento 14 subtipos de receptores de 5-HT farmacológicamente y estructuralmente distintos, agrupados

en 7 familias (Hoyer *et al.*, 1994).

Los invertebrados han sido utilizados como modelos de estudio de la modulación por serotonina (Katz *et al.*, 1994; Satterlie & Norekian, 1995; McPherson & Blankenship, 1991), ya que permiten correlacionar alteraciones comportamentales con modificaciones en los circuitos neuronales subyacentes a dichos comportamientos. La posibilidad de identificar inequívocamente a las neuronas serotoninérgicas permite también correlacionar su actividad con los efectos atribuidos a la serotonina. En particular en la sanguijuela, por la simplicidad de su sistema nervioso y su acotado repertorio de comportamientos se ha utilizado como modelo para el conocimiento de los mecanismos de acción de esta amina.

Neuroanatomía de la sanguijuela

La sanguijuela *Hirudo medicinalis* pertenece al phylum Annelida que comprende a los gusanos segmentados. La característica principal de los Annelida es la segmentación de su cuerpo a lo largo del eje antero-posterior, que se refleja en la organización de su sistema nervioso central. Este está compuesto por 32 ganglios: cuatro ganglios fusionados forman el ganglio cefálico; el ganglio de la cola o caudal compuesto por la fusión de siete ganglios y una cadena de 21 ganglios medios, cada uno de los cuales inerva un segmento corporal. Los ganglios medios están unidos entre sí por nervios conectivos compuestos por dos paquetes axonales laterales gruesos y un fino paquete axonal medio llamado nervio de Faivre. Cada ganglio medio contiene aproximadamente 200 pares de neuronas unipolares, con somas de 10 a 100 μm de diámetro. Las neuronas están organizadas en una monocapa que rodea al neuropilo central donde ocurren todas las conexiones sinápticas (Macagno, 1980). Esta disposición de los somas en el ganglio hace de la sanguijuela un excelente modelo para el estudio de la actividad de neuronas individuales y sus interacciones sinápticas por medio de electrodos intracelulares (Nicholls & Baylor, 1968). Los ganglios medios son muy similares entre sí y entre individuos lo que ha hecho posible el trazado de un mapa de la ubicación y el tamaño de los somas de las neuronas que los componen (Muller *et al.*, 1981). Actualmente, más de 50 pares de neuronas han sido identificadas por su posición en el ganglio, tamaño, forma y sus propiedades electrofisiológicas. El primer estudio extensivo sobre la identidad de las neuronas fue realizado por Nicholls y Baylor (1968) sobre neuronas mecanosensoriales, que son células sensoriales que responden a la estimulación cutánea. Para establecer la relación estructura-función de las neuronas estudiadas utilizaron una preparación llamada semi-intacta, que consiste en un trozo de pared corporal de varios

segmentos de largo conectada al ganglio que inerva el segmento central por las raíces laterales. De esta manera, por estimulación directa de la piel, Nicholls y Baylor describieron tres clases de neuronas mecanosensoriales que responden específica y selectivamente a varios grados de estimulación mecánica cutánea: las células T (existen tres pares por ganglio) responden al tacto; las células P (dos pares por ganglio) responden a presión y la células N a estímulos nociceptivos. Cada una de las neuronas de una misma clase inerva una región definida de la pared corporal, siendo sus campos receptivos marcadamente constantes en su forma y posición, entre segmentos y entre animales. Las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión, P, han sido las más estudiadas por estar asociadas a distintos comportamientos. Existen dos pares de neuronas sensoriales P en cada ganglio medio: un par inerva la parte ventral del cuerpo (Pv) y el otro la parte dorsal (Pd). Cada neurona mecanosensorial P tiene un campo receptivo principal que se encuentra en el cuadrante ipsilateral a la posición de su soma en el ganglio (dorsal, derecho o izquierdo y ventral derecho o izquierdo) (Nicholls & Baylor, 1968), y campos receptivos secundarios en los dos cuadrantes correspondientes de los segmentos adyacentes (Yau, 1976). En estudios más recientes se determinó que las células T responden a la velocidad de deformación de la piel en un rango de estimulación bajo, que es alcanzado durante los movimientos exploratorios normales del animal. El umbral de activación de las neuronas mecanosensoriales P no es alcanzado en estas condiciones ya que es 10 veces mayor que la máxima presión que ejerce la sanguijuela durante movimientos exploratorios, y no es alcanzado tampoco el de las neuronas N, ya que es de alrededor de 3.5 veces mayor que el de P (Carlton & McVean, 1995). Por lo tanto la presión necesaria para la activación de estos mecano-receptores debe ser ejercida por un agente externo como ser predadores, etc.

Utilizando la misma estrategia experimental (la preparación semi-intacta), han sido caracterizados 14 pares de motoneuronas excitatorias y 3 pares de motoneuronas inhibitorias que inervan grupos musculares definidos (Stuart, 1970). Tres capas musculares forman el hidroesqueleto tubular o pared corporal de la sanguijuela: la circular, la oblicua y la longitudinal. La capa de fibras circulares se encuentra directamente debajo de la piel y su contracción produce una disminución del diámetro del animal, favoreciendo su elongación. En la capa interna se encuentran las fibras musculares longitudinales que al contraerse producen el acortamiento del animal. En medio de estas dos capas se encuentran las fibras oblicuas que le dan mayor ductilidad a los movimientos de elongación y contracción.

Todas estas fibras musculares forman capas continuas a lo largo del animal, sin mostrar de por sí límites entre los segmentos. Su segmentación está determinada por la inervación de las fibras musculares por diferentes motoneuronas de los distintos ganglios medios. Existe un cuarto grupo de fibras, las dorso-ventrales que al contraerse achatan el cuerpo del animal. Por último, existen fibras musculares que se insertan en la piel a cada lado de los ámulos en que se dividen los segmentos y que al contraerse producen la erección de los mismos, confiriéndole a la piel del animal un aspecto indentado.

Las fibras longitudinales están inervadas por nueve pares de neuronas excitatorias y cuatro pares de neuronas inhibitorias. Las neuronas 3, 5, 7 y 107 inervan a las fibras longitudinales dorsales, las neuronas 106 fibras longitudinales laterales y las neuronas 4, 8 y 108 fibras longitudinales ventrales. Las neuronas L causan la contracción simultánea de las fibras longitudinales dorsales y ventrales ya que sus campos de inervación abarcan desde línea media dorsal a la línea media ventral y están eléctricamente acopladas entre sí. Las neuronas 1 y 102 son inhibitorias dorsales mientras que las 2 y 119 inhiben a las fibras ventrales (Stuart, 1970; Poon *et al.*, 1978). Las fibras circulares están inervadas por cuatro pares de neuronas, cuyos campos de inervación comprenden entre 9 y 10 ámulos. Un par inerva la parte dorsal y tres pares la parte ventral del cuerpo. Las fibras oblicuas son inervadas por dos pares de neuronas excitatorias y las fibras dorso-ventrales, que producen el achatamiento del cuerpo del animal, por un par de neuronas excitatorias. Todas las motoneuronas mencionadas hasta ahora se encuentran en la cara dorsal del ganglio. Las motoneuronas AE son las únicas motoneuronas presentes en la cara ventral del ganglio e inervan a los músculos responsables de la erección de los ámulos de la piel del animal. Su territorio de inervación abarca cinco ámulos y va desde la línea media ventral hasta la línea media dorsal del cuerpo del animal, del lado contralateral a la posición de su soma en el ganglio (Stuart, 1970).

Las primeras neuronas identificadas en la sanguijuela fueron un par de "células colosales" Retzius y un par de células gigantes Leydig, descritas por Retzius y Leydig respectivamente. Ambos tipos de neuronas tienen efectos neuromodulatorios. La activación de las neuronas Leydig modula la desviación lateral (Lockery & Kristan, 1991), mientras que la activación de las neuronas Rz modula varias conductas motoras que se detallarán más adelante.

Comportamientos en la sanguijuela.

La sanguijuela *Hirudo medicinalis* presenta un repertorio simple de

comportamientos. Entre ellos se encuentran reflejos defensivos, como el de acortamiento (contracción corporal ante un estímulo mecánico) y la desviación lateral (alejamiento localizado del segmento que recibe el estímulo mecánico); movimientos locomotrices como la natación y el desplazamiento sobre ventosas; la alimentación y el apareamiento. La simplicidad de su sistema nervioso, así como la posibilidad de utilizar preparaciones semi-intactas, han permitido conocer las redes neuronales subyacentes a varios de estos comportamientos. La natación ha sido uno de los primeros comportamientos estudiados sistemáticamente a nivel de las neuronas individuales (Ort *et al.*, 1974; Weeks & Kristan, 1978; Friesen, 1989; Brodfuehrer *et al.*, 1995). Actualmente se conocen también los circuitos neuronales responsables del acortamiento longitudinal (Shaw & Kristan, 1995; Shaw & Kristan, 1997; Wittenberg & Kristan, 1992a; Wittenberg & Kristan, 1992b), la desviación lateral (Kristan *et al.*, 1982; Kristan, 1982; Lockery & Kristan, 1990a; Lockery & Kristan, 1990b) y el desplazamiento sobre ventosas (Baader & Kristan, 1995; Baader, 1997).

Algunos de estos comportamientos sólo involucran a circuitos locales de un segmento único, como la desviación lateral, o el acortamiento longitudinal local, si bien en la mayoría de ellos intervienen también elementos intersegmentales que permiten la coordinación del movimiento a lo largo del animal, como en la natación (Brodfuehrer *et al.*, 1995) y en el desplazamiento sobre ventosas (Baader & Kristan, 1995).

Estímulos mecanosensoriales de distintas intensidades, aplicados en diferentes partes del cuerpo del animal son capaces de evocar todo este repertorio comportamientos (Kristan *et al.*, 1982).

Modulación serotoninérgica en la sanguijuela.

El sistema serotoninérgico de la sanguijuela se compone de tres pares de neuronas fácilmente identificables. El par de neuronas "colosales" Retzius (Rz), son las células de mayor tamaño en los ganglios medios de las sanguijuelas *Hirudo medicinalis* y contienen más del 50 por ciento de la serotonina total del ganglio (McAdoo & Coggeshall, 1976). Otros dos pares de neuronas serotoninérgicas que están presentes en los ganglios medios son las neuronas 21 y 61. La excitación de estas interneuronas frecuentemente produce episodios de nado y presentan oscilaciones siguiendo en fase al el patrón de actividad del nado (Nusbaum & Kristan, 1986).

Los niveles de serotonina endógena en el sistema nervioso central y en la

sangre de la sanguijuela están relacionados con su nivel de actividad y a su vez están asociados al estado de saciedad de los animales. Las sanguijuelas hambrientas adoptan posturas de alerta, movimientos exploratorios espontáneos incluyendo el nado hacia la fuente de perturbación el agua. Por el contrario las sanguijuelas saciadas son relativamente inactivas y generalmente no responden a estímulos externos (Sawyer, 1981).

A continuación se detallarán las evidencias experimentales indicando que el neurotransmisor serotonina actúa como neuromodulador de la natación (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989), la alimentación (Dickinson & Lent, 1984; Lent & Dickinson, 1984b; Groome *et al.*, 1993; Lent & Dickinson, 1984b; Groome *et al.*, 1993) y el acortamiento defensivo (Wittenberg & Kristan, 1992a; Wittenberg & Kristan, 1992b) en la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

Existe una correlación positiva entre el comportamiento de nado y los niveles de serotonina endógena en la sangre de sanguijuelas intactas (Williard, 1981). En sanguijuelas bañadas en solución salina conteniendo serotonina o inyectadas con serotonina se observa un incremento en la frecuencia de los episodios de natación (Williard, 1981); también en el sistema nervioso aislado expuesto a serotonina se observa un aumento en la probabilidad de episodios de nado espontáneos (Williard, 1981; Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989). Luego de la estimulación eléctrica de las neuronas serotoninérgicas R₂, que produce un incremento en los niveles de serotonina en los vasos sanguíneos que rodean a la cadena ganglionar, se produce un incremento en el número de episodios de nado espontáneos y en respuesta a la vibración del agua (Williard, 1981). La neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) depleta efectivamente la serotonina del sistema nervioso de la sanguijuela (Glover & Kramer, 1982; Lent, 1984). El tratamiento con 5,7-DHT suprime los episodios de nado en animales intactos así como impide la evocación de nado ficticio en el sistema nervioso central aislado (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989; O'Gara *et al.*, 1991). El mecanismo por el cuál se facilita la evocación del nado y por el cuál aumenta la aparición de episodios de nado espontáneos es por la acción de la serotonina sobre la célula 204, interneurona implicada en la iniciación de la natación (Angstadt & Friesen, 1993b; Angstadt & Friesen, 1993a). La serotonina también afecta las propiedades intrínsecas de motoneuronas implicadas en el circuito generador del nado así como la interacción entre las mismas (Mangan *et al.*, 1994a; Mangan *et al.*, 1994b).

La serotonina también controla varios aspectos de la alimentación de la sanguijuela (Lent & Dickinson, 1984b). La serotonina aumenta la frecuencia de

mordidas en sanguijuelas hambrientas y es capaz de evocar este comportamiento en sanguijuelas saciadas (Williard, 1981; Lent & Dickinson, 1984b). También se observa un aumento en los movimientos peristálticos de la faringe y la secreción de saliva en presencia de serotonina exógena o por estimulación de las neuronas Rz (Lent & Dickinson, 1984b). Lesiones farmacológicas de las neuronas serotoninérgicas con la neurotoxina 5,7-DHT producen una disminución en la frecuencia de mordidas similar a la observada en las sanguijuelas saciadas (Lent & Dickinson, 1984b; O'Gara *et al.*, 1991). Luego de la ingestión de sangre se produce la distensión de la pared corporal del animal. Este estímulo, que es responsable de la terminación de la ingestión y la supresión del comportamiento de mordida, también reduce los niveles de serotonina en el sistema nervioso central al inhibir a las neuronas serotoninérgicas Rz (Lent & Dickinson, 1987; Groome *et al.*, 1993). El contenido ganglionar de serotonina disminuye luego de la ingestión (Lent *et al.*, 1991).

Tanto la ingestión, la depleción por neurotoxina o la distensión artificial de la pared corporal, producen alteraciones similares en el estado comportamental de la sanguijuela, lo que sugiere la existencia de un correlato neuronal en común. Las neuronas serotoninérgicas Retzius parecen cumplir un rol importante en la regulación del estado comportamental de la sanguijuela. Estas neuronas reciben información sensorial que afecta tanto a la natación como al comportamiento de mordida (Brodfuehrer & Friesen, 1986; Lent & Dickinson, 1987; Groome *et al.*, 1993; Lent & Dickinson, 1987; Groome *et al.*, 1993). Datos histoquímicos y obtenidos por HPLC indican que las neuronas Retzius sufren una depleción de serotonina luego de la ingestión o por tratamiento con la toxina 5,7-DHT, mucho más severa que las otras neuronas serotoninérgicas 21 y 61 (Lent & Dickinson, 1984a; Lent *et al.*, 1991; Ehrlich *et al.*, 1992). Además se ha demostrado que la distensión de la pared corporal inhibe la actividad de las neuronas Retzius (Lent & Dickinson, 1987), lo que puede llevar a los cambios comportamentales relacionados con la saciedad (Groome *et al.*, 1993).

A nivel del sistema nervioso central, la aplicación de serotonina exógena aumenta tanto la frecuencia de disparo como la duración de los potenciales de acción de las motoneuronas involucradas en la respuesta de acortamiento longitudinal (Wittenberg & Kristan, 1992a).

Por último, la serotonina tiene efectos periféricos sobre diferentes músculos de la pared corporal y de la faringe. La serotonina exógena, así como la estimulación eléctrica de las neuronas RZ reduce la tensión de los músculos longitudinales y acelera su relajación, favoreciendo de esta manera los eventos que

llevan a las ondulaciones de la pared corporal durante el nado (Mason *et al.*, 1979; Williard, 1981; Mason & Kristan, 1982). La estimulación de la inervación serotoninérgica de la faringe (neuronas LL del ganglio subesofágico 1) (Lent & Dickinson, 1984b) o la aplicación de serotonina exógena produce cuatro respuestas diferentes en los músculos de la faringe, separables farmacológicamente: un incremento en el tono basal, fuertes contracciones fásicas lentas, pequeñas contracciones fásicas rápidas y relajación luego del lavado (O'Gara *et al.*, 1999).

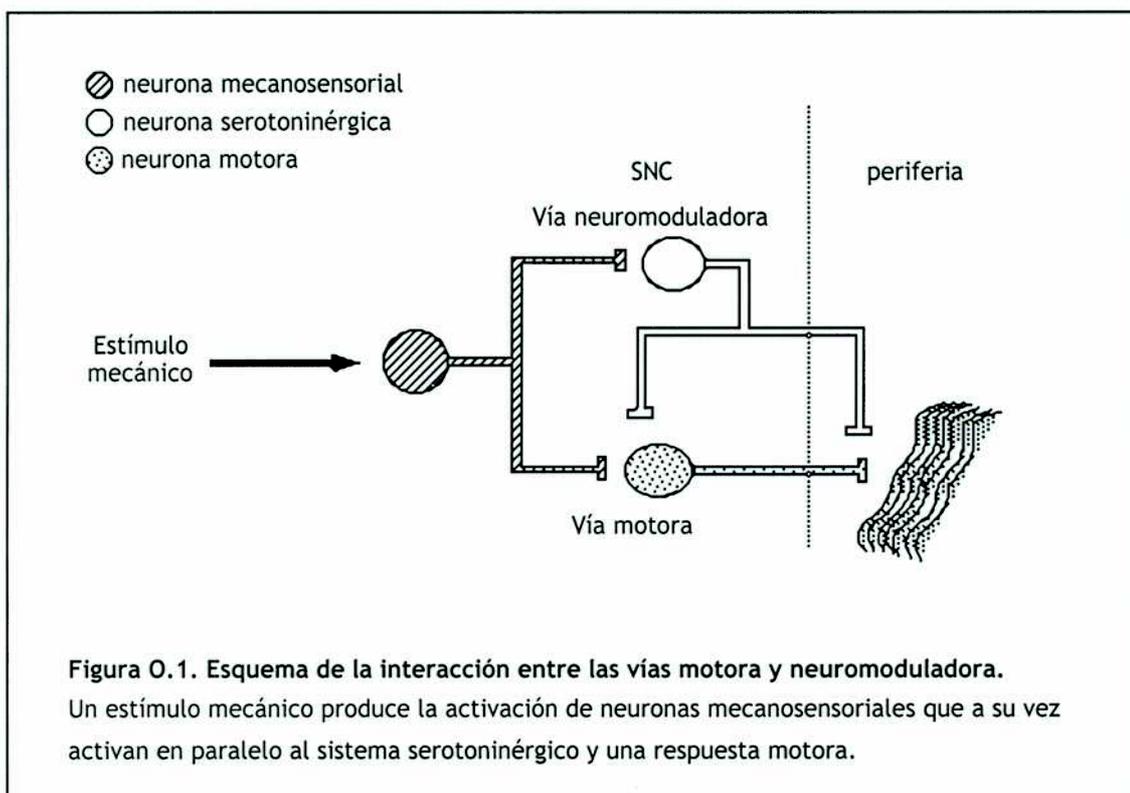
Hasta el momento han sido descritas varias conductancias activadas por serotonina, en sanguijuelas. En células P en cultivo se observaron dos respuestas una despolarizante y otra hiperpolarizante ante la aplicación de 5-HT. La hiperpolarización está mediada por una corriente de Cl⁻ y la despolarización activa una corriente de cationes monovalentes. Cuando se establece el contacto sináptico por el co-cultivo de neuronas Retzius la respuesta despolarizante se pierde casi por completo y la respuesta sináptica de las neuronas P a la estimulación de Rz es sólo inhibitoria (Drapeau & Sanchez-Armass, 1988). Un receptor de serotonina con una farmacología distinta a la de los mamíferos activa una corriente de Cl⁻ vía AMPc y la proteína kinasa A, mientras que la conductancia catiónica está mediada por un receptor tipo 5-HT₂, por medio de la proteína kinasa C (Sanchez-Armass *et al.*, 1991). También se observó que la 5-HT modula dos diferentes corrientes de K⁺ en las neurona Rz, que tendrían un rol importante en la autorregulación de la liberación de este neurotransmisor (Acosta-Urquidi *et al.*, 1989). A nivel de las células sensoriales T, la serotonina inhibe a la bomba Na⁺/K⁺, responsable de la hiperpolarización luego del potencial de acción (Catarsi & Brunelli, 1991).

Las neuronas serotoninérgicas Retzius que constituyen la fuente principal de serotonina del sistema nervioso central de las sanguijuelas (McAdoo & Coggeshall, 1976), son activadas a lo largo de todo el sistema nervioso de la sanguijuela por estimulación de las neuronas mecanosensoriales P (Wittenberg *et al.*, 1990; Szczupak & Kristan, 1995). Como se mencionó anteriormente, la estimulación de estas neuronas mecanosensoriales produce varias respuestas motoras como la natación, el acortamiento y la desviación lateral. Por lo tanto, un mismo estímulo mecanosensorial activa en paralelo, una vía neuromoduladora serotoninérgica y otra motora. La respuesta motora resultante, dependerá de la interacción de esta dos vías. Si bien se han estudiado los efectos de la serotonina neuronas individuales componentes de circuitos generadores de patrones de movimiento y sus interacciones, no se conocen los efectos de este neurotransmisor sobre sinápsis sensorio-motoras. El objetivo de este trabajo de tesis es estudiar la interacción de

Objetivos del trabajo de tesis

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo el estudio de la modulación serotoninérgica de un circuito sensorio-motor en el sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. Como se mencionó anteriormente la serotonina es un importante neuromodulador en este animal y las neuronas serotoninérgicas Retzius constituyen su fuente principal de liberación (McAdoo & Coggeshall, 1976). La estimulación mecánica de la piel del animal produce, entre otras, la activación de las células mecanosensoriales P. Dicha activación es suficiente para evocar diversas respuestas motoras (Kristan *et al.*, 1982) y de activar a su vez, en paralelo, a las neuronas Retzius a lo largo de la cadena ganglionar que compone el sistema nervioso central (Szczupak & Kristan, 1995).

Estas observaciones llevaron a la construcción de una hipótesis de trabajo basada en la activación paralela de las vías neuromoduladora y motora (figura O.1). Según esta hipótesis existe una interacción entre estas dos vías, de la que resultará una respuesta motora adecuada.



El objetivo de la primera parte del trabajo fue caracterizar un circuito sensorio-motor. Se estudiaron las interacciones sinápticas entre las células mecanosensoriales sensibles a presión P y las motoneuronas que inervan a los músculos responsables de la erección de los anillos en que se divide la pared

corporal del animal, las motoneuronas *Annulus erectus* (AE).

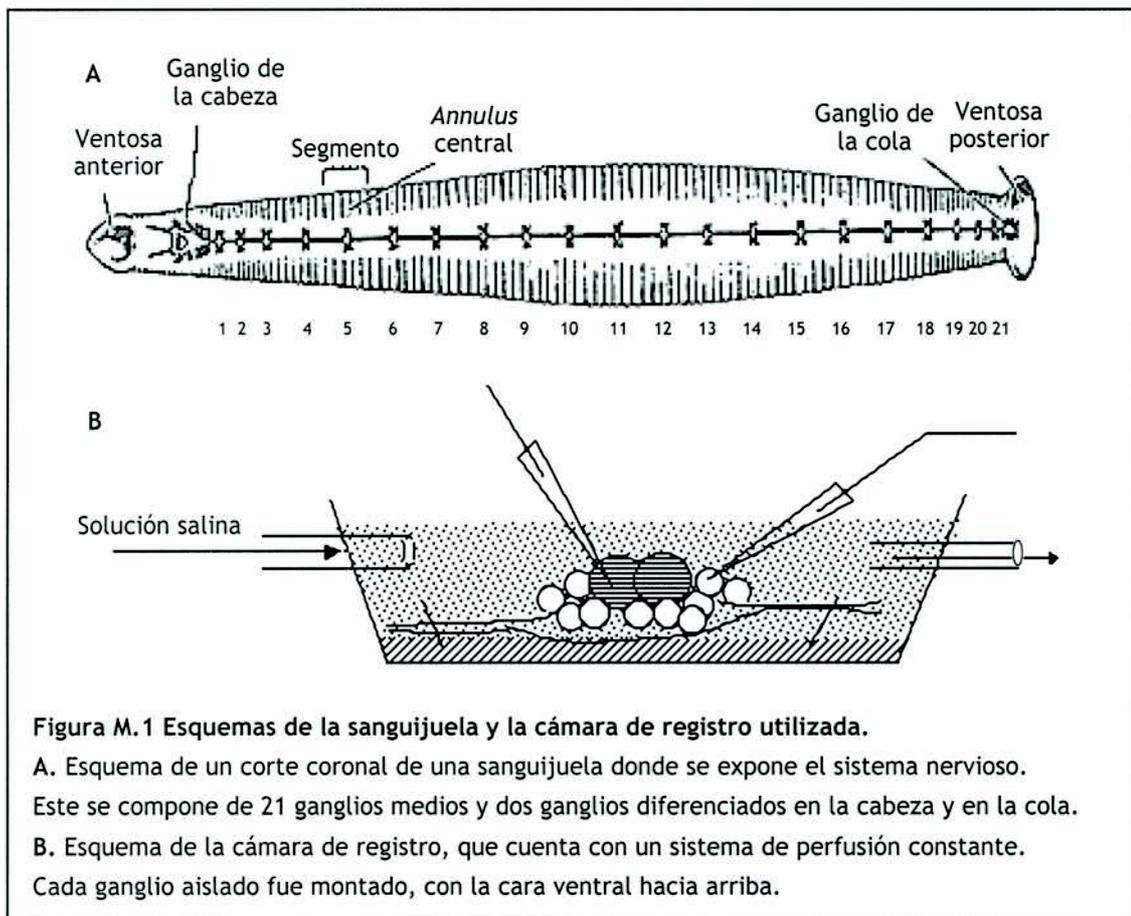
En la segunda parte se evaluó el rol de la serotonina como modulador. Primero se estudiaron los efectos de la serotonina exógena y luego se estimó el rol de la serotonina endógena mediante el uso de antagonistas de receptores serotoninérgicos.

Materiales y métodos

Preparación biológica

En los experimentos realizados para este trabajo de tesis se utilizaron sanguijuelas de la especie *Hirudo medicinalis*, de un peso entre 2 y 5 gramos. Las mismas fueron compradas a la compañía Leeches USA (Westbury, NY, USA) y mantenidas en solución marina artificial (dilución 1:1000) a 15 °C, en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales permanecieron sin alimentar durante, por lo menos, un mes antes de la disección.

El sistema nervioso de la sanguijuela fue disecado, extrayéndose la cadena de ganglios medios correspondientes a los segmentos 7 a 18 (figura M.1 A). Cada ganglio aislado se montó, con la cara ventral hacia arriba, en una cámara cuya base estaba cubierta de un polímero transparente (Sylgard, Dow Corning) (figura M.1 B). Para ciertos experimentos se quitó el epitelio glial que recubre los ganglios. La preparación fue mantenida bajo perfusión constante con solución salina.



Las distintas neuronas estudiadas fueron reconocidas por la ubicación del soma en el ganglio (figuras M2 y M3) y por sus características electrofisiológicas, por ejemplo: forma y amplitud del potencial de acción, potencial de la membrana en reposo, presencia de potenciales post sinápticos excitatorios (PEPS) o inhibitorios (PIPS).

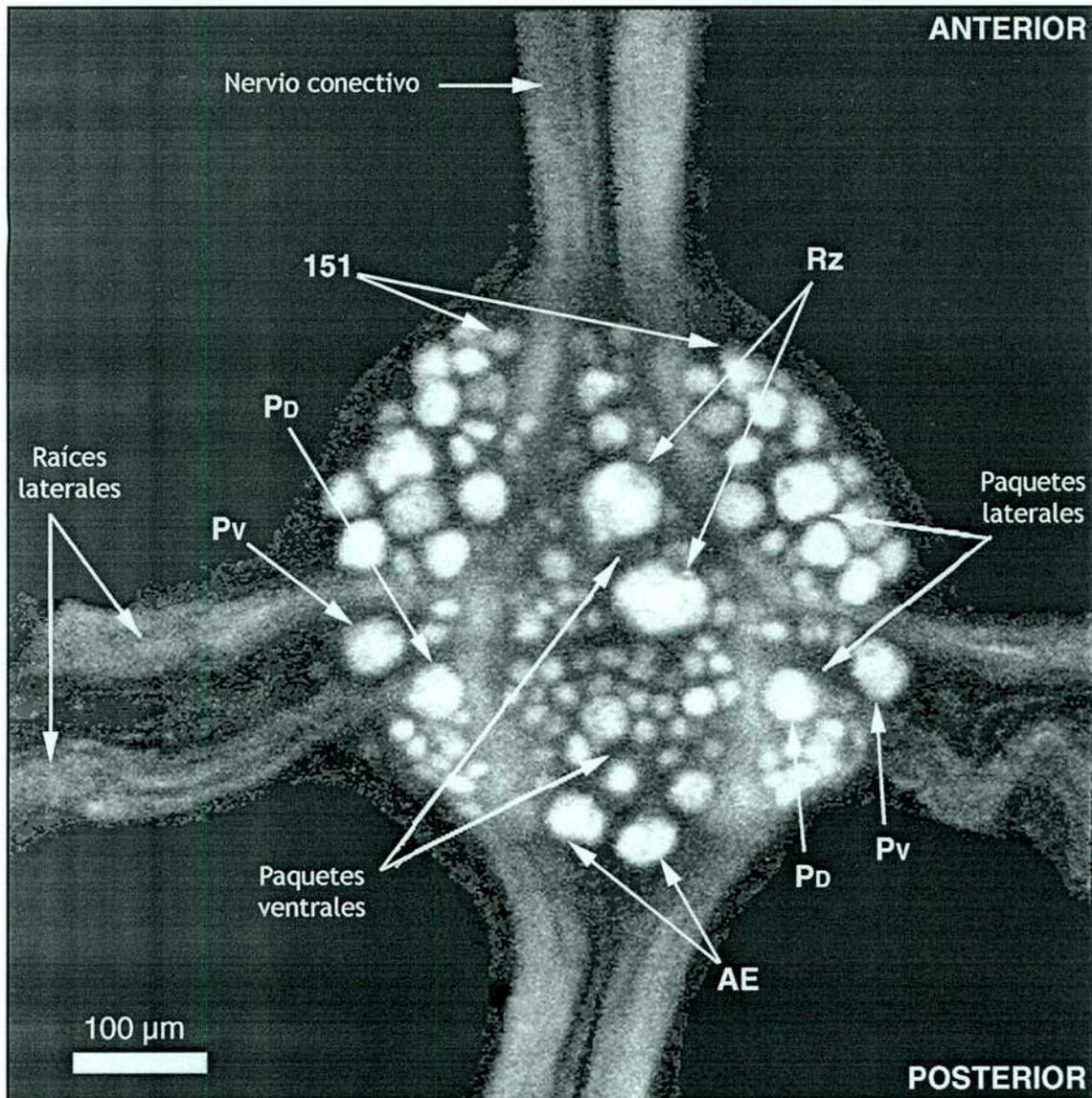
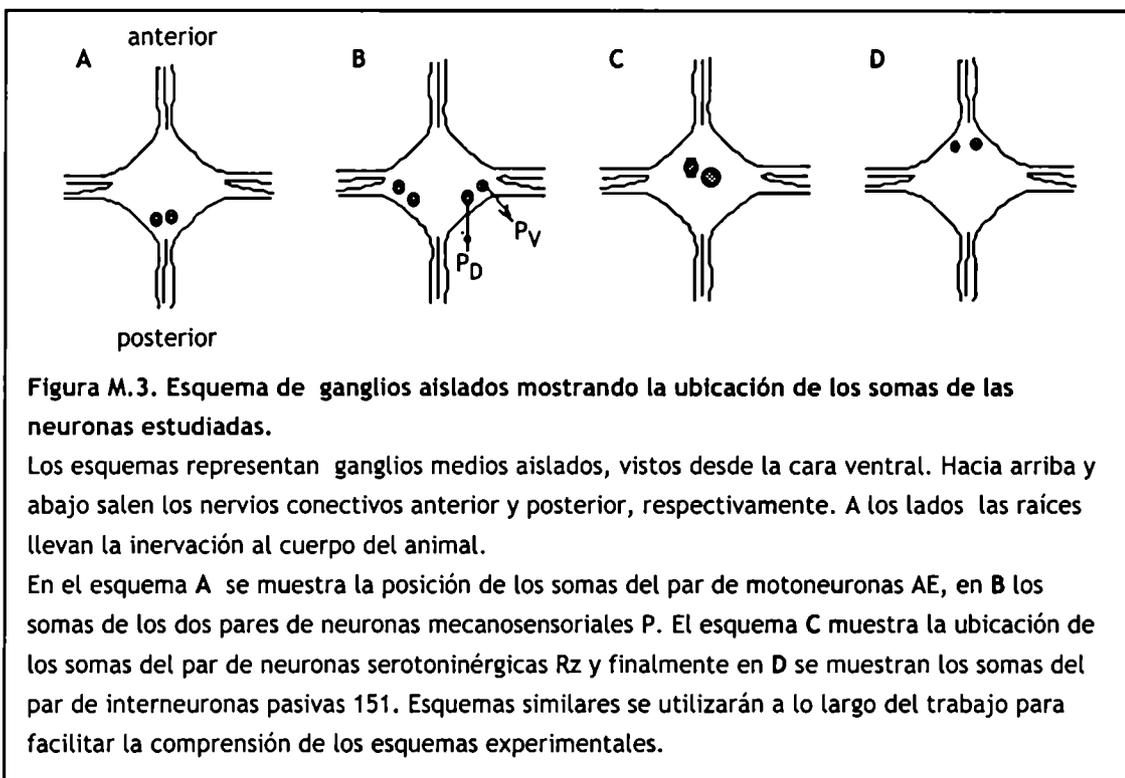


Figura M.2. Foto de un ganglio aislado de sanguijuela, visto de la cara ventral. En la foto se pueden apreciar los cuerpos neuronales, separados en 6 paquetes por tejido conectivo. Se señalan los dos paquetes centrales, el anterior y posterior y los paquetes laterales anterior y posterior derechos. Se ven claramente las raíces laterales, que llevan la inervación al cuerpo y los nervios conectivos que unen a los ganglios entre sí. Se señalan también los somas de las motoneuronas AE, las neuronas serotoninérgicas Rz, las neuronas mecanosensoriales P que inervan los cuadrantes dorsales (Pd) y los ventrales (Pv) y los de las interneuronas pasivas 151.

Las motoneuronas *annulus erectus* (AE) son un par de neuronas cuyos somas se encuentran en el extremo posterior del paquete central posterior, en la cara ventral del ganglio (figuras M 2 y M 3 A). Su potencial de reposo es alrededor de -35 mV y dispara espontáneamente potenciales de acción cuya proyección en el soma es aproximadamente de 2 mV de amplitud.

Los somas de las neuronas mecanosensoriales P se encuentran en los paquetes laterales posteriores (figura M 2). Existen 2 pares de neuronas P, las medias y las laterales, según la posición de su soma en el ganglio respecto del eje antero-posterior. Estas inervan los cuadrantes dorsales y ventrales, respectivamente y a la largo del trabajo las llamaremos dorsales (PD) o ventrales (PV) (figura M 3 B). Su potencial de reposo es de aproximadamente -40 mV y se las reconoce porque disparan un potencial de acción en la fase de repolarización luego de la inyección de un pulso de corriente hiperpolarizante de aproximadamente -4 nA y 300 ms de duración.

Los somas de las neuronas serotoninérgicas Rz se encuentran en posición central dentro del ganglio (figuras M 2 y M 3 D) y son de un tamaño aproximado de 60 μm . Su potencial de reposo es de aproximadamente -40 mV, y disparan espontáneamente potenciales de acción a una frecuencia aproximada de 3 Hz. La proyección de sus potenciales de acción en el soma es alrededor de 15 mV de amplitud.



Los somas de las neuronas 151 están ubicados en el extremo anterior de los paquetes laterales anteriores (figuras M 2 y M 3 D). Son de tipo pasivo, es decir, no disparan potenciales de acción bajo ningún tipo de estimulación, pero exhiben potenciales postsinápticos inhibitorios de entre 5-10 mV de amplitud y 50 ms de duración. La inyección de un pulso de corriente prolongado de -10 nA en el soma de 151 produce una inhibición en el disparo espontáneo de potenciales de acción de las motoneuronas AE (Wadepuhl, 1989; Iscla *et al.*, 1999)

Soluciones y Drogas

A continuación se detallan la composición y concentraciones, expresadas en mM, de las distintas soluciones utilizadas. El pH de todas las soluciones fue de 7,4.

Soluciones \ Sales	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄	Tris base
Normal	115	4	1.8	1	5.4
10 Mg ⁺⁺ /10 Ca ⁺⁺	92.6	4	10	10	5.4
20 ⁺⁺ Mg/1 Ca ⁺⁺	96.1	4	1	20	5.4

La solución de alto contenido de Mg⁺⁺ fue utilizada para bloquear la transmisión química (Baylor & Nicholls, 1969) y la solución de alta concentración de cationes divalentes para bloquear interacciones polisinápticas (Jansen *et al.*, 1974). La osmolaridad de estas soluciones se mantuvo constante reduciendo la concentración de NaCl.

Las drogas serotonina (5-HT) (5-hidroxitriptamina, sal de cloruro) y estircina (sal de cloruro) fueron compradas a la compañía Sigma Co. (St Louis, MO, USA). Los antagonistas de receptores de serotonina mianserina (sal de cloruro), metiotepina (mesilato), ketanserina (tartrato), metisergide (maleato). Todas las drogas fueron disueltas en agua, alícuotadas y almacenadas a -20°C. Las drogas se llevaron a su concentración final en solución normal salina y fueron aplicadas a través del sistema de perfusión. En los experimentos en los que se utilizó el sistema de eyección de drogas por pulsos de presión se llenaron las pipetas con las soluciones de las drogas en las concentraciones indicadas en cada caso.

Eyección de drogas por pulsos de presión.

Estos experimentos fueron realizados en ganglios aislados a los que se les quitó previamente el epitelio glial que los recubre, quedando los cuerpos neuronales expuestos.

Los pulsos de drogas se aplicaron a través de una micropipeta (figura M4). Las micropipetas se fabricaron con capilares de borosilicato (FHC, Brunswick, ME, USA), por medio de un estirador de vidrio vertical (DKI, Modelo 700c, Tujunga, CA, USA) y se llenaron con soluciones de las drogas en las concentraciones indicadas en cada caso. Las puntas de la micropipetas se colocaron cerca del soma de la neurona y su parte posterior fue conectada a un generador de pulsos de presión (Picospritzer II, Parker Instruments, Fairfield, NJ, USA). Las aplicaciones de pulsos fueron comandadas por el programa de adquisición y durante los registros la preparación se mantuvo bajo perfusión constante.



Pipeta de eyección de pulsos de drogas por presión.

Figura M.4. Esquema de la pipeta de eyección de pulsos de drogas por presión. Será utilizada a lo largo del trabajo para facilitar la comprensión de los esquemas experimentales.

Las puntas de las micropipetas se calibraron con el fin de lograr un tamaño de punta uniforme. Este debía ser suficientemente pequeño para disminuir al máximo el fenómeno de difusión de la droga desde la pipeta al baño y a su vez permitir la salida de solución ante un pulso de presión media. Inicialmente la calibración se realizó en dos pasos: primero se tomaron pipetas con diferentes diámetros de punta y se midió la presión necesaria para provocar la salida de burbujas de aire de las puntas sumergidas en alcohol. En base a esto se las clasificó en una escala. Luego se las llenó con una solución 200 mM KCl (que produce la despolarización de las neuronas), se aplicaron pulsos de presión sobre somas y se eligieron aquellas que produjeran la mínima variación en el potencial de membrana de la neurona al acercarlas al soma y que permitieran, a su vez, la salida de solución ante un pulso de presión media. En lo sucesivo se utilizaron pipetas que estuvieran en el rango de la escala de burbujas de las pipetas elegidas.

Registros electrofisiológicos

Los registros de neuronas individuales se realizaron utilizando electrodos intracelulares conectados a un amplificador diferencial (Axoclamp 2B, Axon

Instruments, Foster City, CA, USA) operando en la configuración de fijación de corriente continua o discontinua (DCC).

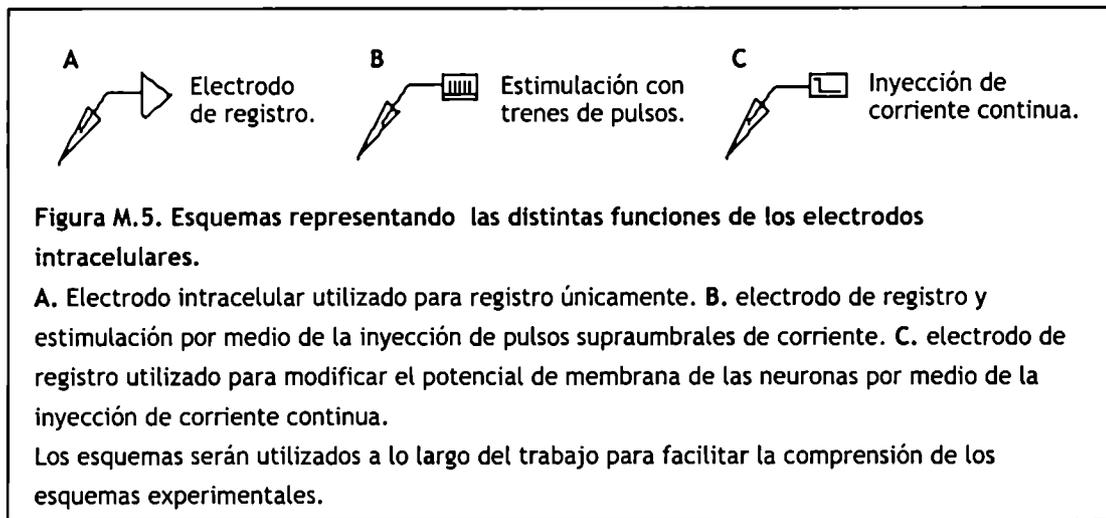
Los microelectrodos se fabricaron con capilares de borosilicato (FHC, Brunswick, ME, USA), por medio de un estirador de vidrio horizontal (Modelo P-97, Sutter Instruments Co., Novato, CA., USA). Se utilizaron microelectrodos con resistencias entre 20-60 M Ω , que se llenaron con una solución de acetato de potasio 3 M.

El electrodo de registro se utilizó también para la inyección de corriente. En los casos en que se operó en la configuración de fijación de corriente continua, se compensó la caída de voltaje a través del electrodo mediante un "bridge balance". En los experimentos en los que se midió la resistencia de entrada se trabajó en la configuración de fijación discontinua de corriente (DCC), ya que permite independizarse de la compensación de la caída de voltaje a través del electrodo.

Los registros fueron digitalizados por un conversor analógico-digital (Digidata 1200 Series Interfase, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) y fueron adquiridos a frecuencias entre 250-5000 Hz mediante el programa de Axoclamp 6 con protocolos Clampex (Axon Instruments).

Manipulaciones experimentales

La actividad eléctrica de las neuronas fue manipulada mediante la inyección intracelular de corriente a través del electrodo de registro. Se utilizaron dos protocolos básicos: la inyección de pulsos supraumbrales de corriente (2-4 nA, 5 ms), para la estimulación de las neuronas sensoriales P y la inyección intracelular de corriente continua, para modificar el potencial de membrana de las células. En la figura M 5 A-C se muestran esquemas indicando las distintas funciones de los microelectrodos de registro, que serán utilizados a lo largo del trabajo para facilitar la comprensión de los esquemas experimentales.



Análisis de los resultados

Los registros fueron analizados con el programa comercial Axograph 6.0 (Axon Instruments). Los datos fueron analizados con el programa comercial Kaleidagraph (Abelbeck Software) y para el análisis estadístico se utilizó el programa Statview (SAS Institute Inc.).

Los resultados se expresaron como valores de media \pm error estándar de la media (S.E.M.). La significancia estadística de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se determinó usando el test de *t* para muestras pareadas o no pareadas, según el caso.

Parte I: Caracterización de la interacción sináptica entre la neurona mecanosensorial P y la motoneurona AE.

El objetivo de esta primera parte del trabajo fue caracterizar una vía sensorio-motora para luego investigar la acción de la serotonina sobre diferentes aspectos del funcionamiento de la misma.

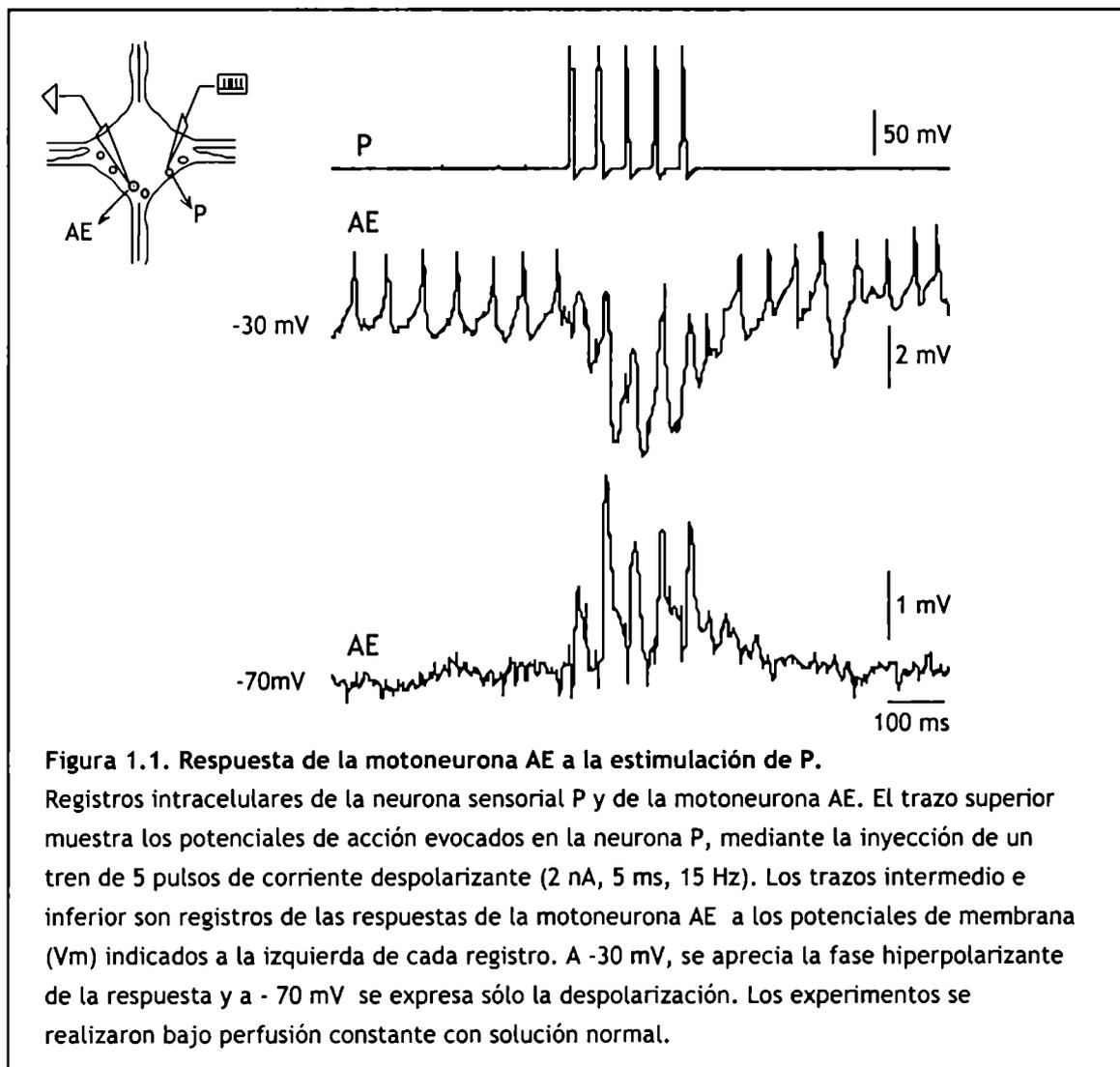
En la sanguijuela la activación de las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (P) es capaz de evocar una serie de comportamientos motores como ser el acortamiento (Wittenberg & Kristan, 1992a; Shaw & Kristan, 1995), la desviación lateral (Kristan, 1982) y el nado (Debski & Friesen, 1987). Por lo tanto la elección de la neurona P como activador sensorial de una vía sensorio-motora tiene un claro valor conductual. Los somas de dichas neuronas mecanosensoriales se encuentran en la cara ventral del ganglio, mientras que los somas de la mayoría de las motoneuronas están del lado dorsal. Esta disposición constituye una dificultad experimental para el estudio de sinápsis sensorio-motoras. Una excepción a esta disposición es la motoneurona *annulus erector* (AE), cuyo cuerpo neuronal se encuentra en la misma cara del ganglio donde se encuentran los somas de las neuronas mecanosensoriales. Estas neuronas inervan los músculos responsables de la erección de los anillos, dándole a la piel un aspecto indentado (Stuart, 1970). Por lo tanto, la actividad electrofisiológica de la neurona AE puede ser correlacionada de manera directa con la actividad muscular que ésta produce en preparaciones semi-intactas.

En base a estas consideraciones elegimos investigar la interacción entre la neurona mecanosensorial P y la motoneurona AE como modelo de sinápsis sensorio-motora, pues nos permite, mediante un abordaje experimental adecuado a las técnicas utilizadas en el laboratorio, un análisis detallado de sus características fisiológicas.

La caracterización de esta interacción se presentará en los primeros cuatro capítulos de este trabajo de tesis. En el capítulo 1 investigamos los tipos de sinápsis involucradas en la transmisión de señales entre la neurona sensorial y la motora. En el capítulo 2 estudiamos la manera en que la neurona motora integra las señales sensoriales. Un análisis más detallado de las conductancias sinápticas involucradas y de las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE, se muestra en el capítulo 3. Finalmente, en el capítulo 4, se estudia la regulación de esta interacción por la interneurona pasiva 151.

Capítulo 1: Conectividad sináptica entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE.

La interacción sináptica entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE fue estudiada en ganglios medios aislados por medio de registros intracelulares simultáneos de ambas neuronas. Cuando es registrada a su potencial de reposo (alrededor de -35 mV), la motoneurona AE dispara potenciales de acción de manera espontánea. Un tren de 5 potenciales de acción evocados en P produjo una respuesta compleja en la motoneurona AE (figura 1.1), que consistió en una serie de potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios alternados. Al registrarse la respuesta de la motoneurona AE a un potencial de membrana cercano al de reposo, se observó una respuesta principalmente inhibitoria en la que los picos de la despolarización quedaban enmascarados. En cambio, en registros tomados a un potencial de membrana hiperpolarizado (-70 mV), cercano al potencial de reversión

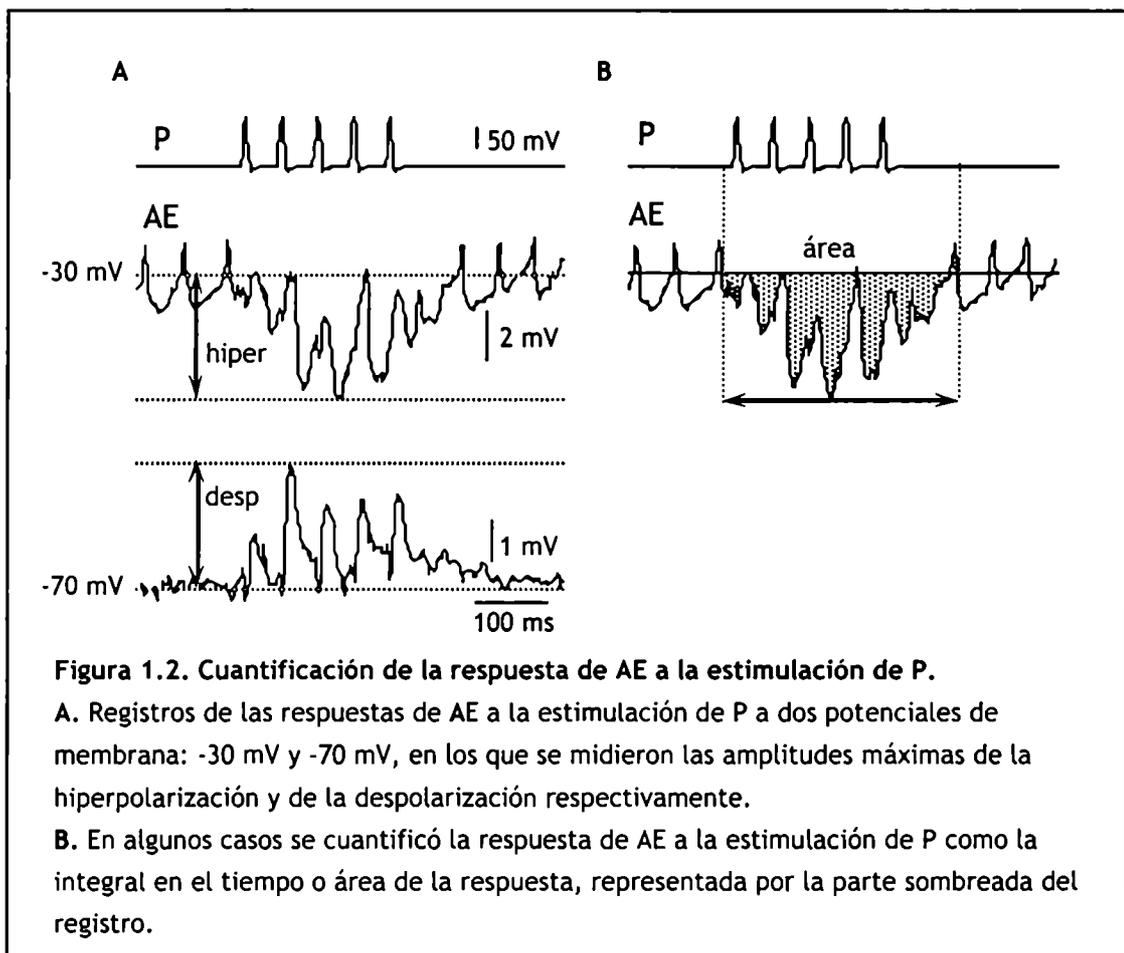


de la hiperpolarización (ver figura 3.1), fue posible observar a los potenciales postsinápticos excitatorios aislados (figura 1.1).

La latencia promedio de ambas fases, medida desde el pico del potencial de acción en P hasta el inicio de la respuesta en AE, fue de 2.3 ± 0.16 ms ($n= 14$) para la despolarización y de 15.4 ± 0.57 ms ($n=7$) para la hiperpolarización. También se cuantificó la duración media de cada una de las fases de la respuesta que fue de 33.9 ± 1.7 ms ($n=9$) y de 63.7 ± 2.74 ms ($n=10$) para la despolarización y la hiperpolarización respectivamente.

Cuantificación de la respuesta de AE a la estimulación de P

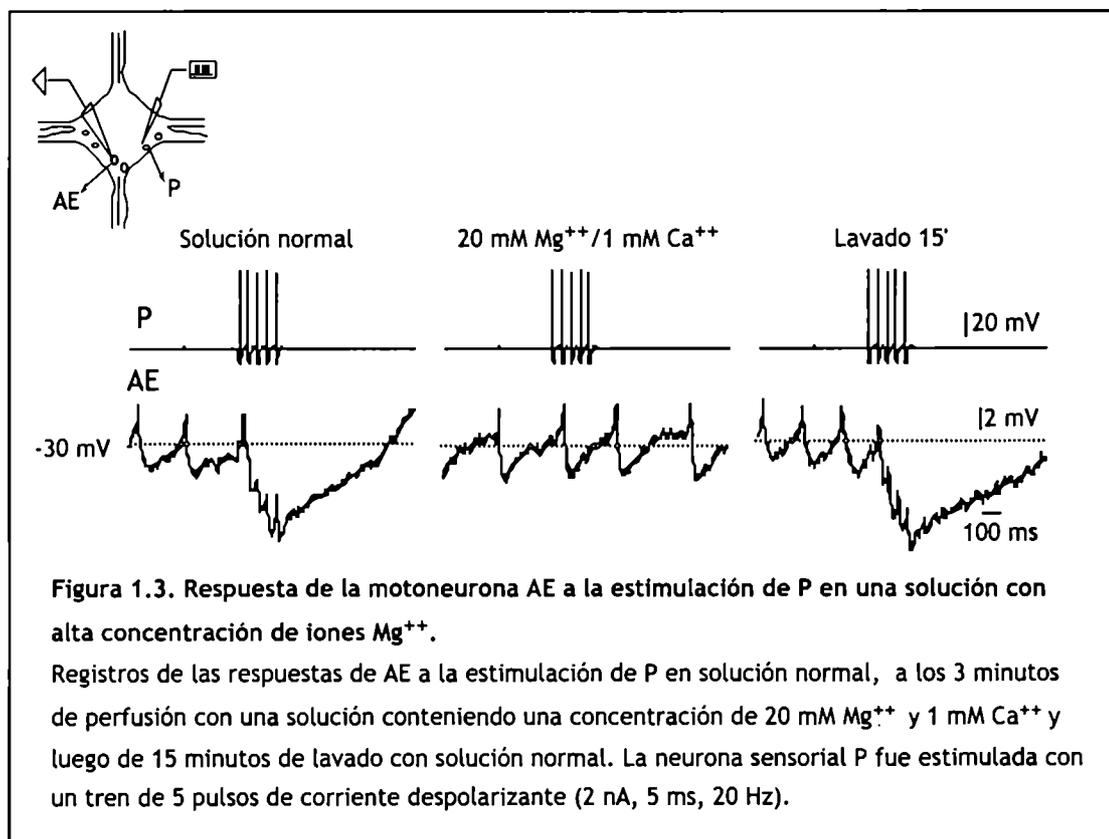
Las respuestas de la motoneurona AE a la estimulación de la neurona P se cuantificaron como la amplitud máxima de las respuestas hiperpolarizante y despolarizante y como la integral en el tiempo o área de las respuestas (figura 1.2 A-B). A lo largo de este trabajo las amplitudes de los potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios fueron medidas en registros tomados a distintos potenciales de membrana de la motoneurona AE. La amplitud de la fase hiperpolarizante se midió en registros tomados a -30 mV, y la amplitud de la fase despolarizante se midió en registros tomados a -70 mV (figura 1.2 A). Mientras que



la amplitud da cuenta de la intensidad máxima que alcanza la respuesta, esta medición no informa sobre su duración. Fue para evaluar este aspecto de las respuestas que se midió también la integral de la respuesta en el tiempo (área sombreada, figura 1.2 B).

Análisis de la interacción entre las neuronas P y AE.

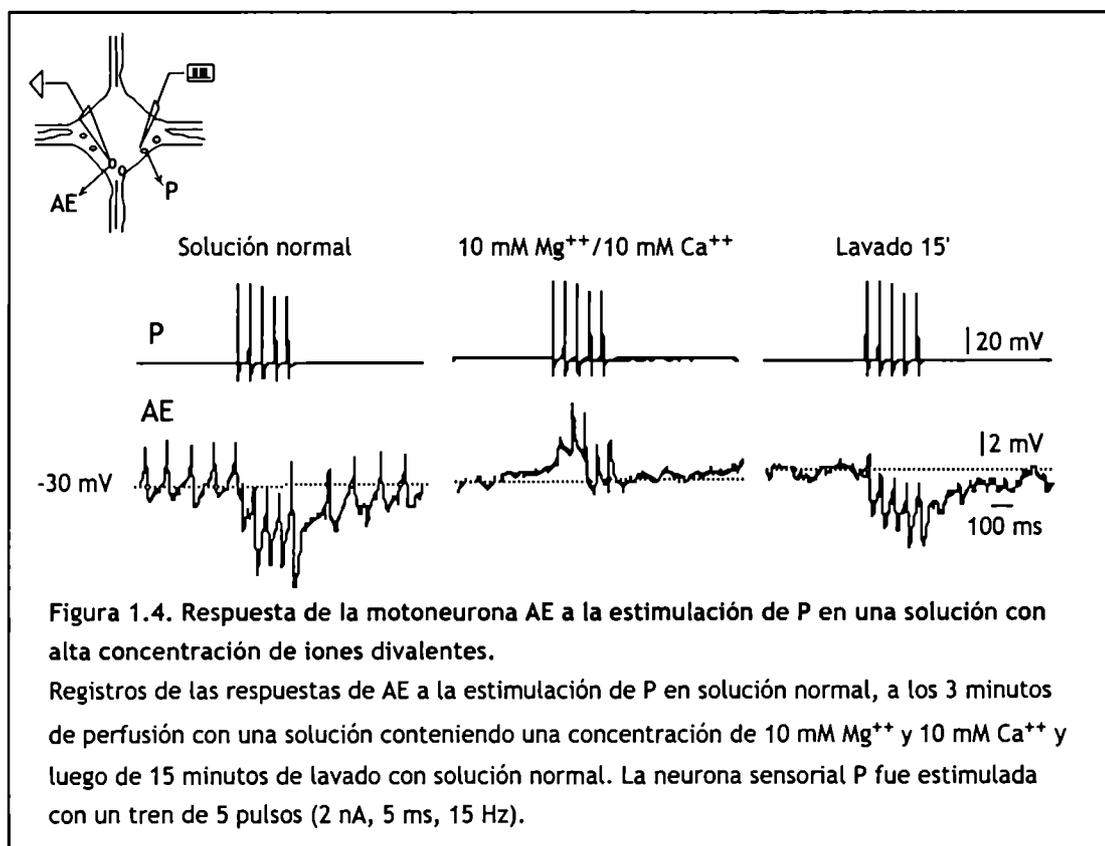
Con el fin de investigar qué tipos de sinápsis están involucradas en la interacción entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE, se realizaron una serie de experimentos en los que se modificó la concentración de cationes divalentes del medio externo. Para discriminar entre sinápsis químicas o eléctricas, se utilizó una solución con alta concentración de iones Mg^{++} y baja concentración de Ca^{++} (20:1 mM), que bloquea las interacciones químicas al interferir en la liberación de neurotransmisor (Baylor & Nicholls, 1969). En la figura 1.3 se muestran registros de un experimento en el que se observa el efecto de una solución con dicha relación entre las concentraciones de cationes divalentes sobre esta interacción. Ambas fases de la respuesta de la motoneurona AE a la estimulación de P, presentes en el control (figura 1.3, izquierda) fueron anuladas bajo estas condiciones. Este efecto resultó reversible ya que la respuesta se recuperó luego de 15 minutos de lavado con solución normal (figura 1.3, derecha). Resultados similares se obtuvieron en otros 5 experimentos, indicando que tanto la



despolarización como la hiperpolarización de las motoneuronas AE inducidas por la estimulación de P están mediadas por sinápsis químicas.

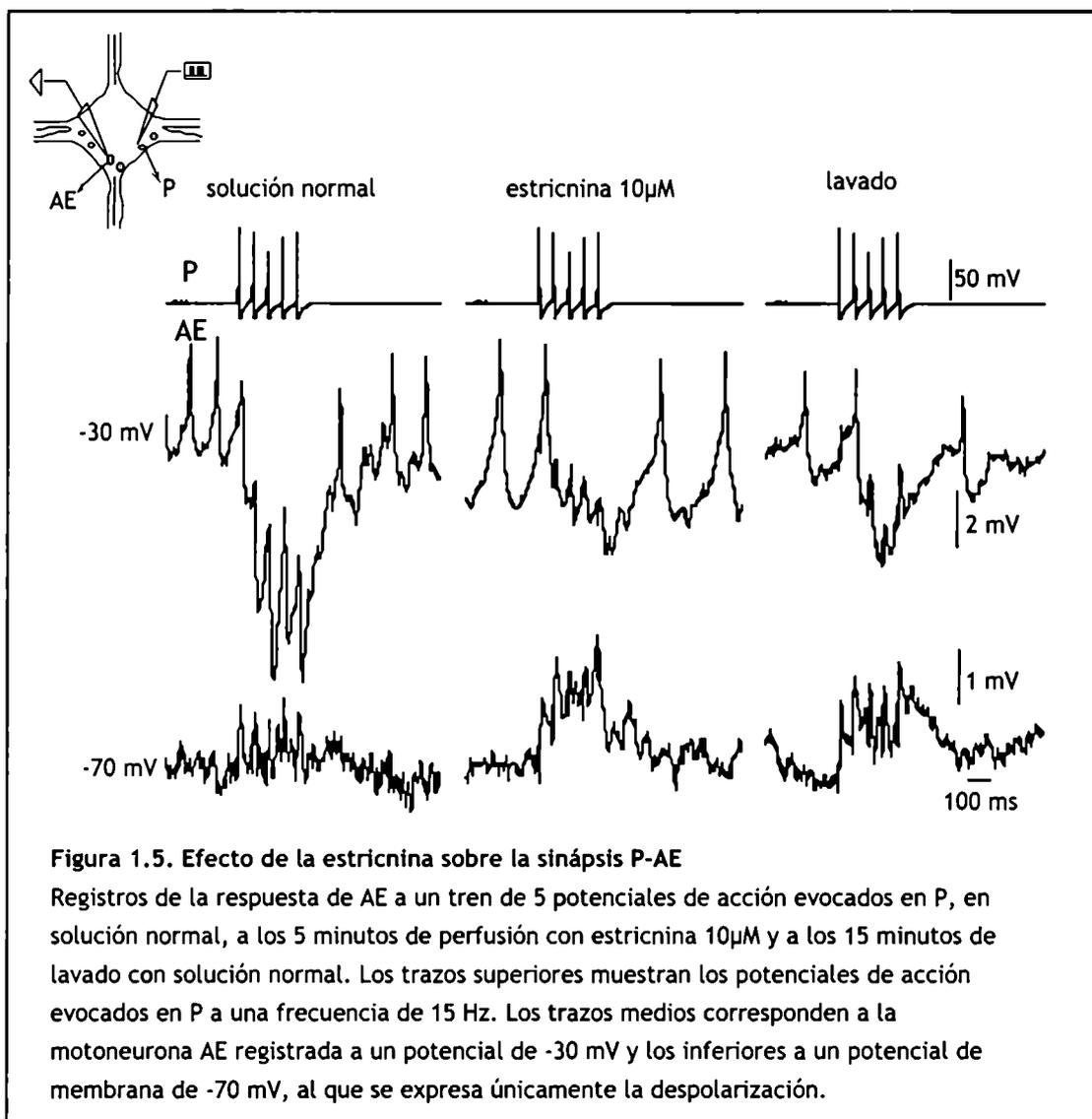
Con el fin de discernir si las respuestas de la motoneurona AE eran producidas por una acción directa de las neuronas P o estaban mediadas por interneuronas, se estudió esta interacción en presencia de una solución con concentraciones de 10 mM Mg^{++} y 10 mM Ca^{++} . En sanguijuelas, esta relación de cationes divalentes en la solución extracelular bloquea las interacciones polisinápticas dado que eleva el umbral de disparo de las neuronas (Jansen *et al.*, 1974). La neurona mecanosensorial P es estimulada con una intensidad de corriente suficiente para que dispare potenciales de acción bajo estas condiciones experimentales y, en consecuencia, se produzca la liberación de neurotransmisor. Así, si la conexión con la motoneurona AE fuera monosináptica, deberíamos registrar un potencial postsináptico en AE como respuesta a esta liberación. Por el contrario, en una vía polisináptica la(s) interneurona(s) no alcanzarán el umbral de disparo de potenciales de acción y por lo tanto no se observará ninguna respuesta en la motoneurona AE.

La perfusión con una solución 10 Mg^{++} /10 Ca^{++} tuvo efectos diferentes sobre cada una de las fases que componen la respuesta (figura 1.4). En estas condiciones la amplitud promedio de la fase hiperpolarizante fue inhibida al $10 \pm 8\%$ de la amplitud del control (n=12), y este efecto se revirtió luego de 15 minutos de lavado



con solución normal. Las despolarizaciones, en cambio, no se vieron afectadas por este tratamiento siendo la amplitud en altos divalentes del $110 \pm 3 \%$ del valor control ($n= 7$) (figura 1.4). Estos resultados indican que los potenciales postsinápticos despolarizantes observados en AE al estimular a P están mediados por una sinápsis directa, mientras que los hiperpolarizantes son transmitidos por una vía polisináptica.

Los potenciales postsinápticos inhibitorios desaparecen a un potencial de membrana de la motoneurona AE de aproximadamente -70 mV que, en sanguijuelas, es cercano al potencial de equilibrio para el ion Cl^- . Con el fin de separar farmacológicamente las dos fases de la respuesta de la motoneurona AE a los de potenciales de acción en P, se probaron antagonistas de receptores de neurotransmisores conocidos por activar canales de Cl^- . Para ello se utilizaron las drogas picrotoxina y estricnina, antagonistas de los receptores de el ácido gamma amino butírico (GABA) y la glicina, respectivamente.

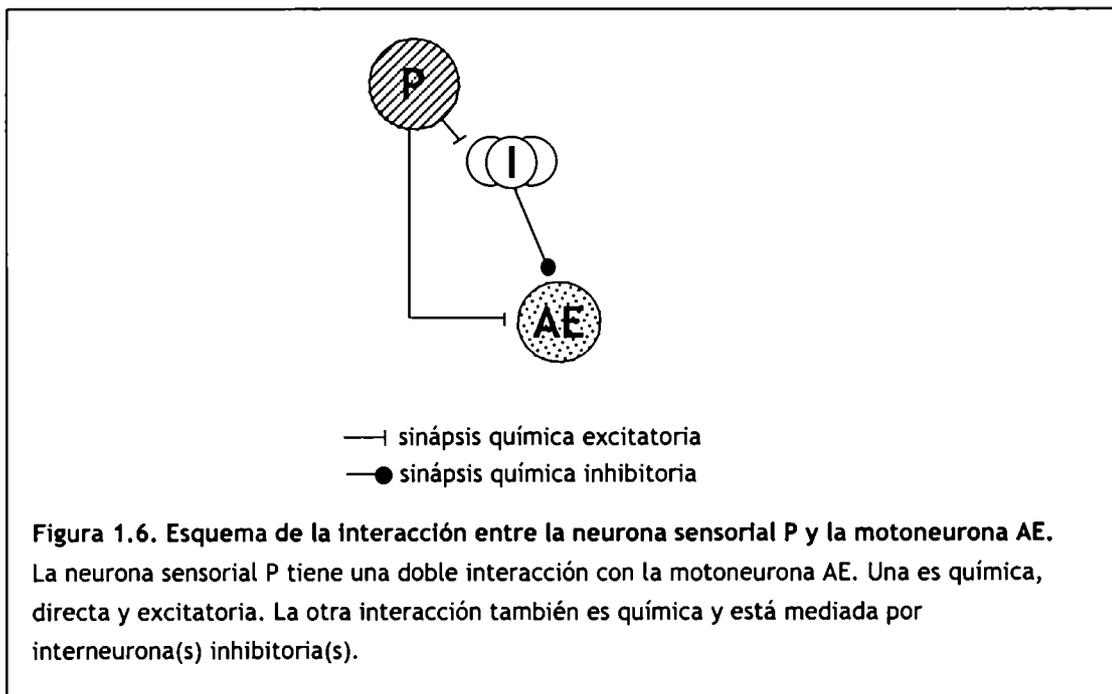


La presencia de picrotoxina 100 μM en la solución de perfusión no produjo ningún cambio en la respuesta de AE a la estimulación de P. La estricnina, en una concentración de 10 μM , inhibió la fase hiperpolarizante de la respuesta, pero no a la despolarizante (figura 1.5). En promedio la amplitud de los potenciales hiperpolarizantes disminuyó al 15 % del valor control y luego de 25 minutos de lavado con solución normal se recuperó al 53 % del valor control (n=5). La amplitud de los potenciales despolarizantes no varió en promedio con este tratamiento.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo nos muestran la existencia de una interacción compleja entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE. Esta interacción consta de dos componentes antagónicos, independientes entre sí, uno despolarizante y otro hiperpolarizante.

La figura 1.6 resume las conclusiones que pueden extraerse de los resultados obtenidos. Los potenciales postsinápticos excitatorios registrados en AE se deben a una interacción directa entre la neurona sensorial y la neurona motora. Los potenciales postsinápticos inhibitorios, en cambio, se produjeron por la activación de interneurona(s) con capacidad de disparar potenciales de acción. La inhibición selectiva ejercida por la estricnina sobre la fase inhibitoria, confirma la independencia de las respuestas inhibitorias y excitatorias inducidas por estimulación de P. En estudios recientes en nuestro laboratorio se demostró que, en la sanguijuela, la estricnina inhibe la respuesta de neuronas a la aplicación de



acetilcolina y serotonina (Lorena Rela y Mariano Rodríguez, reporte personal), por lo tanto el efecto de la estrocnina *per se* no nos permite conocer cuál es el neurotransmisor liberado por la(s) interneurona(s).

Los registros intracelulares simultáneos de las neuronas P y AE mostraron que al potencial de reposo de la motoneurona AE, la respuesta a la activación de P es principalmente inhibitoria. También observamos que las despolarizaciones no produjeron, a ningún potencial de membrana de AE, cambios en su frecuencia de disparo. Con el fin de conocer la expresión conductual de esta vía sensorio-motora, se realizaron experimentos preliminares en una preparación semi-intacta, que consiste en un ganglio conectado por los nervios laterales al trozo de la pared corporal que inerva. En esta preparación fue posible observar bajo lupa el estado de contracción de los ámulos, mientras se registraban intracelularmente a las neuronas. Confirmando los resultados obtenidos mediante registros intracelulares, se observó que partiendo de un estado de contracción de los ámulos, la estimulación intracelular de P produjo la relajación de los mismos, por lo que podría concluirse que estímulos mecanosensoriales capaces de activar a la neurona P, contribuyen a la relajación de los ámulos. Esta observación es coherente con la activación del nado en la sanguijuela que puede ser evocado por estimulación de las neuronas sensoriales P y sólo se produce luego de la relajación de los ámulos. Con respecto a la despolarización se desconoce aún el rol que pueda cumplir ya que los potenciales postsinápticos despolarizantes no afectaron, en ningún caso, la frecuencia de disparo de la motoneurona AE.

Capítulo 2: Integración de Señales por la motoneurona AE.

¿Cómo la motoneurona AE procesa información sobre la intensidad, duración y dirección del estímulo mecanosensorial?

Los estímulos mecánicos recibidos sobre la piel son traducidos a señales eléctricas (potenciales de acción) por las neuronas mecanosensoriales. Los potenciales de acción son señales todo o nada, y es por medio de estas señales que deben decodificarse ciertos parámetros del estímulo que son relevantes para el animal, como ser su intensidad, duración y dirección. La codificación de cada uno de estos parámetros del estímulo mecánico por las neuronas mecanosensoriales ha sido estudiada en preparaciones semi-intactas, en las que se aíslan ganglios medios junto a la pared corporal que inervan. Gracias a estos trabajos hoy sabemos que para las neuronas mecanosensoriales P la duración del estímulo es proporcional al número de potenciales de acción, siendo la frecuencia de disparo la que representa a la intensidad (Kristan *et al.*, 1982). La dirección del estímulo está dada por la identidad de las neuronas P activadas, las cuales inervan los distintos cuadrantes en que se divide la pared corporal (Nicholls & Baylor, 1968).

El objetivo de la serie de experimentos que se muestra a continuación es entender cómo la motoneurona AE responde ante estos diferentes parámetros del estímulo.

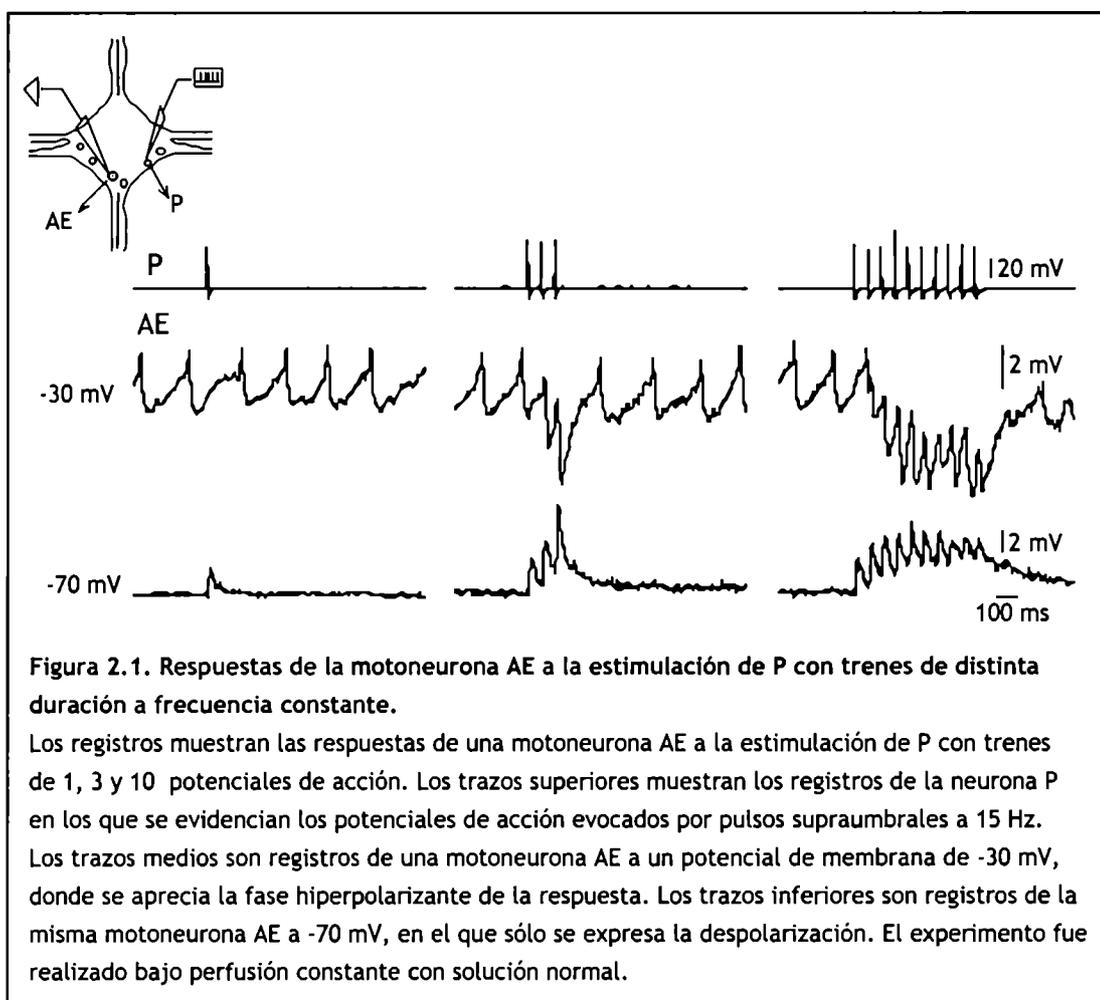
Expresión de las fases hiperpolarizante y despolarizante de la respuesta motora en función de la duración del tren de estímulos.

Con el fin de investigar cómo se expresa en la motoneurona AE la información sobre la duración del estímulo sensorial, se estudió la respuesta de la motoneurona a distinto número de potenciales de acción evocados en P, a una frecuencia constante. En ganglios aislados se analizó la respuesta de la motoneurona AE durante la estimulación de P con 1, 2, 3, 5 ó 10 pulsos a 15 Hz. Para analizar por separado el comportamiento de las fases despolarizante e hiperpolarizante de la respuesta, ésta se estudió a potenciales de membrana de AE de -70 y -30 mV, respectivamente.

Un único potencial de acción en P falló en evocar la respuesta hiperpolarizante en el 80 % de los casos (n=30), observándose siempre al segundo potencial de acción, mientras que la despolarización se expresó siempre al primer potencial evocado en P (figura 2.1). La amplitud de cada una de las fases aumentó con los primeros potenciales de acción a hasta alcanzar una amplitud máxima para

ambas fases, que se mantuvo durante el período del estímulo.

La respuesta de AE a la estimulación de P se cuantificó de dos maneras: midiendo las amplitudes máximas de la hiperpolarización y de la despolarización y calculando el área o integral en el tiempo de la respuesta a -30 mV. En la figura 2.2 se muestran los resultados de esta cuantificación. En la parte A, se graficaron las amplitudes máximas de ambas fases de la respuesta en función del número de potenciales de acción evocados en P. Para ambas fases la máxima amplitud se alcanzó al tercer potencial de acción en P y luego se mantuvo constante durante los sucesivos potenciales de acción. La amplitud de la hiperpolarización aumenta en forma logarítmica en función del número de potenciales evocados en P. La despolarización aumenta siguiendo la forma de un polinomio de tercer grado.



El gráfico 2.2.B muestra el área de la respuesta a -30 mV en función del número de potenciales de acción. Dado que la respuesta inhibitoria prevalece sobre la excitatoria este parámetro exhibe valores negativos, y a diferencia de lo que sucede con la amplitud, el área crece de manera lineal con la duración del estímulo sensorial.

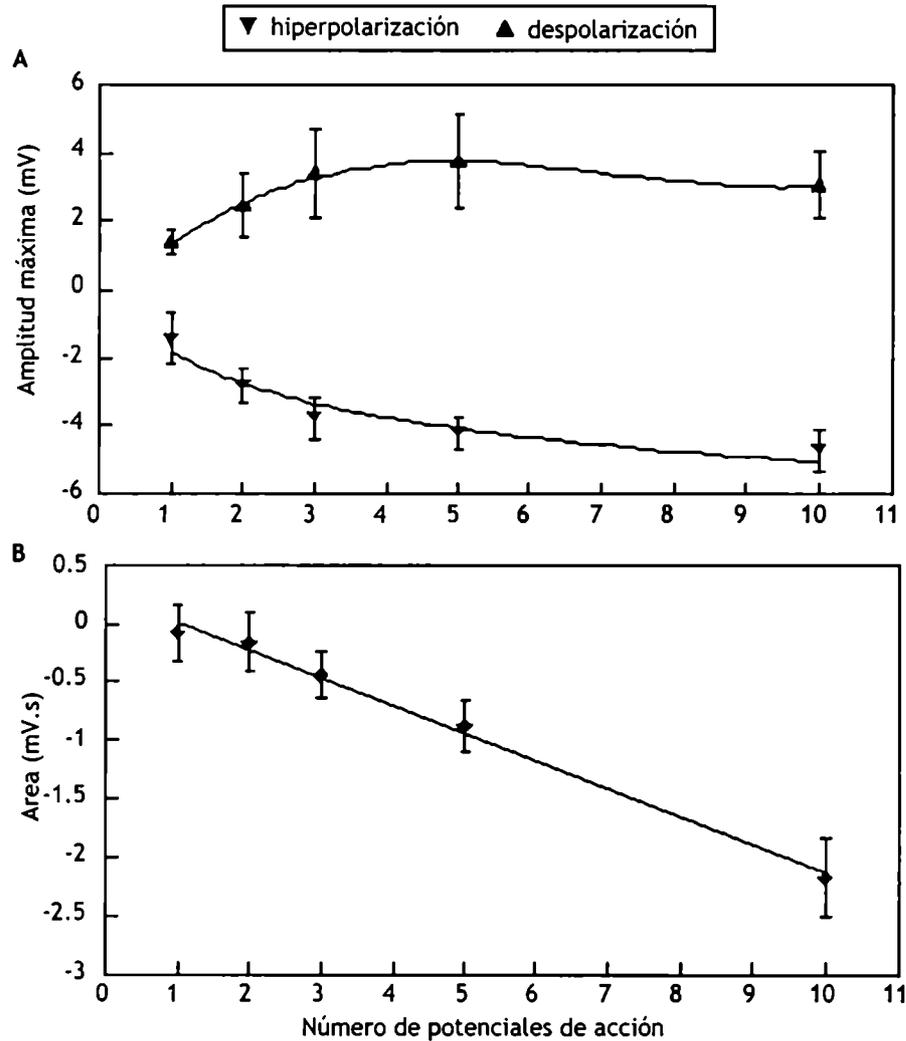


Figura 2.2. Cuantificación de las respuestas de AE en función del número de potenciales de acción evocados en la neurona P.

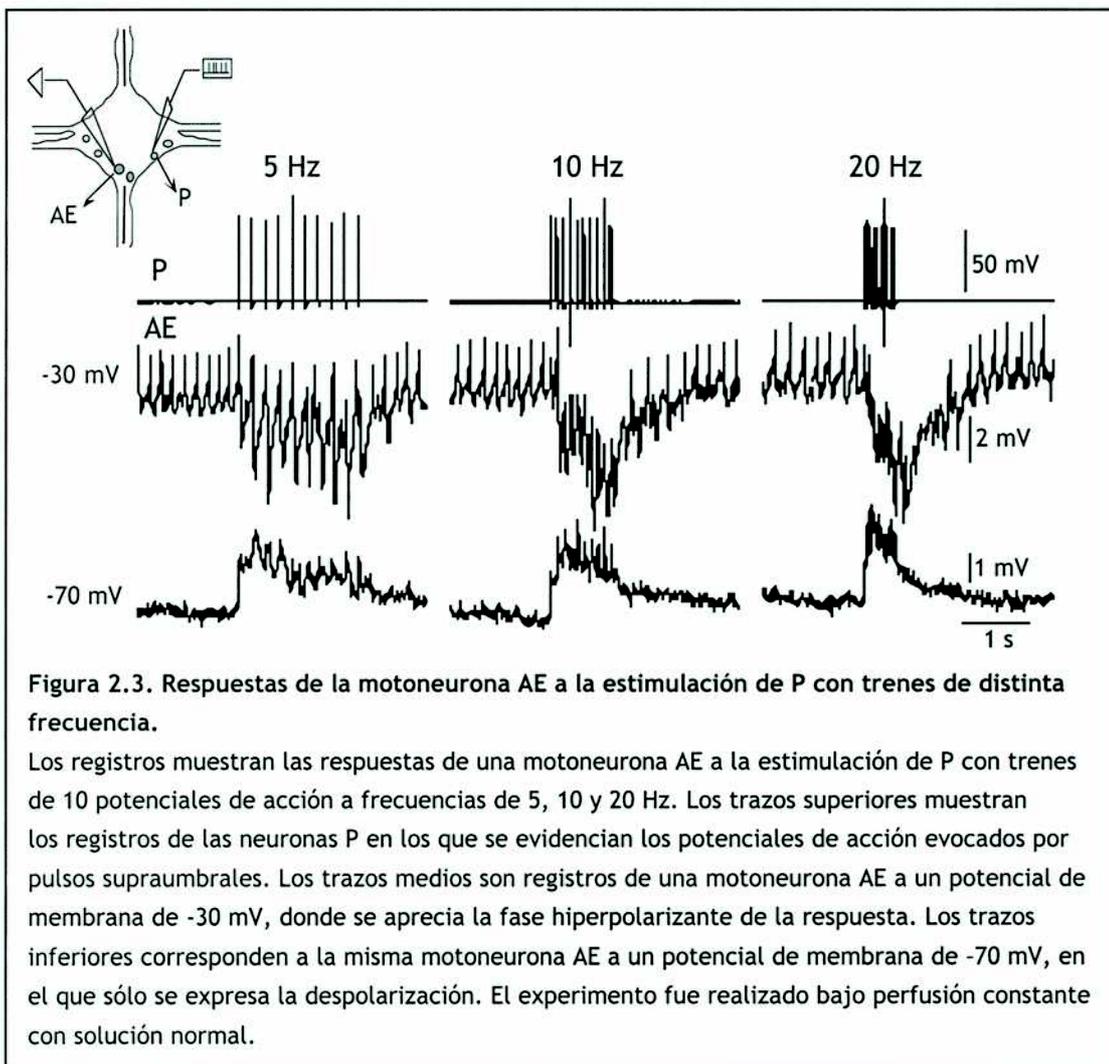
A. El gráfico muestra el valor promedio de la amplitud máxima de ambas fases de la respuesta de AE en función del número de potenciales de acción en P, a una frecuencia de 15 Hz. La fase despolarizante fue medida en registros tomados a -70 mV, similares al de la figura 2.1. El comportamiento de la amplitud máxima de la despolarización en función del número de pulsos, permitió un ajuste a una función polinomial de 3^{er} grado ($R=0.99$). La fase inhibitoria de la respuesta se midió en registros tomados a -30 mV y la amplitud máxima de la hiperpolarización en función del número de pulsos permitió un ajuste a una función logarítmica ($R=0.96$).

B. El gráfico muestra el valor promedio del área de la respuesta de AE en función del número de pulsos, a frecuencia constante. El área se midió en un intervalo de 1 segundo a partir del primer potencial de acción en P. Los datos se ajustaron a una función lineal ($R=0.99$). Los valores son el promedio de experimentos similares al mostrado en la figura 2.1 ($n=4$). Las barras indican el error estándar.

Expresión de las fases hiperpolarizante y despolarizante de la respuesta motora en función de la frecuencia del tren de estímulos.

Con el fin de investigar cómo se expresa en la motoneurona AE la frecuencia de potenciales de acción de la neurona sensorial o intensidad del estímulo, se estudió la respuesta de la motoneurona a trenes de frecuencia variable y un número fijo de pulsos. En ganglios aislados se analizó la respuesta de la motoneurona AE durante la estimulación de P con 10 pulsos supraumbrales a frecuencias de 5, 10, 15 y 20 Hz.

En la figura 2.3 se muestran registros representativos de estos experimentos, en los que puede observarse que las amplitudes máximas de las respuestas inhibitoria y excitatoria no sufrieron mayores cambios con las distintas frecuencias de estimulación de P. La cuantificación de estos experimentos se muestra en el gráfico de la amplitud máxima en función de la frecuencia de estimulación de P de la figura 2.4 A. La frecuencia de disparo de la neurona mecanosensorial P se reflejó pobremente en la amplitud de ambas fases de la respuesta de AE. La amplitud



máxima de la despolarización aumentó un 20 % entre los 5 y los 20 Hz. La amplitud de la hiperpolarización fue aumentando levemente con la frecuencia de estimulación siendo un 40 % mayor cuando se estimuló con un tren de 20 Hz, con respecto a la amplitud a 5 Hz. Ninguno de estos cambios fue estadísticamente significativo.

En el gráfico de la figura 2.4 B se muestran los valores del área de las respuestas medidas a un potencial de membrana de -30 mV para las distintas frecuencias de estimulación. Es preciso destacar que la frecuencia de disparo de los 10 potenciales de acción determina la duración total del estímulo. El área fue medida en dos intervalos de tiempo: uno de dos segundos después del primer potencial de acción en P, que es aproximadamente la duración de los 10 pulsos a 5 Hz y se muestra en el gráfico con rombos negros; otro intervalo de 0.5 segundos que es la duración de los 10 pulsos a 20 Hz y se muestra en el gráfico con rombos blancos.

La respuesta, medida como el área en 2 segundos, aumentó un 120 % entre 5 y 10 Hz ($n=5$) y se mantuvo en este nivel para las frecuencias mayores. Sin embargo si se mide el área en un período de tiempo de 0.5 segundos, el valor del área crece logarítmicamente con la frecuencia de disparo de los potenciales de acción de en P, llegando a un valor 5 veces mayor a los 20 Hz con respecto a los 5 Hz.

Durante un tren de pulsos en P a 5 Hz el período entre espigas es de 200 ms y, como puede observarse en la figura 2.3, éste tiempo es suficiente para que cada respuesta inhibitoria se manifieste en forma casi aislada, repolarizándose la motoneurona entre pulso y pulso. A 10 Hz la neurona no se repolariza entre pulsos y esto se refleja principalmente en el área y, en menor medida, en la amplitud de la respuesta (figura 2.4 A y B).

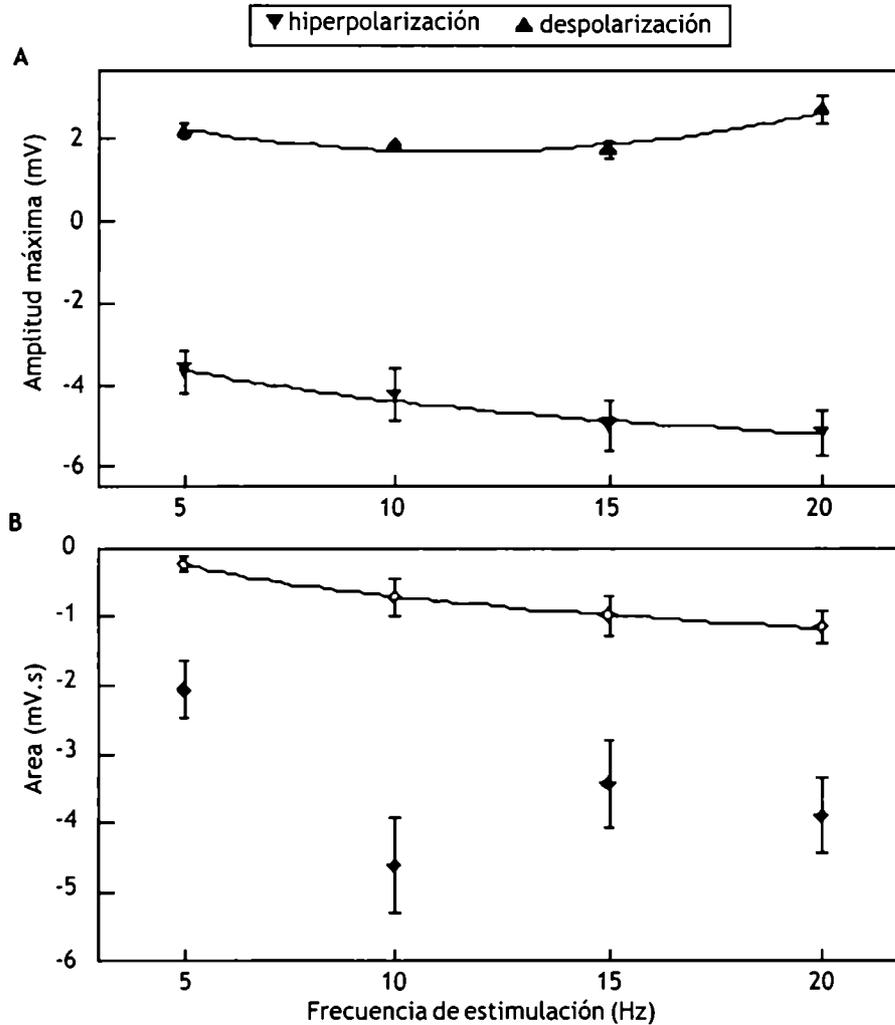


Figura 2.4. Cuantificación de las respuestas de AE en función de la frecuencia de estimulación de la neurona sensorial P.

A. El gráfico muestra el valor promedio de la amplitud máxima de ambas fases de la respuesta de AE en función de la frecuencia de estimulación de P, con trenes de 10 potenciales de acción. La fase despolarizante fue medida en registros tomados a -70 mV, similares al de la figura 2.3. El comportamiento de la amplitud máxima de la despolarización en función de la frecuencia de potenciales de acción en P, permitió un ajuste a una función polinomial de 2^{do} grado ($R=0.97$). La fase inhibitoria de la respuesta se midió en registros tomados a -30 mV y la amplitud máxima de la hiperpolarización en función de la frecuencia de potenciales de acción en P permitió un ajuste a una función logarítmica ($R=0.98$).

B. El gráfico muestra el valor del área promedio de la respuesta de AE en función de la frecuencia de estimulación de P, con trenes de 10 pulsos. El área se midió en un intervalo de 2 segundos a partir del primer potencial de acción en P (♦), y en un intervalo de 0,5 segundos a partir del primer potencial en P (◊). Esta segunda medida permitió un ajuste a una función logarítmica ($R=0.99$).

Los valores son el promedio de experimentos similares al de la figura 2.3 ($n=8$). Las barras indican el error estándar.

Discriminación espacial del estímulo

Cada ganglio medio de la sanguijuela contiene dos pares bilaterales de células P: un par inerva la parte dorsal del cuerpo del animal (PD) y el otro la ventral (PV). Dentro del par, cada neurona P inerva la cara de la pared corporal ipsilateral a la posición de su soma en el ganglio (Nicholls & Baylor, 1968). Así, en cuanto a los campos receptivos de las neuronas mecanosensoriales P, podemos dividir a la pared corporal en cuatro cuadrantes: dos dorsales (izquierdo y derecho) y dos ventrales (izquierdo y derecho) (figura 2.5 A). De esta manera la información sobre la dirección de la señal sensorial que reciben las neuronas AE está dada por la identidad de las neuronas P que son estimuladas. También existen dos neuronas AE por ganglio, cada una de las cuales inerva la pared corporal del hemisegmento contralateral a la posición de su soma en el ganglio (figura 2.5 B).

Para determinar si la vía P-AE es sensible a la dirección del estímulo sensorial se estudiaron las respuestas evocadas por la estimulación de las distintas neuronas P. Así, en cada ganglio aislado, se estudiaron las respuestas de las PD y las PV sobre la AE ipsilateral (AEi) y contralateral (AEC). Esto establece cuatro pares posibles: PDAEC, PDAEi, PV AEC y PVAEi. Las fases inhibitoria y excitatoria de la respuesta se

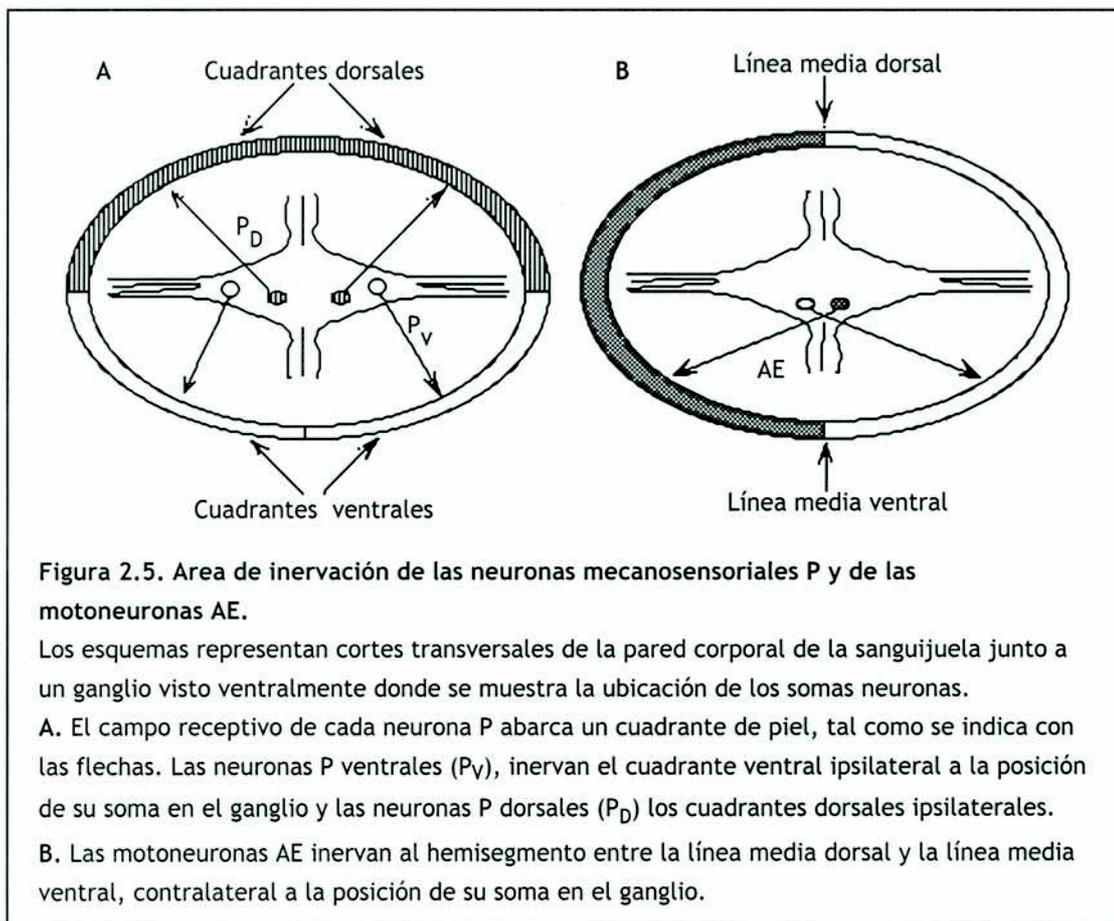


Figura 2.5. Área de inervación de las neuronas mecanosensoriales P y de las motoneuronas AE.

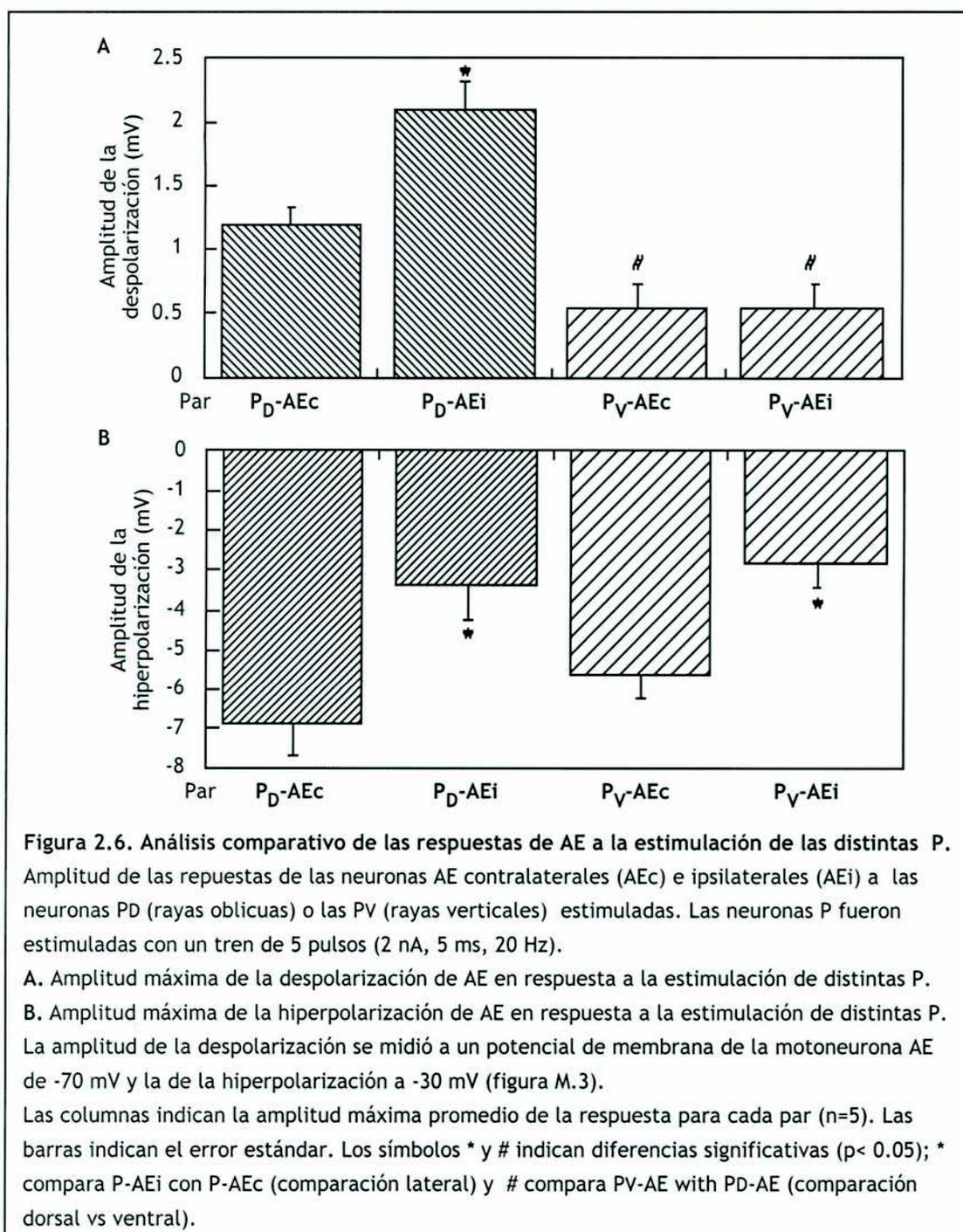
Los esquemas representan cortes transversales de la pared corporal de la sanguijuela junto a un ganglio visto ventralmente donde se muestra la ubicación de los somas neuronas.

A. El campo receptivo de cada neurona P abarca un cuadrante de piel, tal como se indica con las flechas. Las neuronas P ventrales (P_V), inervan el cuadrante ventral ipsilateral a la posición de su soma en el ganglio y las neuronas P dorsales (P_D) los cuadrantes dorsales ipsilaterales.

B. Las motoneuronas AE inervan al hemisegmento entre la línea media dorsal y la línea media ventral, contralateral a la posición de su soma en el ganglio.

estudiaron por separado, tomando registros de la respuesta de la motoneurona AE a -70 y -30 mV, respectivamente.

En la figura 2.6 se resumen los resultados de estos experimentos en gráficos de barras que muestran la amplitudes medias de ambas fases de la respuesta para cada par. La fase despolarizante mostró una marcada sensibilidad en términos de la división dorsal/ventral (figura 2.6 A). La amplitud promedio de las respuestas despolarizantes fue significativamente mayor cuando se estimuló a las PDs que cuando la señal provenía de las PVs. ($p < 0.05$, student t-test). Más aún, se observó que, en el 43 % de los casos ($n=14$) la estimulación de las PVs no evocó la respuesta



despolarizante. Los casos en que no se observó la respuesta despolarizante no fueron tomados en cuenta para la cuantificación. En términos de la distinción ipsi vs contralateral se observó que las PDs produjeron una despolarización de mayor amplitud en las motoneuronas ipsilaterales que en las contralaterales (figura 2.6 A) ($p < 0.05$, student t-test). La fase inhibitoria de la respuesta no discriminó entre la estimulación dorsal ó ventral pero sí entre la ipsi ó contralateral (figura 2.6 B). La amplitud de la hiperpolarización fue siempre mayor cuando se estimuló una P contralateral a la motoneurona, ($p < 0.05$, student t-test).

Discusión

En este capítulo estudiamos la manera en que las motoneuronas AE procesan diferentes parámetros de la señal sensorial proveniente de las neuronas P. Una de las conclusiones más generales de los resultados obtenidos es que el número de pulsos y la frecuencia del tren de estímulos se reflejan más en la duración de la respuesta de AE que en su amplitud.

En primer lugar observamos que la(s) interneurona(s) que median la hiperpolarización tendría(n) una baja probabilidad de alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción ante un único potencial en P. La amplitud de ambas fases de la respuesta de la motoneurona AE aumentó con la sucesión de los primeros tres disparos de la neurona sensorial alcanzando luego un plateau.

La integral de la respuesta en el tiempo o área, medida al potencial de reposo de AE, aumentó en forma lineal con la duración del estímulo. Por lo tanto, considerando la relativa constancia de la amplitud de la respuesta, un aumento lineal del área con el tiempo de estimulación indicaría que la estimulación mecanosensorial mantendría inhibida a la motoneurona AE por un período proporcional a la duración del estímulo.

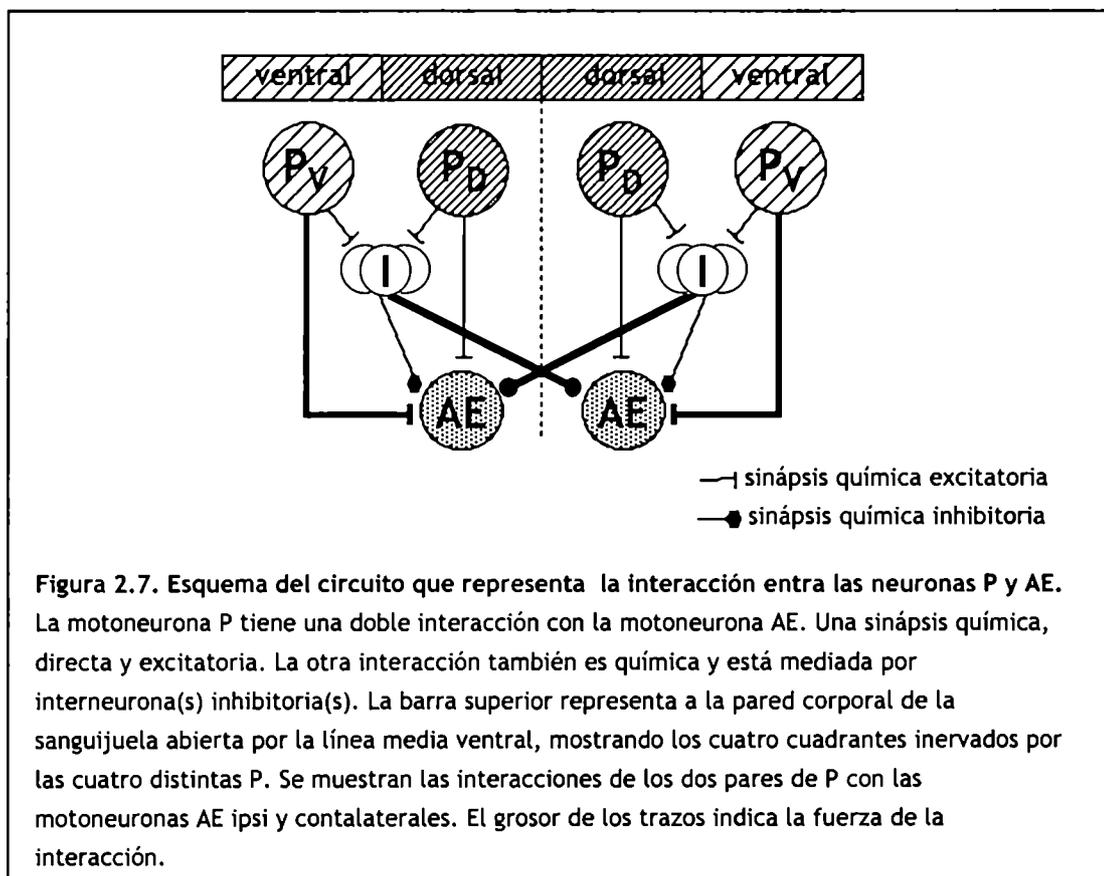
La frecuencia del estímulo tampoco afectó mayormente la amplitud de las respuestas, pero afectó su persistencia. El valor de la integral en el tiempo o área de la respuesta, que refleja dicha persistencia, aumentó con la frecuencia de estimulación debido a la creciente superposición de las respuestas a frecuencias mayores a 5 Hz (figura 2.3).

La dirección del estímulo se expresó, en la amplitud relativa de la respuesta de la motoneurona AE y fue ponderada de manera diferente para cada una de las fases de la respuesta sináptica. La amplitud de la hiperpolarización fue mayor cuando la señal provenía de cualquiera de los dos cuadrantes contralaterales, que de los ipsilaterales y no mostró diferenciación dorsal/ventral. Esto resulta coherente

con el hecho de que las motoneuronas AE inervan a las fibras musculares que se extienden a lo largo del hemisegmento contralateral, desde la línea media dorsal hasta la línea media ventral (Stuart, 1970). Como discutimos en el capítulo anterior la respuesta hiperpolarizante de la motoneurona AE inducida por estimulación de P produce una clara distensión de los ánuos, alisando la pared corporal del animal. Como las neuronas motoras AE inervan el hemisegmento contralateral a la posición de su soma en el ganglio, un estímulo sensorial producirá la relajación de los ánuos del hemisegmento estimulado, sin importar si el estímulo fue ventral o dorsal (ver figura 2.5).

En cambio, la respuesta despolarizante tuvo una amplitud máxima cuando la señal mecanosensorial provenía del cuadrante dorsal, y preferentemente ipsilateral a la motoneurona. Es posible que esta señal tenga efectos a nivel central (afectando a otras neuronas del ganglio), sin afectar la actividad de las fibras musculares que la neurona AE inerva.

Las diferencias en la magnitud de las respuestas generadas por las diferentes neuronas P fueron interpretadas a diferencias en el 'cableado' del circuito. La figura 2.7 representa esquemáticamente esta interpretación según la cual las respuestas de mayor amplitud estarían mediadas por conexiones de mayor peso que las respuestas de menor amplitud.



Capítulo 3: Estudio de las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE. Conductancias iónicas responsables de cada una de las fases de las respuesta.

El objetivo de los experimentos presentados en este capítulo fue estimar las conductancias involucradas en cada una de las fases de la respuesta de la motoneurona AE a la estimulación de P. Para ello se midió dicha respuesta a diferentes potenciales de membrana de la motoneurona, con el fin de conocer su potencial de reversión. Los experimentos se realizaron en ganglios aislados, montados en una cámara de registro con un sistema de perfusión constante. El potencial de membrana de AE se manipuló mediante la inyección de corriente continua a través del electrodo de registro, en una configuración de fijación de

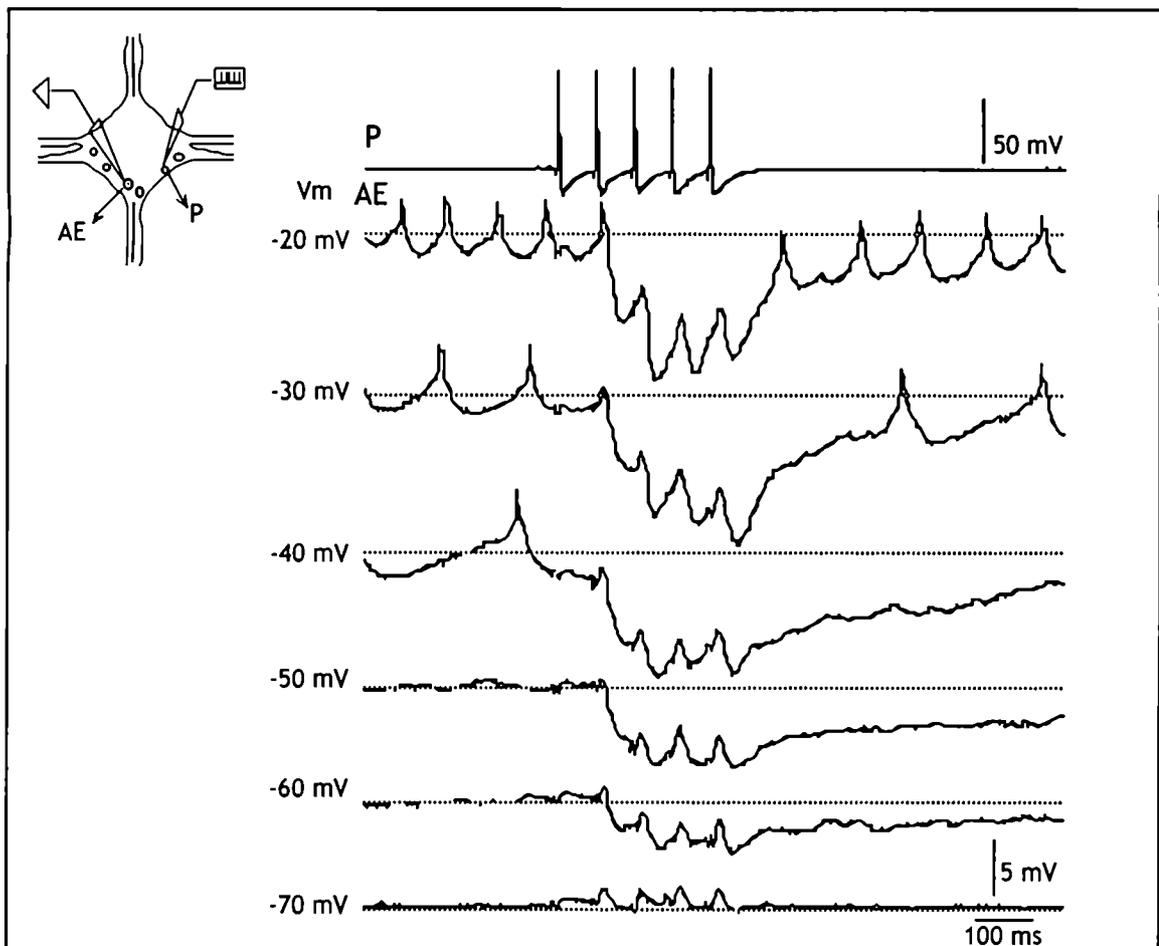


Figura 3.1. Respuestas de una motoneurona AE a la estimulación de P registrada a diferentes potenciales de membrana.

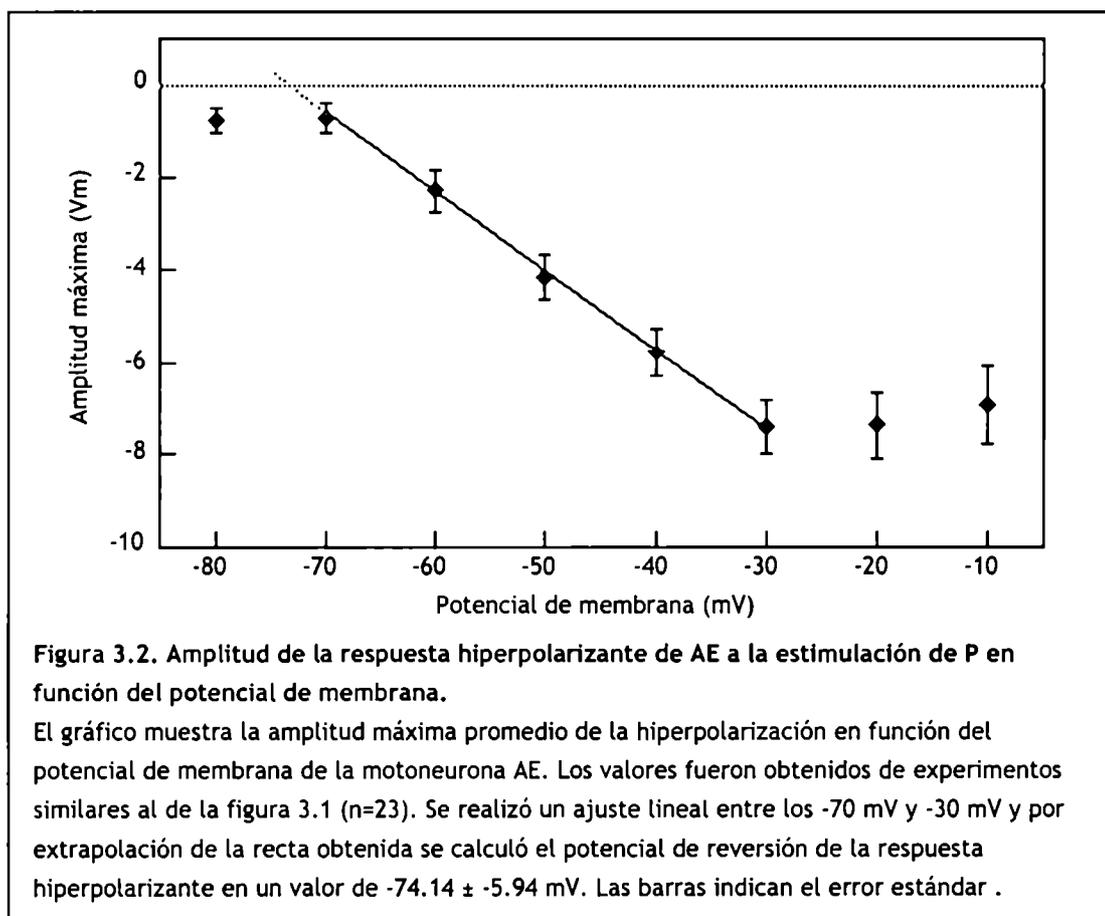
Registros intracelulares simultáneos de una neurona sensorial P (trazo superior), y de una motoneurona AE a diferentes potenciales de membrana. El potencial de membrana de la motoneurona AE fue llevado a los distintos valores mediante la inyección intracelular de corriente continua. A la izquierda de cada registro se indica el potencial de membrana al que estos fueron tomados.

El experimento fue realizado bajo perfusión constante con solución normal.

corriente con un ajuste controlado de la caída de potencial en el electrodo por medio del "balance bridge".

En la figura 3.1, se muestran registros representativos de un experimento realizado en solución normal donde puede observarse que la amplitud de la hiperpolarización fue disminuyendo a potenciales hiperpolarizados, hasta anularse a un potencial de membrana de alrededor de -70 mV. El potencial de reversión de la hiperpolarización, se calculó por extrapolación de la parte lineal de la respuesta de la motoneurona AE a la estimulación de P, en un gráfico de la amplitud en función del potencial de membrana de AE (figura 3.2). La respuesta ajustó a una función lineal ($R=0.999$) en el rango entre -30 y -70 mV y por extrapolación de esta recta hasta el punto en que la amplitud de la respuesta se anula ($y=0$), se calculó un potencial de reversión de -74 ± 5.94 mV ($n=23$).

En el gráfico de la figura 3.2 también se puede observar que la amplitud de la fase inhibitoria de la respuesta alcanza un máximo a un potencial de -30 mV, y se estabiliza en este valor para mediciones realizadas a potenciales más despolarizados.



Con el fin de estimar la corriente responsable de la fase despolarizante de la respuesta de AE se estudió su dependencia con el potencial de membrana. Dado que en condiciones normales estos potenciales excitatorios están montados sobre la fase inhibitoria, y esto dificulta la medición de su amplitud, se realizaron los experimentos perfundiendo al ganglio con una solución conteniendo concentraciones de 10 mM Mg^{++} y 10 mM Ca^{++} (ver figura 1.4). La figura 3.3 muestra una serie de registros representativos en el rango de -20 a -70 mV, en los cuales puede observarse que el valor del potencial de membrana de la motoneurona AE no influyó en la amplitud de la despolarización. En el gráfico de la figura 3.4 se observa que la amplitud de la fase despolarizante de la respuesta, en función del potencial de

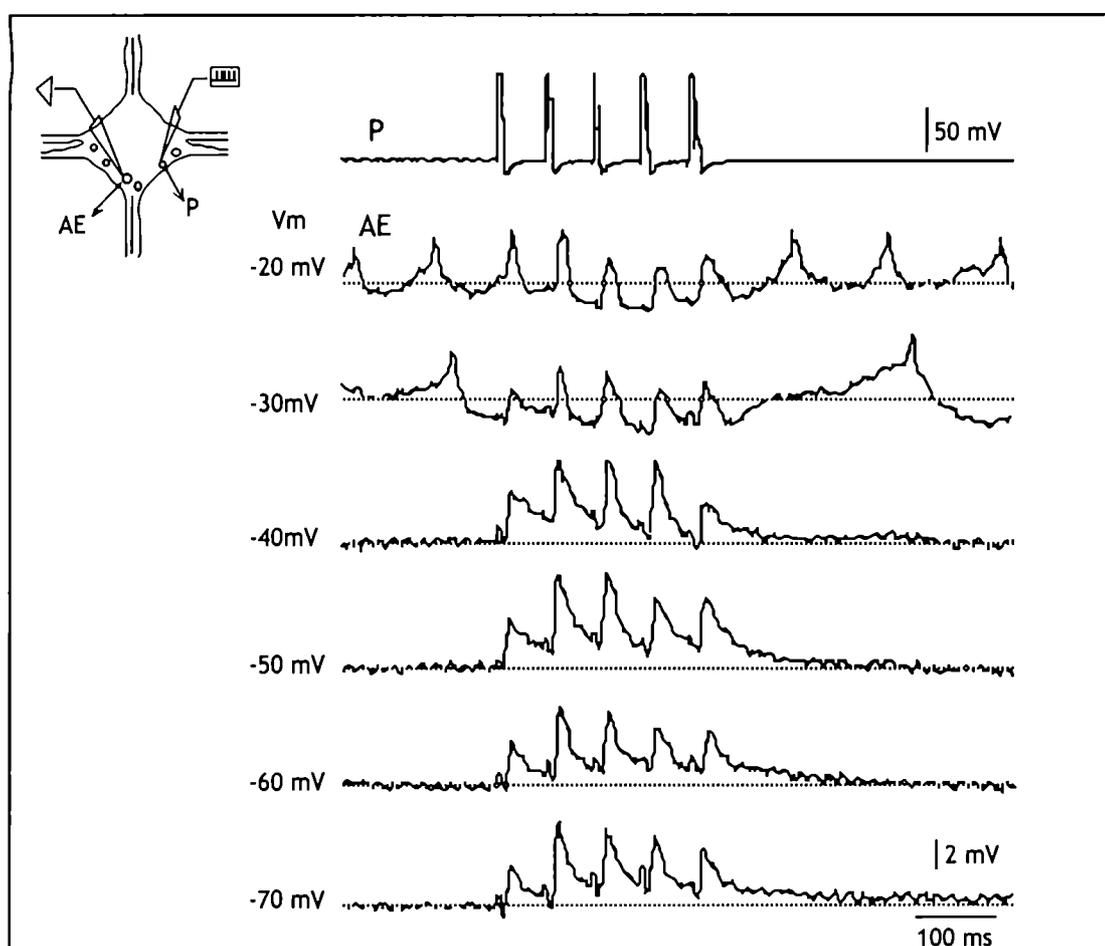
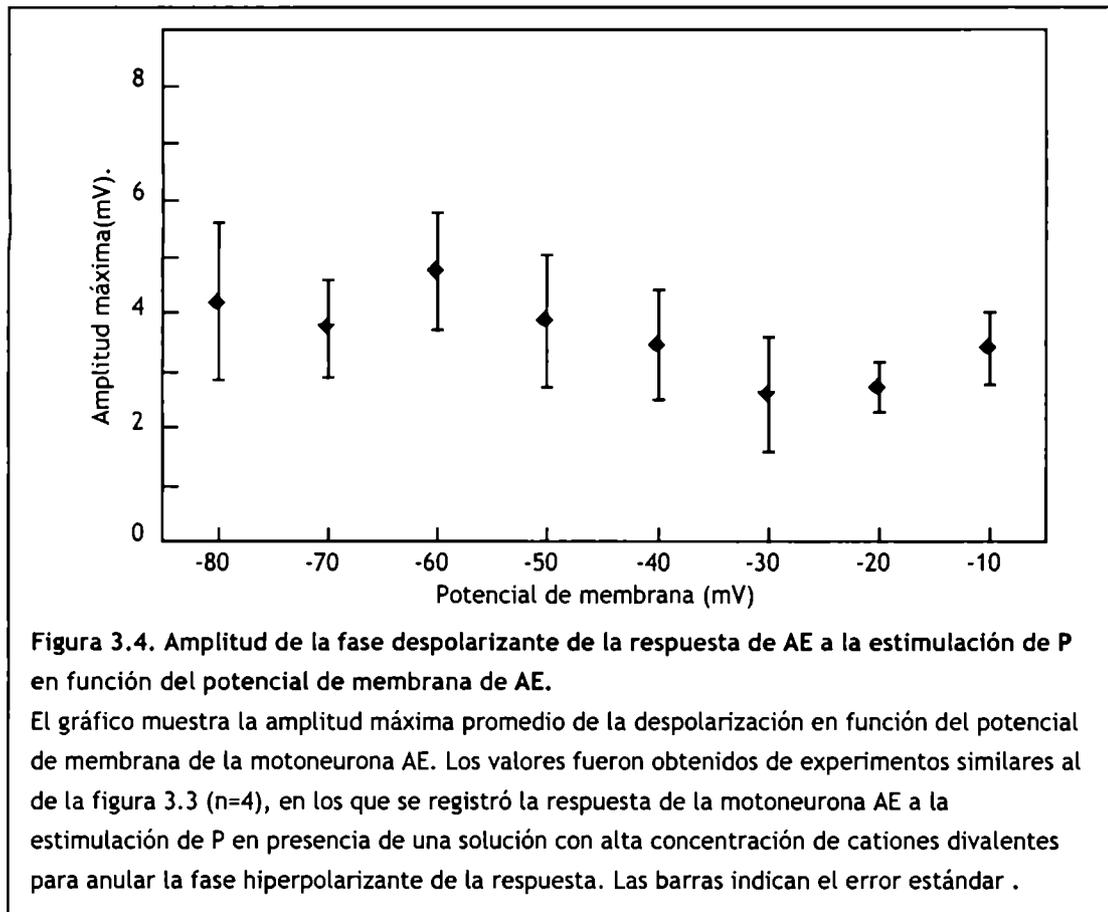


Figura 3.3. Respuestas de una motoneurona AE a la estimulación de P, registrada a diferentes potenciales de membrana, en presencia de una alta concentración de iones divalentes.

Registros intracelulares simultáneos de una neurona sensorial P (trazo superior), y de una motoneurona AE a diferentes potenciales de membrana. El potencial de membrana de la motoneurona AE fue llevado a los distintos valores mediante la inyección intracelular de corriente continua. A la izquierda de cada registro se indica el potencial de membrana al que fueron tomados. El experimento fue realizado bajo perfusión constante de una solución con concentraciones de 10 mM Mg^{++} y de 10 mM Ca^{++} , donde sólo se expresa la fase despolarizante de la respuesta.

membrana de la neurona AE, se mantuvo relativamente constante en el rango de potenciales investigados.

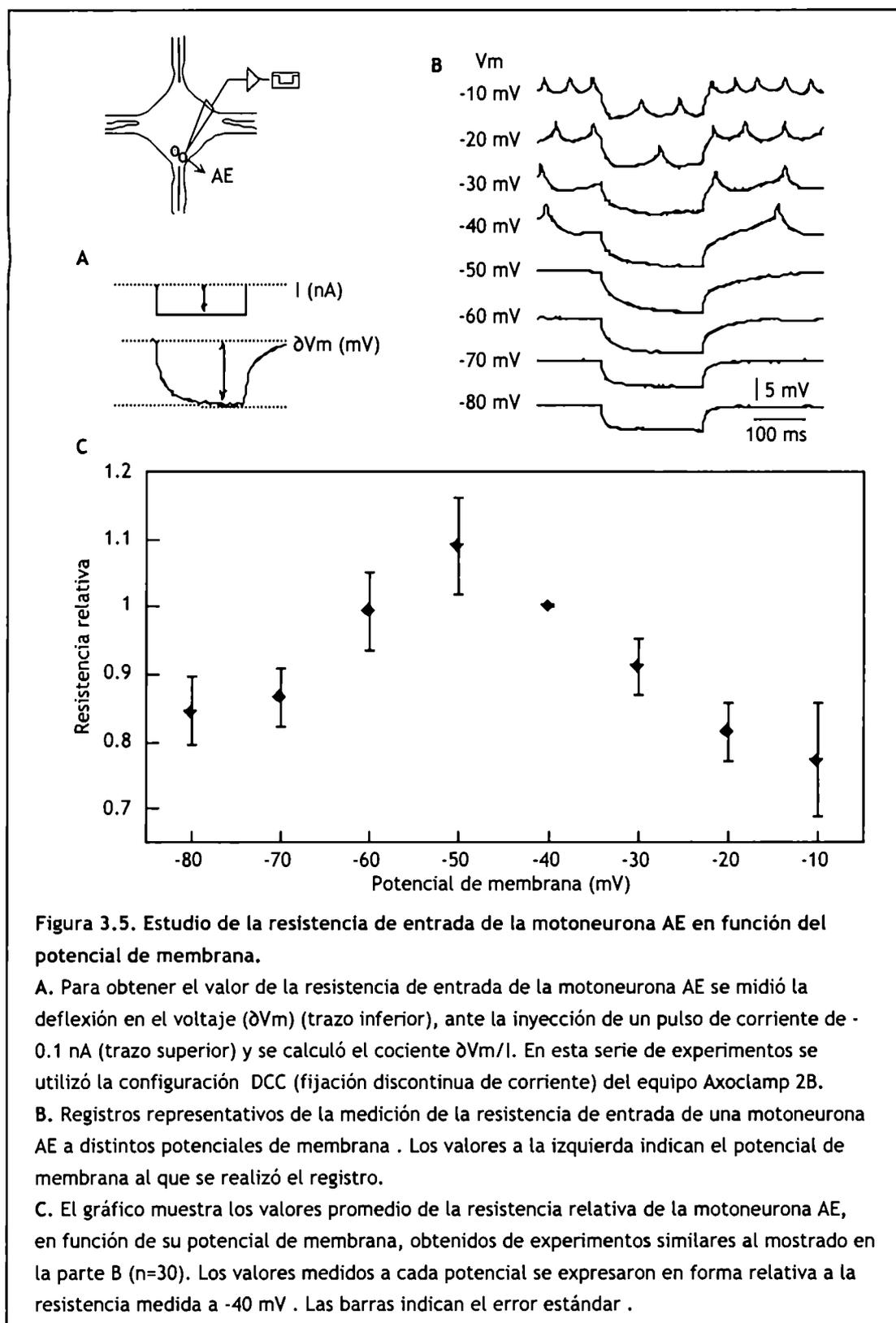


Propiedades intrínsecas de la motoneurona AE en función de su potencial de membrana.

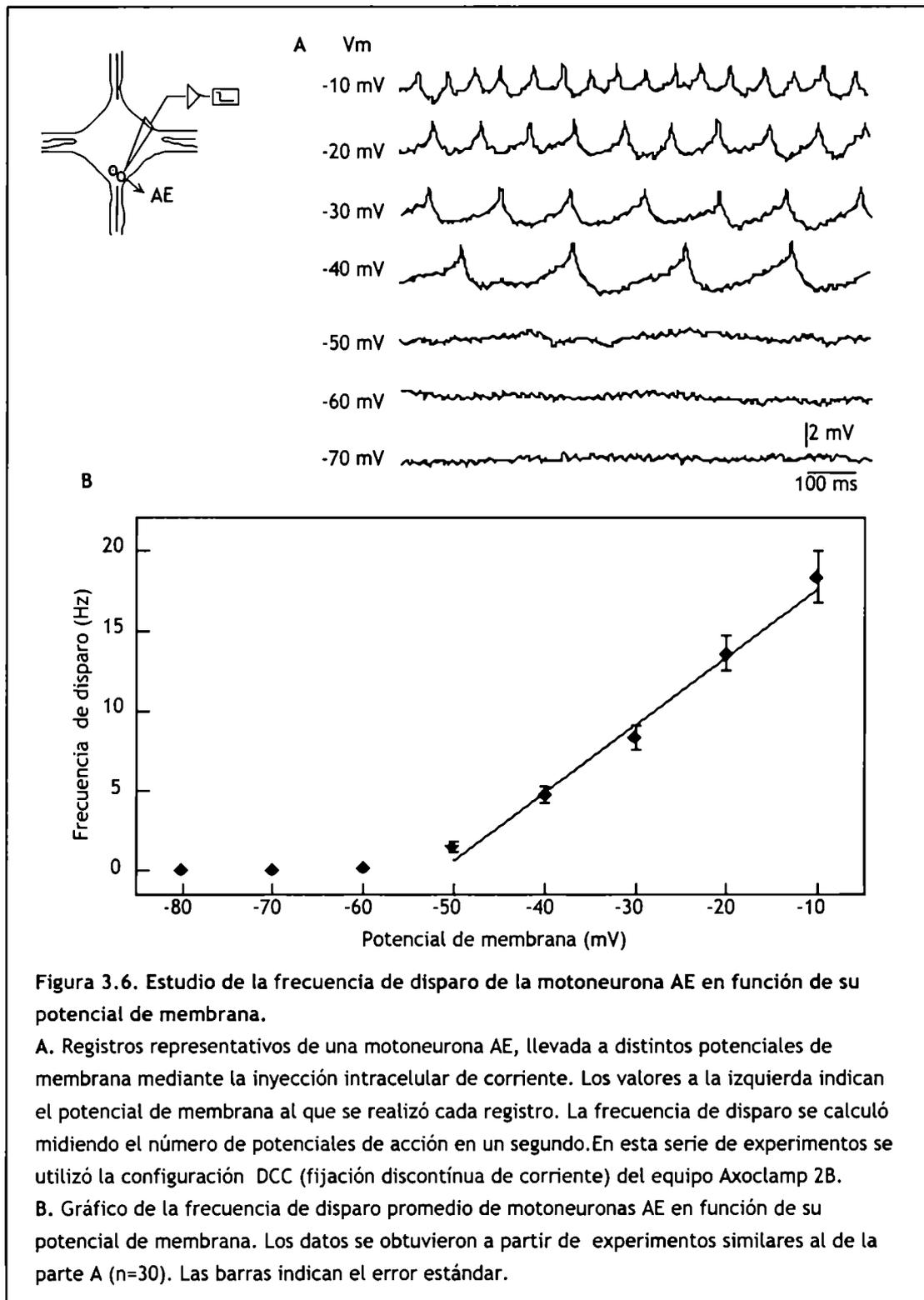
Los resultados obtenidos hasta el momento mostraron que el comportamiento de la amplitud de ninguna de las dos fases de la respuesta de la motoneurona AE con su potencial de membrana, puede ser explicado por variaciones en el potencial electroquímico de los iones involucrados. En el caso de la despolarización se esperaría que la amplitud de la misma aumente linealmente cuando el potencial de la motoneurona se hiperpolariza y para la hiperpolarización se esperaría un aumento en su amplitud a potenciales despolarizados. Cabe entonces preguntarse en qué medida estas alineamientos responden a propiedades intrínsecas de las neuronas AE, o se deben a propiedades particulares de las conductancias sinápticas activadas.

Con este fin investigamos la relación de la resistencia de entrada de la motoneurona AE con el potencial de membrana de la misma. Utilizando la configuración DCC (fijación discontinua de corriente) del amplificador Axoclamp 2 B,

se registró la respuesta de la motoneurona AE a un pulso de corriente hiperpolarizante (figura 3.5 A), partiendo de diferentes potenciales de membrana de la motoneurona AE. El potencial de membrana de la neurona fue llevado a diferentes valores mediante la inyección intracelular de corriente continua. En la figura 3.5 B puede observarse que la inflexión del potencial de membrana producida



por el pulso hiperpolarizante dependió notablemente del potencial desde el cual se inició dicha deflexión. Por ejemplo, es notable la diferencia en la cinética de los cambios de potencial partiendo de un potencial inicial de -50 mV y -70 mV. La figura 3.5 C resume la cuantificación los valores de la resistencia de entrada de la motoneurona AE en función del potencial de membrana, mostrando que ésta describe una curva en forma de V invertida. La resistencia de la neurona AE tuvo un valor máximo a los -50 mV, a partir del cual desciende en ambos sentidos.



Una serie de experimentos similares se realizaron para estudiar la dependencia de la frecuencia de disparo de la motoneurona AE con su potencial de membrana (figura 3.6 A). El potencial de membrana de la motoneurona AE fue llevado a distintos valores por medio de la inyección intracelular de corriente continua y a cada potencial se midió la frecuencia de disparo, contando el número de potenciales de acción en un intervalo de un segundo. En el gráfico de la figura 3.6 B se muestran los valores de la frecuencia de disparo de la motoneurona AE en función de su potencial de membrana. En esta figura se puede observar que la motoneurona AE comienza a disparar potenciales de acción a partir de los -50 mV, y la frecuencia de disparo aumenta linealmente con el potencial de membrana.

Discusión

El estudio de la dependencia de cada una de las respuestas sinápticas de la motoneurona AE con el potencial de membrana, reveló propiedades particulares de las conductancias sinápticas activadas, así como de las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE. Con el fin de correlacionar los comportamientos de los diferentes parámetros estudiados en función del potencial y rescatar los mecanismos comunes para los fenómenos observados, la figura 3.7 A-D muestra estos parámetros en función de una escala de potencial de membrana común.

La amplitud de la fase hiperpolarizante mostró una dependencia lineal con el potencial de membrana en el rango -70 a -30 mV, a partir de la cual se calculó un potencial de reversión aproximado de -70 mV (figura 3.2 y 3.7 A). Este potencial es cercano al potencial de equilibrio del ion Cl^- (Munsch & Schlue, 1993), por lo que se infiere que la respuesta sináptica se debe a la activación de una conductancia a este anión. Siendo así, se esperaba que a valores más positivos que -30 mV la respuesta aumentara en amplitud de manera lineal con el potencial, siguiendo al aumento de la diferencia con el potencial electroquímico para el cloro, pero esto no fue lo que se observó. En cambio, la amplitud de la respuesta no se modificó en el rango de potenciales de -30 a -10 mV. Tal como se detallará más adelante este fenómeno puede explicarse en términos de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de la neurona AE.

La amplitud de la fase excitatoria de la respuesta no mostró dependencia alguna con el potencial de membrana de la motoneurona (figura 3.4 y 3.7 A). De acuerdo a los resultados mostrados en el Capítulo 1 esta fase resulta de la acción sináptica química directa de la neurona sensorial P, cuyo neurotransmisor es el glutamato. La invarianza de la amplitud de la fase despolarizante con el potencial es

un fenómeno altamente peculiar y solo podrá ser explicado de manera parcial en términos de las propiedades electrofisiológicas de la neurona AE.

La compleja respuesta de la neurona AE también puede ser cuantificada como la integral del cambio de potencial en el tiempo o área. Este parámetro evalúa simultáneamente la contribución de la fase despolarizante e hiperpolarizante, y pondera el aspecto temporal de la respuesta que no es contemplado en la medición de las amplitudes máximas. La figura 3.7 B muestra un gráfico del área relativa (relativa al área medida a -40 mV) en función del potencial de membrana. Estos parámetros se relacionan siguiendo una curva en forma de V invertida similar a la descrita por la amplitud de la fase hiperpolarizante. Esta coincidencia no sorprende ya que la despolarización se mantuvo constante a todos los potenciales de membrana, y entonces es de esperar que las variaciones del área sigan el comportamiento de la fase hiperpolarizante. Sin embargo, como puede observarse comparando las figuras 3.7 A y B, mientras que la amplitud alcanza su valor máximo y lo mantiene a potenciales más positivos que -30 mV, el área cae en este rango de potenciales. Esta diferencia entre los comportamientos de los parámetros amplitud y area reside en la dependencia del curso temporal de las respuestas con el potencial de membrana de AE. La figura 3.7 E ilustra este aspecto mediante la superposición de dos registros de las respuestas de una neurona AE a la estimulación de P, tomados a dos potenciales de membrana de AE, -40 y -20 mV. Como puede observarse en ambos registros la amplitud máxima es similar, sin embargo al potencial más hiperpolarizado la fase hiperpolarizante tiene mayor duración y esto se refleja en la medida de la integral en el tiempo.

La resistencia de entrada de la neurona AE mostró una marcada dependencia respecto del potencial de membrana de la misma. Esta dependencia siguió una curva en forma de V invertida según la cual la resistencia adquirió un valor máximo a -50 mV a partir del cual descendía tanto en el sentido despolarizante como hiperpolarizante. Comparando las figuras 3.7 C y D se observa que la caída de la resistencia en el sentido de los valores más positivos resultó inversamente proporcional al aumento en la frecuencia de disparo de la motoneurona en este rango de potenciales. Esta correlación puede explicar la caída en la resistencia en el rango -50 a -10 mV ya que un aumento en la frecuencia de disparos implica un aumento en las conductancias voltaje dependientes. La caída de la resistencia a potenciales más negativos que -50 mV se podría deber a la activación de conductancias del tipo del rectificador anómalo. Este tipo de conductancia al K⁺ fue descrita en las células AP, y se caracteriza por su activación a potenciales

hiperpolarizados (a partir de los -55 mV aproximadamente) y por no inactivarse (Wessel, 1999).

En este cuadro general (figura 3.7) podemos considerar que la variación de la resistencia con el potencial de membrana explica la forma en que la fase hiperpolarizante cambia con el potencial. En el rango entre -50 y -80 mV la caída de la respuesta hiperpolarizante resulta de la de la disminución conjunta de la fuerza electromotriz y la resistencia de membrana. En el rango -50 a -10 mV, en cambio se va estableciendo un equilibrio entre el aumento de la fuerza electromotriz y la disminución de la resistencia que hace que la amplitud de la fase hiperpolarizante

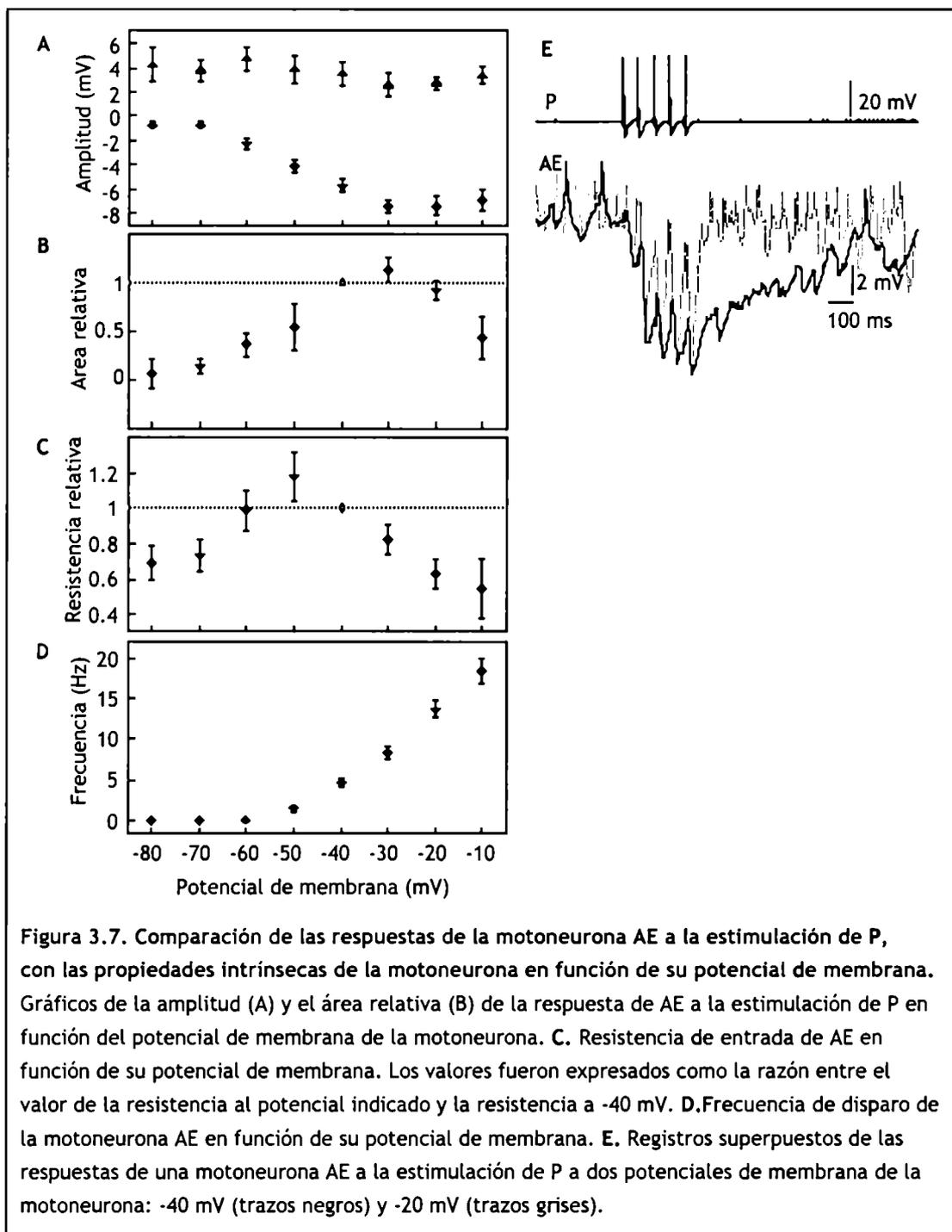


Figura 3.7. Comparación de las respuestas de la motoneurona AE a la estimulación de P, con las propiedades intrínsecas de la motoneurona en función de su potencial de membrana. Gráficos de la amplitud (A) y el área relativa (B) de la respuesta de AE a la estimulación de P en función del potencial de membrana de la motoneurona. C. Resistencia de entrada de AE en función de su potencial de membrana. Los valores fueron expresados como la razón entre el valor de la resistencia al potencial indicado y la resistencia a -40 mV. D. Frecuencia de disparo de la motoneurona AE en función de su potencial de membrana. E. Registros superpuestos de las respuestas de una motoneurona AE a la estimulación de P a dos potenciales de membrana de la motoneurona: -40 mV (trazos negros) y -20 mV (trazos grises).

se estabilice en un valor fijo a partir de un potencial de -30 mV. Es de notar que la modificación en la resistencia tiene un efecto sobre la duración de la respuesta que es reflejado por el área, y se observa a simple vista en la figura 3.7 E: la caída en la resistencia produce una disminución en la constante de tiempo de la célula por lo que, aún cuando la respuesta hiperpolarizante tenga una amplitud similar a -20 y -40 mV, la duración de la respuesta es claramente menor al potencial más positivo.

El comportamiento de la fase despolarizante, en cambio, sólo puede ser explicada parcialmente en base a los parámetros estudiados. Si la fase despolarizante se debiera a la activación de una conductancia a cationes monovalentes, entonces la disminución de la resistencia en el rango de -80 a -50 mV podría explicar que la amplitud permanezca invariable porque se establecería un equilibrio entre el aumento de la fuerza electromotriz y la caída de la resistencia. Sin embargo, en el rango de potenciales entre -50 y -10 mV, la caída en la resistencia se ve acompañada por una disminución de la fuerza electromotriz y ambas fuerzas deberían reducir la amplitud de la fase despolarizante. Sin embargo, la amplitud de esta fase también permanece constante en este rango de potenciales de membrana.

Capítulo 4: Modulación del circuito sensorio-motor P- AE por la interneurona pasiva 151.

Las neuronas ubicadas en la posición 151 del mapa ganglionar (Muller *et al.*, 1981) son un par de células bilaterales, presentes en cada ganglio medio. Estas neuronas son pasivas, es decir que no generan respuestas del tipo potencial de acción ante ningún estímulo. Las neuronas 151 están conectadas eléctricamente con múltiples motoneuronas y su hiperpolarización produce una disminución de la actividad electrofisiológica espontánea de las motoneuronas del ganglio, registrada extracelularmente en las raíces laterales. Estas sinápsis eléctricas presentan una doble rectificación, transmiten corriente negativa de la interneurona a la motoneurona y corriente positiva de la motoneurona a la interneurona (Wadepuhl, 1989).

Las neuronas 151 responden a la estimulación de las neuronas mecanosensoriales P con una compleja respuesta que es mediada por una capa de interneuronas (Marín Burgin & Szczupak,). De esta manera las neuronas 151 reciben información sensorial y a su vez están conectadas con las neuronas motoras por lo que resulta de interés investigar la influencia de esta neurona pasiva en el circuito P-AE.

Modulación graduada del potencial de membrana y la frecuencia de disparo espontánea de la motoneurona AE por la interneurona 151.

Con el fin de estudiar la interacción sináptica entre las motoneuronas AE y las neuronas 151 se realizaron registros intracelulares simultáneos de ambas neuronas en ganglios aislados. Las neuronas pasivas 151 presentan un potencial de membrana de aproximadamente -40 mV, no disparan potenciales de acción y frecuentemente se observan potenciales postsinápticos inhibitorios espontáneos de aproximadamente 5 mV de amplitud.

Para evaluar la interacción sináptica entre las interneuronas pasivas 151 y las motoneuronas AE se inyectaron pulsos de corriente continua en el soma de ambas neuronas, y se registraron los cambios que esta manipulación producía en la otra neurona. La inyección de corriente de -15 a +10 nA de intensidad en el soma de las motoneuronas AE no produjo ningún efecto sobre el potencial de membrana de las neuronas 151. Por el contrario, como puede observarse en los registros de la figura 4.1, la inyección de corriente continua negativa de intensidades crecientes en la neurona 151, produjo una disminución gradual en la frecuencia de disparo

espontánea de la motoneurona AE.

La figura 4.2 A muestra que la relación entre la intensidad de corriente negativa inyectada en 151 y la disminución en la frecuencia de disparo de la motoneurona siguen una función lineal entre los -1 y -15 nA de intensidad ($R=0.99$). La inyección de corriente positiva en la neurona 151 no produjo cambios en la frecuencia de disparo de la motoneurona AE (figura 4.2 A).

En el gráfico se la figura 4.2 B se muestra la variación del potencial de membrana de la motoneurona AE en función de la intensidad de la corriente inyectada en las neuronas 151. La relación entre la variación en el potencial de membrana y la intensidad de la corriente inyectada en 151 también siguió una función lineal para valores de corriente negativos ($R=0.99$). La inyección de corriente positiva en 151 produjo una leve despolarización de la motoneurona AE.

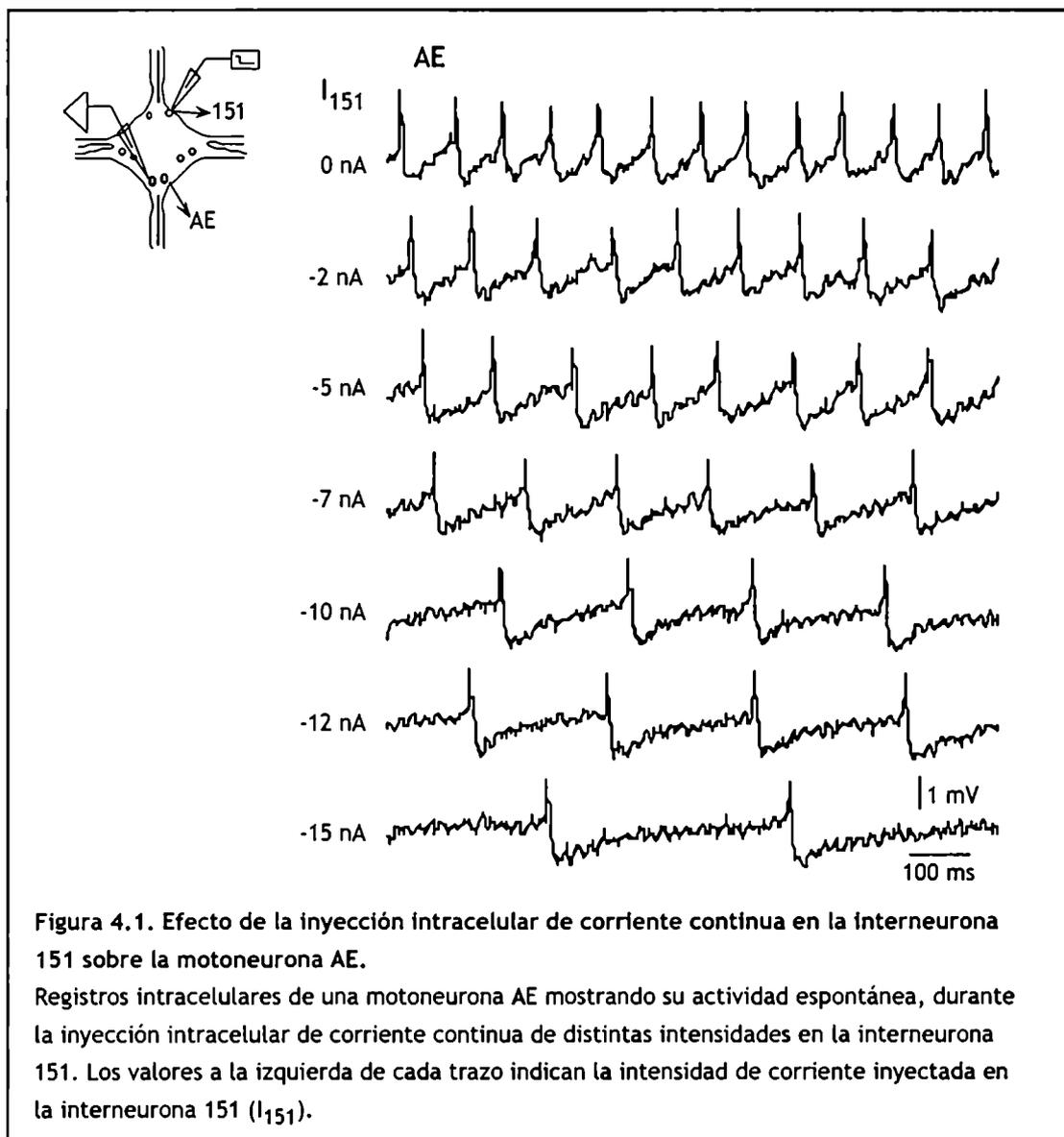
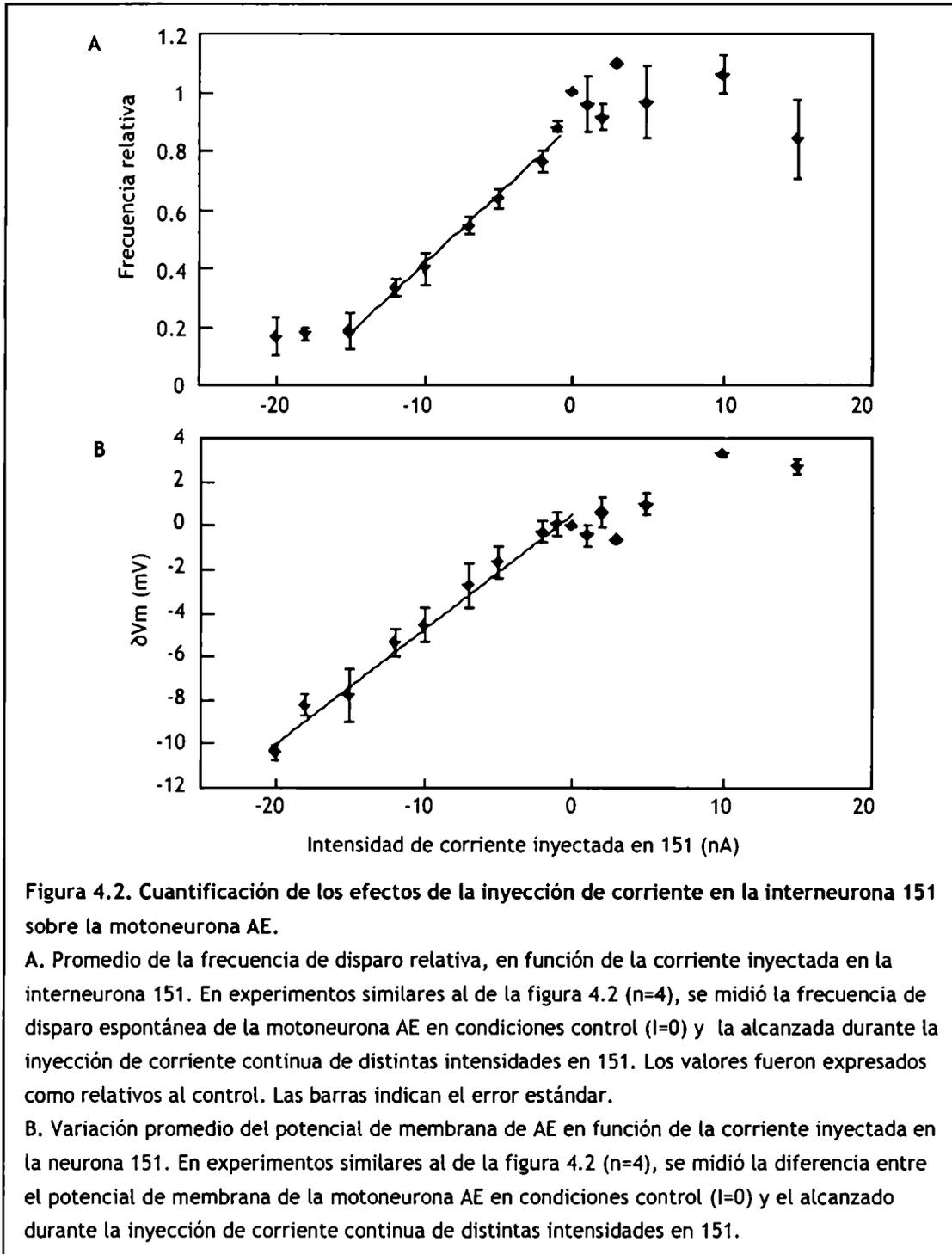


Figura 4.1. Efecto de la inyección intracelular de corriente continua en la interneurona 151 sobre la motoneurona AE.

Registros intracelulares de una motoneurona AE mostrando su actividad espontánea, durante la inyección intracelular de corriente continua de distintas intensidades en la interneurona 151. Los valores a la izquierda de cada trazo indican la intensidad de corriente inyectada en la interneurona 151 (I_{151}).

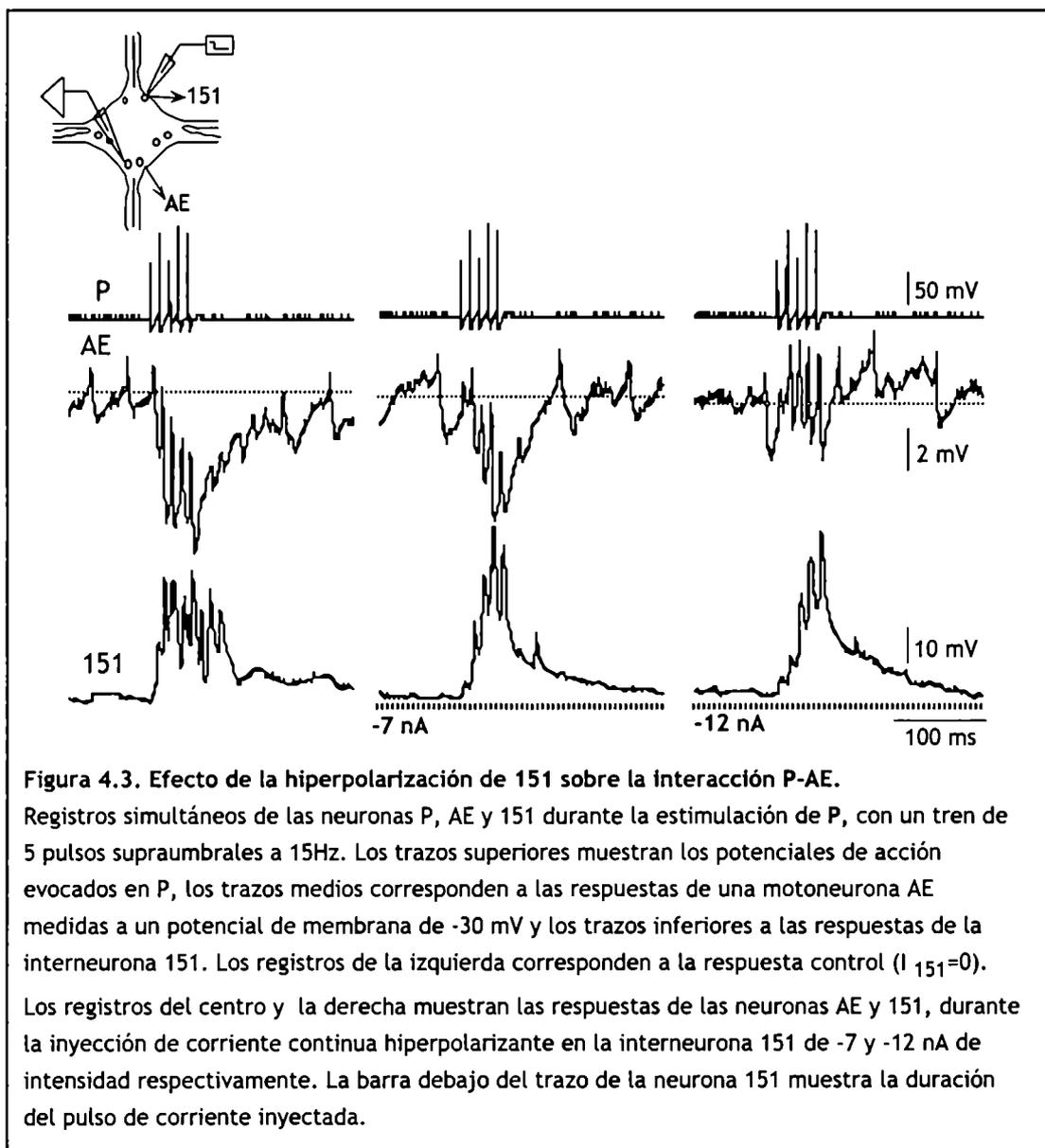


Regulación de la interacción P-AE por la interneurona 151.

Con el fin de evaluar la influencia que ejerce la interneurona 151 sobre el circuito sensorio-motor P-AE, se realizaron experimentos en ganglios aislados, registrando simultáneamente la actividad electrofisiológica de las tres neuronas utilizando microelectrodos intracelulares. Se registró la interacción P-AE durante la inyección de distintas intensidades de corriente en la neurona 151. Es importante

aclarar que como la inyección de corriente negativa en la célula 151 produce la hiperpolarización de la motoneurona AE (figura 4.2 B), fue necesario compensar la hiperpolarización en AE mediante la inyección intracelular de corriente positiva, a fin de poder comparar la amplitud de las respuestas en las diferentes condiciones experimentales.

Se registraron las respuestas de la interneurona 151 y la motoneurona AE a la estimulación de la neurona P con un tren de 5 pulsos supraumbrales a 15 Hz. En condiciones control ($I_{151}=0$), la estimulación de P produjo una despolarización en 151 y una hiperpolarización en la motoneurona AE (figura 4.3, columna izquierda). La inyección intracelular de corriente negativa de distintas intensidades en 151 produjo una disminución de la amplitud de la fase hiperpolarizante de la respuesta de la motoneurona sin afectar a la fase despolarizante de la respuesta. La amplitud de la



despolarización durante la inyección de -12 nA fue del $95.5 \pm 0.03 \%$ ($n=4$) del valor control (figura 4.3). Sorpresivamente tampoco se observaron cambios significativos en la respuesta de las neuronas 151 al estímulo en P, cuantificada como el área de la respuesta (figura 4.3). Durante la inyección de -12 nA el área de la respuesta de la célula 151 fue el $100 \pm 15 \%$ del área en condiciones control ($n=4$).

La disminución de la fase inhibitoria de la respuesta se refleja en la amplitud de la hiperpolarización y en el área de la respuesta de la motoneurona a la estimulación de P. En la figura 4.4 se resumen los efectos de la inyección de corriente en 151 sobre la interacción P-AE, donde se observa que la amplitud de la

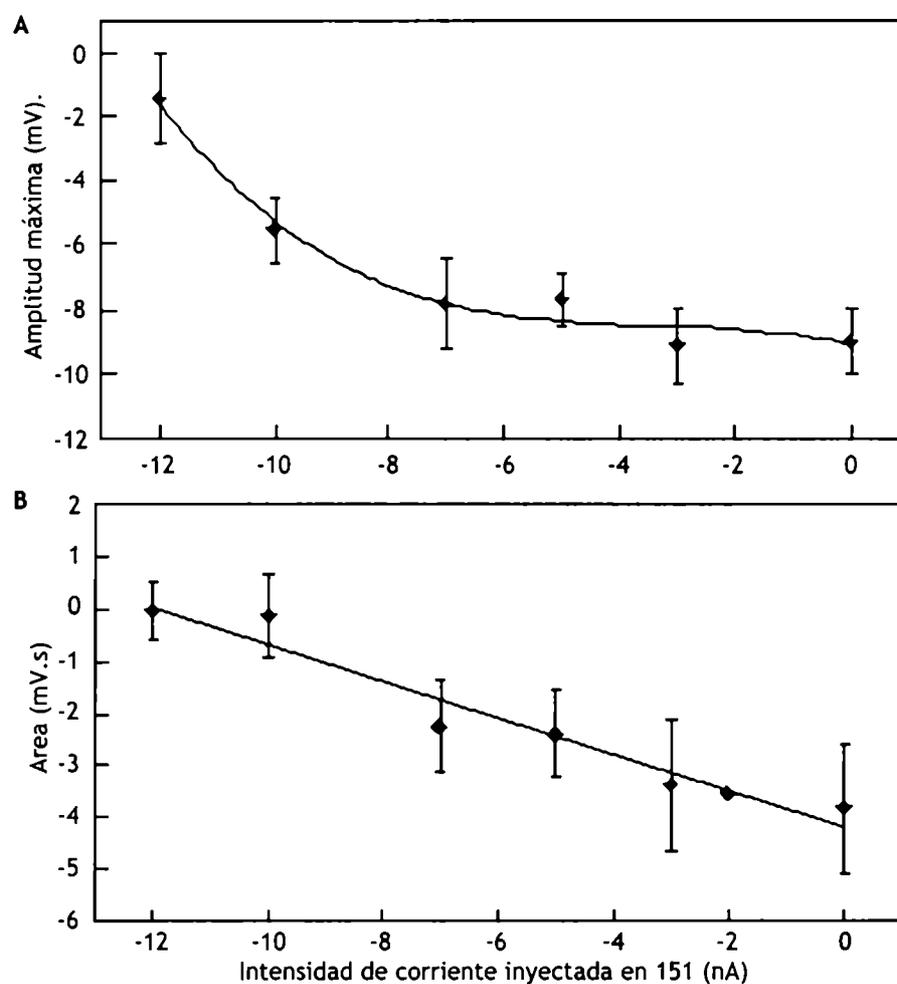


Figura 4.4. Cuantificación de la respuesta de AE ante la estimulación de P en función de la corriente inyectada en 151.

A. Gráfico de la amplitud máxima promedio de la respuesta hiperpolarizante de AE ante la estimulación de P, en función la corriente inyectada en la interneurona 151. Los valores se ajustaron a una función polinomial de 3^{er} grado ($R=0.98$).

B. Gráfico del área de la respuesta de AE a la estimulación de P, en función de la corriente inyectada en 151. Los datos se ajustaron a una función lineal ($R=0.97$).

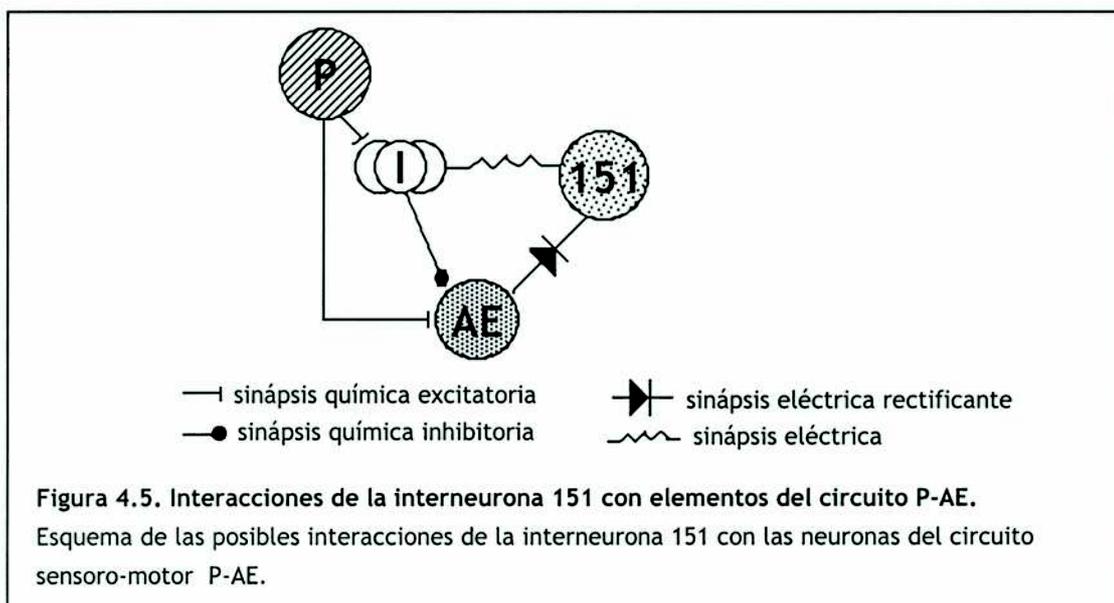
Los valores se midieron en experimentos similares al de la figura 4.3 ($n=4$). La barras indican el error estándar.

respuesta hiperpolarizante disminuyó en función de la intensidad de corriente negativa inyectada en la célula 151, siguiendo una curva exponencial. El área, en cambio, disminuyó siguiendo una relación lineal con la corriente inyectada en 151.

Discusión.

Los resultados presentados en este capítulo mostraron que, de manera similar a como sucede con un grupo amplio de motoneuronas (Wadepuhl, 1989), la célula AE está conectada con la neurona 151 a través de una conexión de tipo eléctrica rectificante. En base a esta conexión, la inyección de corriente negativa en la neurona 151 produjo una hiperpolarización y una reducción de la frecuencia de disparo de la motoneurona AE.

Por otra parte, la inyección de corriente negativa en la interneurona 151 produjo una disminución de la amplitud de la respuesta inhibitoria de AE a la estimulación de P, sin afectar la despolarización. La disminución en la amplitud de la hiperpolarización fue proporcional a la intensidad de corriente inyectada en 151. Estos resultados sugieren que la neurona 151 ejerce un efecto inhibitorio sobre la(s) interneurona(s) que media(n) la fase hiperpolarizante de la respuesta y sin afectar, en cambio, a la fase despolarizante debida a una interacción directa entre las neuronas P y AE. La interpretación de estos resultados nos permite plantear un circuito como el de la figura 4.5. De acuerdo con este circuito la neurona 151 ejercería un efecto inhibitorio directo sobre la motoneurona mediante una sinápsis eléctrica rectificante y, en paralelo, regularía la llegada de señales inhibitorias por parte de la neurona mecanosensorial.



La acción de la neurona 151 sobre las interneuronas inhibitorias fue concebida como una sinápsis eléctrica debido a que esta es la forma de interacción más profusa de esta neurona pasiva. La hiperpolarización de la neurona 151 produciría una hiperpolarización de la(s) interneurona(s) que redundaría en su alejamiento del umbral de disparo de potenciales de acción.

Se desconoce aún el aporte conductual de este circuito pero resulta evidente que la neurona 151 está en una posición clave para ejercer una regulación efectiva sobre las vías sensorio-motoras en la sanguijuela.

Parte II: Modulación serotoninérgica de la interacción P-AE.

La serotonina interviene en la modulación de varios comportamientos en la sanguijuela tales como la alimentación (Dickinson & Lent, 1984; Lent & Dickinson, 1987; Lent & Dickinson, 1984b), el acortamiento defensivo (Wittenberg & Kristan, 1992a) y la natación (Williard, 1981; Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989).

En la sanguijuela se ha estudiado la modulación por serotonina de las propiedades intrínsecas de interneuronas y motoneuronas individuales que intervienen en circuitos generadores de patrones de movimiento y la modulación de sus interacciones, especialmente en la natación (Angstadt & Friesen, 1993b) y la respuesta de acortamiento (Mason & Kristan, 1982; Wittenberg & Kristan, 1992b; Wittenberg & Kristan, 1992a), pero aún no ha sido estudiada la modulación de vías sensoro-motoras por serotonina.

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la modulación serotoninérgica de la vía sensoro-motora que investigamos en la Parte I. Iniciamos este estudio evaluando los efectos de la serotonina exógena sobre las propiedades intrínsecas de las distintas neuronas del circuito P-AE. Los efectos de la serotonina sobre las neuronas individuales serán evaluados de dos maneras: aplicando 5-HT por pulsos de presión sobre el soma de las neuronas (Capítulo 5) y por perfusión de la droga en el baño afectando a todo el ganglio (Capítulo 6). En una segunda etapa se evaluaron los efectos de la serotonina exógena sobre la interacción sensoro-motora. Para ello se estudiaron los cambios en dicha interacción durante la perfusión de 5-HT (Capítulo 6).

Con el fin de hallar herramientas farmacológicas que inhibieran de manera específica los distintos efectos de la serotonina exógena sobre el circuito P-AE, se analizaron una serie de antagonistas de receptores de serotonina. Este estudio no tuvo como finalidad una caracterización farmacológica de los receptores serotoninérgicos involucrados, sino la adquisición de herramientas farmacológicas que nos permitieran investigar los efectos de la serotonina endógena, a través de la acción de los distintos antagonistas en ausencia de serotonina exógena (Capítulo 7).

Capítulo 5: Efecto de pulsos de serotonina sobre las neuronas P y AE.

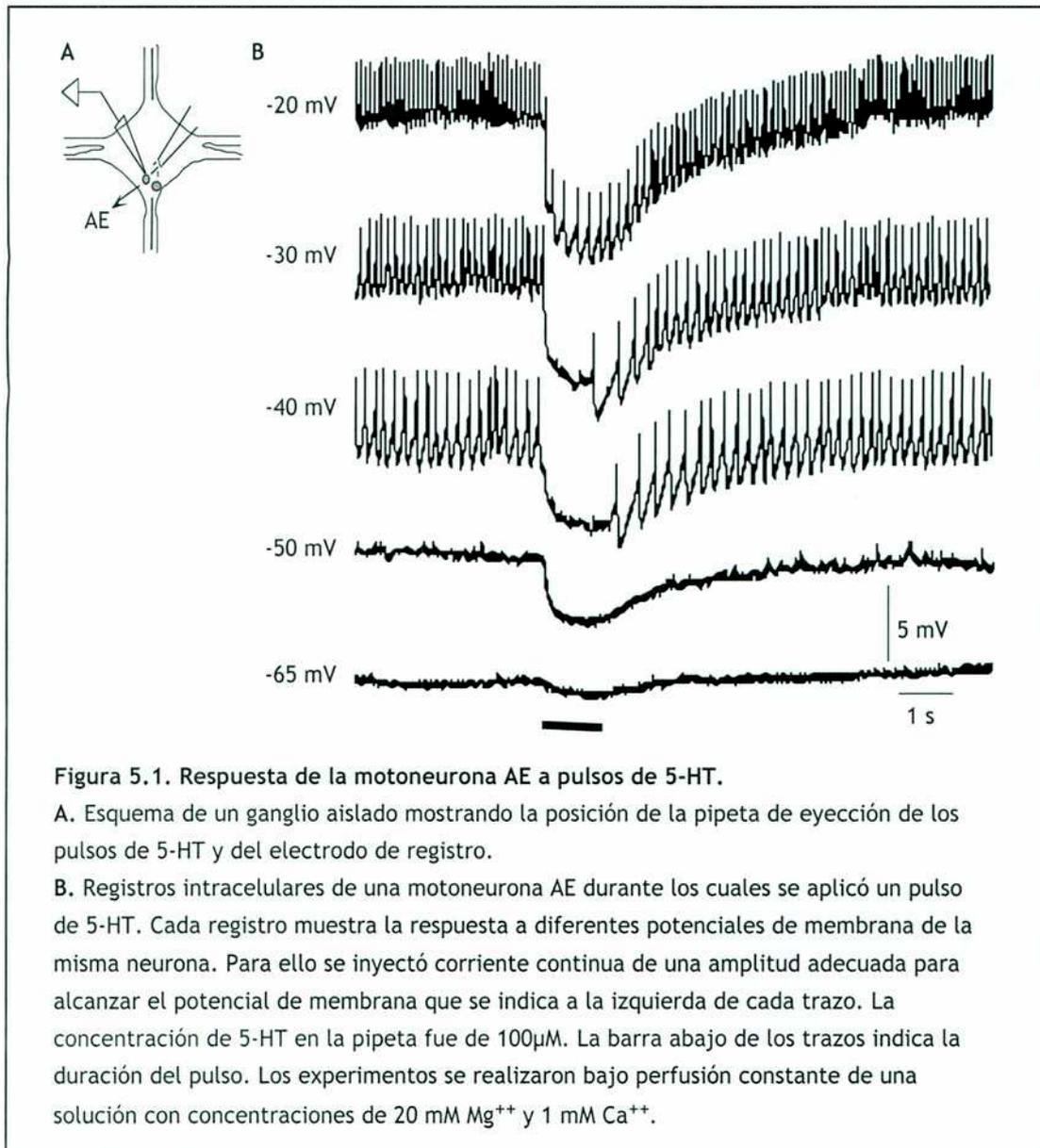
Con el fin de estudiar el efecto de la serotonina sobre las neuronas P y AE se aplicaron pulsos de serotonina eyectados por presión sobre sus somas (ver M & M). Los experimentos fueron realizados en ganglios aislados, mantenidos en una cámara bajo perfusión constante con una solución con una alta concentración de Mg^{++} y una baja concentración de Ca^{++} , con el fin de asegurarse que las respuestas observadas se debieran a efectos directos de los pulsos de 5-HT sobre las neuronas estudiadas ya que en esta solución se bloquean las interacciones sinápticas químicas. Para garantizar el rápido acceso de los pulsos de droga se quitó el epitelio glial que recubre a los ganglios.

Efectos de pulsos de 5-HT sobre la motoneurona AE.

Los pulsos de 5-HT aplicados por presión sobre el soma de las motoneuronas AE produjeron una hiperpolarización transitoria de su potencial de membrana (figura 5.1), cuya amplitud promedio, a un potencial cercano al de reposo de la motoneurona AE (-30 mV), fue de -4.6 ± 0.5 mV (n=8).

Inicialmente se probaron concentraciones de 5-HT de 100 y 1000 μM en la micropipeta de eyección de pulsos sin que se observaran diferencias en la amplitud de las respuestas. Esto sugirió que a la concentración menor se alcanzó la saturación y en lo sucesivo se trabajó con una concentración de 5-HT de 100 μM en la micropipeta.

La amplitud de la respuesta a los pulsos de 5-HT varió con el potencial de membrana al que se llevara a la motoneurona durante el pulso (figura 5.1). Cuando se graficó la relación entre la amplitud de la hiperpolarización inducida por serotonina en función del potencial de membrana al que se registró (figura 5.2) se observó que estas variables guardan una relación lineal. La amplitud de la respuesta revirtió a un potencial de -67.9 ± 7.9 mV (n=8), cercano al potencial de equilibrio para el ion cloro en neuronas de sanguijuela (Munsch & Schlue, 1993).



Efectos de los pulsos de serotonina sobre la neurona mecanosensorial P.

Los pulsos de 5-HT sobre el soma de las neuronas mecanosensoriales P produjeron una pequeña hiperpolarización de su potencial de membrana que se observó sólo en el 40 % de las neuronas estudiadas ($n=10$). La amplitud promedio de esta respuesta en los casos en que se observó fue de $-1.64 \pm 0.38\text{ mV}$ ($n=4$). En la figura 5.3 puede observarse que la amplitud de la respuesta de la neurona P a los pulsos de 5-HT en función de su potencial de membrana se anuló aproximadamente a los -60 mV .

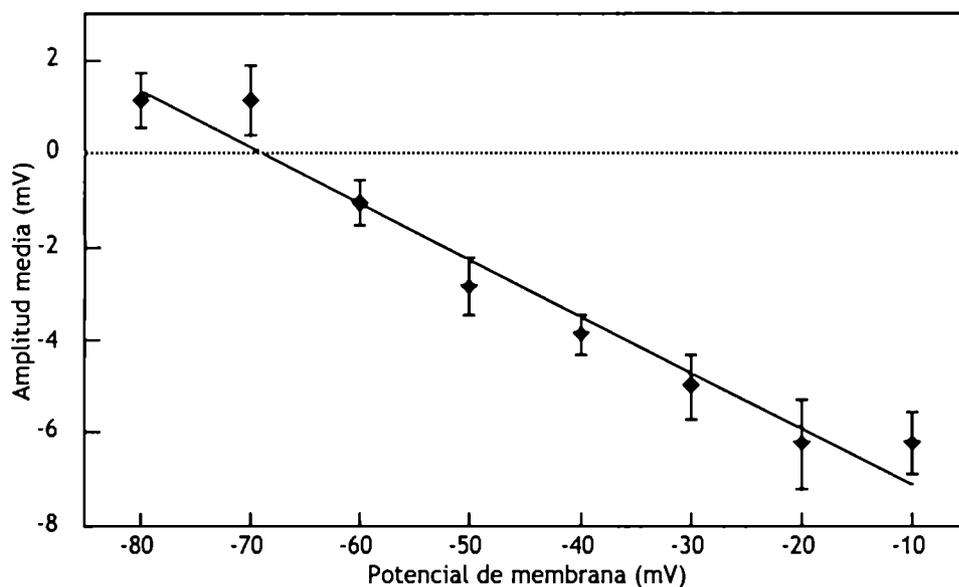


Figura 5.2. Amplitud de la respuesta de la motoneurona AE a los pulsos de 5-HT, en función de su potencial de membrana.

Gráfico de la amplitud promedio de las respuestas de la motoneurona AE a pulsos de 5-HT en función del potencial de membrana de la neurona. Los valores se obtuvieron a partir de experimentos similares al mostrado en la figura 5.1 (n=8). Se realizó un ajuste lineal ($R=0.98$) y se calculó un potencial de reversión de la respuesta de -67.9 ± 7.9 mV, en la intersección de la recta con $y=0$. La concentración de 5-HT en la pipeta fue de $100\mu\text{M}$. Las barras indican el error estándar.

Efecto de distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre la respuesta de la motoneurona AE a los pulsos de 5-HT.

Con el fin de encontrar herramientas farmacológicas capaces de inhibir las respuestas de las neuronas AE a pulsos de 5-HT se probaron distintos antagonistas de receptores de 5-HT en su capacidad de anular dicha respuesta. En este estudio se analizaron los efectos de los antagonistas metiotepina, metisergide, mianserina y ketanserina, los cuales fueron elegidos por su probada acción en neuronas de invertebrados. Todos los antagonistas fueron examinados en una concentración de $100\mu\text{M}$. En invertebrados esta concentración probó ser una concentración máxima adecuada para una gran variedad de antagonistas específicos de neurotransmisores (Trudeau & Castellucci, 1993). En la figura 5.4 se muestran registros de las respuestas de neuronas AE a los pulsos de 5-HT tras 5 minutos de perfusión con cada uno de los antagonista (trazos grises), superpuestos con los registros de la respuesta control (trazos negros).

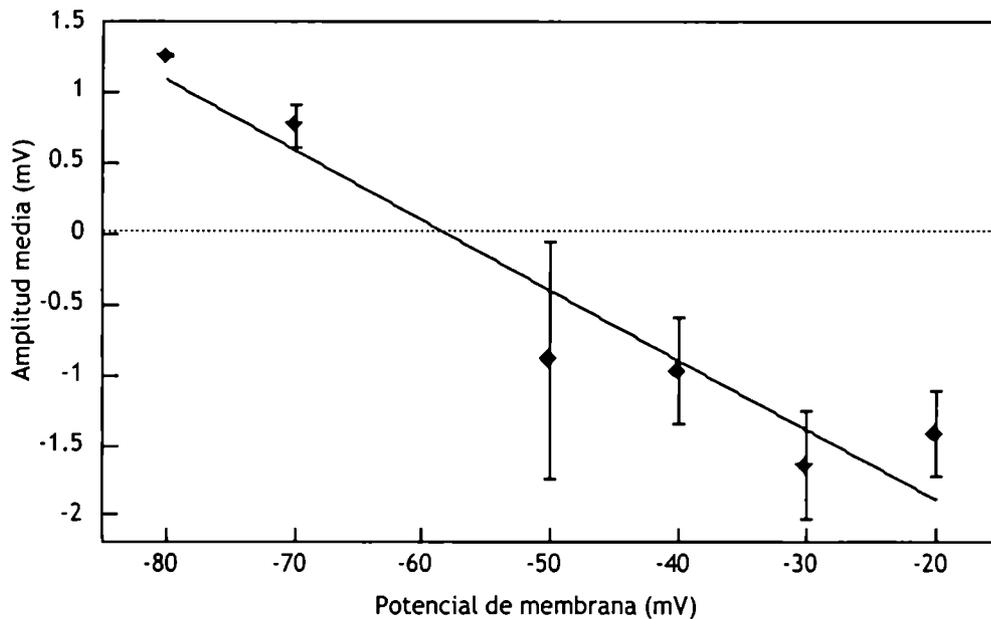
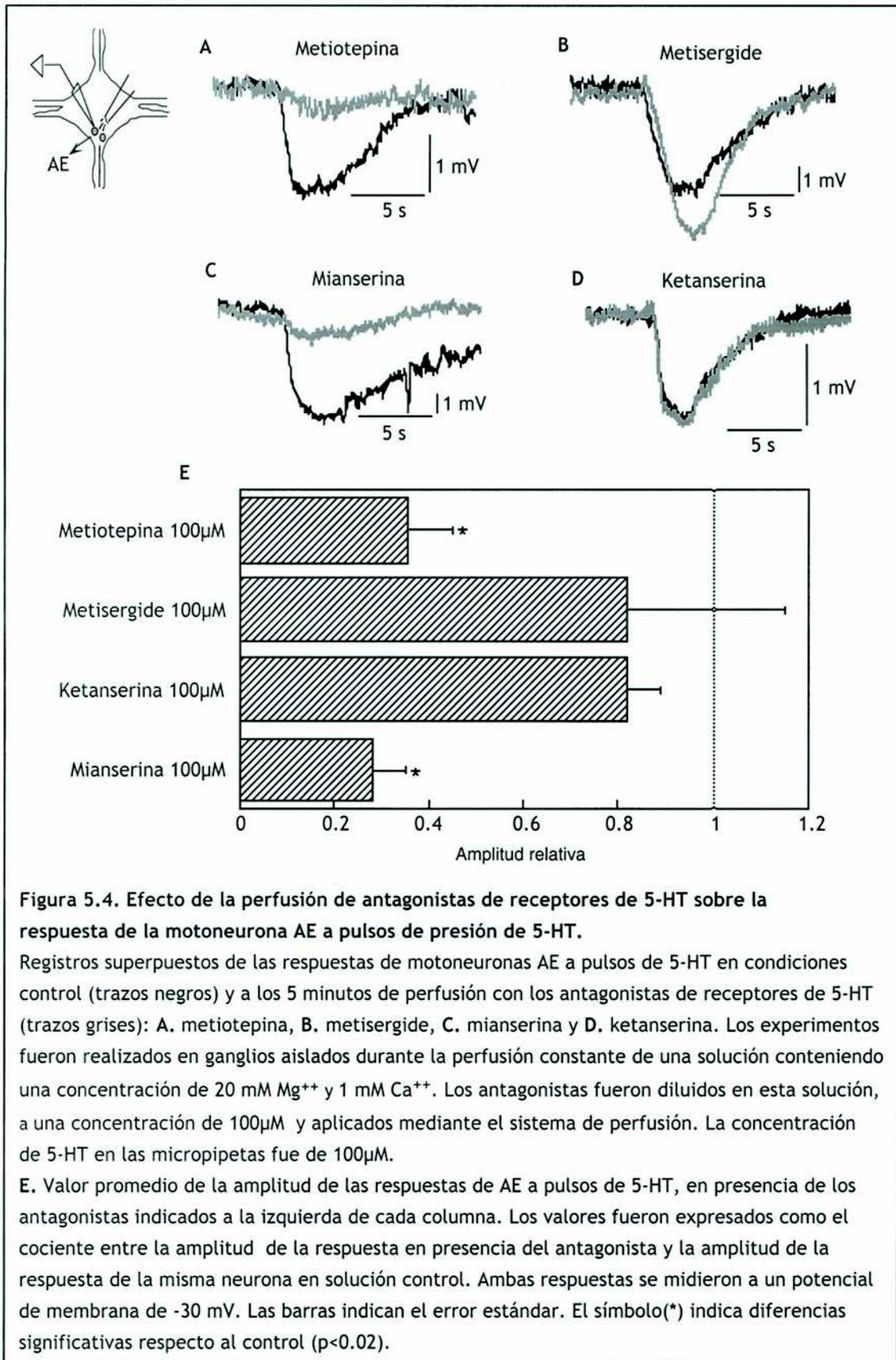


Figura 5.3. Amplitud de la respuesta de la neurona P a los pulsos de 5-HT, en función de su potencial de membrana.

Gráfico de la amplitud promedio de las respuestas de la neurona P a pulsos de 5-HT en función del potencial de membrana de la neurona. Los valores son el promedio de las amplitudes de las respuestas a los pulsos de 5-HT a distintos potenciales de membrana (n=4). Se realizó un ajuste lineal ($R=0.95$) y se calculó un potencial de reversión de la respuesta de -57.2 ± 18.4 mV, en la intersección de la recta con $y=0$. La concentración de 5-HT en la pipeta fue de $100\mu\text{M}$. Las barras indican el error estándar.

Durante la perfusión de los antagonistas metisergide y ketanserina no se observaron variaciones en la amplitud de las respuestas de AE a los pulsos de 5-HT con respecto a las respuestas control (figura 5.4 B y D), mientras que los antagonistas metiotepina y mianserina produjeron una marcada disminución de la amplitud de estas respuestas (figura 5.4 A y C). No fue posible revertir esta inhibición aún después de 30 minutos de lavado con solución normal.

Para cuantificar el efecto de los distintos antagonistas se calculó la razón entre la amplitud de la respuesta de las motoneuronas AE a los pulsos de 5-HT en presencia de los antagonistas sobre la amplitud control. Las barras de la figura 5.4 E muestran el promedio de la amplitud relativa observada para cada uno de los antagonistas estudiados. Las amplitudes relativas de las respuestas de las neuronas AE a pulsos de serotonina en presencia de metisergide y ketanserina se mantuvieron cerca de la unidad, mientras que en presencia de metiotepina y mianserina las respuestas se redujeron un 65 y 72 %, respectivamente.



Discusión

En este capítulo se analizó el efecto de pulsos de serotonina sobre la neurona AE, aislándola del resto de la red neuronal mediante el uso de una solución con alto Mg^{++} . La aplicación de pulsos de serotonina sobre el soma de las motoneuronas AE produjo respuestas inhibitorias que se activaron con el inicio del pulso, mantuvieron su amplitud durante el período de duración del mismo y decayeron lentamente. Estudios anteriores mostraron que la aplicación de pulsos eyectados por presión producen efectos relativamente localizados a la zona de aplicación (Szczupak *et al.*, 1998). Por ello, los resultados alcanzados sugieren que las neuronas AE exhiben receptores a serotonina distribuidos en, o muy cerca, del soma.

El potencial de reversión de esta respuesta fue cercano al potencial de equilibrio del Cl^- que en sanguijuelas se encuentra entre los -65 y -70 mV (Munsch & Schlue, 1993), por lo que se deduce que la respuesta a serotonina está mediada por la activación de una conductancia a este anión.

Es interesante observar que esta respuesta escapó a los efectos que la resistencia de entrada de AE presenta con las variaciones del potencial (Capítulo 3). La figura 5.2 muestra una relación lineal entre la amplitud de la señal y el potencial de membrana en el rango -10 a -70 mV. En este rango se mostraron variaciones importantes en la impedancia de membrana (figura 3.7), y como consecuencia de ello, en la amplitud de las respuestas sinápticas. Esto puede deberse a que la activación de los receptores serotoninérgicos causó, *per se*, una caída significativa de la resistencia de entrada que enmascaró las variaciones causadas por el cambio de potencial.

Conductancias al Cl^- activadas por serotonina fueron previamente descritas en las neuronas mecanosensoriales P (Lessmann & Dietzel, 1995; Sanchez-Armass *et al.*, 1991) y en las neuronas serotoninérgicas Retzius (Lessmann & Dietzel, 1991). En estas últimas la serotonina activa dos conductancias al Cl^- , con distinta cinética, una de ellas se desensibiliza y la otra no (Lessmann & Dietzel, 1995).

La caracterización del perfil farmacológico de la respuesta de las motoneuronas AE a los pulsos de serotonina aplicados en el soma, se realizó utilizando aquellos antagonistas de receptores de serotonina que mostraron ser eficaces en sanguijuelas como el metisergide (Catarsi *et al.*, 1995) y la ketanserina (Mar & Drapeau, 1996), o en otros invertebrados como la mianserina (Norekian & Satterlie, 1996) y la metiotepina (Liao X. *et al.*, 1999; Sun & Schacher, 1996).

Esta respuesta a serotonina presentó un perfil farmacológico particular. Fue

inhibida por el antagonista de los receptores 5-HT1 metiotepina y por el inhibidor de los receptores 5-HT2 mianserina (Poyurovsky M, 1999), pero no fue afectada por el antagonista genérico de los receptores serotoninérgicos metisergide ni por el antagonista de receptores 5-HT2, ketanserina (Van Nueten JM, 1983; Awouters , 1985). Recientemente se ha descrito un receptor ionotrópico de serotonina con un perfil farmacológico similar en neuronas de *C. elegans* cuya activación genera una corriente de cloro (Ranganathan *et al.*, 2000).

Capítulo 6: Efecto de la perfusión de serotonina sobre las propiedades intrínsecas de las motoneuronas AE y las neuronas sensoriales P.

Efecto de la perfusión de 5-HT sobre la motoneurona AE.

Inicialmente se estudió el efecto de la presencia de serotonina en el baño sobre las propiedades intrínsecas de las motoneuronas AE. A tal fin, en ganglios aislados, se midieron la resistencia de entrada y el potencial de reposo antes y durante la perfusión con una solución de 5-HT en concentraciones de 10, 50 ó 100 μM .

La presencia de 5-HT en el baño produjo una disminución de la resistencia de entrada de la motoneurona AE cuya magnitud mostró una clara dependencia con la concentración (figura 6.1 A). Serotonina 10 μM no produjo cambios en la resistencia de entrada de AE, mientras que 5-HT 50 y 100 μM produjeron una disminución respecto del control del 32 y 53 %, respectivamente.

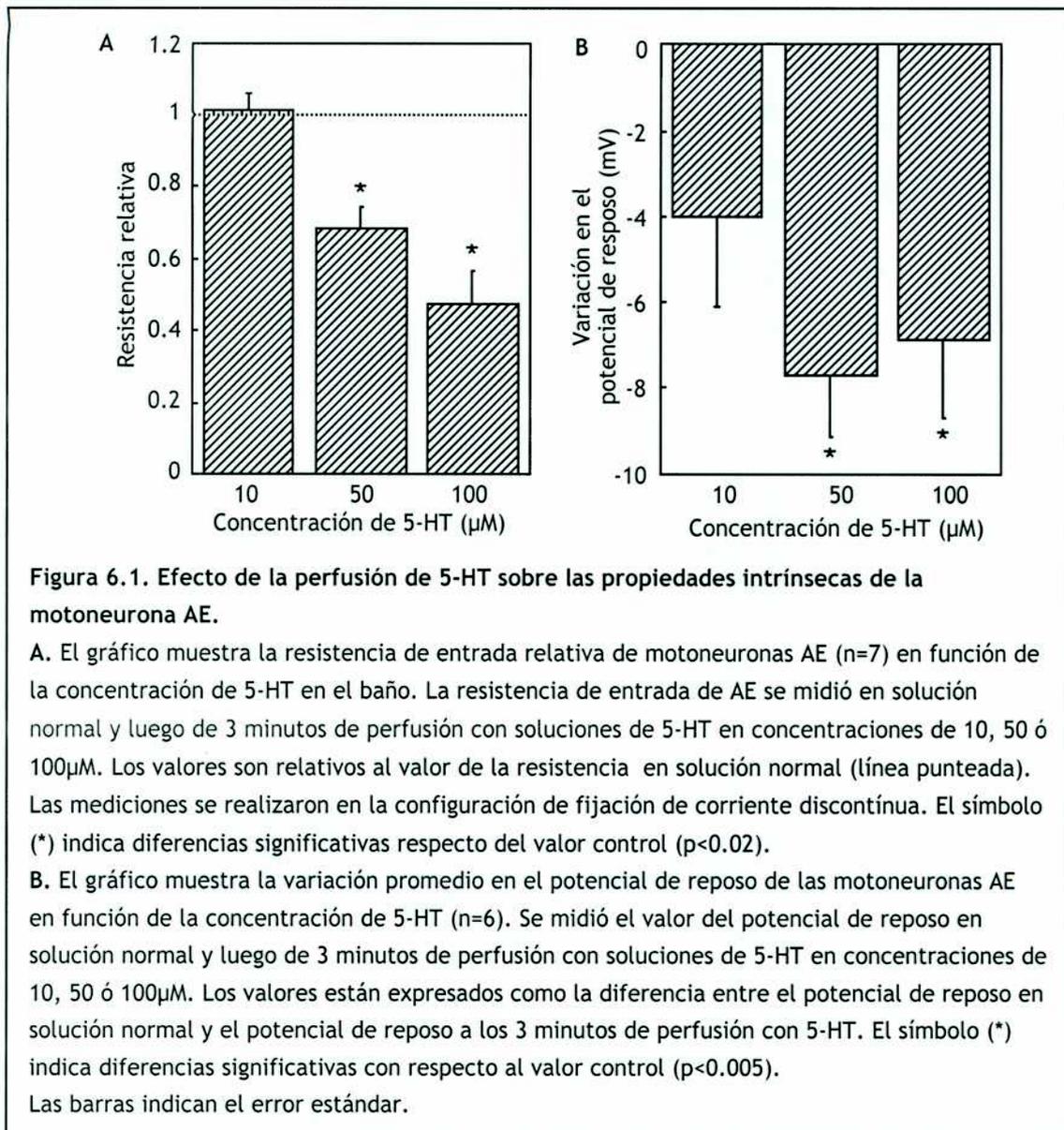
Concomitantemente, la perfusión con 5-HT produjo una hiperpolarización del potencial de membrana de la motoneurona AE cuya dependencia con la concentración no fue paralela a la expresada en los cambios de la resistencia de entrada (figura 6.1 B). Serotonina 10 μM produjo un cambio en el potencial de membrana de AE que no resultó estadísticamente significativo, y 5-HT 50 μM produjo el cambio máximo no superado por 5-HT 100 μM .

Efectos de la perfusión 5-HT sobre la neurona P.

También se estudiaron los efectos de la perfusión de 5-HT sobre las propiedades intrínsecas de la neurona sensorial P. Para ello se tomaron los valores de la resistencia de entrada y del potencial de membrana de P antes y durante la perfusión con soluciones de 5-HT en concentraciones de 50 ó 100 μM . La 5-HT exógena, a ninguna de las concentraciones utilizadas produjo variaciones en la resistencia de entrada de la neurona mecanosensorial P. Las resistencias relativas al valor control fueron de 1.2 ± 0.2 (n=5) para 50 μM y de 1.2 ± 0.1 (n=8) para 100 μM . La perfusión con 5-HT tampoco afectó el potencial de membrana de las células P.

Sin embargo es importante mencionar que luego de la perfusión de 5-HT por tiempos superiores a los 5 minutos, se observó una disminución en la excitabilidad de las neuronas P y en algunos casos no fue posible evocar un potencial de acción aún a altas intensidades del estímulo. Durante la perfusión de 5-HT 50 μM no fue posible evocar potenciales de acción en P en el 28 % de los casos (n=25). En 4 de estos casos fue posible revertir esta pérdida de la excitabilidad tras 5 minutos de

lavado con solución normal. Durante la perfusión de 5-HT 100 μM P falló en el 63 % de los casos ($n=11$) y en todos este efecto pudo ser revertido a partir de los 5 minutos de lavado. Este fenómeno no se observó durante la perfusión de 5-HT 10 μM , pero a esta concentración en 4 de 6 casos se observó el disparo espontáneo de potenciales de acción aislados, de la neurona P.



Efecto de los distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE.

Con el objetivo de determinar la existencia de una posible modulación de las propiedades de las motoneuronas AE por un tono basal de 5-HT endógena, se evaluaron los efectos de la presencia de los antagonistas metisergide, mianserina, ketanserina y metiotepina sobre su potencial de membrana y resistencia de entrada.

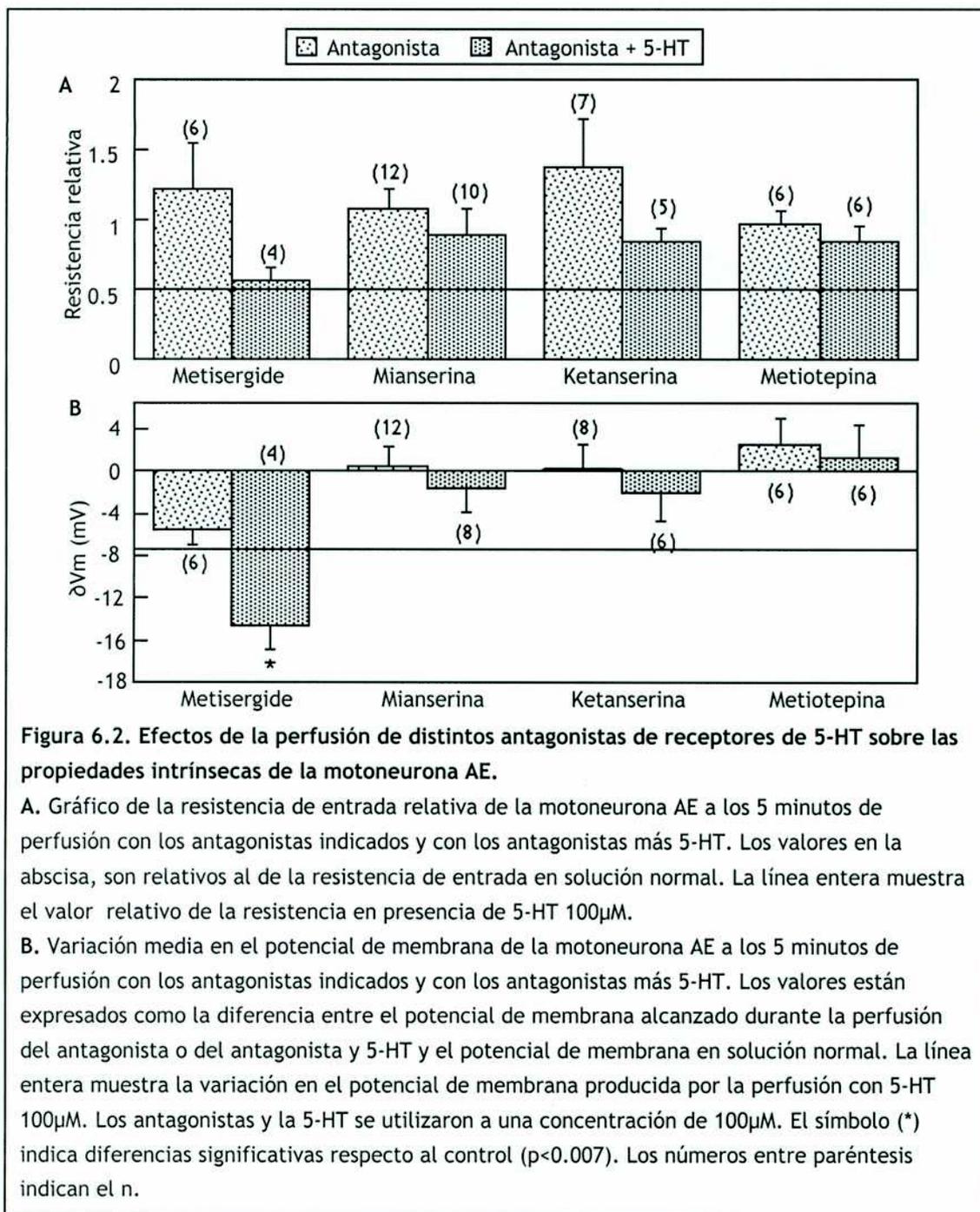
También se estudió la capacidad de estos antagonistas de inhibir los efectos de la 5-HT exógena sobre las propiedades intrínsecas de la motoneurona AE observados en el punto anterior. Para ello se realizaron experimentos, en ganglios aislados, en los que se midieron el potencial de membrana y la resistencia de entrada de motoneuronas AE en solución normal, a los 5 minutos de la perfusión con cada uno de los antagonistas y a luego de 5 minutos de coperfusión con el antagonista más 5-HT. Tanto los antagonistas como la serotonina fueron examinados a una concentración final de 100 μM .

En los gráficos de barras de la figura 6.2 se resumen los efectos de cada antagonista *per se* y del antagonista más 5-HT, sobre la resistencia de entrada (A) y el potencial de membrana (B) de la motoneurona. Los efectos sobre la resistencia se expresaron como la razón entre la resistencia de entrada de las neuronas AE en presencia de cada uno de los antagonistas sobre la resistencia control (tratado/control, 'resistencia relativa') y la variación del potencial de membrana como la diferencia entre el potencial de membrana en cada uno de los tratamientos y el control (tratado - control).

La perfusión de los antagonistas metisergide, mianserina, ketanserina y metiotepina no modificó la resistencia de entrada de las motoneuronas AE con respecto a los valores en solución normal (figura 6.2 A). Sin embargo, los antagonistas mianserina, ketanserina y metiotepina inhibieron los efectos de la perfusión de 5-HT sobre la resistencia de entrada de la motoneurona AE. Como se mostró en el punto anterior, la perfusión de 5-HT 100 μM produjo una caída en la resistencia de entrada de las neuronas AE de aproximadamente 50 % (figura 6.1 A). Esto se indica en la figura 6.2 A con una línea entera y, como puede observarse, en presencia de estos antagonistas la serotonina no modificó el valor de la resistencia de entrada de las neuronas AE, que fueron similares a las medidas en condiciones control. El antagonista metisergide no fue capaz de antagonizar el efecto de la 5-HT exógena, aunque en su presencia el cambio producido por la serotonina no resultó estadísticamente significativo respecto del control ($p=0,08$).

Los efectos de la perfusión de los distintos antagonistas sobre el potencial de membrana se muestran en la figura 6.2 B. Ninguno de los antagonistas produjo, *per se*, variaciones significativas sobre el potencial de membrana de la motoneurona AE. La perfusión con 5-HT 100 μM produjo una hiperpolarización de aproximadamente 7 mV (figura 6.1 B) lo que se señala en la figura 6.2 B con una línea entera. La perfusión de mianserina, ketanserina y metiotepina antagonizaron la hiperpolarización de la motoneurona AE producida por la 5-HT exógena. Al igual que

con la resistencia, el antagonista metisergide no fue capaz de antagonizar los efectos de la 5-HT exógena sobre el potencial de membrana (figura 6.2 B).



Discusión

En este capítulo analizamos el efecto de serotonina afectando a toda la neurona AE. En concordancia con los efectos producidos por los pulsos de serotonina eyectados por presión sobre el soma de estas neuronas (Capítulo 5), la presencia de serotonina en el medio externo produjo una hiperpolarización del potencial de membrana de la motoneurona AE que se sostuvo durante el período de aplicación de

esta monoamina en el medio externo. Esto indicaría que los receptores responsables de este efecto no se desensibilizan en presencia del agonista y, por el contrario, permiten generar cambios sostenidos en el potencial de membrana de la motoneurona AE.

El efecto sobre el potencial de membrana se vio acompañado por un cambio en la resistencia de entrada de las motoneuronas debido, posiblemente, al aumento en la conductancia responsable de la hiperpolarización. De ser así, es de notar que mientras una concentración de 5-HT de 50 μM produjo un cambio máximo en el potencial de membrana, 5-HT 100 μM pudo aún acentuar la reducción en la resistencia. Esto indicaría que la apertura de canales causada por 50 μM habría llevado al potencial de membrana de la neurona al valor de reversión de la respuesta a la 5-HT. Un aumento en la concentración externa de 5-HT pudo abrir un mayor número de canales, causando una mayor caída en la resistencia de entrada, sin traducirse en un cambio adicional en el potencial de membrana. Sin embargo, los experimentos realizados con pulsos de presión (figura 5.2) indicaron un potencial de reversión de alrededor de -70 mV, mientras que una hiperpolarización máxima de -8 mV a partir del potencial de reposo lleva a un potencial de membrana de alrededor de -45 mV. Una manera de saldar esta discordancia es comprender que mientras los pulsos actúan de manera relativamente localizada y acotada en el tiempo, la aplicación de un agonista al medio externo actúa de manera extensiva tanto en el orden espacial como temporal. Los cambios producidos por la presencia sostenida del neurotransmisor pueden alterar, entre otras cosas, el potencial de equilibrio del ion cuya conductancia es activada, y por lo tanto modificar la magnitud del cambio de potencial que genera.

La perfusión con serotonina no modificó el potencial de reposo o la resistencia de entrada de las neuronas mecanosensoriales P. Sin embargo, estudios realizados en el laboratorio del Dr. Drapeau (Sanchez-Armass *et al.*, 1991) mostraron que las neuronas P aisladas en cultivo respondieron a aplicaciones de 5-HT con la generación de una conductancia al Cl^- y una conductancia catiónica inespecífica. *In situ*, estas corrientes no se evidenciaron como un cambio consistente del potencial de membrana. Múltiples razones pueden explicar estas diferencias en los resultados obtenidos en esquemas experimentales altamente diferentes. Por ejemplo se conoce que existe una redistribución de los receptores de serotonina expresados por las células P en cuando hacen contacto sináptico con otras células (Drapeau & Sanchez-Armass, 1988), por lo que es altamente probable que su expresión *in vivo* difiera de la del cultivo. También, en preparaciones semi-intactas (ganglio unido a la pared

celular del segmento correspondiente y de los segmentos adyacentes) mostraron que la serotonina favorece la conducción de señales provenientes de los campos receptivos secundarios hacia el soma de las neuronas P, minimizando el fenómeno conocido como "bloqueo de conducción" y que se produce en la transmisión de señales desde neuritas finas (en los terminales sensoriales) hacia zonas del árbol con neuritas de calibre creciente (Mar & Drapeau, 1996). Esta modulación se ejerce a través de receptores sensibles a metisergide y a ketanserina.

Las concentraciones de 5-HT utilizadas en este trabajo son similares a las utilizadas en otros trabajos en sanguijuelas, por ejemplo para facilitar la aparición de episodios de nado, en preparaciones del sistema nervioso aislado (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989) o para estudiar modificaciones en la interacciones entre elementos del circuito de nado (Angstadt & Friesen, 1993b; Angstadt & Friesen, 1993a; Mangan *et al.*, 1994a; Mangan *et al.*, 1994b). Concentraciones de 5-HT similares también se utilizaron en trabajos realizados en otros invertebrados como *Tritonia* (Katz *et al.*, 1994) y *Aplysia* (Mauelshagen *et al.*, 1998).

Los antagonistas mianserina y metiotepina inhibieron los efectos de la serotonina exógena sobre el potencial de membrana y también sobre la resistencia de entrada de la motoneurona AE, por lo que se confirma su eficacia como antagonistas en este sistema. Sin embargo, el antagonista de receptores de 5-HT₂, ketanserina, inhibió los efectos de la perfusión de 5-HT sobre la resistencia de entrada y el potencial de membrana de AE, pero no tuvo efecto sobre las respuestas generadas por pulsos de serotonina sobre el soma. Dado que los tres antagonistas bloquearon el efecto inhibitorio de serotonina de manera casi total es difícil concebir la existencia de sub-poblaciones de receptores, pero queda por resolver por qué la ketanserina no resultó efectiva ante la aplicación localizada de serotonina.

La perfusión de los distintos antagonistas de receptores de 5-HT no produjo variaciones en la resistencia de entrada ni en el potencial de membrana de las motoneuronas AE. Estos resultados nos indican, en principio, que estas drogas *per se* no están modificando conductancias ni provocando daño alguno en las motoneuronas. Esto también sugiere que los niveles basales de 5-HT endógena no ejercen una modulación generalizada sobre la motoneurona AE como para afectar la medición de estos parámetros en el soma.

Capítulo 7: Efectos de la perfusión de 5-HT sobre la interacción P-AE.

Finalmente se estudiaron los efectos de la presencia de 5-HT en el medio externo sobre la interacción sináptica entre las neuronas mecanosensoriales P y las motoneuronas AE. Para ello se realizaron registros de las respuestas de las neuronas AE a la estimulación de neuronas P en condiciones control, después de 3 minutos de perfusión con 5-HT y a los 20 minutos de lavado con solución normal. Para estudiar los efectos de la 5-HT sobre las dos fases de la respuesta de la motoneurona AE por separado, se tomaron registros a dos potenciales de membrana de AE, a -30 mV y a -70 mV, en los que se midieron las amplitudes de los potenciales postsinápticos inhibitorios y excitatorios, respectivamente.

En el capítulo anterior se mencionó que a tiempos de perfusión con 5-HT 50 y 100 μM superiores a los 5 minutos, la excitabilidad de las neuronas P se perdía en un 23 y 70 % de los casos, respectivamente. Estos estudios se realizaron a tiempos de perfusión no mayores a los 5 minutos y se descartaron los casos en que no fue posible evocar potenciales de acción en la neurona sensorial P.

La presencia de 5-HT en la solución de perfusión produjo una disminución de la amplitud de la fase hiperpolarizante de la respuesta, mientras que los potenciales

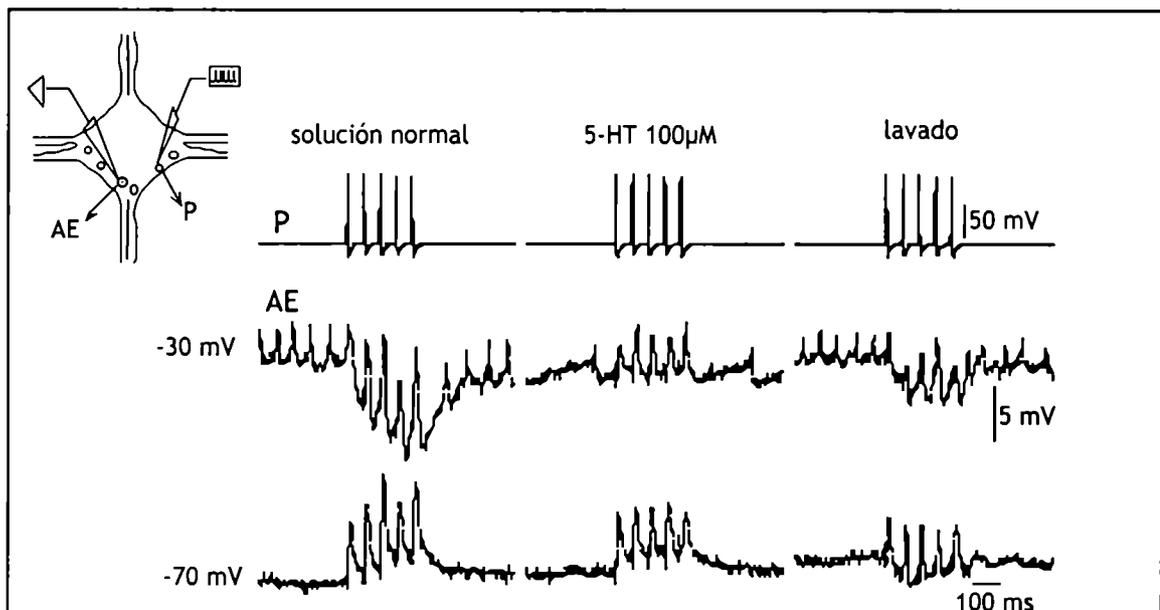


Figura 7.1. Efecto de la perfusión de 5-HT sobre la respuesta de la motoneurona AE a la estimulación de P.

Registros representativos de las respuestas de una motoneurona AE a un tren de potenciales de acción evocado en P en solución normal, a los 3 minutos de perfusión con una solución de 5-HT 100 μM y luego de 20 minutos de lavado con solución normal. Los registros se realizaron a dos potenciales de membrana de la motoneurona AE, -30 y -70 mV indicados a la izquierda de los trazos.

postsinápticos excitatorios no se vieron afectados (figura 7.1). Este efecto de la serotonina sobre la hiperpolarización pudo ser revertido aproximadamente a los 20 minutos de lavado con solución normal.

A continuación estudiamos la dependencia de la inhibición de los potenciales postsinápticos inhibitorios con la concentración de 5-HT en la solución de perfusión. Para esto se realizaron experimentos similares al de la figura 7.1 utilizando soluciones de 5-HT en concentraciones de 10, 50 ó 100 μM . Los resultados de esta serie de experimentos se resumen en la figura 7.2, donde se cuantificaron por separado los efectos sobre cada una de las fases de la respuesta. Los resultados se expresaron como la amplitud relativa, esto es la razón entre la amplitud de la respuesta en presencia de serotonina y la amplitud de la respuesta control (en solución normal).

La disminución de la amplitud de la fase inhibitoria de la respuesta de la motoneurona AE, mostró una clara dependencia con la concentración de 5-HT (figura 7.2 A). Serotonina 10 μM no produjo cambios significativos en la amplitud de los potenciales postsinápticos inhibitorios, mientras que concentraciones de 50 y 100 μM produjeron disminuciones del 47 y el 79 %, respectivamente, comparados con los valores control (n=7). Los efectos de las tres concentraciones fueron

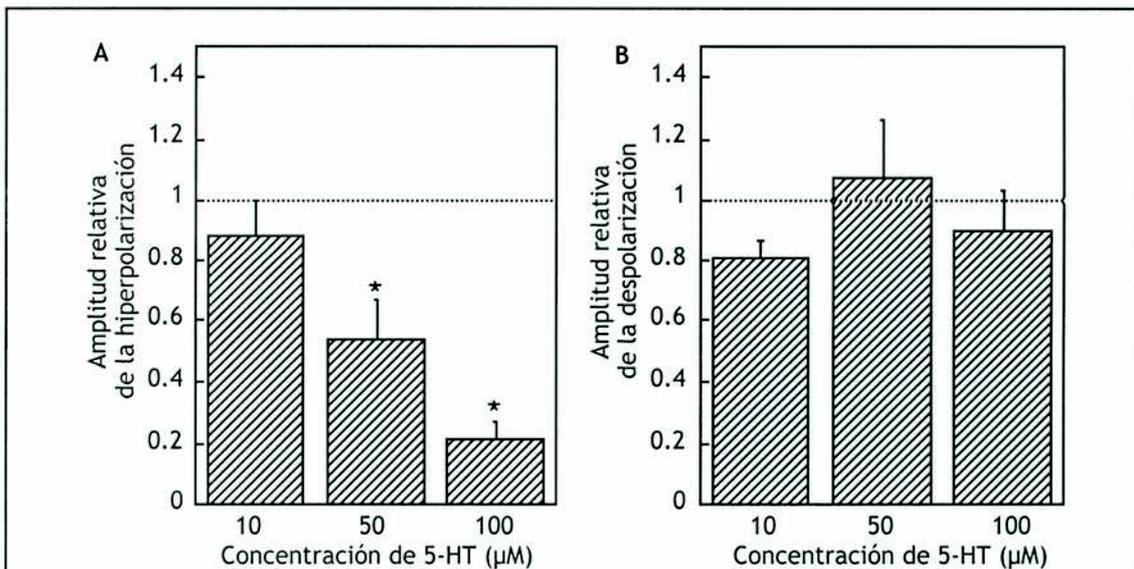


Figura 7.2. Efecto de la perfusión de 5-HT sobre la respuesta de la motoneurona AE a la estimulación de P.

Los gráficos muestran las amplitudes relativas de la fases inhibitoria (A) y excitatoria (B) de la respuesta de motoneuronas AE a la estimulación de P, a los 3 minutos de perfusión con soluciones de 5-HT 10, 50 ó 100 μM . Las amplitudes de la hiperpolarización se midieron en registros tomados a -30 mV y las de la despolarización a -70 mV, en experimentos similares al de la figura 7.1 (n=7). Los valores son relativos a la amplitud de la respuesta en solución normal (línea punteada). Las barras indican el error estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control (p<0.001).

estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$, t test muestras no pareadas).

Por su parte, la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios no se vio significativamente afectada por ninguna de las concentraciones de serotonina utilizadas (figura 7.2 B).

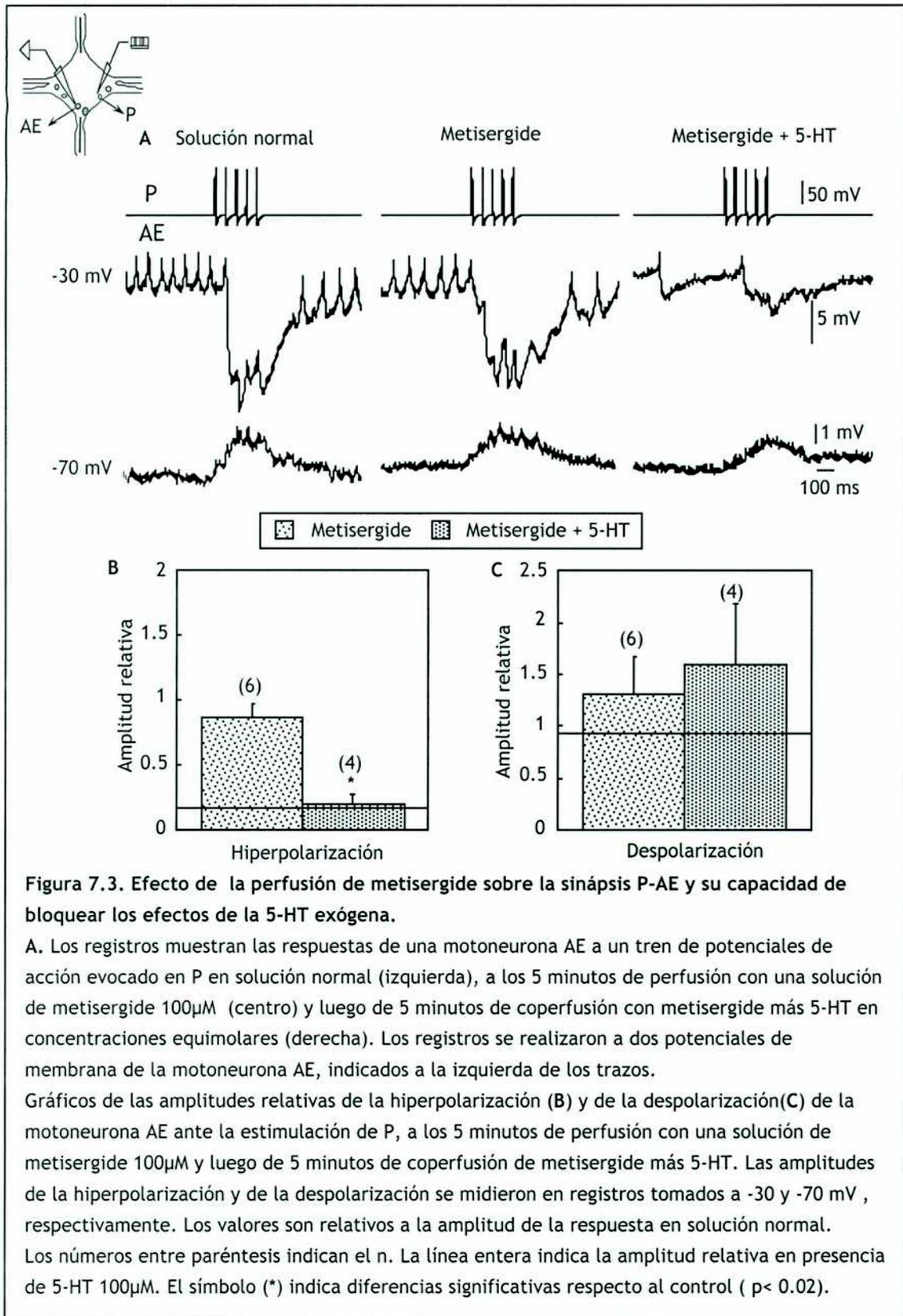
Efecto de distintos antagonistas de receptores de 5-HT sobre la interacción P-AE.

Los resultados de los experimentos realizados en el punto anterior nos permiten concluir que existe un posible sitio de regulación por serotonina sobre la vía polisináptica de la interacción P-AE. Para investigar la existencia de una modulación por la serotonina endógena liberada ante la estimulación sensorial, se estudiaron los efectos de la presencia de los antagonistas metisergide, mianserina, ketanserina y metiotepina en la solución de perfusión, sobre la interacción P-AE. También se analizó la capacidad de los mismos de inhibir la acción de la serotonina exógena sobre la fase hiperpolarizante de la respuesta de AE a la estimulación de P.

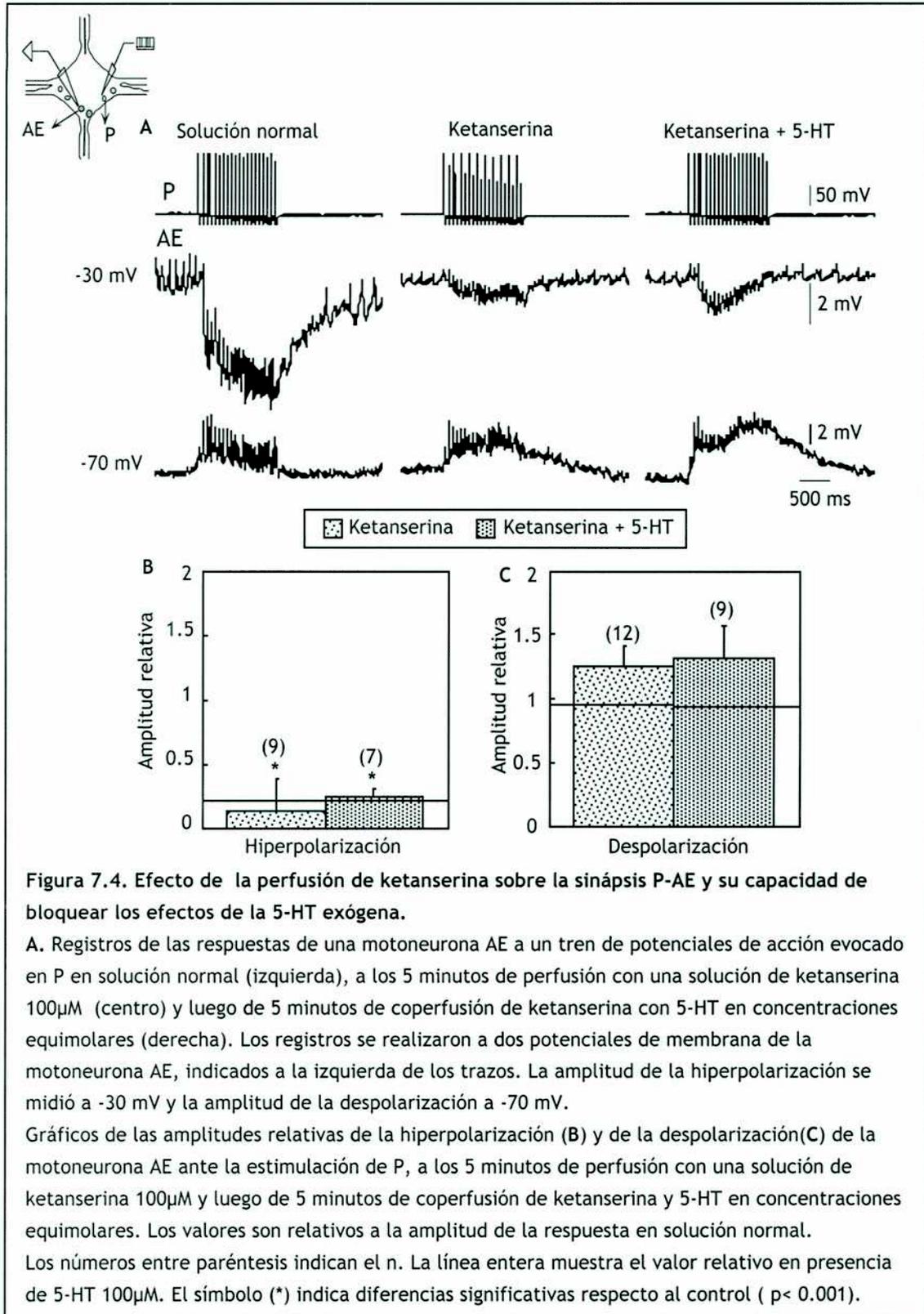
La interacción P-AE se estudió en ganglios aislados en solución normal, luego de 5 minutos de perfusión con una solución de alguno de los antagonistas y, finalmente, tras 5 minutos de coperfusión del antagonista más serotonina en concentraciones equimolares. Se tomaron registros de las repuestas de las neuronas AE a los potenciales evocados en P a dos potenciales de membrana de las motoneuronas AE, -30 y -70 mV, para obtener información sobre cada una de las fases de la respuesta por separado. Los antagonistas y la serotonina fueron estudiados a una concentración de 100 μM . Los resultados se expresaron como la amplitud relativa, esto es la razón entre el valor de la amplitud en cada tratamiento y el valor de la amplitud en condiciones control. A continuación se analizará el efecto de cada uno de los cuatro antagonistas estudiados.

El antagonista metisergide no tuvo efecto alguno sobre la interacción sináptica P-AE. En la figura 7.3 A, se muestran registros representativos de las respuestas de una neurona AE a -30 y -70 mV, bajo las siguientes condiciones experimentales: control, metisergide, y metisergide más serotonina. La perfusión con metisergide no produjo *per se* cambios significativos en ninguna de las dos fases de la interacción P-AE. Además, como puede observarse en los registros de la derecha, en presencia de metisergide la 5-HT inhibió la expresión de la fase hiperpolarizante de la respuesta de AE a la estimulación de P. Un resumen cuantitativo de estos efectos sobre las fase hiperpolarizante y despolarizante se muestra en las figuras 7.3 B y C, respectivamente. En presencia de este agente farmacológico las amplitudes relativas de las fases hiper y despolarizante fueron

similares al control y la coperfusión con serotonina no afectó la inhibición que la monoamina ejerce sobre la fase hiperpolarizante (indicado en la figura 7.3 B con una línea entera).



La perfusión con ketanserina produjo *per se* una disminución en la amplitud de la fase hiperpolarizante de la respuesta de AE, similar a la producida por la perfusión de 5-HT 100 μ M (figura 7.4 A). Durante la coperfusión del antagonista con 5-HT la amplitud de la hiperpolarización se mantuvo en un nivel de inhibición



similar. En la figura 7.4 B puede observarse que la amplitud relativa promedio de la hiperpolarización en presencia de ketanserina, disminuyó a valores similares a los observados en presencia de 5-HT 100 μ M (línea entera). La amplitud de la fase excitatoria de la respuesta no se vio afectada en ninguna de las dos condiciones experimentales (figura 7.4 C). Dado que la ketanserina actuó en el mismo sentido que la serotonina consideramos la hipótesis de que este antagonista estuviera actuando como agonista de receptores serotoninérgicos en este sistema. Para ello se aplicaron pulsos de ketanserina sobre el soma de las neuronas AE, eyectados por presión desde una pipeta conteniendo ketanserina 1 mM. Estos pulsos no produjeron ningún cambio en la actividad eléctrica de las neuronas AE, por lo que desestimamos esta hipótesis.

La metiotepina tuvo un efecto potenciador sobre la fase hiperpolarizante de la respuesta de AE a la estimulación de P y este efecto mostró una clara dependencia de la amplitud de la respuesta control. A partir de las diferencias observadas entre las amplitudes de las fases hiperpolarizantes en condiciones control, fue posible separar a los animales en dos grupos. En aquel en que la amplitud de la respuesta inhibitoria en condiciones control era baja, la perfusión con metiotepina produjo un aumento en la amplitud de esta fase de la respuesta, sin afectar a la despolarización. Por otra parte la metiotepina también fue capaz de antagonizar los efectos de la 5-HT exógena sobre la hiperpolarización (figura 7.5).

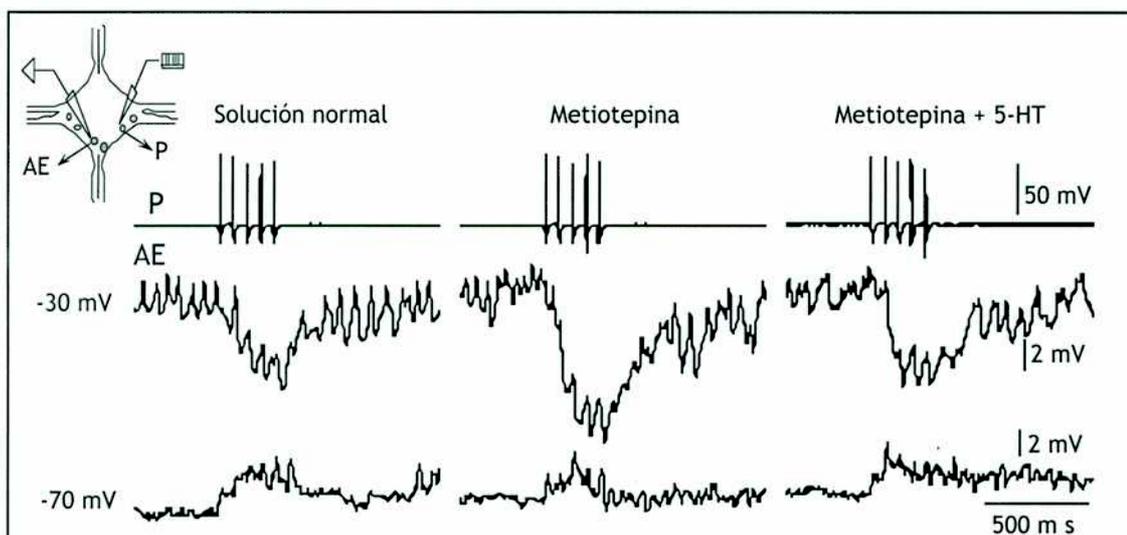
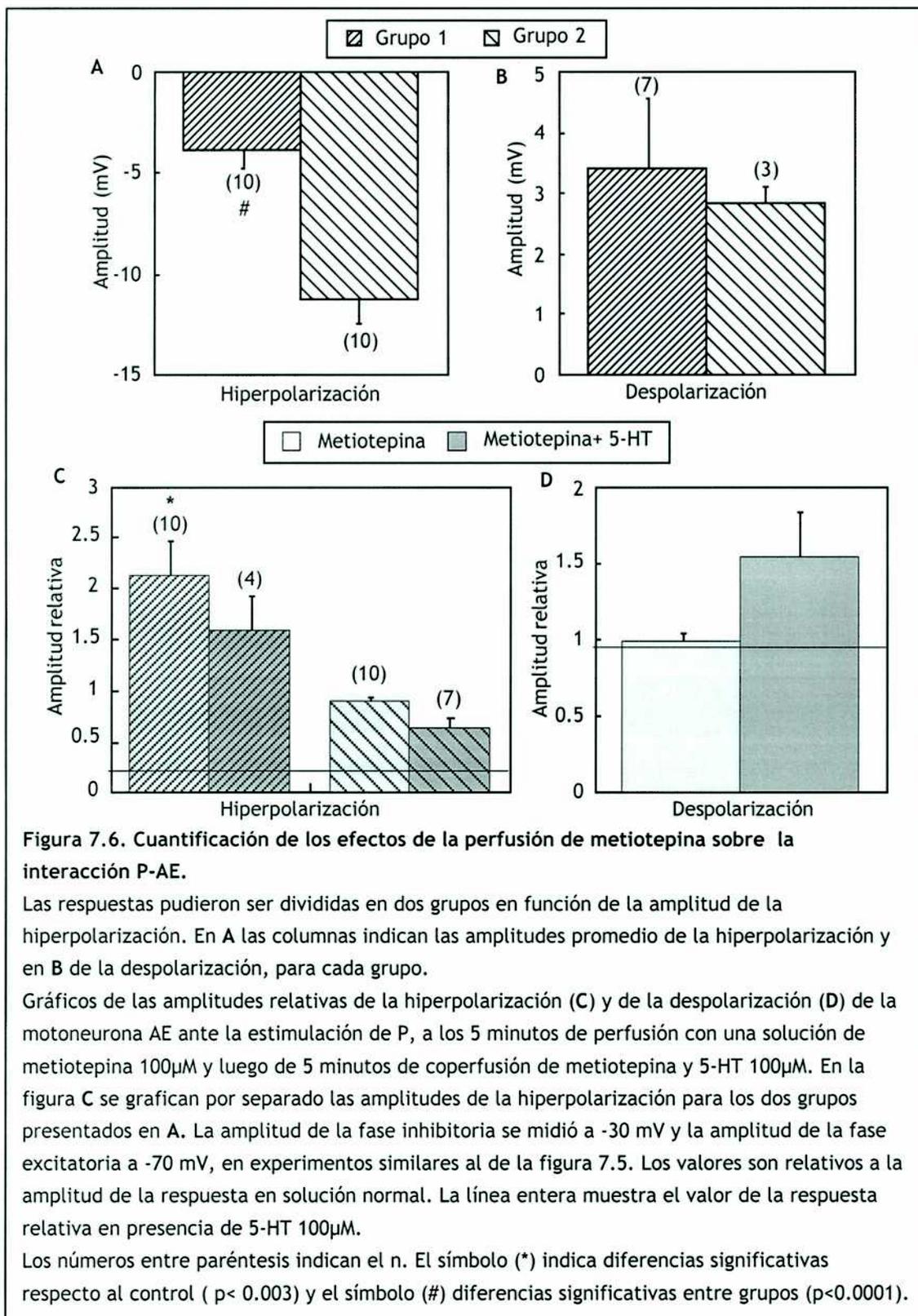


Figura 7.5. Efecto de la perfusión de metiotepina sobre la sinápsis P-AE y su capacidad de bloquear los efectos de la 5-HT exógena.

Los registros muestran las respuestas de una motoneurona AE a un tren de potenciales de acción evocado en P en solución normal (izquierda), a los 5 minutos de perfusión con una solución de metiotepina 100 μ M (centro) y luego de 5 minutos de coperfusión con metiotepina más 5-HT en concentraciones equimolares (derecha). Los registros se realizaron a dos potenciales de membrana de la motoneurona AE, indicados a la izquierda de los trazos.

Las figuras 7.6 A y B muestran las amplitudes medias de las hiperpolarizaciones y despolarizaciones de cada grupo. Como puede observarse, existe una segregación natural significativa basada en la amplitud de la fase hiperpolarizante, pero ésta no estuvo acompañada por diferencias en la amplitud de



la fase despolarizante de cada grupo. El efecto de la metiotepina sobre los potenciales postsinápticos inhibitorios fue claramente diferente en cada grupo. En el grupo 1, de una amplitud control promedio de -4.8 mV, la metiotepina produjo un marcado aumento de la fase hiperpolarizante que se mantuvo, aunque disminuido, en presencia de serotonina (figura 7.6 C). En el grupo 2, cuya amplitud media fue de -11 mV, la metiotepina *per se* no causó cambios en la amplitud de la fase hiperpolarizante pero evitó la inhibición causada por la serotonina exógena (figura 7.6 C). La despolarización no se vio afectada por este antagonista aunque en presencia de serotonina se manifestó un aumento que no resultó estadísticamente significativo (figura 7.6 D).

Finalmente, el antagonista mianserina tuvo un efecto complejo sobre la interacción P-AE. La perfusión de mianserina no modificó, *per se*, la respuesta de AE a la estimulación de P. Sin embargo, como puede observarse en la figura 7.7 A, la coperfusión del antagonista con 5-HT produjo un aumento drástico de la amplitud de la fase hiperpolarizante de la respuesta (registros de la derecha). En promedio la amplitud de la hiperpolarización aumentó de manera significativa respecto a la amplitud control en un 84 % (figura 7.7 B). La coperfusión de mianserina con 5-HT también produjo un aumento en amplitud de la despolarización, que en promedio fue un 95 % mayor que la amplitud control. Sin embargo, este aumento resultó estadísticamente no significativo ($p=0.06$), debido a una mayor dispersión de los datos (figura 7.7 C).

Discusión

En términos de la interacción sináptica P-AE, la serotonina aplicada al medio externo actuó de manera diferencial sobre ambas fases de la misma: por un lado disminuyó sustancialmente la manifestación de la fase hiperpolarizante mientras que no afectó a la fase despolarizante. Por lo tanto, la serotonina exógena afectó selectivamente a las respuestas mediadas por la vía polisináptica sin afectar la interacción directa entre P y AE.

La disminución en un 50 % del valor de la resistencia de entrada de la motoneurona AE en presencia de 5-HT 100 μM , nos hacía predecir una disminución similar de las amplitudes de las respuestas de esta motoneurona a la estimulación de P. Sin embargo la amplitud de la despolarización no se vio afectada por la presencia de 5-HT en la solución de perfusión. Esta invarianza en la amplitud de la respuesta despolarizante podría indicar que la serotonina produzca un aumento en la liberación del neurotransmisor utilizado por la neurona sensorial, que compense

la caída en la magnitud de la sensibilidad postsináptica. No poseemos aun evidencias directas sobre esta posibilidad.

En tanto que la despolarización no se vio alterada, es poco probable que la disminución en la resistencia sea la responsable de la disminución en la amplitud de la hiperpolarización. Una explicación más plausible sería que la 5-HT afecte a la(s) interneurona(s) que median la respuesta inhibitoria de AE a la estimulación de P.

Las respuestas sinápticas se midieron a potenciales prefijados y por lo tanto la disminución de la amplitud de la fase hiperpolarizante no puede ser considerada una mera consecuencia de los cambios en el potencial de membrana que produjo la serotonina sobre la motoneurona AE.

El perfil farmacológico del efecto de la serotonina sobre la capa interneuronal que media la interacción P-AE fue analizado en competencia con la serotonina exógena y endógena. Este mostró ser más complejo que el perfil de los receptores responsables de la acción directa de la serotonina sobre AE.

La ketanserina, no antagonizó el efecto inhibitorio de la serotonina y, aplicado *per se*, produjo un efecto similar al de la serotonina. La posibilidad de que la ketanserina actúe como agonista en este sistema se desestimó en base a que careció de efectos directos sobre la neurona AE. De todas maneras, no se pudo analizar de forma directa el efecto de la ketanserina sobre la capa interneuronal. En cambio, se sugiere que los efectos de este antagonista podrían estar señalando una acción moduladora positiva de la 5-HT sobre este circuito sensorio-motor.

La mianserina no sólo bloqueó los efectos inhibitorios de la serotonina sobre la interacción P-AE sino que potenció dicha interacción. Estos resultados podrían pensarse como una segunda evidencia de un efecto potenciador de la serotonina sobre el funcionamiento de la capa interneuronal que, para expresarse, requiere del bloqueo de receptores sensibles a mianserina.

La metiotepina actuó como un bloqueante de los efectos inhibitorios de la serotonina exógena ya que en su presencia la amplitud de la respuesta hiperpolarizante de AE fue similar a los valores control. Más aún, este antagonista reveló que la serotonina endógena puede ejercer un efecto depresor sobre la interacción P-AE ya que, *per se*, la metiotepina potenció las interacciones sinápticas de baja amplitud.

Estos efectos dispares del mismo modulador indican que la serotonina no actúa de manera generalizada sino que posiblemente importe cuáles sitios de liberación se activan, que regiones del árbol neurítico de las interneuronas afecta y sobre qué tipo de receptores actúa.

Conclusiones Generales

En este trabajo hemos alcanzado resultados que permiten extraer las siguientes conclusiones generales.

La motoneurona AE recibe dos señales simultáneas ante la activación de la neurona mecanosensorial P: una excitatoria y otra inhibitoria. Estas señales convergen en las neuronas AE a través de dos vías paralelas. La fase excitatoria de esta interacción está mediada por una sinápsis directa y la inhibitoria por una interacción polisináptica (Iscla *et al.*, 1999).

La neurona pasiva 151 (Wadepuhl, 1989) está conectada con el circuito P-AE de tal manera que puede afectar la transmisión de señales sinápticas en éste. Existe una sinápsis directa de tipo eléctrica rectificante entre la motoneurona AE y 151, capaz de afectar al potencial de membrana y la frecuencia de disparo de la motoneurona. A su vez, la hiperpolarización de la neurona 151 inhibe la transmisión de la fase inhibitoria, a través de la capa interneuronal, pero no afecta la interacción directa entre P y AE (Iscla *et al.*, 1999).

La respuesta inhibitoria de la neurona AE alcanza su máxima amplitud a poco de iniciarse el tren de estímulos en P y puede sostenerse durante un largo período de estimulación. Podemos concluir que la actividad de la motoneurona AE es sensible a la duración de la señal sensorial y a su intensidad: estímulos mecánicos capaces de activar a las neuronas P van producir una inhibición de AE que perdurará durante el período de estimulación y será proporcional a la intensidad del estímulo.

La magnitud de las respuestas de las neuronas AE dependen de la dirección del estímulo mecanosensorial. Las respuestas inhibitorias son máximas en los cuadrantes ipsilaterales al estimulado, mientras que las despolarizaciones se producen mayormente por estímulos a la cara dorsal del cuerpo.

La duración de la respuesta sináptica es también afectada por el potencial de membrana en el que ésta se registra ya que la resistencia de entrada de la motoneurona es sensible a este parámetro. La neurona AE tiene un valor pico de resistencia alrededor de -50 mV que decae en ambos sentidos en la escala de potenciales de membrana, produciendo una consecuente variación en la constante de tiempo de la neurona que afecta a la fase de decaimiento de la respuesta sináptica.

Por los resultados obtenidos en este trabajo, concluimos que la serotonina modularía a este circuito sensorio-motor actuando a distintos niveles: sobre las motoneuronas AE, sobre la capa interneuronal .

La serotonina exógena, aplicada fásicamente por pulsos de presión sobre el soma o por perfusión afectando a todo el ganglio, produjo la hiperpolarización de la neurona AE por activación de una corriente de cloro. El perfil farmacológico de la respuesta a la aplicación fásica, bloqueable por los antagonistas serotoninérgicos mianserina y metiotepina, sugiere que podría estar mediada por un receptor ionotrópico recientemente descrito (Ranganathan *et al.*, 2000). Los niveles basales de serotonina endógena no parecen afectar a las propiedades electrofisiológicas de la neurona AE.

Otro blanco de acción de la serotonina en este circuito lo constituirían la(s) interneurona(s) que median la interacción P-AE. La perfusión con serotonina (10-100 μ M) produjo una inhibición de la transmisión de señales en el circuito P-AE, afectando sólo a la vía polisináptica, pero no a la interacción directa. El perfil farmacológico de esta acción, bloqueable también por los antagonistas mianserina y metiotepina, sugiere nuevamente la intervención del receptor ionotrópico antes mencionado. Es posible que la(s) interneurona(s) exhiban en su superficie a dicho receptor, cuya activación por la presencia de serotonina afecte su excitabilidad.

La aplicación de los antagonistas estudiados *per se*, en cambio, sugieren que la serotonina endógena tiene un doble efecto inhibitor y potenciador de la vía polisináptica.

Los resultados alcanzados en este primer estudio sobre la modulación serotoninérgica de una vía sensoro-motora en la sanguijuela muestra que la trama de efectos de la serotonina es compleja y que posiblemente existan diferentes focos de acción de la serotonina con efectos dispares, que responden a diferentes estímulos del medio externo e interno.


IRENE ISCLA


Lidia Szoupau

Bibliografia

- ACOSTA-URQUIDI, J., SAHLEY, C.L. & KLEINHAUS, A.L. (1989). Serotonin differentially modulates two K⁺ currents in the Retzius cell of the leech. *J Exp Biol* **145**, 403-17.
- ANGSTADT, J.D. & FRIESEN, W.O. (1993a). Modulation of Swimming behavior in the medicinal leech. I. effects of serotonin on the electrical properties of swim-gating cell 204. *J.Comp.Physiol.* **172**, 223-234.
- ANGSTADT, J.D. & FRIESEN, W.O. (1993b). Modulation of swimming behavior in the medicinal leech II. Ionic conductances underlying serotonergic modulation of swim-gating cell 204. *J Comp Physiol A* **172**, 235-248.
- ARSHAVSKY, Y., ORLOVSKY, G.N., PANCHIN, Y., ROBERTS, A. & SOFFE, S.R. (1993). Neuronal control of swimming locomotion: analysis of the pteropod mollusc *Clione* and embryos of the amphibian *Xenopus*. *Trends Neurosci Jun*; **16**, 227-33.
- AWOUTERS (1985). The pharmacology of ketanserin, the first selective serotonin 5₂-antagonist. *Drug Dev. Res.* **263**
- 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.J. (1995). Parallel pathways coordinate crawling in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *J Comp Physiol A* **176**, 715-726.
- BAYLOR, D.A. & NICHOLLS, J.G. (1969). Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurones in the central nervous system of the leech. *J.Physiol.* **203**, 591-609.
- BRODFUEHRER, P.D., DEBSKI, E.A. , O'GARA, B.A. & FRIESEN, W.O. (1995). Neural control of leech swimming. *J. Neurobiol.* **27**, 403-418.
- BRODFUEHRER, P.D. & FRIESEN, W.O. (1986). Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. I. Output connections of Tr1 and Tr2. *J.Comp.Physiol.* **159**, 489-502.
- CALABRESE, R.L. (1989). Modulation of muscle and neuromuscular junction in invertebrates. *Seminar Neurosci* **1**, 26-34.
- CALABRESE, R.L., ANGSTADT, J.D. & ARBAS, E.A. (1989). A neural oscillator based on reciprocal inhibition. In *Perspectives in Neural Systems and Behavior.*, Anonymouspp. 33-50. New York: CArew, T.J.//Kelley, D.B.
- CARLTON, T. & MCVEAN, A. (1995). The role of touch, pressure and nociceptive mechanoreceptors of the leech in unrestrained behavior. *J.Comp.Physiol.* **177**, 781-791.
- CATARSI, S. & BRUNELLI, M. (1991). Serotonin depresses the after-hyperpolarization through the inhibition of the Na⁺/K⁺ electrogenic pump in T sensory neurones of the leech. *J Exp Biol* **155**, 261-73 .

- CATARSI, S., SCURI, R. & BRUNELLI, M. (1995). Octopamine and Leydig cell stimulation depress the afterhyperpolarization in touch sensory neurons of the leech. *Neuroscience* **66**, 751-9.
- CHIEL, H.J., KUPFERMAN, I. & WEIS, K.R. (1988). An identified histaminergic neuron can modulate the outputs of buccal-cerebral interneurons in *Aplysia* via presynaptic inhibition. *J Neurosc* **8**, 49-63.
- DALE, N., KANDEL, E.R. & SCHACHER S. (1996). Serotonin produces long-term changes in the excitability of *Aplysia* sensory neurons in culture that depend on new protein synthesis. *J Neurosc* **7**, 2232-2238.
- DAY, M. (2000). Neuromodulation: spinal cord and peripheral nerve stimulation. *Curr Rev Pain* **4**, 374-82.
- DEBSKI, E.A. & FRIESEN, W.O. (1987). Intracellular stimulation of sensory cells elicits swimming activity in the medicinal leech. *J.Comp.Physiol.* **160**, 447-457.
- DESCARRIES, L., AUDET, M.A., DOUCET, G., GARCÍA S. , OLESKEVICH, S., SÉGUELA, P., SOGHOMONIAN, J.-J. & WATKINGS, K.C. (1990). Morphology of central serotonin neurons. *Ann NY Acad Sci* **600**, 81-92.
- DICKINSON, M.H. & LENT, C.M. (1984). Feeding behavior of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L. *J.Comp.Physiol.* **154**, 449-455.
- DOWLING, J.E. (1989). Neuromodulation in the retina: the role of dopamine. *Semin Neurosci* **1**, 35-43.
- DRAPEAU, P. & SANCHEZ-ARMASS, S. (1988). Selection of postsynaptic serotonin receptors during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *J Neurosci* **8**, 4718-27.
- EDWARDS, D.H. & KRAVITZ, E.A. (1997). Serotonin, social status and aggression. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 812-819.
- EHRlich, J.S., BOULIS, N.M., KARRER, T. & SAHLEY, C.L. (1992). Differential effects of serotonin depletion on sensitization and dishabituation in the leech, *Hirudo medicinalis*. *J.Neurobiol* **23**, 270-279.
- FRIESEN, W.O. (1989). Neuronal Control of Leech Swimming Movement. In *Neuronal and cellular oscillators*, ed. JACKLET, J.W., pp. 269-316. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc.
- GLOVER, J.C. & KRAMER, A.P. (1982). Serotonin analogue selectively ablates identified neurons in the leech embryo. *Science* **216**, 317-319
- GROOME, J.R., CLARK, M. & LENT, C.M. (1993). The behavioral state of satiation in the leech is regulated by body distension and mimicked by serotonin depletion. *J.Exp.Biol.* **182**, 265-270.
- HARRIS-WARRICK, 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-WARRICK, 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 octopamine. *Comp.Biochem.Physiol.* **94C**, 295-302.
- HOUNSGAARD, J., HULTBORN, H., JESPERSEN, B. & KIEHN, O. (1988). Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J. Physiol.* **405**, 345-67.
- HOUNSGAARD, J. & KIEHN, O. (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J. Physiol.* **414**, 265-82.
- HOYER, D., CLARKE, D.E. & FOZARD, J.R. (1994). International union of pharmacological classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**, 157-193.
- HURWITZ, I., CROPPER, E.C., VILIM, F.S., ALEXEEVA, V., SUSSWEIN, A.J., KUPFERMANN, I. & WEISS, K.R. (2000). Serotonergic and peptidergic modulation of the buccal mass protractor muscle (I2) in aplysia. *J Neurophysiol* **84**, 2810-20.
- ISCLA, I.R., ARINI, P.D. & SZCZUPAK, L. (1999). Differential channeling of sensory stimuli onto a motor neuron in the leech. *J.Comp.Physiol.* **184**, 233-241.
- JANSEN, J.K.S., MULLER, K.J. & NICHOLLS, J.G. (1974). Persistent modification of synaptic interactions between sensory and motor nerve cells following discrete lesions in the central nervous system of the leech. *J.Physiol.* **242**, 289-305.
- KANDEL, E.R., CASTELUCCI, V.F., GOELET, P. & SCHACHER, S. (1987). Cell-biological interrelationships between short-term and long-term memory. In Anonymouspp. 111-132. Raven Press, New York: Kandel, E.R.
- KATZ, P.A. & FROST, W. (1996). Intrinsic neuromodulation: altering neuronal circuits from within. *Trens Neurosci.* **19**, 54-61.
- KATZ, P.A., GETTING, P.A. & FROST, W.N. (1994). Dynamic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *Nature* **367**, 729-731.
- KRAVITZ, E.A. (2000). Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *J Comp Physiol* **186**, 221-38.
- KRISTAN, W.B., MCGIRR, S.J. & SIMPSON, G.V. (1982). Behavioral and mechanosensory neurone responses to skin stimulation in leeches. *J.Exp.Biol.* **96**, 143-160.
- KRISTAN, W.B.J. (1982). Sensory and motor neurones responsible for the local bending response in leeches. *J.Exp.Biol.* **96**, 161-180.

- 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.* **154**, 457-471.
- LENT, C.M. & DICKINSON, M.H. (1987). On the termination of ingestive behaviour by the medicinal leech. *J.Exp.Biol.* **131**, 1-15.
- LENT, M.C., ZUNDEL, D., FREEDMAN, E. & GROOME, J.R. (1991). Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. *J.Comp.Neurol.* **168**, 191-200.
- LESSMANN, V. & DIETZEL, I.D. (1991). Development of serotonin-induced ion currents in identified embryonic Retzius cells from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *J Neurosci* **11**, 800-9.
- LESSMANN, V. & DIETZEL, I.D. (1995). Two kinetically distinct 5-hydroxytryptamine-activated Cl⁻ conductances at Retzius P-cell synapses of the medicinal leech. *J Neurosci* **15**, 1496-505.
- LEUNG, C.G. & MASON, P. (1999). Physiological properties of raphe magnus neurons during sleep and waking. *J. Neurophysiol* **81**, 584-595.
- LIAO X. , BROU, C.G. & WALTERS, E.T. (1999). Limited contributions of serotonin to long-term hyperexcitability of *Aplysia* sensory neurons. *J Neurophysiol* **82**, 3223-35 .
- LOCKERY, S.R. & KRISTAN, W.B. (1991). Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech. *J.Comp.Physiol.* **168**, 165-177.
- LOCKERY, S.R. & KRISTAN, W.B.J. (1990a). Distributed Processing of sensory information in the leech. I. Input-Output relations of the local bending reflex. *J.Neurosci.* **10**, 1811-1815.
- LOCKERY, S.R. & KRISTAN, W.B.J. (1990b). Distributed Processing of sensory information in the leech: II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J.Neurosci.* **10**, 1816-1829.
- LOPEZ-BARNEO, J. & LLINÁS, R. (1988). Electrophysiology of mammalian tectal neurons in vitro:I. Transient ionic conductances. *J Neurophysiol* **60**, 853-868.
- MACAGNO, E.R. (1980). Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J Comp Neurol.* **190**, 283-302.(Abstract)
- MACKEY, S. & CAREW, T.J. (1983). Locomotion in *Aplysia*: triggering by serotonin and modulation by bag cell extract. *J.Neurosci.* **3**, 1469-1477.

- MANGAN, P.S., COMETA, A.K. & FRIESEN W.O. (1994a). Modulation of swimming behavior in the medicinal leech IV. Serotonin-induced alteration of synaptic interactions between neurons of the swim circuit. *J Comp Physiol* **175**, 723-736.
- MANGAN, P.S., CURRAN, C.A., HURNEY, C.A. & FRIESEN W.O. (1994b). 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.
- MAR, A. & DRAPEAU, P. (1996). Modulation of Conduction Block in Leech Mechanosensory Neurons. *J. Neurosci.* **16**, 4335-4343.
- MARDER, E. (1998). From biophysics to models of network function. *Ann Rev Neurosci* **21**, 25-45.
- MARDER, E. & CALABRESE, R.L. (1996). Principles of rhythmic motorn pattern generation. *Physiol. Rev.* **76**, 687-717.
- MARÍN BURGÍN, A. & SZCZUPAK, L. Processing of sensory signals by a non-spiking neuron in the leech. *J Comp Physiol A* **186**, 989-997.
- MASON, A. & KRISTAN, W.B. (1982). Neuronal excitation, inhibition and modulation of leech longitudinal muscle. *J.Comp.Physiol.* **146**, 527-536.
- 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.
- MAUELSHAGEN, J., SHERFF, C.M. & CAREW, T.J. (1998). Differential Induction of Long-Term Synaptic Facilitation by Spaced and Massed Applications of Serotonin at Sensory Neuron Synapses of *Aplysia californica*. *Learning & Memory* **5**, 246-256.
- MCADOO, D.J. & COGGESHALL, R.E. (1976). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of biogenic amines in identified neurons and tissues of *Hirudo medicinalis*. *J.Neurochem.* **26**, 163-167.
- MCPHERSON, D.R. & BLANKLENSHIP, J.A. (1991). Neural control of swimming in *Aplysia brasiliiana*. III. Serotonergic modulatory neurons. *J.Neurophysiol.* **66**, 1366-1379.
- MULLER, K.J., NICHOLLS, J.G. & STENT, G.S. (1981). *Neurobiology of the Leech*, eds. MULLER, K.J., NICHOLLS, J.G. & STENT, G.S., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- MUNSCH, T. & SCHLUE, W.R. (1993). Intracellular Chloride Activity and the Effect of 5-Hydroxytryptamine on the Chloride Conductance of Leech Retzius Neurons. *European Journal Of Neuroscience* **5**, 1551-1557.
- 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.
- NOREKIAN, T.P. & SATTERLIE, R.A. (1996). Cerebral serotonergic neurons reciprocally modulate swim and withdrawal neural networks in the mollusk *Clione limacina*. *J Neurophysiol* **75**, 538-46.

- NUSBAUM, M.P. & KRISTAN, W.B. (1986). Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61. *J.Exp.Biol.* **122**, 277-302.
- 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.
- O'GARA, B.A., ILLUZZI, F.A., CHUNG, M., PORTNOY, A.D., FRAGA, K. & FRIEMAN, V.B. (1999). Serotonin induces four pharmacologically separable contractile responses in the pharynx of the leech *Hirudo medicinalis*. *Gen Pharmacol* **32**, 669-81.
- ORT, C.A., KRISTAN, W.B.J. & STENT, G.S. (1974). Neuronal control of swimming in the medicinal leech. *J.Comp.Physiol.* **94**, 121-154.
- POON, M., FRIESEN, W.O. & STENT, G.S. (1978). Neural control of swimming in the medicinal leech. V. Connexions between the oscillatory interneurons and the motor neurons. *J.Exp.Biol.* **75**, 43-63.
- POYUROVSKY M, S.M.F.C.S.M.W.A. (1999). Treatment of neuroleptic-induced akathisia with the 5-HT₂ antagonist mianserin. Double-blind, placebo-controlled study. *Br J Psychiatry* **238**-42.
- RANGANATHAN, R., CANNON, S.C. & HORVITZ, H.R. (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* **408**, 470-475.
- ROSEN, S.C., KUPFERMAN, I., GOLDSTEIN, R.S. & WEISS, KR. (1983). Lesion of a serotonergic modulatory neuron in *Aplysia* produces a specific defect in feeding behavior. *Brain Res* **260**, 151-155.
- SANCHEZ-ARMASS, S., MERZ, D.C. & DRAPEAU, P. (1991). Distinct receptors, second messengers and conductances underlying the dual responses to serotonin in an identified leech neurone. *J. exp. Biol.* **155**, 531-547.
- SATTERLIE, R.A. & NOREKIAN, T.P. (1995). Serotonergic modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limcina*. III. Cerebral neurons. *J.Exp.Biol.* **198**, 917-930.
- SAWYER, R.T. (1981). Leech biology and behavior. In *Neurobiology of the leech.*, eds. MULLER, K.J., NICHOLLS, J.G. & STENT, G.S., pp. 7-26. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCHACHETNER, J. & BRAUNIG, P. (1993). The activity pattern of identified neurosecretory cells during feeding behavior in the locust. *J Exp Biol* **185**, 287-303.
- SHAW, B.K. & KRISTAN, W.B.J. (1995). The whole-body shortening reflex of the medicinal leech: motor pattern, sensory basis, and interneuronal pathway. *J.Comp.Physiol.* **177**, 667-681.
- SHAW, B.K. & KRISTAN, W.B.Jr. (1997). The Neuronal Basis of the Behavioral Choice between Swimming and Shortening in the Leech: Control Is not Selectively Exercised at Higher Circuit Levels. *J.Neurosci.* **17**, 786-795.

- SIMMERS, J., MEYRAND, P. & MOULINS, M. (1995). Modulation and dynamic specification of motor rhythm-generating circuits in crustacea. *J Physiol Paris* **89**, 195-208.
- STOCKMEIER, C.A., SHAPIRO, L.A., DILLEY, G.E., KOLLI, T.N., FRIEDMAN, L. & RAJKOWSKA, G. (1998). Increase in Serotonin-1a autorreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**, 7394-7401.
- STUART, A.E. (1970). Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J.Physiol.* **209**, 627-646.
- SUN, Z.Y. & SCHACHER, S. (1996). Development of short-term heterosynaptic facilitation at aplysia sensorimotor synapses in vitro is accompanied by changes in the functional expression of presynaptic serotonin receptors. *J. Neurophysiol.* **76**, 2250-61 .
- SZCZUPAK, L., EDGAR, J., PERALTA, M.L. & KRISTAN, W.B.Jr. (1998). Long-lasting depolarization of leech neurons mediated by receptors with a nicotinic binding site. *J.Exp.Biol.* (In Press)
- SZCZUPAK, L. & KRISTAN, W.B.J. (1995). Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *J.Neurophysiol.* **74**, 2614-2624.
- TRUDEAU, L.E. & CASTELLUCCI, V.F. (1993). Functional Uncoupling of Inhibitory Interneurons Plays an Important Role in Short-Term Sensitization in Aplysia Gill and Siphon Withdrawal Reflex. *J Neuroscience* **13**, 2126-2135.
- VAN NUETEN JM, L.J.S.J.V.P. (1983). Ketanserin: a selective antagonist of 5-HT₂ serotonergic receptors. *Lancet* **1**, 297-8.
- WADEPUHL, M. (1989). Depression of excitatory motoneurons by a single neurone in the leech central nervous system. *J.Exp.Biol.* **143**, 509-527.
- WEEKS, J.C. & KRISTAN, W.B. (1978). Initiation, maintenance, and modulation of swimming in the medicinal leech by the activity of a single neurone. *J.Exp.Biol.* **77**, 71-88.
- WEGENER, C. & NASSEL, D.R. (2000). Peptide-induced Ca²⁺ movements in a tonic insect muscle: effects of proctolin and periviscerokinin-2. *J Neurophysiol Dec*; **84**, 3056-66.
- WESSEL, R.K.W.B.K.D. (1999). Supralinear Summation of Synaptic Inputs by an Invertebrate Neuron: Dendritic Gain Is Mediated by an "inward Rectifier" K⁺ Current. *J Neurosci* **19**, 5875-5888.(Abstract)
- WILLIARD, A.L. (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor pattern for swimming by the medicinal leech. *J.Neurosci.* **1**, 936-944.
- WITTENBERG, G. & KRISTAN, W.B. (1992a). Analysis and modeling of the multisegmental coordination of shortening behavior in the medicinal leech. I. Motor output. *J.Neurophysiol.* **68**, 1683-1692.

- WITTENBERG, G. & KRISTAN, W.B.J. (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.J. (1990). Segmental specialization of neuronal connectivity in the leech. *J.Comp.Physiol.* **167**, 453-459.
- YAU, K.W. (1976). Receptive fields, geometry and conduction block of sensory neurones in the central nervous system of the leech. *J.Physiol.* **263**, 513-538.
- YEOMAN, M.S., BRIERLEY, M.J. & BENJAMIN, P.R. (1996). Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of Lymnaea. *J.Neurophysiol.* **75**, 11-25.