

Tesis Doctoral

# Propagación de señales en neuronas NS de la sanguijuela *Hirudo sp.*

Yang, Sung Min

2012

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

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

Cita tipo APA:

Yang, Sung Min. (2012). Propagación de señales en neuronas NS de la sanguijuela *Hirudo sp.*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Yang, Sung Min. "Propagación de señales en neuronas NS de la sanguijuela *Hirudo sp.*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.



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

**Propagación de señales en  
neuronas NS de la sanguijuela**

***Hirudo sp.***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área:  
Ciencias Biológicas

**Autor: Sung Min Yang**

**Directora: Dr. Lidia Szczupak**  
**Consejero de Estudios: Dr. Daniel Tomsic**

**Lugar de trabajo:**

**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular**, Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales, Universidad de Buenos Aires.

**Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE)**, Consejo  
Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)  
(2007-2012).

**-Buenos Aires, 2012-**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
PROPAGACIÓN DE SEÑALES EN EL ÁRBOL NEURÍTICO .....	8
LA SANGUIJUELA: ANATOMÍA Y SISTEMA NERVIOSO .....	11
NEURONA NS: ESTRUCTURA, PROPIEDAD BIOFÍSICAS E INTERACCIONES SINÁPTICAS .....	15
CANALES DE CALCIO SENSIBLES A VOLTAJE.....	18
<i>Canales de calcio tipo T</i> .....	23
NATURALEZA DE LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO .....	25
NATURALEZA DE LA SEÑAL $\Delta F/F$ .....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA TESIS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
PREPARACIÓN BIOLÓGICA .....	34
SOLUCIONES .....	35
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	35
PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN .....	37
TINCIONES .....	38
ADQUISICIÓN DE IMÁGENES .....	39
NEURONAS ESTUDIADAS .....	40
<i>Neurona NS</i> .....	41
<i>Neuronas P</i> .....	41
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES .....	42
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	46

<b>RESULTADOS I.....</b>	<b>52</b>
<b>TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR LTS</b>	
<b>LOS LTSS EVOCAN TRANSITORIOS DE CALCIO.....</b>	<b>55</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR LTS.....</b>	<b>59</b>
<b>SIN EVOCACIÓN DE LTS NO HAY TRANSITORIO DE CALCIO.....</b>	<b>63</b>
<b>SIN EVOCACIÓN DE LTS NO HAY TRANSITORIO DE CALCIO.....</b>	<b>64</b>
<b>SIN EVOCACIÓN DE LTS NO HAY TRANSITORIO DE CALCIO.....</b>	<b>65</b>
<b>PROPIEDADES CINÉTICAS DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR LTS.....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTADOS II.....</b>	<b>75</b>
<b>TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR PULSOS DESPOLARIZANTES</b>	
<b>LOS PULSOS DESPOLARIZANTES EVOCAN TRANSITORIOS DE CALCIO.....</b>	<b>76</b>
<b>LA RESPUESTA A PULSOS DESPOLARIZANTES ES MODULADA POR EL POTENCIAL DE MEMBRANA.....</b>	<b>79</b>
<b>LOS TRANSITORIOS DE CALCIO NECESITAN DE LAS CCSVs.....</b>	<b>85</b>
<b>INACTIVACIÓN DE LAS CCSVs.....</b>	<b>88</b>
<b>RESULTADOS III.....</b>	<b>91</b>
<b>SEÑALES DE CALCIO EVOCADAS POR ESTIMULACIÓN SINÁPTICA</b>	
<b>LA ESTIMULACIÓN SINÁPTICA PRODUCE TRANSITORIOS DE CALCIO.....</b>	<b>92</b>
<b>EL TAMAÑO DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO CORRELACIONA CON EL POTENCIAL SINÁPTICO.....</b>	<b>94</b>
<b>DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS SINÁPTICAMENTE.....</b>	<b>97</b>
<b>HIPERPOLARIZACIONES ESPONTÁNEAS GENERAN UN <math>\Delta[Ca^{2+}]_i</math>.....</b>	<b>103</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>106</b>
<b>LOS LTS GENERAN TRANSITORIOS DE CALCIO.....</b>	<b>106</b>
<b>PULSOS DESPOLARIZANTES EVOCAN TRANSITORIOS DE CALCIO.....</b>	<b>112</b>
<b>EL TRANSITORIO DE CALCIO DEPENDE DEL <math>V_m</math> BASAL.....</b>	<b>117</b>

<b>MECANISMOS DE MAGNIFICACIÓN VS DE <i>BOOSTING</i></b> .....	119
<b>TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR ESTIMULACIÓN SINÁPTICA</b> .....	123
<b>CONCLUSIONES</b> .....	130
<b>ANEXO I</b> .....	133
<b>ANEXO II</b> .....	134
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	135

## Propagación de señales en neuronas NS de la sanguijuela *Hirudo sp.*

### RESUMEN

Un número creciente de estudios señalan la importancia de la distribución espacial de las conductancias iónicas activas en el procesamiento de las entradas sinápticas y en la señalización intracelular. Conocer la distribución de las conductancias sensibles a voltaje es importante porque éstas podrían servir como un mecanismo para el *boosting* y la propagación de las respuestas postsinápticas, reduciendo la atenuación espacial que resultaría de una transmisión pasiva.

Las neuronas NS de la sanguijuela no desencadenan potenciales de acción dependientes de sodio y presentan una arborización neurítica muy extensa. Estas células están eléctricamente acopladas a prácticamente todas las motoneuronas excitatorias y, de esta forma, son capaces de modular el comportamiento motor. Dada esta amplia influencia sobre las neuronas efectoras, resulta de sumo interés analizar la integración de entradas sensoriales por las neuronas NS.

Se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares en el soma en simultáneo con la medición de señales de calcio en árbol neurítico empleando indicadores fluorescentes sensibles a calcio. De esta forma, se pudieron estudiar transitorios de calcio evocados por potenciales de acción dependientes de calcio de bajo umbral (Capítulo I), por pulsos despolarizantes (Capítulo II) y por estimulación sináptica activada por neuronas sensoriales (Capítulo III).

Los resultados indican que la neurona dispone de conductancias de calcio de bajo umbral ampliamente distribuidas en el árbol neurítico de la neurona NS. Estas conductancias

participan de la regeneración activa de las señales sinápticas, activándose en forma gradual dependiendo de la amplitud de la señal electrofisiológica y sirviendo como un mecanismo para el procesamiento e integración de señales dentro de la arborización neuronal.

**Palabras claves:** Hirudo sp., neuronas pasivas, conductancias de calcio sensibles a voltaje, transitorios de calcio, propagación de señales, integración sináptica.

## Propagation of signals in NS neurons of leech *Hirudo sp.*

### ABSTRACT

An increasing number of studies point out the importance that the spatial distribution of active ionic conductances have in synaptic processing and intracellular signaling. Knowing the distribution of voltage-dependent conductances is relevant because of the role they can play in boosting and propagation of synaptic responses, reducing the spatial attenuation that would result from purely passive spread.

The NS neurons of the leech are nonspiking neurons (they do not fire sodium dependent action potentials) and present a widespread neuritic arborization. These cells are electrically coupled to all the excitatory motoneurons and, in this way, they are able to modulate motor behaviors. Given the wide influence of NS neurons on effector neurons it is of great importance to analyze how they integrate sensory inputs.

We have performed intracellular electrophysiological recordings in the NS soma, together with calcium imaging throughout its neuritic arborization by means of fluorescent calcium indicators. In this way we studied calcium transient evoked by low threshold spikes (Chapter I), by depolarizing pulses (Chapter II) and by synaptic inputs from sensory neurons (Chapter III).

The results indicate that NS neuron display calcium conductances that can be activated at a low threshold and are distributed throughout the entire neuritic arbor. These conductances participate in the active regeneration of synaptic inputs, giving rise to calcium transients whose amplitude is a function of the electrophysiological response magnitude, and thus they contribute to the processing and integration of signals throughout the neuronal arborization.

**Key words:** *Hirudo sp.*, passive neurons, voltage dependent calcium conductances, calcium transients, signal propagation, synaptic integration.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **Propagación de señales en el árbol neurítico**

Tanto en vertebrados como en invertebrados, las redes sensorio-motoras están formadas por múltiples vías paralelas, donde las neuronas que transmiten las señales desde el extremo sensorial al motor no son meros conductores fieles de las señales que reciben sino que transforman las entradas, extrayendo de ellas parámetros específicos del medio ambiente (Burrows, 1992; McCrea, 2001; Grillner, 2003). En consecuencia, entender las propiedades fisiológicas de cada una de las neuronas que componen estos circuitos es muy importante a la hora de comprender cómo se convierte la señal sensorial en una salida motora determinada.

Una visión simplificada de la transmisión de señales eléctricas en neuronas permite postular que existen dos modalidades para la misma: la transmisión electrotónica (pasiva) y la transmisión mediada por potenciales de acción (activa) (Nicholls et al., 2001). La transmisión pasiva de señales se caracteriza por una alta velocidad de propagación, y por permitir la transmisión de señales de amplitudes graduales, ampliando la capacidad de codificación de información. No obstante, la modalidad electrotónica expone a las señales a sufrir una atenuación al propagarse desde el sitio de origen hasta las regiones donde se produce la integración de las mismas. Por otra parte, la transmisión activa de señales es relativamente más lenta y permite la transmisión de señales del tipo “todo o nada” que no se desforman con la propagación. Esto se alcanza gracias a procesos regenerativos que involucran conductancias dependientes de voltaje y que contrarrestan la atenuación espacial.

Neuronas que no disparan potenciales de acción han sido identificadas tanto en invertebrados como en vertebrados. En un principio, se conjeturó que en ellas las señales electrofisiológicas se propagaban en forma únicamente electrotónica y estaban sujetas a

atenuación espacial. La arquitectura de las neuronas planteaba la posibilidad de que diferentes regiones de estas neuronas actuaran como subcompartimentos funcionales independientes (Kondoh y Hisada, 1986; Burrows, 1992). Sin embargo, en neuronas que no disparan potenciales de acción se han descrito conductancias voltaje-dependientes involucradas en la integración sináptica y en contrarrestar la atenuación espacial dada por la propagación pasiva de señales, tanto en invertebrados (Laurent, 1990; Wildman y Cannone, 1990; Weckstrom et al., 1993) como en vertebrados (Pan y Hu, 1999; Protti et al., 2000).

La dicotomía entre disparar y no disparar potenciales de acción no solamente corresponde a poblaciones segregadas de células, sino que también puede coexistir en una misma neurona. Algunos compartimentos celulares típicamente no disparan potenciales de acción (dendritas), mientras que otros están dominados por la modalidad “todo o nada” (axones). Es así como hasta que fue posible el registro electrofisiológico intracelular de dendritas (Llinas y Nicholson, 1971), se asumía que la propagación de señales eléctricas en ellas estaba regida por la modalidad pasiva de transmisión. Sin embargo, actualmente existen múltiples evidencias de la presencia de conductancias activas (dependientes de voltaje) en dendritas y de sus efectos en la integración de señales (Yuste y Tank, 1996; Spruston et al., 1999). Por ejemplo, se ha descrito que las dendritas de las neuronas piramidales neocorticales (Larkum et al., 1999; Schwindt y Crill, 1999) poseen conductancias de calcio sensibles a voltaje (CCSV) que dan lugar a potenciales regenerativos o en algunos casos a potenciales *plateau*. De esta forma, más allá de las funciones particulares que las neuronas sin potenciales de acción puedan ejecutar, el procesamiento de señales en ellas es de gran interés porque pueden compartir características con la integración de señales en los árboles dendríticos de neuronas que usualmente producen potenciales de acción.

El rol de las CCSVs de bajo umbral de activación en dendritas (que no disparan potenciales de acción dependientes de sodio) está siendo activamente estudiado en el marco de la integración sináptica (Yuste y Tank, 1996; Larkum et al., 1999; Migliore y Shepherd, 2002). A la hora de definir el rol funcional de las CCSVs de bajo umbral en la capacidad de integración de señales en el árbol neurítico de una neurona es altamente valioso conocer el rol que juega dicha neurona en la red neuronal en que opera. En este sentido, una de las grandes ventajas que ofrece el sistema nervioso de la sanguijuela para el estudio del procesamiento neuronal radica en que los estudios se realizan en neuronas altamente caracterizadas, cuya identidad puede garantizarse de experimento en experimento y cuyo rol en el comportamiento motor del animal puede estudiarse con relativa efectividad (Kristan et al., 2005).

Entre las CCSVs más usualmente involucradas en la propagación de señales se encuentran las conductancias de tipo T. Éstas se caracterizan por tener bajo umbral de activación, una rápida inactivación, baja conductancia y una tasa de inactivación voltaje-dependiente (Armstrong y Matteson, 1985; Huguenard, 1996; Perez-Reyes, 1998). Asimismo, una herramienta ampliamente desarrollada y empleada en las últimas décadas para el estudio de las señales de calcio en múltiples sitios de la estructura neuronal es la técnica de *calcium imaging*, que utiliza indicadores fluorescentes sensibles a calcio.

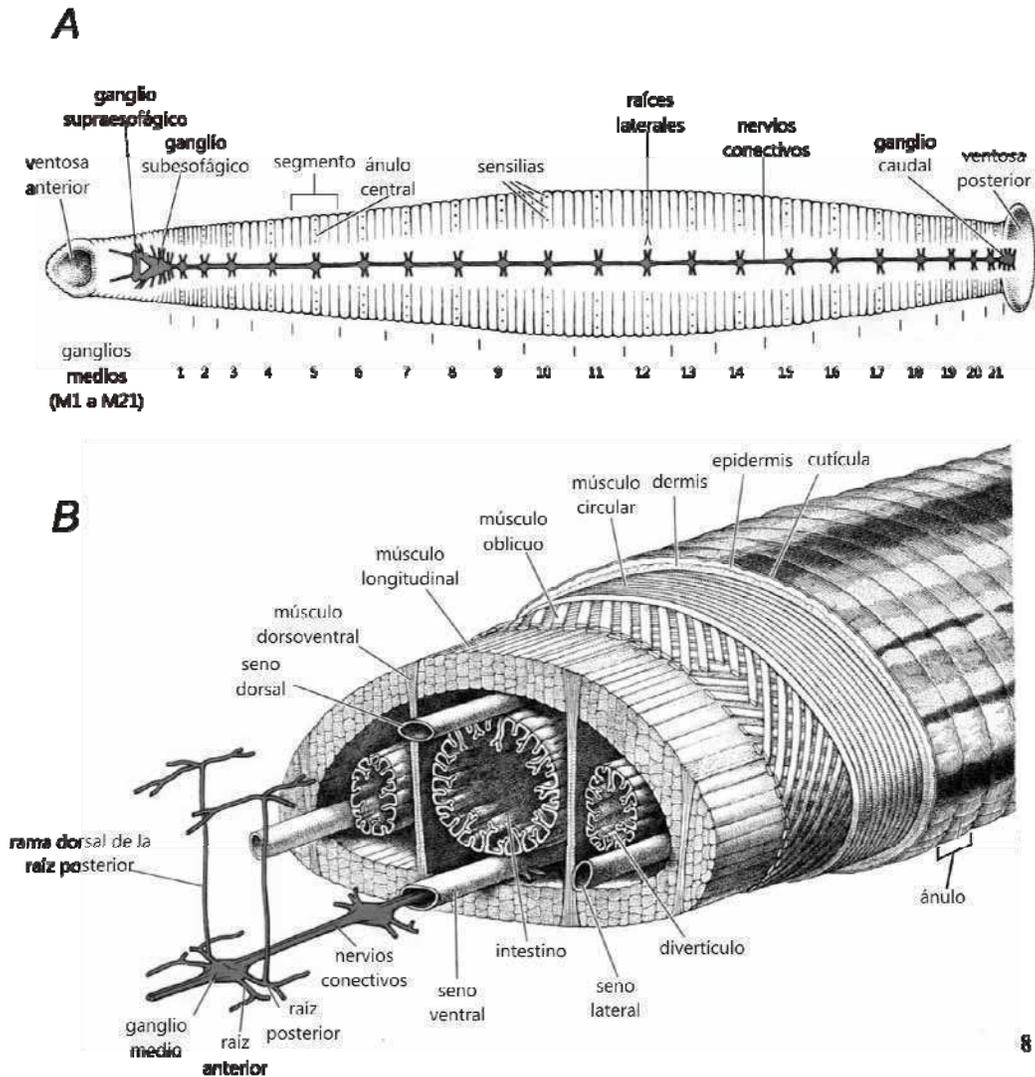
El presente estudio se centra en un par de neuronas premotoras que no disparan potenciales de acción, las neuronas NS (por *nonspiking*, sin potenciales de acción en inglés). El objetivo es investigar cómo se propagan las señales en el extenso árbol neurítico de esta neurona del sistema nervioso de la sanguijuela.

### **La sanguijuela: anatomía y sistema nervioso**

La sanguijuela *Hirudo sp.* es un anélido cuyo organismo está dividido en 34 segmentos, de los cuales seis conforman la región cefálica y siete la zona caudal. La segmentación de su cuerpo se refleja en la estructura de su sistema nervioso, el cual se compone de una cadena de ganglios comunicados entre sí por medio de nervios conectivos (**figura I.1A**) compuestos por dos paquetes axonales laterales y un delgado nervio central, el nervio de Faivre. En la región cefálica de la cadena, los ganglios se fusionan para formar los ganglios supraesofágico (dos ganglios fusionados) y subesofágico (cuatro ganglios fusionados). En la zona caudal, siete ganglios fusionados forman el ganglio caudal (Sawyer, 1986).

Entre el cerebro rostral y el cerebro caudal existen 21 ganglios medios (M1-M21) que son muy similares entre sí y entre individuos (**figuras I.2A**). Cada ganglio contiene aproximadamente 200 pares bilaterales de neuronas y unas pocas neuronas impares. El tamaño de los *somata* neuronales oscila entre 10 y 80  $\mu\text{m}$ , y se localizan en una monocapa externa formando una cara dorsal y otra ventral. Entre ambas caras se ubica el neuropilo central, donde probablemente ocurre la mayoría de las interacciones sinápticas (Macagno, 1980).

Gran parte de las neuronas pueden ser identificadas por la ubicación de su soma, su morfología neuronal y sus propiedades electrofisiológicas (potencial de reposo, resistencia de entrada, forma y tamaño del potencial de acción, etc.). De esta forma, se ha generado un mapa del ganglio (Muller et al., 1981) en el que se ilustra la ubicación y tamaño de los *somata* neuronales que lo componen, siendo las mismas identificadas por número o letra según su ubicación o función, respectivamente (**figuras I.2B**). De cada ganglio surgen dos pares de nervios llamados “raíces” que inervan los tejidos periféricos (órganos y musculatura) (**figura**



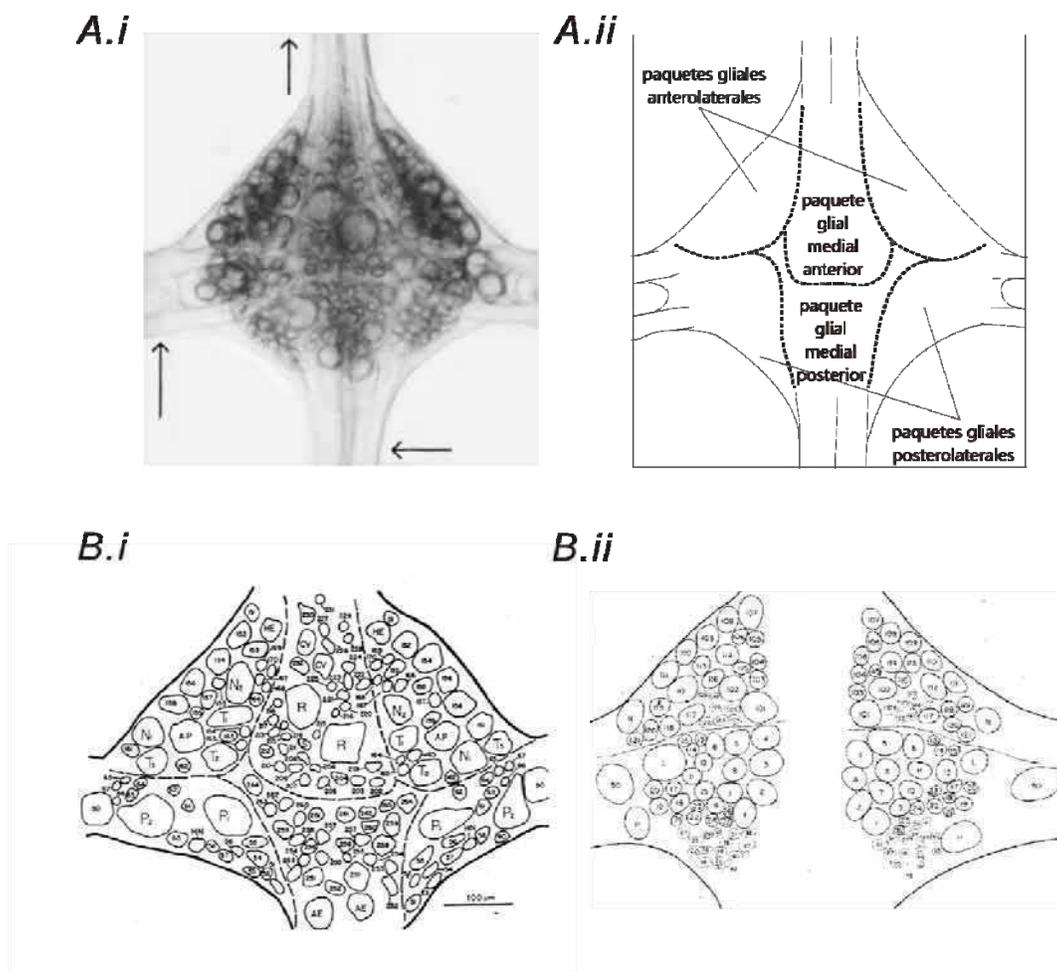
**Figura I.1. Anatomía de la sanguijuela *Hirudo sp.*** **A**, dibujo de la vista ventral del cuerpo de una sanguijuela y la localización de su sistema nervioso. Éste consta de 21 ganglios medios (M1-M21), un ganglio cefálico (formado por los ganglios supra y subesofágicos) y un ganglio caudal. La cadena de ganglios está conectada por nervios conectivos. Cada segmento medio está inervado por un ganglio medio, mediante ramificaciones de las neuronas que se envían a la periferia por las raíces laterales (anterior y posterior). El animal posee una ventosa anterior y otra posterior. **C**, dibujo en perspectiva de un corte transversal del cuerpo de la sanguijuela. Se muestra que la cadena de ganglios se encuentra en la parte ventral del cuerpo, en el interior de seno venoso. Se ven las tres capas de músculos dorsoventrales (circulares, oblicuos y longitudinales) y los músculos dorsoventrales. Los dibujos fueron tomados de Nicholls et al. (2001)

**I.1B).** Las neuronas sensoriales y motoras que inervan los órganos sensoriales de la piel y la musculatura del cuerpo, respectivamente, proyectan sus ramificaciones a través de las raíces.

Debido a esta organización, es relativamente sencillo realizar registros electrofisiológicos del soma neuronal de la mayoría de las neuronas de la sanguijuela. Es así como se han identificado varias de las neuronas, en particular las neuronas sensoriales que responden a estímulos mecánicos ejercidos sobre la pared corporal (Nicholls y Baylor, 1968), las motoneuronas efectoras de los distintos grupos de fibras musculares (Stuart, 1970), interneuronas que participan en diferentes circuitos motores (Weeks, 1981; Lockery y Kristan, 1990b; Shaw y Kristan, 1995; Baader, 1997) y neuronas efectoras modulatorias (Willard, 1981; Arbas y Calabrese, 1990).

De esta forma, esta preparación muestra ser accesible a registros electrofisiológicos (en especial registros intracelulares) y permite una identificación inequívoca de las neuronas individuales para el estudio de las interacciones, en forma repetible, mientras se produce un patrón motor reconocible. La sanguijuela ha mostrado ser un modelo ideal para el estudio de circuitos neuronales involucrados en distintos comportamientos y en su modulación, al permitir una caracterización bastante completa de las neuronas que forman parte de dichos circuitos.

En cada ganglio existen tres tipos de neuronas mecanosensoriales que inervan la piel: las células T (responden al tacto) y N (responden a estímulos nociceptivos) están ubicadas en los paquetes anterolaterales, y las células P (responden a la presión) se localizan en los paquetes posterolaterales (**figuras I.2Aii e I.2B**) (Nicholls y Baylor, 1968). Cada una inerva una región definida (dorsal, ventral o lateral) de la pared corporal del segmento correspondiente, a la que llegan a través de las raíces laterales del ganglio. La excitación de las células P ha sido identificada como el estímulo más efectivo para desencadenar diferentes respuestas motoras en el sistema nervioso aislado de la sanguijuela (Debski y Friesen, 1987; Kristan, 1982; Lockery y



**Figura 1.2. Ganglio medio de la sanguijuela *Hirudo sp.*** *Ai*, foto de la vista ventral de un ganglio medio de la sanguijuela (tomada de Nicholls y Baylor, 1968). Se pueden ver los *somata* de neuronas individuales y los límites entre los paquetes gliales (señalados en *Aii*, con un esquema que se puede superponer con la foto de *Ai*). *B*, mapa de las posiciones relativas de los *somata* neuronales de las caras ventral (*Bi*) y dorsal (*Bii*) de un ganglio medio (Sawyer, 1986).

Kristan, 1990a; Wittenberg y Kristan, 1992; Shaw y Kristan, 1995). Existen dos pares de células P por ganglio, que tienen sus campos receptivos primarios en el cuadrante dorsal y ventral de la piel del hemisegmento ipsilateral. Así, dos neuronas P inervan los cuadrantes dorsales (derecho e izquierdo) y otras dos neuronas P inervan los cuadrantes ventrales (derecho e izquierdo) (Nicholls y Baylor, 1968). Estas neuronas tienen, además, campos receptivos secundarios en los cuadrantes correspondientes de los segmentos adyacentes (Yau, 1976). De esta manera, una presión aplicada en un punto de la pared del cuerpo del animal puede activar hasta tres células P: una en su campo receptivo primario y dos en los secundarios. Sin embargo, los últimos tienen umbrales de activación mayores. Por lo tanto, con una presión débil se puede activar una única célula P.

### **Neurona NS: estructura, propiedad biofísicas e interacciones sinápticas**

Las neuronas NS son neuronas premotoras que se encuentran de a pares en cada ganglio medio del sistema nervioso de la sanguijuela. Los somas de las mismas están ubicados en los paquetes anterolaterales de la cara ventral del ganglio, en la posición 151 del mapa del ganglio (**figura I.2Bi**). Ante múltiples condiciones experimentales se observó que las neuronas NS no disparan potenciales de acción estándar (Wadepuhl, 1989; Relá y Szczupak, 2003). Estas neuronas se encuentran acopladas eléctricamente con virtualmente todas y cada una de las motoneuronas excitatorias descriptas, y funcionan como reguladoras de la coactivación de las motoneuronas, lo cual puede ser importante para la coordinación de la actividad motora (Relá y Szczupak, 2003). Además, reciben señales sinápticas de las neuronas mecanosensoriales (Marín Burgin y Szczupak, 2000).

Los circuitos neuronales descritos en la sanguijuela han sido caracterizados como circuitos distribuidos, es decir, que son capaces de generar un amplio rango de salidas motoras, mediante la combinación de las participaciones de un número acotado de elementos neuronales (Lockery y Kristan, 1990a; Lockery y Kristan, 1990b). Por lo tanto, la generación de los distintos comportamientos estará dada por el procesamiento que realicen las interneuronas a partir de la entrada sensorial. Por su parte, las neuronas consideradas como elementos de rango bajo en la organización jerárquica de los circuitos motores (motoneuronas y neuronas premotoras) pueden cumplir un papel organizador de dichas respuestas.

Las neuronas NS de la sanguijuela constituyen elementos premotores. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Rodríguez et. al, 2012) indican que aunque la neurona NS parece no participar de la natación, este elemento premotor modula al generador central de patrones (CPG) que controla el desplazamiento sobre ventosas. Más precisamente, la hiperpolarización o la despolarización de la neurona NS no tiene efecto sobre la natación, pero la hiperpolarización de esta neurona desacelera la actividad del desplazamiento sobre ventosas y disminuye la frecuencia de disparo de las motoneuronas. Además, la despolarización de la neurona NS incrementa la actividad de las motoneuronas, y, en estadios en que el patrón de desplazamiento sobre ventosas está decayendo, la despolarización de esta neurona lo reestablece.

Al igual que en la sanguijuela, las neuronas sin potenciales de acción han sido objeto de estudio en diversos sistemas. Experimentos en el sistema nervioso de insectos han permitido encontrar que las neuronas locales sin potenciales de acción son elementos premotores que influyen sobre la actividad de las motoneuronas y coordinan el movimiento de las extremidades (Laurent y Burrows, 1989; Brunn, 1998). En varios casos se ha demostrado que reciben entradas de aferentes mecanosensoriales y que intervienen en la modulación de reflejos (Laurent y Burrows, 1988; Burrows et al., 1988). En algunos casos se ha demostrado que las neuronas sin

potenciales de acción son capaces de liberar neurotransmisor aún a su potencial de membrana (Vm) de reposo y que los cambios de cualquier polaridad en su Vm pueden alterar de forma gradual dicha liberación (Burrows y Siegler, 1978; Burrows, 1979).

Asimismo, es común encontrar neuronas que no desencadenan potenciales de acción en los niveles más periféricos de la codificación y el procesamiento de señales (sistemas sensoriales) tanto en invertebrados (Tautz y Plummer, 1994; Schrader, 2000) como en vertebrados (Bufler et al., 1992). Los casos más estudiados corresponden a neuronas que responden a estímulos visuales con cambios graduales en su Vm, sin desencadenar potenciales de acción, en diversas especies de invertebrados (Jacklet, 1969; Wang-Bennett y Glantz, 1987; Beron de Astrada et al., 2001) y vertebrados (Werblin y Dowling, 1969; Steinberg y Schmidt, 1970; Toyoda et al., 1970; Baylor y Fuortes, 1970; Kaneko, 1971; Nelson, 1977; Nelson y Kolb, 1983)

Las neuronas NS presentan una extensa arborización (Wadepuhl, 1989; Rela y Szczupak, 2007; **figura RI.1A**). Dada esta estructura, resulta difícil concebir que estas neuronas estén limitadas solamente a la transmisión electrotónica. Experimentos previos demostraron que bajo determinados protocolos de estimulación eléctrica, las neuronas responden de una manera estereotipada similar a un potencial de acción (**figura RI.2**). Sin embargo, este no es un evento “todo o nada”, sino un fenómeno graduado que depende de la intensidad y duración del estímulo eléctrico (Rela et al., 2009). A través del reemplazo iónico en el medio externo y análisis farmacológico se pudo determinar que estas respuestas regenerativas dependen de calcio y de potasio, pero son insensibles a la concentración extracelular de sodio. Estas respuestas pueden ser evocadas aplicando pulsos cuadrados tanto hiperpolarizantes como despolarizantes. Utilizando el protocolo de pulsos hiperpolarizantes el fenómeno se desencadena durante la fase de repolarización, siempre que el potencial supere un umbral de

aproximadamente -55 mV. Su amplitud es una función logarítmica de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , y su amplitud y duración se magnifican notablemente en presencia del bloqueante de canales de  $\text{K}^+$  tetraetilamonio (TEA). De estos resultados se concluyó que las neuronas NS poseen CCSVs de bajo umbral de activación, y conductancias de  $\text{K}^+$  del tipo rectificador retardado (Rela et al., 2009).

Este evento regenerativo, al cual llamaremos potencial de acción de bajo umbral (LTS, por *low threshold spike*), mostró tener dos fases (Rela et al., 2009): un crecimiento rápido seguido de un potencial *plateau* persistente, atribuibles a dos poblaciones de CCSVs con cinéticas diferentes. Una de ellas debería tener un bajo umbral de activación, cercano al potencial de reposo de la neurona NS. En cuanto a las conductancias que subyacen al potencial *plateau*, al manifestarse con claridad una vez que la neurona se despolarizó y alcanzó el pico del LTS, los datos existentes no permiten discernir si su umbral de activación es bajo o alto. En otro trabajo desarrollado en el laboratorio, la neurona NS fue inyectada con pulsos breves de corriente despolarizante y las respuestas generadas sugirieron que habían dos poblaciones de CCSVs involucradas (Vilarchao, 2011): una de bajo umbral de activación, con una cinética de inactivación rápida y sensible al magnesio, encargada de la subida rápida de la respuesta regenerativa; y una segunda de conductancias persistentes e insensibles al magnesio, responsables de la magnificación de la respuesta electrofisiológica y de las colas de voltaje.

### **Canales de calcio sensibles a voltaje**

Los canales de calcio son reconocidos por ser ubicuos, y por tener un rol único entre los canales iónicos: traducir las señales eléctricas en otras formas de actividad fisiológica. Además de ser una fuente de corriente despolarizante, mediante el flujo de iones de calcio hacia

el citoplasma, los canales de calcio pueden controlar varias funciones biológicas tales como la excitabilidad en diversos tipos celulares, la liberación de vesículas conteniendo hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo y la expresión de genes (Huguenard, 1996; Berridge, 1998; Hille, 2001; Clapham, 2007)

Los canales de calcio activados por voltaje se encuentran en toda célula excitable (Hille, 2001). Éstos comparten muchas propiedades con los canales de sodio y los canales de potasio del tipo rectificador retardado. Todos los miembros de esta amplia superfamilia de canales de sodio, potasio y calcio activados por voltaje tienen una apertura que depende abruptamente del voltaje (activación), respondiendo a la despolarización de la membrana con cierto retraso. Éstos se cierran (deactivación) rápidamente después de una repolarización y presentan algún tipo de inactivación durante una despolarización sostenida. Una vez inactivados, necesitan de una repolarización para pasar a un estado cerrado pero activable (desinactivación).

Desde su descubrimiento en la década de 1950, la clasificación de los canales de calcio activados por voltaje ha evolucionado en términos generales en tres etapas. En primer lugar fueron categorizadas por sus potenciales de activación, luego en base a observaciones sobre su farmacología y su funcionamiento, y finalmente por análisis genéticos y de clonado.

En cuanto a los aspectos fenomenológicos, los distintos tipos de canales de calcio se diferencian en la dependencia con el voltaje, la tasa de inactivación, la selectividad de iones, y la farmacología. Algunos de estos canales necesitan de una gran despolarización para ser activados y otros precisan sólo de una pequeña despolarización.

Una clase, los canales de calcio activados a bajo voltaje (LVA, por *low voltage activated*), generalmente también tienen una rápida inactivación dependiente de voltaje y, por lo tanto, no son observables cuando la célula se mantiene a un potencial fijo despolarizado. La otra clase, los canales activados a alto voltaje (HVA, por *high voltage activated*), a menudo carecen

de una rápida inactivación, y muchas veces pueden ser registrados en forma aislada de las corriente LVA partiendo de un potencial despolarizado (Hille, 2001).

Los canales de calcio de la clase LVA se caracterizan por manifestar una baja conductancia (*tiny* en inglés) y producen corrientes transitorias (*transient* en inglés), por lo que se los denominó canales tipo T. Los canales de la clase HVA comprenden dos tipos: los canales de calcio tipo L y los canales de calcio tipo N, P/Q y R. Los canales tipo L tienen una conductancia de canal único grande (*large* en inglés) y generan corriente duraderas (*long-lasting* en inglés). Los canales de calcio tipo N, P/Q y R se diferencian entre sí en su farmacología pero son funcionalmente similares: tienen conductancias de canal único intermedias entre aquellas de las tipo T y L, y todas ellas expresan algún grado de inactivación dependiente de voltaje (Hille, 2001).

	lento, persistente	rápido, inactivable	
Umbral de activación	alto (HVA)	alto (HVA)	bajo (LVA)
Clasificación fenomenológica de Tsien	L	P/Q, N, R	T
Rango de activación	Positivo a -30 mV	Positivo a -20 mV	Positivo a -70 mV
Rango de inactivación	-60 a -10 mV	-120 a -30 mV	-100 a -60 mV
Inactivación	Muy lento ( $\tau > 500$ ms)	Parcial ( $\tau = 50-80$ ms)	Completo ( $\tau = 20-50$ ms)
Tasa de deactivación	rápido	lento	rápido (2-12 ms)

**Tabla 1.1 Tipos de canales de calcio en vertebrados (modificado de Hille, 2001)**

El flujo de iones a través de canales iónicos depende del voltaje por dos razones. Tanto la fuerza electromotriz para cada ión como la probabilidad de apertura de un canal pueden depender del voltaje. Es así como en los canales de calcio activados por voltaje, despolarizaciones progresivas abren una fracción creciente de los canales disponibles y producen una corriente de calcio entrante también creciente. La corriente aumenta con la despolarización hasta que la apertura de canales alcanza el máximo, y luego la corriente decrece con las despolarizaciones posteriores debido a una disminución del gradiente de potencial electroquímico del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los diferentes tipos de canales de calcio difieren en su inactivación, tanto en su cinética como en su dependencia con el voltaje. La rápida inactivación de los canales LVA parece ser un típico proceso sensible a voltaje como el de los canales de sodio. En cambio la lenta inactivación de los canales HVA presenta otras características. Brehm y Eckert (1978) y Tillotson (1979) propusieron que la inactivación de los canales de calcio HVA es un proceso dependiente de calcio en lugar de ser una inactivación dependiente de voltaje: algunos canales de calcio se inactivan con un incremento local de la concentración de calcio intracelular libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) por encima de su valor normal. De esta forma, el funcionamiento de estos canales de calcio HVA es auto-limitante: si los canales se encuentran abiertos tiempo suficiente para producir un crecimiento local de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ellos pueden cerrarse nuevamente (típicamente la inyección de quelantes de calcio baja la tasa de inactivación de la corriente de calcio previniendo el crecimiento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Es así como, por ejemplo, los canales de calcio tipo L pueden presentar tanto una inactivación dependiente de calcio (Fedulova et al., 1985; Dupont et al., 1986; Yue et al., 1990) como una inactivación por despolarización de la membrana (Fox et al., 1987).

La inactivación de los canales tipo T típicamente ocurre en un rango de voltaje muy diferente al de la curva de inactivación de los canales tipo L. Por ejemplo, en las neuronas sensoriales de pollo (Fox et al., 1987), la inactivación de las corrientes L está casi completa a -10 mV y está removida prácticamente en forma total a -60 mV, mientras la inactivación de las corrientes T está casi completa a -60 mV y se remueve en forma progresiva entre -60 mV y -95 mV. La corriente en los canales HVA tipo N se encuentra en una situación intermedia: la inactivación es removida en el amplio rango de -40 mV a -110mV. Por lo tanto, la componente L se puede aislar usando un potencial de partida de -40mV para inactivar los otros dos tipos de corriente de calcio. Por otra parte, la corriente T se puede registrar en forma aislada usando pulsos de baja amplitud (comienza a activarse en -70 mV y alcanza un máximo en aproximadamente -40 mV).

Generalmente, hay un grado significativo de superposición entre las curvas de inactivación y de activación de los canales tipo T, sugiriendo que estos canales de calcio podrían ser capaces de generar una corriente entrante y estacionaria de calcio en un rango estrecho de potenciales. Sin embargo, las curvas de inactivación y de activación de los canales tipo L pueden tener escasa superposición, sugiriendo que la inactivación dependiente de voltaje puede ocurrir a despolarizaciones demasiado pequeñas para abrir dichos canales (Fox et al., 1987).

A pesar de que los canales de calcio dependientes de voltaje tienen a la inactivación, ya sea dependiente de voltaje o de calcio, como un elemento que frecuentemente los caracteriza, se pueden encontrar varios ejemplos de canales de calcio cuya activación depende del voltaje pero que no presentan inactivación, o para ser más precisos, resultan persistentes durante despolarizaciones prolongadas. Estos canales podrían permitir una modulación continua del flujo de calcio en respuesta a cambios lentos del potencial de membrana (Eckert y Lux, 1976). Tanto las corrientes de alto umbral de activación (Coulter et al., 1989) como las de bajo umbral

(Pan, 2000) pueden tener una componente persistente. La amplitud de esta componente estacionaria de la corriente de calcio podría estar determinada por el balance entre una activación dependiente de voltaje y una inactivación mediada por calcio (Chad et al., 1984).

### **Canales de calcio tipo T**

Bajo condiciones fisiológicas, el umbral de activación aparente de las corrientes tipo T en registros electrofisiológicos está cerca del potencial de membrana de reposo, de -50 mV a -60 mV, alcanzando una activación completa normalmente de -20 a -30 mV (Huguenard, 1996). La activación es relativamente gradual en la mayoría de los casos. Y la tasa de activación de la corriente tipo T es fuertemente dependiente de voltaje, creciendo con la despolarización.

La inactivación es una de las principales características que distinguen a las corrientes tipo T de los varios componentes de HVA. Tres propiedades relacionadas con la inactivación tienen impacto funcional significativo en las neuronas que contienen corriente tipo T: inactivación dependiente de tiempo, inactivación de estado estacionario, y recuperación de la inactivación (Huguenard, 1996). Las corrientes tipo T se conocen como transitorias porque generalmente los canales se inactivan en forma rápida y completa durante una despolarización sostenida. Sin embargo, cuando la membrana se repolariza, los canales de calcio tipo T se deactivan lentamente y esto permite un flujo de calcio significativo, por ejemplo, a continuación de los potenciales de acción. En la mayoría de las células la inactivación de las conductancias de tipo T puede ser descrita como un proceso que tiene una evolución temporal que sigue un decaimiento exponencial simple que es fuertemente dependiente del voltaje: la constante de tiempo de la inactivación decrece con despolarizaciones progresivas. Esta característica promueve la auto-finalización de los LTSs.

La inactivación de estado estacionario aproxima la disponibilidad de canales tipo T como una función del potencial de membrana; en su potencial de reposo, una gran proporción de los canales tipo T están tónicamente inactivados. Los canales tipo T se vuelven disponibles para ser activados alrededor del potencial de reposo y valores más negativos, alcanzando un nivel mínimo de inactivación alrededor de -100 mV. Esta característica les confiere una gran influencia sobre la regulación de la excitabilidad neuronal.

Por último, el proceso de remoción de la inactivación, o desinactivación, también es fuertemente dependiente de voltaje en casi todas los tipos de células. Una hiperpolarización transitoria de la membrana (tal como las generadas por potenciales postsinápticos inhibitorios, o por la activación de ciertos tipos de canales de potasio) resulta en una recuperación de la inactivación de estos canales, derivando en un aumento del número de canales disponibles para la apertura por despolarizaciones subsiguientes de la membrana.

En diferentes células las corrientes tipo T cumplen diferentes roles funcionales que incluyen la generación de LTSs que conducen a disparos de ráfagas de potenciales de acción dependientes de sodio, promoción de oscilaciones intrínsecas, aumento de la entrada de calcio, potenciación de respuestas sinápticas, y disminución del umbral para la generación de potenciales de acción de alto umbral (Huguenard, 1996). En cuanto al primero de ellos, varias características biofísicas de la cinética de las corriente tipo T promueven los LTSs regenerativos: la activación de las corrientes tipo T comienza aproximadamente en el reposo, la tasa de activación dependiente de voltaje contribuye a las respuestas regenerativas robustas, y la tasa de inactivación dependiente de voltaje conduce a un LTS que se auto limita en el tiempo (Coulter et al. 1989).

### **Naturaleza de los cambios en la concentración intracelular de calcio**

En una célula en reposo, el nivel de calcio libre en el citoplasma ( $[Ca^{2+}]_i$ ) se mantiene extremadamente bajo. La  $[Ca^{2+}]_i$  en reposo normal se halla en el rango de 30 a 200 nM en la mayoría de las células, mientras que la concentración de calcio en el medio externo es del orden de 1 a 2 mM. La  $[Ca^{2+}]_i$  se preserva tan baja gracias a la acción combinada de bombas de calcio dependientes de ATP y sistemas intercambiadores de  $Na^+-Ca^{2+}$ , ambos en la membrana plasmática, y de bombas de calcio dependientes de ATP en la membrana de organelas intracelulares, tales como el retículo endoplasmático y el sarcoplásmico. Una vez que los canales que permean calcio se abren, ya sea en la membrana plasmática o del retículo, los iones de calcio fluyen hacia el citoplasma y la  $[Ca^{2+}]_i$  local aumenta transitoriamente hasta que la difusión, el *buffering* y los mecanismos de bombeo inmovilizan o remueven el calcio extra.

De esta forma, las señales de  $[Ca^{2+}]_i$  están modeladas por la dinámica de las fuentes intracelular y extracelular de calcio y de los mecanismos de extrusión, las propiedades y distribución espacial de los *buffers* de calcio, y la difusión del ión dentro de la célula.

El incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  puede resultar principalmente de la entrada de calcio a través de canales ligando dependientes (por ejemplo: con receptores NMDA o receptores metabotrópicos de glutamato, mGluR) o canales de calcio activados por voltaje, o por medio de la liberación de reservorios intracelulares (mediada por la activación de receptores de  $IP_3$  o de receptores de rianodina activados por calcio, que dan lugar al mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (CICR, por *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*)).

Varios de estos mecanismos para la entrada de calcio al citoplasma pueden estar presentes en una misma célula, expresándose en forma selectiva dependiendo del estímulo. Por ejemplo, en las neuronas piramidales del hipocampo, una activación sináptica subumbral

conduce a un flujo de calcio postsináptico primordialmente a través de receptores de NMDA (Alford et al., 1993; Yuste et al., 1999). Estímulos supraumbrales producen un flujo adicional de calcio por medio de CCSVs activadas por potenciales de acción de sodio (Jaffe et al., 1992; Miyakawa, 1992; Sabatini y Svoboda, 2000). Bajo ciertas condiciones, el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  puede jugar un papel en el cambio de la concentración intracelular de calcio ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en estas neuronas (Emptage et al., 1999); y en otras circunstancias se puede inducir una liberación regenerativa de calcio mediada por  $\text{IP}_3$  (Nakamura et al., 1999).

Asimismo, las diferentes fuentes de calcio pueden interactuar para dar lugar a un incremento  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , principalmente debido a la modulación por  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de los canales de calcio del retículo endoplásmico (Bezprozvanny et al., 1991; Miyakawa et al., 2001). Por ejemplo, el calcio que entra a través de CCSVs puede actuar sinérgicamente con el  $\text{IP}_3$  generado sinápticamente para modular los receptores de  $\text{IP}_3$  (Nakamura et al., 1999). Éstos últimos controlan una de las vías de liberación de calcio desde el retículo endoplasmático. En las células piramidales, la liberación transitoria de calcio evocada sinápticamente en espinas dendríticas depende de la activación de receptores de NMDA y es atribuida principalmente a CICR (Emptage et al., 1999).

Más aún, la distribución y la dinámica de las diferentes fuentes de calcio también pueden dar lugar a diferentes mecanismos actuando en forma simultánea en diferentes ubicaciones dentro de una misma célula. Es así como cuando una neurona piramidal de la corteza prefrontal recibe una entrada glutamatérgica espacialmente restringida, se pueden presentar tres zonas distintas en el árbol dendrítico en lo que respecta a la interacción voltaje-calcio (Milojkovic et al., 2007). Otro caso se da en las neuronas piramidales de hipocampo, en donde el incremento de calcio intracelular resulta de la entrada del catión a través de canales

activados por ligando, entrada por canales sensibles a voltaje, y liberación desde reservorios intracelulares. Estas fuentes tienen una distribución espacial distinta y los mecanismos no son independientes.

Un claro ejemplo de la modulación de las señales de  $[Ca^{2+}]_i$  son las ondas de calcio (Nakamura et al., 1999). La estimulación sináptica evoca aumentos en  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la liberación de reservorios intracelulares; ellos se propagan en forma de onda en regiones acotadas de las neuronas piramidales del hipocampo y son debidas a la activación de mGluR y la subsecuente generación de  $IP_3$  (Finch y Augustine, 1998). Según este modelo el incremento regenerativo en  $[Ca^{2+}]_i$  es debido a la acción sinérgica del  $IP_3$  y el calcio sobre los receptores de  $IP_3$  para la liberación de calcio del retículo endoplasmático, generando así las ondas de calcio. En este modelo, el tiempo de difusión del calcio sería responsable de mucho del retraso de propagación de las ondas de calcio (Nakamura et al., 1999).

Podemos encontrar otro caso particular en el que el alcance de la difusión del ión influye sobre las características de las señales de calcio: la difusión de calcio a través del cuello de la espina dendrítica de neuronas piramidales de CA1 es despreciable en condiciones fisiológicas, y la cabeza de la espina funciona como un compartimento separado a escalas temporales largas, permitiendo la sumación temporal de calcio localizado durante trenes de estimulación sináptica (Sabatini et al., 2002). Aunque en una forma no tan extrema, en general la difusión de calcio está sensiblemente limitada, fijando el alcance espacial y las características de la señalización por calcio. Pero a diferencia de la restricción geométrica establecida por el cuello de las espinas dendríticas, el fenómeno de difusión es típicamente contrarrestado por mecanismos homeostáticos, tales como la extrusión y los buffers de calcio.

De esta manera, los mecanismos de extrusión también pueden modelar las señales de calcio. Una rápida remoción del calcio del citoplasma puede ocurrir por su transporte hacia el

espacio extracelular así como hacia los reservorios intracelulares. Algunos de los mecanismos de extrusión de calcio más conocidos son: remoción de calcio por secuestro hacia los reservorios internos a través de la bomba de calcio dependiente de ATP en el retículo endoplasmático liso y por medio del intercambiado de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria (Rigoni y Deana, 1986; Verkhratsky y Petersen, 1998); y hacia el exterior a través de bombas de calcio dependientes de ATP en la membrana plasmática y vía el intercambiado de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Sabatini et al., 2002).

### **Naturaleza de la señal $\Delta F/F$**

Los indicadores de calcio que son excitados y emiten en el rango de luz visible, como son los de la familia de los Oregon Green BAPTA y Calcium Green, han adquirido una popularidad creciente desde su formulación. Ante la unión de calcio, estos fluoróforos aumentan su eficiencia cuántica (impactando sobre la intensidad de fluorescencia) sin corrimientos en sus espectros de absorción o de emisión. Así es como la intensidad de emisión  $F$  depende de las propiedades del fluoróforo, de la concentración del mismo y de las condiciones experimentales, además de depender de la cantidad relativa de las formas libre y ligada del agente fluorescente.

Los indicadores de calcio que trabajan con luz visible y están disponibles hoy día no permiten realizar mediciones ratiométricas de diferentes longitudes de onda. En su lugar, las señales que resultan del cambio de la concentración de calcio ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) típicamente son expresadas como cambios relativos de la fluorescencia respecto a la basal:  $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$ . Donde  $F_0$  denota el nivel de fluorescencia antes del estímulo una vez substraído el nivel de fondo (el cual es generado por componentes ópticos, la solución de baño, fluoróforos endógenos, etc.).

Al igual que las mediciones ratiométricas de diferentes longitudes de onda,  $\Delta F/F$  es, en teoría, independiente de la concentración del indicador, la longitud del camino óptico (y por tanto, el espesor del preparado), la intensidad de excitación, y la eficiencia del detector (Yuste et al., 2000). Sin embargo,  $\Delta F/F$  es una función sublineal de  $\Delta[Ca^{2+}]$ : grandes  $\Delta[Ca^{2+}]$  saturan el indicador (Minta et al., 1989; Tsien y Waggoner, 1995; O'Malley et al., 1999). Además,  $\Delta F/F$  depende del nivel basal de la concentración de calcio ( $[Ca^{2+}]$ ) en reposo,  $[Ca^{2+}]_0$ .

Una variedad de métodos han sido desarrollados para traducir la fluorescencia de longitud de onda única en  $[Ca^{2+}]$ . Todas ellas derivan directamente de la ecuación 5 de Grynkiewicz y colaboradores (1985). Una ecuación de conversión para  $\Delta F/F$  ampliamente usada en la literatura es la siguiente (Lev-Ram et al., 1992; Neher y Augustine, 1992):

$$[Ca^{2+}] = \frac{[Ca^{2+}]_b + K_d \frac{(\Delta F/F)}{(\Delta F/F)_{\max}}}{\left(1 - \frac{(\Delta F/F)}{(\Delta F/F)_{\max}}\right)} \quad (1)$$

donde  $K_d$  es la constante de disociación para la reacción  $Ca^{2+}$ :indicador y  $(\Delta F/F)_{\max}$  es el cambio máximo bajo saturación del fluoróforo. Otra forma de escribir la misma ecuación es (Sabatini et. al, 2000):

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]}{K_D} = \frac{F_{\max}}{F_0} (1 - R_f^{-1}) \frac{(\Delta F/F)}{\left((\Delta F/F)_{\max} - (\Delta F/F)\right) \cdot (\Delta F/F)_{\max}} \quad (2)$$

donde  $R_f = F_{\max}/F_{\min}$  es el rango dinámico. Con el fin de poder medir los distintos parámetros que intervienen en la fórmula, este último método requiere mediciones de fluorescencia durante el experimento que estén cerca de la saturación del indicador, además del uso de un fluoróforo con un rango dinámico grande.

De esta forma,  $\Delta F/F$  es una medida experimental con la propiedad de ser proporcional al correspondiente  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ , pero únicamente en el régimen lineal del indicador ( $[\text{Ca}^{2+}] \ll K_d$ ). Esta condición equivale a evocar cambios de fluorescencia pequeños, de forma tal que el indicador esté lejos de la saturación. En ese caso, ambas ecuaciones se reducen a:

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}] = \frac{K_d}{(\Delta F/F)_{\max}} (\Delta F/F) \quad (\Delta F/F \ll (\Delta F/F)_{\max}) \quad (3)$$

Todas estas fórmulas (ec. 1, 2 y 3) para relacionar  $\Delta F/F$  con  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  asumen las siguientes condiciones: estequiometría 1:1 de la reacción  $\text{Ca}^{2+}$ :indicador, equilibrio químico entre  $\text{Ca}^{2+}$  y el fluoróforo, y que la intensidad de fluorescencia sea linealmente proporcional a la concentración de las especies fluorescentes (Grynkiewicz, 1985).

A pesar de estas limitaciones para el uso de estos métodos, las comparaciones cualitativas entre diferentes regiones celulares siguen siendo válidas: por ejemplo, si  $\Delta F/F$  es más grande en una región que en otra, entonces el cambio de  $[\text{Ca}^{2+}]$  debería ser también más grande. La validez de este tipo de comparaciones depende de la suposición de que el  $[\text{Ca}^{2+}]$  basal es uniforme en la célula.

Por construcción, los indicadores actúan como *buffers* de calcio, ya que es la unión reversible del calcio a la molécula del indicador lo que induce el cambio en el nivel de fluorescencia sobre el que se basa la señal de calcio. Como agentes quelantes, una vez introducidos dentro de la célula, los indicadores contribuyen al *buffering* del calcio celular. Esto afecta tanto a la amplitud como a la dinámica de las señales de calcio. En esta discusión, el término *buffer* de calcio se emplea en sentido estricto para designar a las moléculas (ya sean endógenas o agregadas por el experimentador) que ligan calcio. Los *buffers* de calcio no deben confundirse con otros mecanismos (bombas o intercambiadores de calcio) que secuestran o bombean el calcio hacia adentro de organelas u otros compartimentos. El poder de *buffering* de

calcio de tales moléculas es típicamente caracterizado por la capacidad del *buffer* de calcio,  $\kappa_B$  ( $Ca^{2+}$ -binding ratio; Neher y Augustine, 1992):

$$\kappa_B = \frac{d[CaB]}{d[Ca^{2+}]} = \frac{B_T}{K_d} \times \frac{1}{(1 + [Ca^{2+}]/K_d)^2}$$

donde [CaB] es la concentración del *buffer* unido a calcio,  $[Ca^{2+}]$  es la concentración de iones de  $Ca^{2+}$  libres, y  $B_T$  es la concentración total de *buffer*. La capacidad del *buffer* brinda la razón entre el calcio secuestrado por el *buffer* sobre el calcio que permanece libre ante un incremento de  $[Ca^{2+}]$ .

De esta expresión se deduce que se requieren concentraciones extremadamente bajas del indicador, si tanto la amplitud como el curso temporal de las señales de calcio se desean ser registradas con fidelidad. La razón es que los indicadores compiten con los *buffers* endógenos por el calcio.

El modelo de compartimento único para la dinámica de  $[Ca^{2+}]$  celular (Neher y Augustine, 1992; Helmchen et al., 1996) fue desarrollado para explicar las propiedades básicas de los transitorios de calcio observados en los experimentos de *imaging* en estructuras pequeñas tales como terminales presinápticas y dendritas, producidos por una corriente pequeña y breve de calcio. La solución analítica para  $[Ca^{2+}]$  es una función exponencial con amplitud  $A$  y constante de tiempo de decaimiento  $\tau$ . Tanto  $A$  como  $\tau$  dependen de la capacidad de los *buffers* de calcio. Comparado con los transitorios de  $[Ca^{2+}]$  inalterados (sin participación de los *buffers* exógenos), la amplitud  $A$  que es obtenida de las mediciones con los indicadores de calcio está reducida por un factor  $(1+\kappa_E)/(1+\kappa_E+\kappa_B)$ , donde  $\kappa_E$  y  $\kappa_B$  denotan la capacidad de los *buffer* endógenos y exógenos, respectivamente. Ante una entrada de calcio dada y una  $[Ca^{2+}]$  basal fija, tanto el  $\Delta[Ca^{2+}]$  como  $\Delta F/F$  decrecen con la concentración del indicador, debido al *buffering* de calcio.

La constante de tiempo de decaimiento ( $\tau$ ) de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , tras un pequeño y breve incremento, al nivel de reposo depende de los mecanismos de extrusión del calcio del citoplasma, pero resulta afectada por los buffers;  $\tau$  es inversamente proporcional a la capacidad total de los *buffers* de calcio (la suma del endógeno y la del indicador) (Sabatini et al., 2002).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA TESIS**

Este trabajo tiene como objetivo principal analizar el procesamiento y la propagación de señales sinápticas en las neuronas NS de la sanguijuela. Como se ha mencionado, estas neuronas no desencadenan potenciales de acción pero cuentan con un árbol neurítico muy extenso y profuso. Además, se sabe que este tipo neuronal cuenta con canales de calcio sensibles a voltaje. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo básica es que conductancias activas participan y moldean la integración de señales en este elemento de la vía de procesamiento sensoromotor. En esencia, evaluamos dos hipótesis extremas: la neurona se comporta como un sistema de compartimentos funcionales eléctricamente aislados, permitiendo la integración de múltiples señales en forma simultánea, o hay que considerarla como una única unidad eléctrica, en la cual la señal se transmite sin atenuarse de un punto a otro.

En particular, se dispuso estudiar las señales de calcio evocadas en el árbol neurítico de la NS bajo diferentes protocolos de estimulación, con la meta de analizar diferentes propiedades intrínsecas involucradas. En el Capítulo I, se pretende caracterizar las señales de calcio generadas por una respuesta en la cuál está involucrada una apertura regenerativa de canales de calcio sensibles a voltaje. A continuación, el propósito del Capítulo II es estudiar la dependencia de las señales de calcio con el grado de despolarización y el potencial de membrana basal. Por último, el objetivo del Capítulo III es analizar las señales de calcio evocadas por estímulos sinápticos provenientes de neuronas sensoriales, con especial énfasis en el procesamiento y propagación de estas señales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación biológica

Los animales utilizados fueron sanguijuelas de la especie *Hirudo sp*, con un peso entre 2 y 5 gramos. Las mismas fueron compradas a la compañía Leeches USA (Westbury, Nueva York, Estados Unidos) y mantenidas en un medio salino comercial (utilizado en una dilución 1:1000 con respecto a la recomendada para alojar peces marinos) llamado Instant Ocean (Aquarium Systems, Mentor, Ohio, Estados Unidos), a 15 °C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales no fueron alimentados durante, por lo menos, un mes antes de la disección con el fin de estandarizar sus condiciones fisiológicas.

Antes de realizar cada disección, los animales fueron anestesiados por enfriamiento a 0°C durante por lo menos media hora. El sistema nervioso de las sanguijuelas fue disecado en solución salina normal (ver Soluciones) fría. Para este trabajo de tesis se utilizaron ganglios aislados pertenecientes a segmentos medios (entre el segmento 7 y el 18; ver **figura I.1A**). Los ganglios fueron montados con su cara ventral hacia arriba en cámaras de registro con solución salina normal. La base de la cámara contenía una capa del elastómero de silicona transparente Sylgard184 (Dow Corning, Midland, Michigan, Estados Unidos), sobre la cual se fijaron los ganglios utilizando alfileres pequeños de acero inoxidable. En todos los ganglios estudiados se removi6 quirúrgicamente el tejido que empaqueta los *somata* neuronales (*sheath*), que está formado por un endotelio, una capa de tejido conectivo y parte de las células gliales gigantes que definen la compartimentalización del ganglio en paquetes (Sawyer, 1986) (**figura I.2**).

En los casos en los que la solución normal fue reemplazada por soluciones de otras composiciones, el recambio de solución se realizó a una tasa de 50 µl/s (tasa que alcanza para llenar la cámara de registro de 6 ml en 2 minutos), durante el tiempo indicado en cada

experimento. Para los experimentos que duraron más de 30 minutos, se mantuvo un flujo similar constante de solución normal fresca. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~ 20 °C).

### **Soluciones**

La solución salina normal empleada tenía la siguiente composición (en mM): NaCl 115; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 1.8; MgSO<sub>4</sub> 1; Tris base 5.4. Cuando se quiso usar el magnesio como bloqueante inespecífico de canales permeables a calcio (Hille, 2001), se recurrió a una solución con alta concentración de magnesio, en el que la relación entre este último divalente y el Ca<sup>2+</sup> fue 20:1. La solución de alto magnesio tenía la siguiente composición (en mM): NaCl 106; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> 20; Tris base 5.4. Todas las soluciones usadas para perfundir los ganglios tenían un pH ajustado a 7.4 con pequeños volúmenes de NaOH 1 N o HCl 5 N, según correspondiera. Los cambios en la composición de las soluciones cuidaron que la osmolaridad de las mismas no cambiara más del 10% con respecto a la osmolaridad de la solución normal (~261).

Algunas de las sales (KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>) fueron obtenidas de Merck Química Argentina; el Tris-HCl se obtuvo de Merck (Damstadt, Alemania); y el NaCl se obtuvo de Fisher Chemicals (Fair Lawn, Nueva Jersey, Estados Unidos..

### **Registros electrofisiológicos**

Las neuronas individualizadas fueron registradas mediante electrodos intracelulares impalados en el soma neuronal. Se utilizó un amplificador diferencial Axoclamp 2A ó Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, California, Estados Unidos), operando en la

configuración de fijación de corriente continua (*current clamp*) o discontinua (*discontinuous current clamp, DCC*).

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (FHC, Bowdoinham, Maine, Estados Unidos) utilizando un estirador de micropipetas horizontal Sutter P-97 (Sutter Instrument, Novato, California, Estados Unidos) y se llenaron con una solución de acetato de potasio 3 M (Mallinckrodt Argentina). Se seleccionaron electrodos de 20-50 M $\Omega$  de resistencia.

Los registros fueron digitalizados mediante un conversor analógico-digital Digidata 1440A ó 1322A (Axon Instruments) y adquiridos a una frecuencia de 1 ó 10 kHz en una PC con el programa Clampex del paquete pClamp (Axon Instruments). En los casos en que se operó en la configuración de fijación de corriente continua, se compensó la caída de voltaje en el electrodo mediante la función “*bridge balance*” del amplificador. En algunos de los experimentos en los que se inyectó corriente en la neurona NS, se trabajó en la configuración de fijación discontinua de corriente (DCC), ya que permite independizarse de la compensación de la caída de voltaje en el electrodo. Además, en el caso particular de las neuronas NS, este método es ventajoso ya que estas neuronas mostraron un componente rápido en la constante temporal de su membrana, que hizo que los cambios de potencial debidos a la resistencia de entrada de la célula no fueran fácilmente distinguibles de los debidos a la resistencia del electrodo. La frecuencia de muestreo de 1 kHz se utilizó para los experimentos en que se registró con el amplificador diferencial operando en la configuración de fijación de corriente discontinua (DCC). En cambio, cuando el amplificador era configurado en el modo de fijación de corriente continua, la frecuencia de muestreo se estableció en 10 kHz, permitiendo conocer con más detalle la actividad eléctrica de las neuronas.

### **Protocolos de estimulación**

La estimulación de las neuronas se realizó inyectando corriente continua (DC) por medio del electrodo de registro. Todos los estímulos fueron comandados desde el programa de adquisición y procesados por el mismo sistema que se usa para la adquisición de datos.

La generación de una espiga de bajo umbral (LTS por las siglas en inglés de *low-threshold-spike*) robusta en la neurona NS se alcanzó inyectando un pulso de corriente hiperpolarizante de -8 nA de amplitud y 2 s de duración (Rela et al., 2009).

La evocación de potenciales de acción en las neuronas mecanosensoriales P se realizó inyectando pulsos breves de corriente (5 ms) con intensidad supraumbral (3-4 nA). El estímulo usado en los experimentos produjo un tren de potenciales de acción durante un lapso de 1 s: las frecuencias estudiadas fueron 4, 8, 15 y 25 Hz.

Cuando se aplicaron series de estímulos de diferente amplitud o frecuencia, siempre que fue posible, el orden de los mismos fue alterado para compensar posibles efectos de preconditionamiento debidos a estímulos previos. Por la misma razón, se esperó un intervalo entre estímulos sucesivos (70 s entre pulsos despolarizantes de diferente amplitud inyectados en la neurona NS, y 60 s entre las estimulaciones eléctricas de la neurona mecanosensorial P para generar ráfagas de potenciales de acción).

Cuando se requirió llevar el potencial de membrana ( $V_m$ ) de las neuronas a valores distintos de su  $V_m$  de reposo, se inyectó corriente DC por medio del electrodo de registro con la amplitud necesaria para alcanzar el  $V_m$  deseado. Dicha inyección se mantuvo durante el episodio de registro, subyacente a cualquier cambio de  $V_m$  que experimentara la neurona en respuesta a la entrada sináptica o en respuesta a estímulos adicionales que se aplicaran.

La resistencia de entrada ( $R_e$ ) de las neuronas se midió inyectando pulsos de corriente hiperpolarizante de pequeña amplitud (-0.2 nA) con una duración suficiente para alcanzar un nuevo valor estable de  $V_m$  medido en el soma de las células (300 ms). La  $R_e$  se calculó como el cociente entre el cambio en el  $V_m$  de la neurona y la amplitud del pulso de corriente inyectado.

### **Tinciones**

Con el fin de aplicar la técnica de *Calcium-Imaging*, las neuronas fueron cargadas por iontoforesis con colorantes fluorescentes sensibles a calcio: Calcium Green-1 (CG-1,  $K_d = 190$  nM), Calcium Green-5N (CG-5N,  $K_d = 14$   $\mu$ M), Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1,  $K_d = 170$  nM), u Oregon Green 488 BAPTA-2 (OGB-2,  $K_d = 580$  nM). Todos los fluoróforos (Invitrogen/Molecular Probes, Oregon, Estados Unidos) fueron empleados en la forma de sales de potasio que no permean la membrana celular, y fueron preparados en una solución de acetato de potasio 100 mM, con una concentración final de colorante de 5mM. Haciendo uso de la propiedad de capilaridad, dicha solución se empleó para llenar los microelectrodos desde su base durante un tiempo de 2 minutos. A diferencia de los electrodos de registro intracelular, los electrodos así llenados tenían una resistencia de entre 80 y 130  $M\Omega$ .

La inyección de colorante se realizó en el soma de las neuronas NS. Para inyectar los colorantes se aplicó un protocolo que consistía en un breve pulso de corriente despolarizante (+0.2 nA, 100 ms), seguido de un pulso hiperpolarizante (-6 nA, 500 ms), siendo esta secuencia repetida a una frecuencia de 1 Hz durante un lapso de 15 minutos.

El colorante inyectado se dejó difundir durante 90 minutos a temperatura ambiente ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ), tiempo durante el cual la solución normal contenida en la cámara de registro fue reemplazada cada 20 minutos, aproximadamente.

El CG-5N se empleó para el estudio de la cinética de las señales de calcio evocadas por LTS (**figuras RI.8 y RI.9**). Para el resto de los experimentos mostrados en el capítulo 1 se utilizó CG-1, OGB-1 y OGB-2. En los trabajos del capítulo 2 se usó CG-1 y OGB-1. Y, finalmente, los resultados del capítulo 3 se obtuvieron con OGB-1.

### **Adquisición de imágenes**

Las imágenes de las preparaciones fueron tomadas con un microscopio confocal Fluoview FV1000 (Olympus, Nagano, Japón), usando un objetivo de inmersión en agua 20x (apertura numérica 0.5). Dadas las características de los fluoróforos empleados, para la excitación se recurrió a un láser de Argón multilínea (se usó la línea de 488 nm) y un espejo dichroico DM405/488, y para la emisión un filtro BA505IF. CG-1 y CG-5N tienen su pico de emisión en 530 nm, y OGB-1 y OGB-2 en 520 nm (The Molecular Probes Handbook 2010).

Típicamente, las imágenes fueron registradas en el modo “cuadro”, a una tasa de adquisición de un cuadro (256 x 256 píxeles) cada 450 ms. Dicha configuración fue modificada únicamente cuando se trabajó con el colorante CG-5N: las imágenes fueron tomadas en el modo “línea”, a una tasa de muestreo promedio de una línea (1 píxel de ancho) cada 15 ms. En el modo “cuadro”, cada píxel correspondía a una superficie real de 2.5  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ ; en cambio, en el modo “línea” cada píxel representaba una superficie promedio de 0.6  $\mu\text{m}$  x 0.6  $\mu\text{m}$ . Las imágenes tenían un formato de 12 bits; es decir, la intensidad de fluorescencia ( $F$ ) en un píxel podía tomar un valor discreto en el rango de 0 a 4095, designándose  $u\text{PMT}$  (unidad del fotomultiplicador) a la mínima unidad.

Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: la apertura confocal ( $C.A.$ ) o apertura del *pinhole* siempre fue fijada en 300  $\mu\text{m}$ , la ganancia ( $gain$ ) en 1.0, y el *offset* en 5%;

la potencia del *laser* se estableció en la mayoría de los casos en 8% (aunque podía variar en el rango 6%-10%). El fotomultiplicador se configuró en el modo analógico y el voltaje del mismo (*PMT*) fue el principal parámetro de ajuste, pudiendo variar entre 560 V y 800 V (típicamente, entre 660 V y 720 V). El *PMT* se acomodó buscando maximizar la cantidad de pixeles de la imagen de la neurona NS en el rango 70-2500 uPMT.

La toma de imágenes fue sincronizada en forma automatizada con el sistema de registro electrofisiológico. Además, el sistema de adquisición de imágenes enviaba una señal eléctrica que permitía distinguir los momentos en los que se realizaba la toma y los momentos en que no; dicha señal fue registrada junto con la actividad electrofisiológica.

El potencial de membrana de reposo y la intensidad de fluorescencia fueron monitoreados durante el transcurso de los experimentos. Cualquier desviación significativa de los valores iniciales que no se debiera a la estimulación o al cambio de medio extracelular terminaba el experimento.

### **Neuronas estudiadas**

La ubicación de los *somata* neuronales en los ganglios de la sanguijuela es altamente conservada (**figura I.2B**), de modo que las distintas neuronas estudiadas fueron reconocidas inicialmente por la ubicación de los mismos. Finalmente su identidad fue confirmada según sus características electrofisiológicas conocidas, es decir, la presencia de potenciales de acción, la forma, amplitud y frecuencia de los mismos, la presencia de potenciales sinápticos espontáneos y la conectividad con otras neuronas conocidas. Cabe aclarar que las características de los potenciales de acción se refieren a las registradas en el soma, que en la mayoría de los casos

representa una propagación pasiva del fenómeno que se inicia a cierta distancia en el árbol neurítico.

### **Neurona NS**

Los *somata* de las neuronas NS ocupan un lugar identificado como 151 en el mapa de un ganglio medio de la sanguijuela (**figura I.2Bi**). Están ubicados en el extremo anterior de los paquetes laterales anteriores y son las únicas en su entorno que no muestran potenciales de acción espontáneos, ni en respuesta a múltiples tipos de estimulación. Expresan, en cambio, potenciales post-sinápticos inhibitorios espontáneos de entre 5-10 mV de amplitud y 50 ms de duración. Debido a esta actividad espontánea, debe aclararse que cada vez que se refiere al “Vm de reposo” o “Vm basal” de las neuronas NS, éste correspondió al Vm promedio durante 2 s sin estimulación alguna. En reposo, su Vm es de aproximadamente -40 mV, y en algunos casos muestran variaciones lentas de Vm, con amplitudes del orden de los 20 mV (Wadepuhl, 1989). En los experimentos se confirmó la identidad de la neurona NS verificando dos características principales: a) la neurona no genera potenciales de acción, y b) al finalizar la inyección de un pulso de corriente prolongado (aproximadamente 3 s) de -10 nA, se desencadena una respuesta despolarizante lenta y estereotipada. Además, en los casos en que se trabajó con la técnica de *calcium-imaging*, se pudo corroborar la identidad de la neurona a través de su morfología.

### **Neuronas P**

Los *somata* de las neuronas mecanosensoriales P están ubicados en los paquetes laterales posteriores (**figura I.2**). Existen 2 pares bilaterales de neuronas P por ganglio: el par lateral y el par medio, según la posición de sus *somata* en el ganglio con respecto al eje antero-posterior. Estas neuronas inervan el área ventral y dorsal de la pared del cuerpo del animal, respectivamente. En reposo su Vm es de aproximadamente -40 mV y son silentes. Se

caracterizan por generar un potencial de acción en la fase de repolarización (*rebound*), luego de la inyección de un pulso hiperpolarizante de aproximadamente  $-4$  nA y 300 ms de duración. También presentan, en su respuesta a la aplicación de dicho pulso, una inflexión que pone en evidencia la activación de una conductancia activada por hiperpolarización (*sag*).

### **Procesamiento de imágenes**

Las imágenes de fluorescencia fueron procesadas con un programa diseñado y escrito por el autor utilizando el programa Matlab (MathWorks, Massachusetts, Estados Unidos), tratando de emular muchas de las funciones básicas que tienen los programas de uso comercial, pero ajustando su funcionamiento a las necesidades del presente trabajo.

En primer lugar, antes de empezar con el procesamiento, se verificó observando la secuencia de imágenes que no hubiesen desplazamientos del preparado en el tiempo, ya sean espontáneos o productos de la estimulación.

El procesamiento propiamente dicho empezó con la aplicación de un filtro espacial de tipo gaussiano. Dicho filtro suaviza la imagen en la dimensión espacial, facilitando la futura tarea de reconocimiento y reconstrucción del trazado de los principales procesos neuríticos de la neurona. Para ello, se le asigna a cada pixel la intensidad de fluorescencia promedio de los 9 pixeles que forman un cuadrado de  $3 \times 3$  con centro en el pixel en cuestión. Éste es un promedio ponderado por la distancia al centro del cuadrado, de una forma tal que se conserva la intensidad total de la imagen completa.

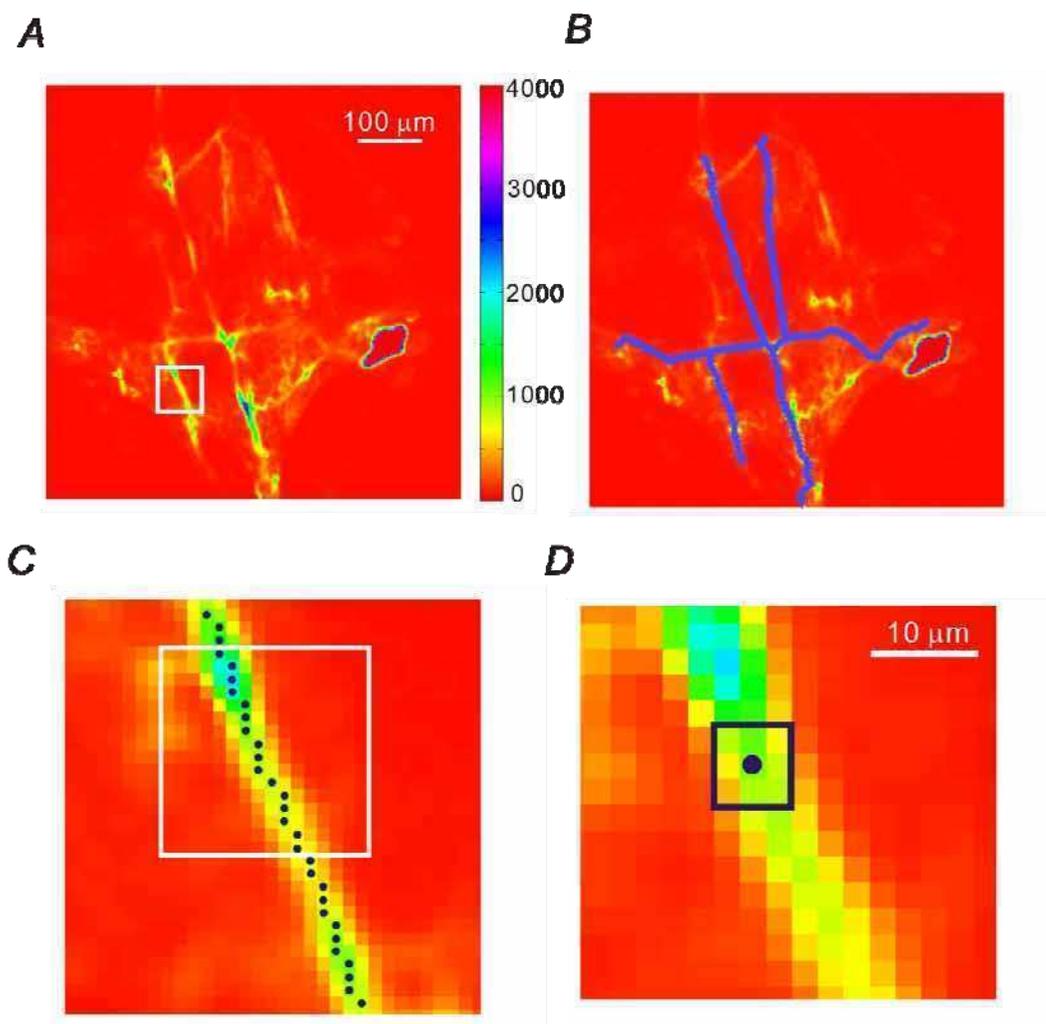
En segundo término, se procedió a efectuar la corrección por el fondo. Para dicha enmienda, se eligieron en forma aleatoria 10 pixeles que se encontraban fuera del contorno del ganglio. Para cada pixel elegido, se tomó un cuadrado de  $3 \times 3$  pixeles centrado en el

seleccionado y se promediaron todos los valores (90 píxeles) de intensidad de fluorescencia. Como dicho valor le corresponde a un cuadro, se promediaron todos los datos de una secuencia temporal completa, obteniéndose un único “valor para el fondo” de una secuencia. Finalmente, se les descontó este último valor a las intensidades de fluorescencia de todos los píxeles de cada uno de los cuadros de una secuencia.

En este estudio no se efectuaron correcciones por el fenómeno de *bleaching* del colorante, ya que se demostró que su efecto se puede despreciar dadas las características del presente trabajo.

En tercer lugar se definieron “superpíxeles” a lo largo de la estructura de la neurona. Definimos como “superpíxel” a un conjunto de 9 píxeles que forman un cuadrado de 3 píxeles de lado (**figura MyM.1D**), su intensidad de fluorescencia es la intensidad promedio de los 9 píxeles y su ubicación es la localización de su píxel central. Éstos se ubicaron manualmente sobre los elementos más visibles del árbol neurítico de la neurona (**figura MyM.1C**), tratando de abarcar todas las estructuras a analizar (**figura MyM.1A-B**); no se estudiaron las señales de fluorescencia en el soma neuronal. En caso de que la imagen no permitiera distribuir los superpíxeles en forma continua a lo largo de las neuritas, el último píxel visible de un tramo fue unido siguiendo una línea recta con el primer píxel visible del tramo siguiente que pareció ser su continuación. Las discontinuidades se debían, muy posiblemente, por el enmascaramiento que producían en especial los otros somata neuronales por sobre las arborizaciones llenadas con el fluoróforo.

Finalmente, se calculó el cambio relativo de fluorescencia  $\frac{\Delta F(t)}{F}$ . Se define como fluorescencia basal ( $F_0$ ) a la intensidad de fluorescencia promedio durante el lapso de tiempo previo a la estimulación. Dicho promedio consistió, en todos los protocolos empleados, de un



**Figura MyM.1. Pixeles, superpíxeles, ROIs y procesos neuríticos.** **A**, imagen de fluorescencia basal de una neurona NS cargada con OGB-1. La escala de colores codifica la intensidad de la señal de fluorescencia, medida en uPMT. **B**, sobre la misma imagen mostrada en **A**, se presentan los trazos formados por píxeles (círculos violetas) contiguos a lo largo de los procesos neuríticos a estudiar (ver figura RI.1). **C** y **D**, se amplían las regiones recuadradas en blanco en **A** y **C**, respectivamente. Los superpíxeles (en **D**, cuadrado violeta) están constituidos por un píxel central (círculo violeta) y 8 píxeles circundantes que forman un cuadrado de 3 x 3 píxeles. Los píxeles centrales de los ROIs se ubican a lo largo de las neuritas de interés (ver **C**), pasando por los puntos de mayor intensidad de fluorescencia y nitidez. Un conjunto de superpíxeles consecutivos que ocupan un largo de 40  $\mu\text{m}$  constituyen un ROI (región recuadrada en **C**).

mínimo de 10 cuadros. Luego, cuadro a cuadro, se calculó el cambio relativo de fluorescencia (de ahora en adelante,  $\Delta F/F$  o transitorio de calcio) de cada superpixel como:

$$\frac{\Delta F(t)}{F} = \frac{F(t) - F_0}{F_0} \times 100\%$$

Un pixel o un superpixel se categorizaron como “defectuosos” cuando no cumplían alguna de las siguientes dos condiciones: fluorescencia basal mayor a 3 veces la intensidad del fondo (baja relación señal/ruido) o fluorescencia basal menor a 3000 uPMT (posibilidad de saturación del  $\Delta F/F$ ).

Para definir las regiones de interés (ROI, por *region of interest*) donde focalizar el estudio de las señales de fluorescencia, se procedió a dividir el árbol neurítico de la neurona en una secuencia de segmentos de un largo de 40 $\mu$ m (ROI). Cada ROI estaba compuesto por una secuencia de superpíxeles, no necesariamente en línea recta, que seguían el trazo formado por los puntos más brillantes de la neurona. Un ROI se consideró para su estudio únicamente si al menos un 40% de los superpíxeles que lo constituían no habían sido clasificados como defectuosos.

Finalmente, cada ROI se identifica por su ubicación espacial, descripta por su pertenencia a una de las cuatro ramas primarias o al tronco que se describen en la **figura RL.1**, y por la distancia de su centro respecto del tronco o del soma de la neurona, respectivamente. De esta forma, la notación para denominar a los ROI es la siguiente: “neurita-distancia” (por ejemplo, *rIA-140 $\mu$ m* identifica al ROI ubicado a 140  $\mu$ m del tronco dentro de la rama ipsilateral anterior). Cada ROI así definido se asocia a una señal de fluorescencia que resulta del promedio de la señal de fluorescencia de todos los superpíxeles que lo componen (se descartan los superpíxeles defectuosos para el promedio).

Este criterio para definir las zonas de interés se modificó cuando se trabajó con CG-5N (**figura RL.8 y 9**). En este caso, las imágenes fueron tomadas en forma de líneas y el segmento

de interés (SOI, por *segment of interest*) fue definido como una secuencia de píxeles consecutivos en la cual ninguno de los ellos había sido calificado como defectuoso. Además, el SOI debía tener una longitud mínima de 20  $\mu\text{m}$ , y tenía que haber similitud entre las señales de fluorescencia de cada píxel dentro del SOI. La señal de fluorescencia que se le asocia al SOI resulta del promedio de la señal de fluorescencia de todos los píxeles que lo conforman. Para los paneles A, B y C de la **figura RI.9** se usaron los mismos SOIs; para el panel D de la **figura RI.9** se trabajó con SOIs de 20  $\mu\text{m}$ .

### **Análisis de los resultados**

El análisis y procesamiento de los registros se realizó en máquinas PC, usando los programas Clampfit del paquete pClamp (Axon Instruments), Statistica (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos), Origin (Microcal Software, Northampton, Massachusetts, Estados Unidos), y programas escritos a tal fin por el autor usando la aplicación Matlab.

Los resultados se expresaron como valores de media  $\pm$  error estándar (s.e.m.) y el número de preparaciones (n) se expresó entre paréntesis.

El grado de significancia estadística de los resultados obtenidos en los distintos experimentos se determinó usando alguna de las siguientes pruebas (elegido según el diseño experimental y el tamaño de la muestra): *t-test de Student* para dos muestras no pareadas; *t-test de Student pareado* para dos muestras pareadas; *test de ANOVA* de un factor y prueba de Tukey para comparaciones múltiples; *test de Mann-Whitney* para dos muestras no pareadas; *test de Kruskal-Wallis* para tres o más muestras independientes; *test de Shapiro-Wilk* y *test de Lilliefors* para prueba de normalidad (distribución normal o gaussiana). Los resultados de los tests fueron

considerados significativos cuando p-valor < 0.05 (un asterisco, \* p < 0.001; doble asterisco, \*\*p < 0.05).

Con el fin de caracterizar y estudiar las señales registradas, se procedió a identificar, medir y calcular los siguientes parámetros en forma sistemática:

*Tiempo cero*: en los casos en que se inyectó un pulso de corriente hiperpolarizante, se define como origen del eje temporal al momento en que finaliza dicho pulso. Cuando el pulso de corriente inyectado fue de carácter despolarizante o cuando se estimuló una neurona mecanosensorial con el fin de evocar una serie de potenciales de acción, se establece como el origen temporal al momento en que comienza la estimulación eléctrica.

a) del LTS de la neurona NS (**figura RI.3**):

1. *Umbral*: punto de inflexión de la fase de subida del LTS. La coordenada temporal del umbral ( $T_{umbral}$ ) corresponde a la del mínimo local de la derivada primera con respecto al tiempo del registro de voltaje, durante la fase de subida del LTS. Con el fin de evitar la alta sensibilidad al ruido que tiene la derivada, se filtró el registro de voltaje con un filtro pasabajo gaussiano con una frecuencia de corte de 10 Hz. Con esta manipulación, se conservaron las características principales de la señal en la región de interés, como son el valor del Vm y su curso temporal, y se anularon las fluctuaciones rápidas debidas al ruido.
2. *Pico<sub>LTS</sub>*: punto de máximo valor de la curva de Vm en función del tiempo.

3.  $Amplitud_{LTS}$  [mV]: diferencia de  $V_m$  medida desde el umbral hasta el  $pico_{LTS}$ .
4.  $T_{pico_{LTS}}$  (tiempo al pico) [s]: tiempo transcurrido entre el tiempo cero y el  $pico_{LTS}$ .
5.  $Ancho_{LTS}$  [s]: ancho del LTS medido al 80% de la amplitud  $LTS$ . Se ubicaron los puntos en los que se alcanza el 80% de la amplitud  $LTS$ , contando a partir del umbral, a un lado y a otro del pico. Y se calculó la duración como la diferencia entre las coordenadas temporales de esos dos puntos.
6.  $T_{b50\%_{LTS}}$  (tiempo al 50%) [s]: tiempo transcurrido entre el tiempo cero y el punto en que se alcanza la mitad de la  $amplitud_{LTS}$  durante la fase de bajada.

Exceptuando el caso del umbral, para la medición de los restantes parámetros se empleó el registro electrofisiológico original (sin filtrar).

b) del potencial sináptico de la neurona NS:

1.  $Potencial\ sináptico$  [mV]: respuesta promedio durante los primeros 5 s. Primero se midió la línea de base para  $V_m$  durante los 5 s previos a la estimulación de la neurona mecanosensorial. Luego se midió el cambio promedio de  $V_m$  de la neurona NS respecto a la línea de base durante los 5 s posteriores al tiempo cero.

c) del transitorio de calcio (**figura RI.3**):

1.  $Ruido_{\Delta F}$  [%]: desviación estándar del valor basal de  $\Delta F/F$ , previa a cualquiera de los

estímulos.

2.  $Amplitud_{\Delta F}$  [%]: valor promedio de  $\Delta F/F$  durante los primeros 5 s a partir del tiempo cero.
3.  $Pico_{\Delta F}$ : a la señal de  $\Delta F/F$  se le aplicó un filtro pasabajos gaussiano con un frecuencia de corte de 0.25 Hz y luego se identificó el punto de máximo valor de la señal a partir del tiempo cero ( $pico_{\Delta F}$ ).
4.  $T_{pico_{\Delta F}}$  (tiempo al pico)[s]: tiempo transcurrido entre el tiempo cero y el  $pico_{\Delta F}$ .
5.  $Ancho_{\Delta F}$  [s]: ancho del transitorio de calcio medido al 50% de su valor máximo. Se ubicaron los puntos en los que se alcanza el 50% del valor de  $\Delta F/F$  en el  $pico_{\Delta F}$ , a un lado (antes) y al otro (después) del  $pico_{\Delta F}$ . Y se calculó el  $ancho_{\Delta F}$  como la diferencia entre las coordenadas temporales de esos dos puntos.
6.  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  (tiempo al 50%) [s]: tiempo transcurrido entre el tiempo cero y el punto en que alcanza la mitad del valor de  $\Delta F/F$  en el  $pico_{\Delta F}$  durante la fase de subida.
7.  $\Delta T_{20\mu m}$  [s]: diferencia entre los valores de  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  de dos SOIs cuyos centros están separados entre si por 20  $\mu m$ . La estructura de la neurona se dividió en segmentos de 20  $\mu m$  (SOI; únicamente para esta medición). Una vez obtenido el  $T_{50\%_{\Delta F}}$  correspondiente a cada SOI, se calculó la diferencia entre dichos valores para SOIs contiguos; a la del SOI más distante se le sustrajo la del SOI más cercano al soma.

8. *Amplitud Normalizada<sub>ΔF</sub> [ad.]*: la amplitud<sub>ΔF</sub> de la señal evocada por un dado protocolo se normaliza por la amplitud<sub>ΔF</sub> de la señal evocada por un LTS (desencadenado por un pulso hiperpolarizante de -8 nA y 2 s) en el mismo ROI. El LTS fue desencadenado al menos una vez al comienzo del experimento general al cual le sirve de referencia, y como mínimo una segunda vez durante el desarrollo del mismo (y en por lo menos 75% de los experimentos, se lo midió también al final de la serie de mediciones sobre un preparado). Esto resulta en una medida adimensional ([ad.]), y se abrevia como A.N. en las figuras.
9. *Amplitud Referenciada<sub>ΔF-5mV</sub> [ad.]*: la amplitud<sub>ΔF</sub> evocada por una señal sináptica se normaliza usando la amplitud<sub>ΔF</sub> generada por un potencial sináptico de referencia. En base a los resultados obtenidos en cada experimento de estimulación sináptica, se aplicó un ajuste lineal a los datos de amplitud<sub>ΔF</sub> en función del potencial sináptico. A partir de estos datos se calculó, para cada ROI de una neurona NS, la amplitud<sub>ΔF</sub> de la señal para un potencial sináptico de 5 mV. Con dicho valor de referencia se normalizaron los valores de amplitud<sub>ΔF</sub> para todos los potenciales sinápticos evocados.
10. *Amplitud Normalizada<sub>ΔF-syn</sub> [ $mV^{-1}$ ]*: amplitud normalizada<sub>ΔF</sub> relativizada por el valor del potencial sináptico. En los protocolos de estimulación de la neurona mecanosensorial P (Capítulo 3) se normalizó la amplitud<sub>ΔF</sub> del transitorio de calcio evocado por la estimulación sináptica: primero, usando la amplitud<sub>ΔF</sub> de la señal generada por un LTS; segundo, por el potencial sináptico registrado en la neurona NS. Este proceso se hace ROI por ROI en cada preparado.

Cuando se reportan los valores promedio de estas variables, correspondientes a la muestra poblacional, cada preparado aportó su valor promedio para una ubicación y/o condición dadas. El valor promedio para un preparado se obtuvo calculando la media entre repeticiones en esa ubicación y/o condición. Por ejemplo, el protocolo de pulso hiperpolarizante para evocar LTS (Capítulo 1) fue repetido un mínimo de tres para cada neurona NS. En los protocolos de pulsos despolarizantes de 200 ms (Capítulo 2), cada serie (6 intensidades de corriente para cada  $V_m$  basal) fue repetida al menos dos veces por neurona. Y en los protocolos de estimulación sináptica (Capítulo 3), cada serie (una frecuencia de estimulación para una neurona mecanosensorial P) consistía de 5 repeticiones; además, una misma serie se podía hacer más de una vez.

Para estudiar la correlación temporal del registro electrofisiológico y los transitorios de calcio (**figura RIII.5**), se calculó la correlación cruzada normalizada.

La correlación cruzada se define, para dos funciones discretas  $f$  y  $g$ :

$$(f * g)[\Delta t] \equiv \sum_{m=-\infty}^{\infty} f[m] \cdot g[\Delta t + m]$$

En caso de necesitarse, se normaliza de tal forma que la autocorrelación para un desfase nulo sea igual a la unidad. De esta forma, 1 es el valor máximo que puede adoptar el índice.

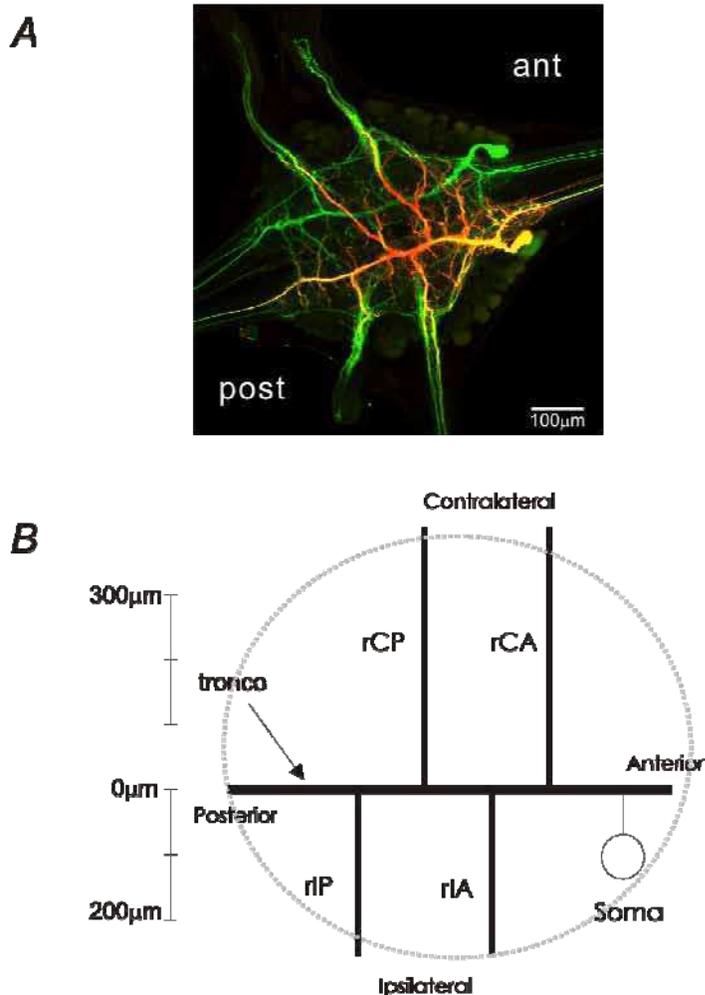
## RESULTADOS I

### TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR LTS

El estudio de las señales electrofisiológicas medidas intracelularmente brinda un panorama acotado de la actividad de una célula y su funcionamiento dentro de un circuito neuronal. La diversidad de fenómenos que pueden tener lugar simultáneamente en la dimensión espacial se ve reducida al evento puntual registrado. Más aún, una de las principales limitaciones que tiene este tipo de medición focalizada y muchas veces distante, es que los diferentes hechos que acontecen en la neurona pueden ser registrados en forma incompleta y/o alterada. Y en el peor de los casos, el efecto de un evento lejano puede disiparse antes de alcanzar el electrodo de registro.

Como se ha mencionado, las neuronas NS de la sanguijuela han sido descritas como carentes de potenciales de acción. Extienden arborizaciones profusas en el ganglio donde se encuentra su soma (**Figura RI.1A**) y envían ramificaciones que salen del ganglio por los nervios laterales y conectivos (Wadepuhl, 1989). Esta estructura sugiere que esta neurona puede recibir y/o emitir señales a distancias relativamente grandes, lo cual es, en principio, incompatible con una propagación exclusivamente pasiva.

Tal como se demostró en estudios previos (Rela et. al, 2009), las neuronas NS presentan espigas de calcio que pueden ser evocadas tanto al estimular con pulsos de corriente hiperpolarizante (*anode break*) como con pulsos de corriente despolarizante. La etapa regenerativa de la espiga de las neuronas NS se desencadena principalmente debido a una conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya activación resulta dependiente del voltaje. Esta activación tiene un umbral bajo menor a -50 mV, y por ende, llamaremos a este fenómeno espiga de bajo umbral



**Figura RI.1. Morfología de la neurona NS.** **A**, imagen confocal de fluorescencia (superposición de distintos planos focales) de un par de neuronas NS presente en un ganglio medio aislado (gentileza de Lorena Rela). Una neurona NS fue llenada con Lucifer Yellow y la otra con Rodamina-Dextrano 3K. Se alcanzan a distinguir los somas de varias otras neuronas como efecto de su autofluorescencia, y un contorno tenue que corresponde al límite del ganglio (ant: anterior, post: posterior). **B**, diagrama simplificado del árbol neurítico de la neurona NS, en el que se indican un tronco principal y cuatro neuritas primarias que se proyectan por cada uno de los cuatro nervios (r: rama, C: contralateral, I: ipsilateral, A: anterior, P: posterior). Las distancias sobre las ramas se miden a partir del tronco. En línea punteada se indica en forma esquemática el contorno del ganglio.

(LTS, por *low-threshold spike*). La despolarización y/o entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  producen la activación de canales de  $\text{K}^+$  sensibles a TEA, que contribuyen con la repolarización de la membrana (los resultados sugieren que la repolarización está mediada preponderantemente por canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Una de las preguntas que se intentará responder en este capítulo es acerca de la distribución espacial de estas conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje (CCSV). La distribución espacial de estas conductancias a lo largo de la extensa estructura neuronal podría ser importante para determinar en qué medida las señales electrofisiológicas se propagan en compartimentos reducidos o se extienden a todas sus arborizaciones.

La integración, propagación y transmisión de señales son elementos vitales para el funcionamiento de las redes neuronales. Y entender su funcionamiento requiere de técnicas de medición que permitan abordar el problema en forma extendida, tomando registros simultáneos en múltiples sitios.

Para hacer viable el análisis de la distribución espacial de las CCSVs, la compleja estructura de la neurona NS fue simplificada para su estudio (**Figura RI.1B**). Es así como durante todo el presente trabajo estudiaremos los transitorios de calcio en los elementos más prominentes de su árbol neurítico. El soma de la neurona está ubicado en el extremo anterior del paquete lateral anterior. Del soma emerge una sola neurita que se divide en dos: el tronco principal posterior, que recorre el ganglio siguiendo el eje antero-posterior y se extiende por el nervio conectivo posterior, y otra proyección de grueso calibre que se proyecta por el nervio conectivo anterior (tronco anterior). Del tronco posterior se extienden cuatro neuritas primarias, cada una de las cuales se proyecta por el par de nervios laterales anterior y posterior (dos ipsilaterales y dos contralaterales a la ubicación del soma).

### **Los LTSs evocan transitorios de calcio**

Los LTS generados por las neuronas NS son respuestas activas, aunque no fenómenos “todo o nada”, sino fenómenos graduales en los cuales la amplitud, duración y latencia dependen de los parámetros del estímulo (Rela et al., 2009). El protocolo de estimulación que produce los LTSs de mayor amplitud es la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, siendo el fenómeno desencadenado sobre la fase de subida del pulso. Además, estos LTSs se desarrollan siguiendo la cinética determinada por las conductancias responsables del mismo, sin las impuestas por el estímulo, como sucede con los estímulos despolarizantes (ver Capítulo 2). Por lo tanto, reservaremos el nombre LTS para el fenómeno evocado por un pulso hiperpolarizante y al generado por un pulso despolarizante lo llamaremos evento regenerativo.

En este trabajo se buscó en todos los casos desencadenar un LTS de máxima amplitud, y para ello se utilizaron pulsos de -8 nA de amplitud y 2 s de duración. Este estímulo garantizó que la respuesta generada fuera robusta, y que la amplitud, la latencia y la duración alcanzaran los valores de saturación

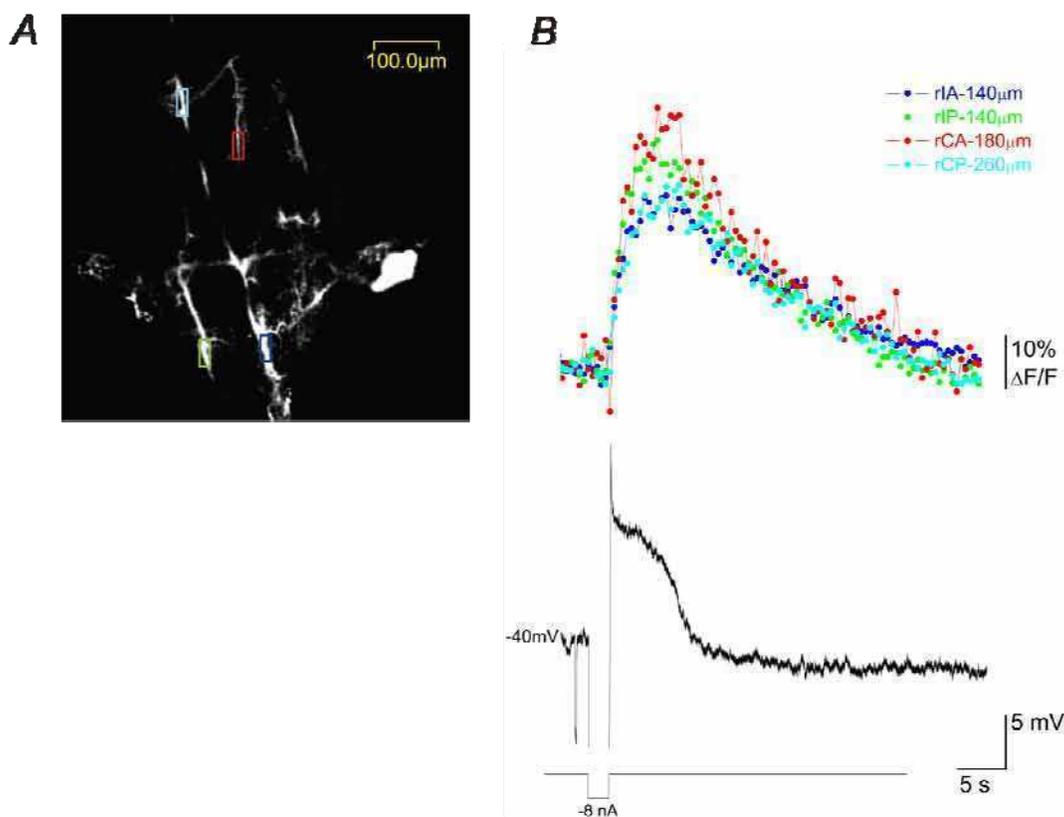
Los resultados previos (Rela et al., 2009) indican que la fase regenerativa del LTS se debe a un aumento transitorio de la conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$ . Llenando una neurona con un fluoróforo sensible a calcio y registrando con un sistema de adquisición de imágenes de fluorescencia adecuado (ver Materiales y Métodos) es posible observar cambios de la concentración intracelular de calcio ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), reflejados en variaciones de la intensidad de fluorescencia ( $\Delta F/F$ ). Aplicando esta técnica, denominada *calcium-imaging*, fuimos capaces de registrar modificaciones temporales de la concentración de calcio intracelular (transitorios de calcio) en el árbol neurítico de la neurona NS al evocar un LTS.

El ejemplo que presentamos en la **figura RI.2A** es el de una neurona NS llenada con OGB-1. Estando la célula en estado de reposo, se inyectó un pulso hiperpolarizante (-8 nA, 2 s) que evocó un LTS. En simultáneo, se pudieron registrar señales de  $\Delta F/F$  de más de 30% de valor máximo en regiones de interés (ROIs por *regions of interest*) a lo largo de diferentes arborizaciones de la neurona (**figura RI.2B**).

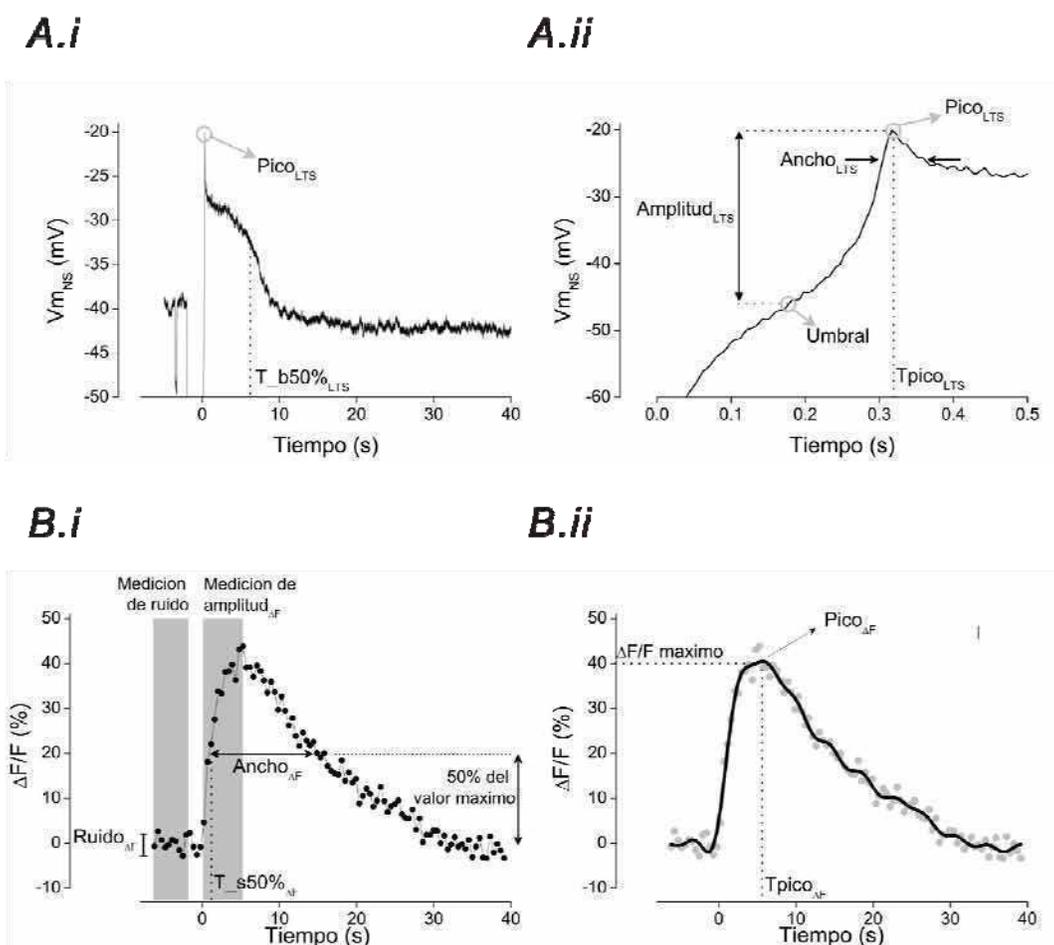
Claramente se puede apreciar que el comienzo de los transitorios de calcio se correspondió en tiempo con el LTS, sugiriendo un vínculo entre ambos fenómenos. No obstante, la cinética de los  $\Delta F/F$  fue considerablemente más lenta que la del evento electrofisiológico (tanto en la fase de subida como en la de bajada). Esta disparidad pudo haber sido generada por factores endógenos (como sistemas reguladores de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cinética lenta), aunque la distorsión introducida por el método de medición es siempre un factor importante a tener en cuenta. Como se alcanza a observar, la frecuencia de adquisición (~2 Hz) no fue un factor limitante para describir la subida al pico. Por su parte, el fluoróforo pudo haber influenciado en el desarrollo natural del transitorio de calcio (ver Discusión). Esto será estudiado más adelante en este capítulo.

En el ejemplo representativo mostrado en la **figura RI.2B**, los transitorios de calcio presentados corresponden a ROIs ubicadas en cada una de las cuatro neuritas primarias. Además, a simple vista, no parece haber diferencias sustanciales en la amplitud de las señales de fluorescencia. Estudiar en forma sistemática éstas y otras propiedades generales de los transitorios de calcio generados por LTS es el siguiente paso.

Con el fin de caracterizar los transitorios de calcio evocados por LTS fue importante definir una serie de variables. La **figura RI.3** presenta en forma gráfica las variables a ser evaluadas, y cuya medición fue detallada en Materiales y Métodos. La amplitud del LTS fue caracterizada, como se describió por Rela y colaboradores (2009), como la diferencia entre el



**Figura RI.2. Transitorios de calcio evocados por un LTS.** **A**, imagen de fluorescencia de una neurona NS inyectada con Oregon Green 488 BAPTA-1. Un electrodo de registro/estimulación se ubica en el soma (estructura compacta de la derecha). Se indican cuatro regiones de interés, una en cada neurita primaria: rectángulo azul (rIA), verde (rIP), rojo (rCA) y celeste (rCP). **B**, registros representativos de la respuesta de la neurona NS a un pulso de corriente hiperpolarizante (-8 nA; 2 s), esquematizado por el trazo inferior. El LTS se registra electrofisiológicamente en el soma (panel inferior) y, en simultáneo, se mide el cambio de fluorescencia  $\Delta F/F$  (panel superior) en las cuatro regiones de interés indicadas en **A**. Junto a la respuesta eléctrica se indica el  $V_m$  de reposo de la neurona antes del estímulo y con las respuestas ópticas se precisa la distancia desde el tronco de cada una de las regiones de interés medida.



**Figura R1.3. Caracterización de las respuestas.** Ejemplo representativo de un LTS (**A**) evocado por un pulso hiperpolarizante (-8 nA, 2 s) y su correspondiente transitorio de calcio (**B**). Se muestran los parámetros utilizados para describir dichas señales (ver Materiales y Métodos). **A.ii** es una aplicación de **A.i**. El  $pico_{LTS}$  es el punto de máximo valor de  $V_m$  y  $Tpico_{LTS}$  es su coordenada temporal. El umbral es el punto de inflexión de la fase de subida del LTS. La  $amplitud_{LTS}$  se midió desde el umbral hasta el  $pico_{LTS}$  y el  $ancho_{LTS}$  se evaluó al 80% de la  $amplitud_{LTS}$ . El parámetro  $T_{b50\%_{LTS}}$  corresponde al tiempo en que se alcanza la mitad de la  $amplitud_{LTS}$  durante la fase de bajada. El transitorio de calcio en un ROI se muestra tanto en su versión estándar (**B.i** y círculos grises en **B.ii**) como en su versión filtrada (trazo continuo en **B.ii**; filtro pasabajo de 0.25 Hz). El  $ruido_{\Delta F}$  mide la desviación estándar del valor basal de  $\Delta F/F$ . La  $amplitud_{\Delta F}$  es el valor promedio de  $\Delta F/F$  en los primeros 5 s. Los rectángulos grises indican las ventanas temporales en que se midieron el  $ruido_{\Delta F}$  y la  $amplitud_{\Delta F}$ . El  $pico_{\Delta F}$  se determinó sobre la señal filtrada: el valor máximo de  $\Delta F/F$  y su coordenada temporal ( $Tpico_{\Delta F}$ ). El  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  es el tiempo en que se alcanza el 50% de ese valor máximo durante la fase de subida. El  $ancho_{\Delta F}$  se midió a esa altura.

valor máximo del  $V_m$  ( $V_m$  en el  $\text{pico}_{LTS}$ ) y el  $V_m$  en el umbral de disparo. El  $\text{pico}_{LTS}$  tiene además una coordenada temporal ( $T_{\text{pico}_{LTS}}$ ). El ancho del LTS se mide al 80% de la amplitud máxima ( $\text{ancho}_{LTS}$ ). La medición del ancho al 80% es particularmente relevante cuando la espiga se desencadena por pulsos despolarizantes, pero no da una medida de la duración del fenómeno electrofisiológico. Por eso, en este trabajo medimos además el tiempo que le lleva a la señal en bajar al 50% del valor máximo ( $T_{b50\%LTS}$ ). Para caracterizar los transitorios de calcio tomamos dos medidas de la amplitud. Por un lado medimos el valor máximo ( $\Delta F/F$  en el  $\text{pico}_{\Delta F}$ ) a partir de la señal filtrada con un filtro pasabajos (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, para transitorios de baja amplitud esta medición puede dar una medida distorsionada de la magnitud de la respuesta, y por ello se optó en todos los casos por medir el promedio de la señal durante los primeros 5 s. Teniendo en cuenta las señales de pequeña amplitud, medimos el desvío estándar de la línea de base de  $\Delta F/F$  para contar con una medida del “ruido” de la señal ( $\text{ruido}_{\Delta F}$ ) previo al estímulo, y así poder ponderar si un aumento en  $\Delta F/F$  podía ser considerado una respuesta. Para evaluar los parámetros temporales de los transitorios de calcio se midió el tiempo al 50% del transitorio en la fase de subida ( $T_{s50\%\Delta F}$ ) y el  $\text{ancho}_{\Delta F}$ , también medido al 50% del valor máximo de  $\Delta F/F$ .

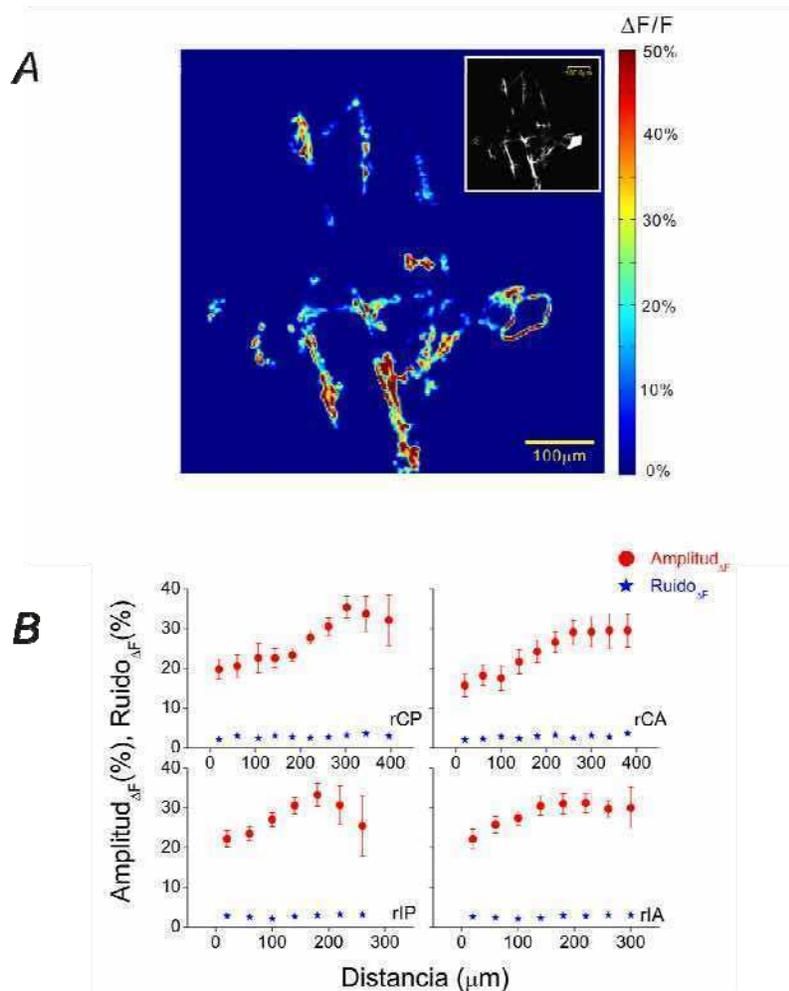
### **Características generales de los transitorios de calcio evocados por LTS**

Los transitorios de calcio evocados por LTS no parecen ser un fenómeno localizado, sino más bien extendido a lo largo de la estructura neuronal. Los mismos datos del ejemplo representativo mostrado en la **figura RI.2** son expuestos nuevamente, pero esta vez con el fin de resaltar la distribución espacial de la señal de  $\Delta F/F$ . La evolución temporal de los transitorios de calcio evocados junto con el LTS es detenida cerca de los puntos de máximo valor de la señales

(3.8 s desde el final del pulso hiperpolarizante). Y la intensidad del  $\Delta F/F$  en ese instante es codificada a través de una escala de colores y representada para todo el cuadro (**figura RI.4A**). Al comparar dicha imagen con la distribución espacial de la fluorescencia basal (imagen en tono de grises), queda en evidencia que los transitorios de calcio se observaron en toda la estructura visible de la neurona. Las diferencias en la magnitud de la señal de  $\Delta F/F$  a lo largo de las arborizaciones son tangibles, pero es factible medir los transitorios en toda porción de la neurona que la técnica permitió observar en la condición de reposo (sin estimulación).

La relación entre la imagen de fluorescencia basal y la imagen del cambio de fluorescencia también se puede analizar en el sentido inverso. Como el fluoróforo fue inyectado en una neurona NS (descartando el pasaje del colorante a otras células), la presencia de señales de  $\Delta F/F$  sugiere que todas las estructuras visibles en la imagen basal corresponden a la neurona en cuestión, y no son aberraciones generadas por el sistema óptico.

Cabe aclarar que los cambios del nivel de fluorescencia en el contorno del soma neuronal posiblemente hayan sido un artefacto de la medición. En varias oportunidades se detectó un movimiento del soma neuronal, tanto en sentido axial como dentro del plano focal, en especial durante la inyección de corriente a través del electrodo de registro. Además, el protocolo de adquisición y procesamiento de las imágenes fue desarrollado para brindar un resultado óptimo y fidedigno en el árbol neurítico de la neurona, pero se ignoró por completo su efecto sobre las señales en la zona del soma. Por ejemplo, los píxeles correspondientes a dicha estructura siempre resultaron estar completamente saturados (dado la alta concentración de fluoróforo). No obstante esto, el descarte de los píxeles saturados o próximos a estarlo (ver Materiales y Métodos) sólo fue aplicado a los trazos del árbol neurítico, pero no sobre los píxeles del soma.



**Figura R1.4. Distribución espacial de los transitorios de calcio evocados por LTS.** **A**, imagen pseudocolor representativa de una neurona NS, donde el color indica la magnitud del cambio de fluorescencia  $\Delta F/F$  según la escala presente a la derecha. La imagen pertenece al mismo ejemplo mostrado en la figura R1.2, correspondiendo a un tiempo de 3.8 s después de finalizado el pulso eléctrico. En el ángulo superior derecho se muestra la imagen de fluorescencia basal de la neurona, quedando en evidencia que los transitorios de calcio evocados por el LTS están presentes en todo el árbol neurítico visible de la célula. **B**, promedio de la amplitud <sub>$\Delta F$</sub>  (ver Materiales y Métodos) del transitorio de calcio evocado por LTS en función de la distancia, para las cuatro neuritas primarias ( $n=33$  con OGB-1, 15 con OGB-2, y 25 con CG-1). En azul se indica el ruido <sub>$\Delta F$</sub>  promedio (ver Materiales y Métodos).

Para resumir los resultados sobre la distribución espacial de los transitorios de calcio evocados por LTS, se midió la amplitud<sub>ΔF</sub> de las señales ópticas generadas junto con un LTS al inyectar un pulso hiperpolarizante de -8 nA de amplitud y 2 s de duración a lo largo de las cuatro neuritas primarias (ver **figura RI.3** y Materiales y Métodos). En la **figura RI.4B** se presentan los datos promedios obtenidos al emplear tres indicadores de calcio diferentes: CG-1, OGB-1 y OGB-2. Se grafica la amplitud<sub>ΔF</sub> integrada en ROIs de 40 μm de longitud (ver Materiales y Métodos) en función de la distancia para las cuatro neuritas primarias (rIA, rIP, rCA y rCP; ver **figura RI.1**). Además, se enseña el nivel promedio del ruido basal de cada ROI (ruido<sub>ΔF</sub>; ver Materiales y Métodos), quedando en evidencia que las amplitudes medidas corresponden efectivamente a cambios sensibles de la concentración de calcio intracelular. Tanto la magnitud de las señales como su perfil espacial no presentaron diferencias apreciables al medir con los diferentes fluoróforos (no se muestra).

Nuevamente se puede apreciar que los transitorios de calcio evocados por LTS están presentes a lo largo de las cuatro ramas primarias. Este resultado no es producto del aporte localizado en diferentes ubicaciones hecho por distintos preparados, cuya complementación podría dar lugar a curvas como las mostradas. Todos los preparados considerados para el promedio mostraron un comportamiento como el del ejemplo representativo de la **figura RI.4A**: toda porción visible del árbol neurítico presentó un transitorio de calcio al evocar un LTS mediante pulso hiperpolarizante.

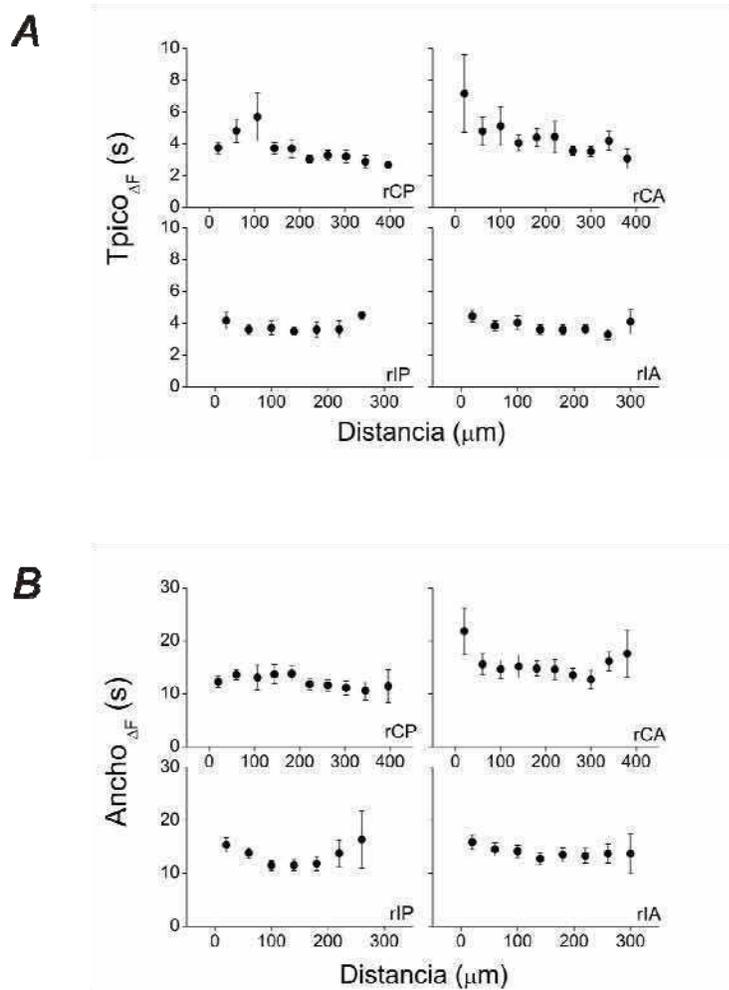
Los transitorios de calcio así evocados no sólo fueron encontrados en las ramas primarias, sino que también fueron medidos en forma consistente en el tronco posterior (a lo largo de todo el ganglio) y en el tronco anterior (hasta 400 μm del soma, a través del nervio conectivo); estos datos no se muestran.

La ubicación del ganglio dentro del campo visual (en la gran mayoría de los casos, el ganglio ocupaba casi por completo el campo de registro con la lente x20 utilizada), las limitaciones impuestas por el plano focal, el alcance del fluoróforo por difusión pasiva, la disección ejecutada, y otros factores hicieron que las señales en las neuritas primarias se pudieran medir sólo hasta el contorno del ganglio.

El aumento de la amplitud de la señal de  $\Delta F/F$  con la distancia al soma (**figura RI.4B**) es consistente con una distribución no uniforme del fluoróforo, que predice una menor concentración a medida que nos alejamos del sitio de inyección. Aunque tampoco hay que descartar la posibilidad de que las diferencias en la amplitud del  $\Delta F/F$  reflejen una verdadera disparidad en la magnitud del cambio de concentración de calcio intracelular. También hay que notar que una posible variación de la relación superficie/volumen a lo largo de las neuritas daría lugar a esta diferencia en amplitud $_{\Delta F}$  (ver Discusión).

Asimismo, queda por dilucidar las causas y las implicaciones de que el rango de valores de amplitud $_{\Delta F}$  registradas en las distintas neuritas sea prácticamente el mismo, sin presentar diferencias inter-procesos apreciables. Si este comportamiento es un artefacto de la medición o es la naturaleza misma de los  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  se analizará más adelante (ver Discusión).

En los experimentos en que se midió la amplitud $_{\Delta F}$  de los transitorios de calcio, también se midieron el tiempo al pico ( $T_{pico_{\Delta F}}$ ) y el ancho $_{\Delta F}$  (**figura RI.5**). El primero de ellos serviría para describir la fase de subida y el segundo la duración de la señal. En forma más notable que la amplitud $_{\Delta F}$ , estas cantidades presentan un perfil espacial uniforme a lo largo de cada una de las cuatro ramas (uniformidad intra-proceso). Y en consonancia con el tamaño de la señal, al comparar entre las distintas neuritas los valores de estos parámetros cinéticos, ellos resultan altamente similares (uniformidad inter-proceso).



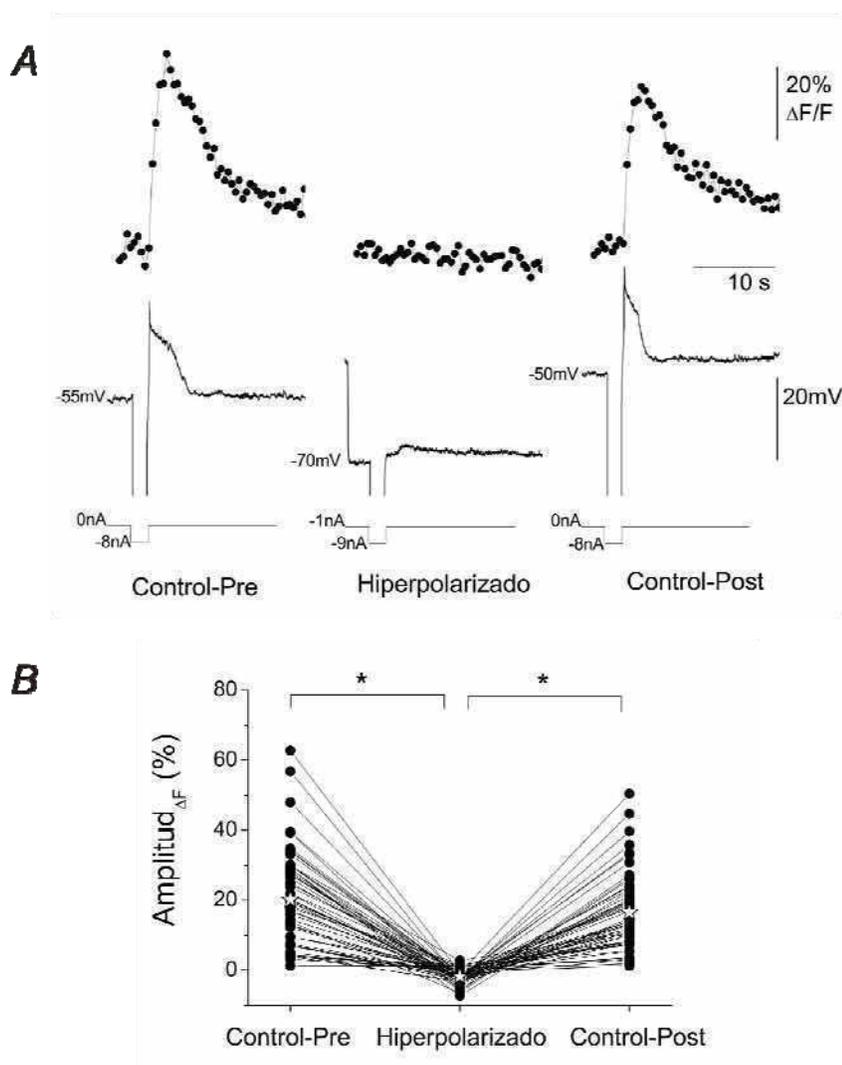
**Figura RI.5. Características cinéticas de los transitorios de calcio evocados por LTS. A-B, valores promedio del tiempo al pico  $T_{pico_{\Delta F}}$  (A) y del ancho  $\Delta F$  (B) del transitorio de calcio (ver Materiales y Métodos) evocado por LTS en función de la distancia, para las cuatro neuritas primarias. Los datos corresponden a los mismos experimentos que dieron lugar a la figura RI.4B.**

### **Sin evocación de LTS no hay transitorio de calcio**

La concentración de calcio intracelular puede cambiar a raíz del flujo de calcio a través de canales iónicos ubicados en la membrana plasmática (Jaffe et al., 1992; Yuste y Denk, 1995; Koester y Sackmann, 1998; Schiller et al., 1998). Otro medio posible para producir  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  es la liberación desde reservorios intracelulares (Emptage et al., 1999; Finch y Augustine, 1998). Una combinación de ambos procesos también es factible (Bezprozvanny et al., 1991; Finch et al., 1999; Nakamura et al., 1999).

Trabajos previos establecieron que el LTS es un fenómeno que depende de la concentración de calcio extracelular (Rela et al., 2009) y en este trabajo mostramos que los transitorios de calcio fueron evocados en forma sincrónica con cada LTS. A la luz de estos hechos, una pregunta que interesaría abordar es si existe una relación causal entre los LTS y los transitorios de calcio observados.

Los pulsos hiperpolarizantes desencadenaron LTS cuyo umbral estuvo cercano al  $V_m$  de reposo de las neuronas. Un mismo pulso de corriente puede evocar o no un LTS dependiendo de si la neurona alcanza el umbral o no. Una forma directa y sencilla de controlar esta condición es mediante la manipulación del  $V_m$  de la neurona, inyectando corriente a través del electrodo de registro. Por lo tanto, la siguiente serie experimental consistió en inyectar un pulso de corriente de -8 nA de intensidad y 2 s de duración en tres condiciones diferentes (en este orden): 1) estado de reposo (control previo a la hiperpolarización inducida); 2) neurona hiperpolarizada (a través de la inyección de una corriente basal de -1 nA); y 3) estado de reposo (control posterior a la hiperpolarización). Como en los experimentos anteriores, en las condiciones control (1 y 3) el  $V_m$  de la neurona cruzó el umbral al regreso del pulso hiperpolarizante,



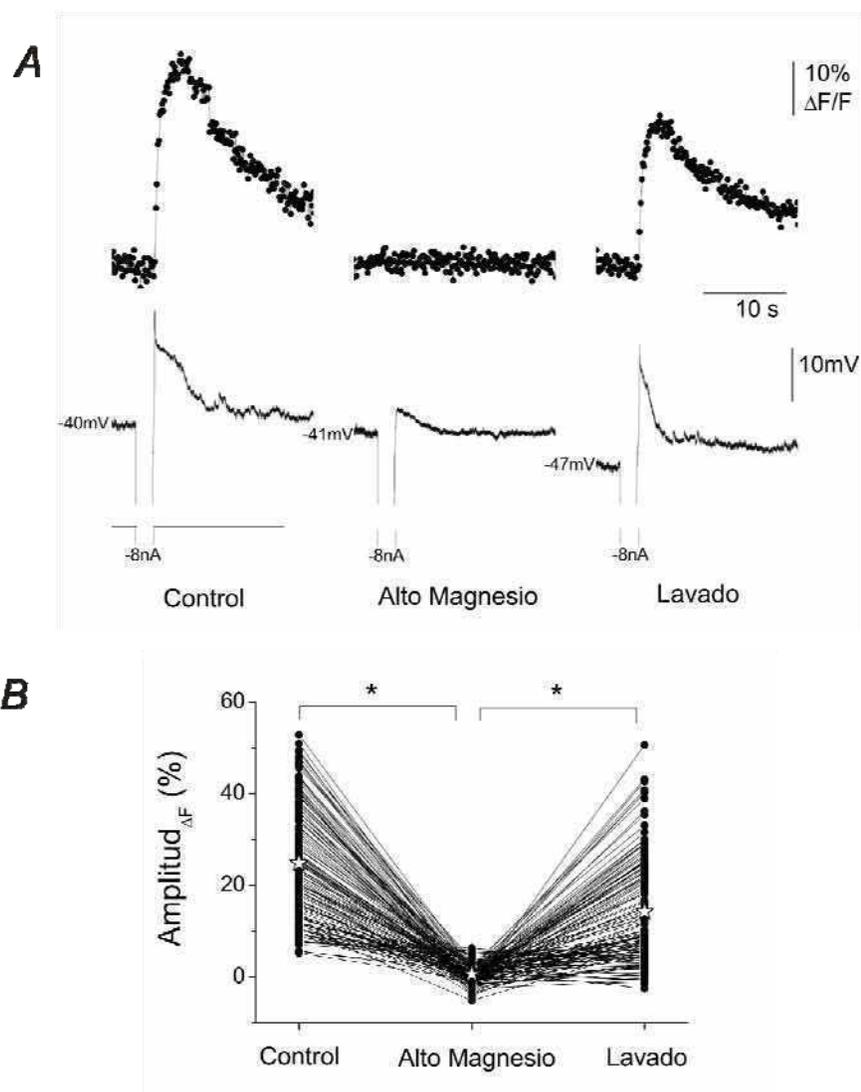
**Figura RI.6. La estimulación eléctrica sin evocación de LTS no produce transitorio de calcio. A,** señales representativas de la respuesta de una neurona NS a un pulso de corriente hiperpolarizante antes (columna izquierda), durante (columna central) y después (columna derecha) de la aplicación de un escalón de corriente hiperpolarizante. Señales de  $\Delta F/F$  (fila superior) y registros electrofisiológicos (fila inferior; se indica el  $V_{m_{NS}}$  de reposo o el  $V_{m_{NS}}$  basal, según corresponda). Los trazos inferiores esquematizan la corriente inyectada en cada situación (en las tres condiciones el pulso fue de -8 nA y 2 s). Nótese que en el estado hiperpolarizado no se produjo el LTS ni tampoco el transitorio de calcio. **B,** resumen de los datos de amplitud $_{\Delta F}$  para las tres condiciones caracterizadas en A. Cada serie de puntos corresponde a un ROI de un preparado (n=58 ROIs, 10 preparados). Las estrellas representan las medias. El grado de significancia estadística fue determinado usando el *t-test de Student pareado* (\* $p < 0.001$ ).

evocando tanto un LTS como un transitorio de calcio (**figura RI.6A**). Pero si la neurona estaba lo suficientemente hiperpolarizada (condición 2), el umbral no fue alcanzado y el pulso por si sólo no fue capaz de generar el LTS. En este caso, el transitorio de calcio no se produjo en ningún sitio del árbol neurítico.

Esta información se resume en la **figura RI.6B**, en donde se puede ver en los datos del estado hiperpolarizado que el pulso de corriente *per se* no generó transitorios de calcio. Esta ausencia de respuesta no fue producto de algún daño en el preparado ni falla en el sistema de adquisición, dado que inmediatamente después, una vez que se la regresó al estado de reposo, la neurona fue capaz de evocar un LTS y correspondientes transitorios de calcio.

El magnesio en altas concentraciones demostró ser un bloqueante inespecífico de los canales de calcio en las neuronas de la sanguijuela *Hirudo sp* (Baylor y Nicholls, 1969). Se sabe que la perfusión de los ganglios con una solución de alta concentración de  $Mg^{2+}$  anula de manera reversible la producción de los LTSs (Rela et al., 2009).

Los siguientes experimentos consistieron en repetir la serie experimental descrita en la **figura RI.6A**, registrando la respuesta de la neurona NS en i) solución normal, ii) tras profundir el ganglio con la solución con alta concentración de  $Mg^{2+}$  (20 mM, 8 minutos) y iii) luego de un lavado de por lo menos 10 minutos en solución normal. El tratamiento aplicado con la solución de  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  20:1 no sólo anuló de manera reversible la generación del LTS, sino también el desarrollo de los transitorios de calcio (**figura RI.7**). Al igual que en los protocolos subumbrales analizados con anterioridad, la ausencia de transitorios de calcio en solución de alto magnesio es un común denominador de todas las ROIs analizadas a lo largo de las arborizaciones neuronales.



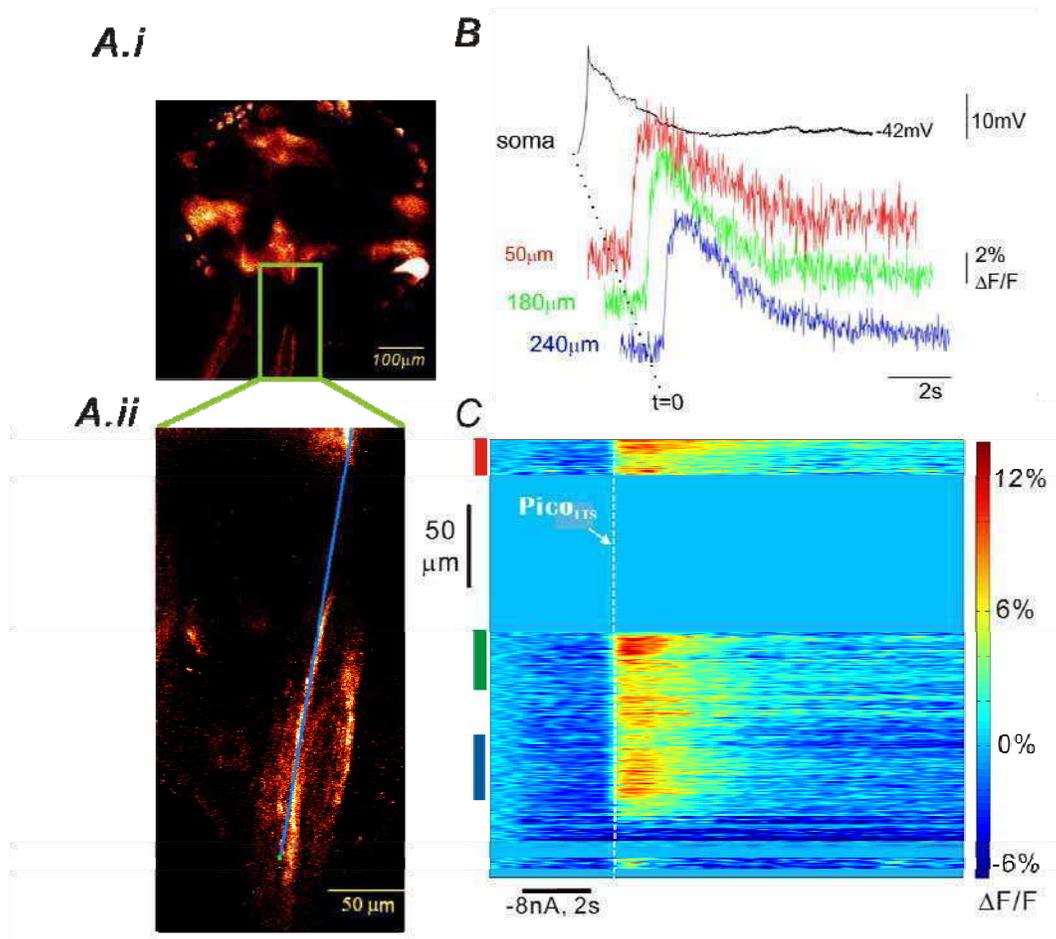
**Figura R1.7. El magnesio bloquea la generación del LTS y del transitorio de calcio.** **A**, señales representativas de la respuesta de una neurona NS a un pulso de corriente hiperpolarizante en tres condiciones: solución normal (columna izquierda), durante la perfusión del ganglio con una solución de alto magnesio (columna central), y después del lavado en solución normal (columna derecha). Señales de  $\Delta F/F$  (fila superior) y registros electrofisiológicos (fila inferior; se indica el  $V_{m_{NS}}$  de reposo). Los trazos inferiores esquematizan el pulso de corriente inyectado (en las tres condiciones el pulso fue de -8 nA y 2 s). Nótese que en alto magnesio no se produjo LTS ni tampoco transitorio de calcio. **B**, resumen de los datos de amplitud  $\Delta F$  para las tres condiciones caracterizadas en **A**. Cada serie de puntos corresponde a un ROI de un preparado (n=133 ROIs, 8 preparados). Las estrellas representan las medias. El grado de significancia estadística fue determinado usando el *t-test de Student* *pareado* (\* $p < 0.001$ ).

A modo de resumen, podemos decir que los resultados sugieren que la manifestación del LTS es una condición necesaria para la evocación de transitorios de calcio bajo el protocolo de estimulación con pulsos hiperpolarizantes. El transitorio de calcio puede deberse a la entrada del ión a través de las CCSVs de bajo umbral de activación pero también podría tener origen en un flujo de calcio a través de CCSVs diferentes a las involucradas en los LTSs. Tampoco descartamos la posibilidad de que parte del  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  se deba a otros mecanismos, como pueden ser la liberación desde el retículo endoplasmático mediado por  $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5 trisfosfatasa) o por receptores de rianodina.

### **Propiedades cinéticas de los transitorios de calcio evocados por LTS**

Los fluoróforos que se utilizan en la técnica de *calcium-imaging* pueden actuar como *buffers* exógenos, compitiendo con los *buffers* endógenos y los sistemas de recaptación y extrusión del calcio en las neuronas. Esta situación podría generar una alteración en el curso temporal natural de los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , haciéndolos más lentos (Sabatini et al., 2002). Para minimizar este efecto, los estudios de las propiedades cinéticas de las señales de fluorescencias evocados por LTS fueron realizados utilizando un fluoróforo de relativa baja afinidad al calcio, el Calcium Green-5N ( $K_d = 14 \mu\text{M}$ ). Además, las imágenes fueron adquiridas en forma de líneas para permitir una alta tasa de muestreo (66 Hz promedio; ver Materiales y Métodos).

Nuevamente, los LTS evocaron transitorios de calcio (**figura RL8**). Pero como se esperaba, sus amplitudes fueron considerablemente menores a las medidas con los fluoróforos de mayor afinidad. Los cursos temporales de los transitorios de calcio a lo largo de una misma neurita no parecen presentar diferencias apreciables entre sí. Y como ya se había notado, las señales ópticas parecen estar altamente sincronizadas con la señal electrofisiológica.



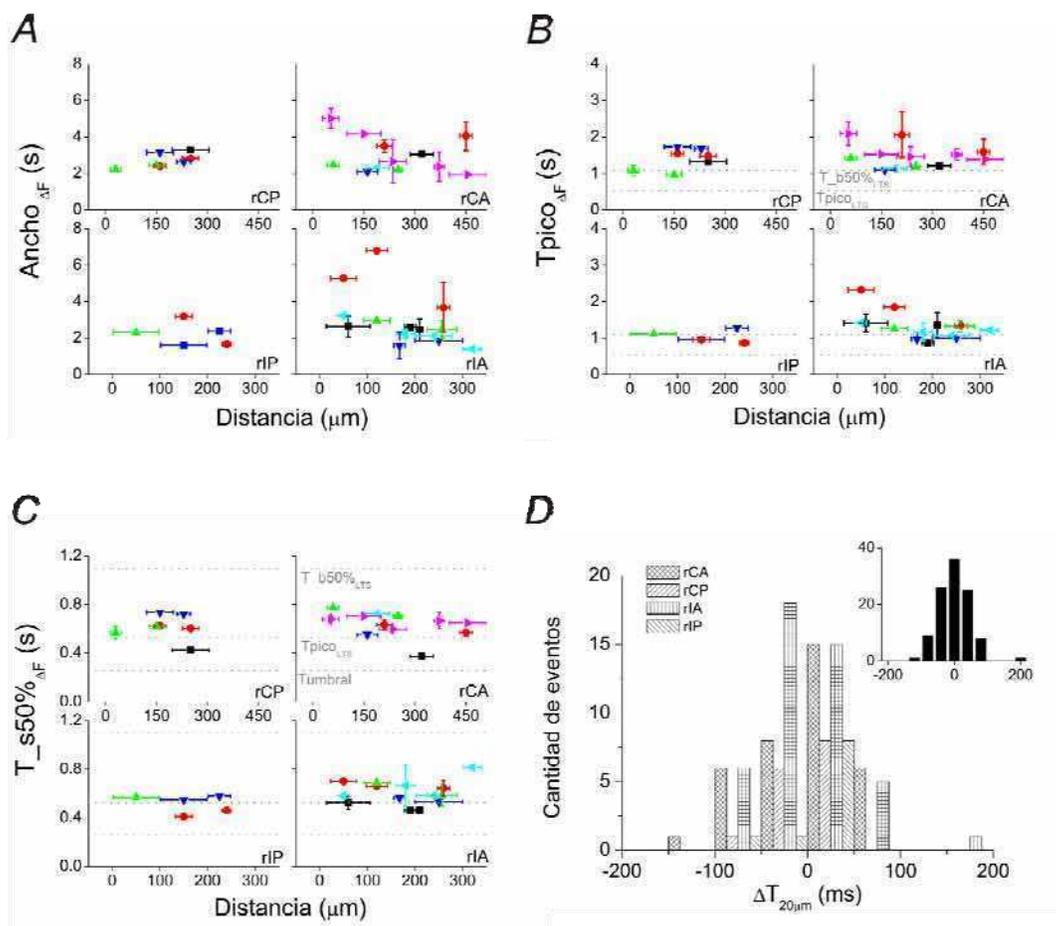
**Figura R1.8. Transitorios de calcio evocados por LTS estudiados con un indicador de calcio de baja afinidad. A.i,** Imagen de una neurona NS llenada con CG-5N ( $K_d=14\mu\text{M}$ ). **A.ii,** ampliación de la neurita rIA enmarcada en el rectángulo verde. La línea azul indica la línea de escaneo (100 Hz). **B,** el trazo negro superior es el registro electrofisiológico representativo (se indica el  $V_{m_{NS}}$  de reposo) y los trazos de colores son los correspondientes transitorios de calcio generados a lo largo de la línea azul en A.ii, desplazados entre si en el tiempo. La línea punteada representa el tiempo cero para todos los registros. Se indican las distancias a partir del tronco sobre la rIA. **C,** imagen pseudocolor de los transitorios de calcio. El color codifica la magnitud de los transitorios según la escala de la derecha, el eje horizontal corresponde al tiempo y el eje vertical a la posición. La barra inferior indica el tiempo de aplicación del pulso de corriente hiperpolarizante (-8 nA, 2 s) y la línea punteada blanca el  $\text{pico}_{LTS}$ . Las barras verticales de la izquierda indican los pixeles promediados para dar lugar a los trazos en B, con correspondencia en el código de colores.

Tanto los trazos obtenidos al promediar las señales de distintos pixeles (**figura RI.8B**) como el mapa de los transitorios en *pseudocolor* que muestra la evolución temporo-espacial de la señal de  $\Delta F/F$  (intensidad codificada en colores) (**figura RI.8C**) dejan en clara evidencia que los transitorios de calcio se inician sin desfases apreciables a lo largo de la misma neurita. Asimismo, si comparamos la ubicación temporal del  $\text{pico}_{\text{LTS}}$  ( $T_{\text{pico}_{\text{LTS}}}$ ) y la del máximo de la señal óptica ( $T_{\text{pico}_{\Delta F}}$ ), se puede notar que el pico de la señal electrofisiológica precedió a la señal de fluorescencia.

Todas las características hasta aquí expuestas pueden observarse nuevamente en el conjunto de los datos presentados en la **figura RI.9**, correspondientes a todos los preparados estudiados con CG-5N. Bajo el protocolo de estimulación con pulsos de corriente hiperpolarizante que evocan LTS, se mide el ancho $_{\Delta F}$  (**A**), el tiempo al pico  $T_{\text{pico}_{\Delta F}}$  (**B**) y el  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  (**C**) de los transitorios de calcio, y se muestran en función de la ubicación dentro del árbol neurítico. Las tres variables cinéticas muestran cierta variabilidad entre ubicaciones y entre preparados, pero no se distingue ningún patrón espacial. Los valores oscilan dentro de márgenes relativamente acotados.

La variabilidad en el ancho $_{\Delta F}$  puede deberse, en parte, a la variabilidad en la componente lenta del LTS, es decir, el *plateau* que se encuentra en la fase de repolarización. Resultados preliminares sugieren que mientras más prolongado es el *plateau* del LTS, más duradero son los transitorios de calcio asociado (no se muestra). En promedio, el ancho $_{\Delta F}$  del transitorio evocado por LTS tuvo un valor de 3 s ( $2.96 \pm 0.22$  s).

El LTS alcanza el  $\text{pico}_{\text{LTS}}$  en un tiempo promedio de 0.50 s ( $0.53 \pm 0.02$  s) tras finalizar el pulso hiperpolarizante, y retorna a la mitad de su amplitud en 1.1 s ( $T_{b50\%_{\text{LTS}}} = 1.09 \pm 0.07$  s). La señal de  $\Delta F/F$  alcanza su pico después del  $\text{pico}_{\text{LTS}}$ , y en coincidencia o con



**Figura RI.9. Los transitorios de calcio evocados por LTS presentan características cinéticas uniformes. A-C**, para las cuatro neuritas primarias, se reportan el ancho<sub>ΔF</sub> (A), el tiempo al pico Tpico<sub>ΔF</sub> (B) y el tiempo a la mitad del máximo T\_s50%<sub>ΔF</sub> (C) (ver Materiales y Métodos) de los transitorios de calcio desencadenados por un LTS. Los resultados provienen de experimentos como el mostrado en la figura RI.8. Cada combinación color/símbolo corresponde a un preparado diferente. La barra de error en el eje de abscisas indica el E.S. y en el eje de ordenadas el largo del segmento de interés (SOI). Se indican en líneas punteadas los valores promedio de algunos parámetros cinéticos del LTS: el tiempo del umbral, el tiempo al pico (Tpico<sub>LTS</sub>) y el tiempo a la mitad del máximo (T\_b50%<sub>LTS</sub>) (ver Materiales y Métodos). D, histograma de diferencia en el inicio de las señales de ΔF/F para SOIs separados 20 μm (ΔT<sub>20μm</sub>, ver Materiales y Métodos); n=9 preparados. En el *inset* se grafican las mismas variables, pero se promediaron los datos de las diferentes ramas.

posterioridad  $T_{b50\%LTS}$  (**figura RI.9B**). En promedio el  $T_{pico_{\Delta F}}$  tuvo un valor de 1.4 s ( $1.39 \pm 0.05$  s).

La señal de  $\Delta F/F$  alcanza la mitad de su altura máxima ( $T_{s50\%_{\Delta F}}$ ) a un tiempo promedio de 0.6 s ( $0.604 \pm 0.014$  s), en coincidencia o después del  $pico_{LTS}$  pero antes de que  $V_m$  disminuya hasta volver a alcanzar la mitad de la amplitud del LTS ( $T_{b50\%LTS}$ ) (**figura RI.9C**).

Resumiendo, las señales de  $\Delta F/F$  estudiados con un fluoróforo de baja afinidad mostraron tener características cinéticas uniformes, tanto a lo largo de una misma neurita como entre ellas. Además, la evolución temporal de los transitorios de calcio manifestó una cinética mucho más lenta que la del LTS.

Observando el ejemplo representativo en la **figura RI.8B**, habíamos notado un comienzo prácticamente simultáneo de las señales de  $\Delta F/F$  a lo largo de una misma neurita. Dicha observación se ve avalada por los datos correspondientes al  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  (**figura RI.9C**): la fase de subida de las señales ópticas alcanza su punto medio sin presentar desfasajes apreciables, ahora no sólo dentro de una misma neurita, sino también al comparar distintos procesos del árbol neurítico.

Con el objeto de aportar pruebas a la idea de que los transitorios de calcio evocados por LTS no se propagan en el espacio, medimos  $\Delta T_{20\mu m}$  (desfasaje temporal entre señales de  $\Delta F/F$  de segmentos de interés (SOIs) separados por 20  $\mu m$ ; ver Materiales y Métodos). El gráfico de la **figura RI.9D** muestra un histograma de  $\Delta T_{20\mu m}$  que indica que segmentos contiguos mostraron un desfasaje que, en promedio, resultó nulo ( $\Delta T_{20\mu m} = 0.6 \pm 46$  ms; media  $\pm$  S.D. )

La cantidad de datos por neurita es insuficiente para realizar un test estadístico que determine si los datos de cada rama provienen de una población con distribución normal. Pero si

se observa el conjunto total (sin discriminar las diferentes ramas), los datos parecen sugerir que el  $\Delta T_{20\mu m}$  responde a una distribución normal o gaussiana con media cero (**figura RI.9D inset**) (p-valor=0.055 con *test de Shapiro-Wilk*; p-valor<0.001 con *test de Lilliefors*). Esto es consistente con la idea de que la variable es del tipo aleatoria con media nula, es decir, que los desfasajes medidos son producto de la variabilidad intrínseca del proceso de medición.

De esta forma, los resultados parecen indicar que los transitorios de calcio se originan en forma prácticamente simultánea y luego se desarrollan con dinámica uniforme a lo largo de las arborizaciones neuríticas primarias de la neurona.

En resumen, los datos sugieren que los canales de calcio sensibles a voltaje están distribuidos a lo largo de toda la extensión de las 4 neuritas primarias estudiadas y el tronco principal de la neurona NS. La apertura de dichos canales (en este caso, durante la fase regenerativa de un LTS) permite la entrada de iones calcio al medio intracelular, dando lugar a incrementos transitorios de la concentración interna de calcio. Bajo este protocolo de estimulación con pulsos hiperpolazantes, los transitorios se producen sin desfasaje mensurable en todo el árbol neurítico de la neurona. Además, presentan evoluciones temporales con una cinética uniforme, y de una forma consistente con los cambios de  $V_m$  de la neurona.

## **RESULTADOS II**

### **TRANSITORIOS DE CALCIO EVOCADOS POR PULSOS DESPOLARIZANTES**

Experimentos previos hechos en el laboratorio mostraron la presencia de conductancias activadas por despolarización en las neuronas NS. Como el umbral de activación de estos canales se encuentra cercano al  $V_m$  de reposo, la despolarización mediante la inyección de pulsos de corriente conduce a un evento regenerativo que se superpone a la despolarización pasiva producida por el pulso (Rela et al., 2009).

Se ha planteado repetidas veces que las conductancias despolarizantes activadas por voltaje en neuronas sin potenciales de acción, o en dendritas, pueden tener un papel en el *boosting* de señales fisiológicas despolarizantes (Reyes, 2001), de modo que permitirían la transmisión de señales a distancias mayores que las que podrían darse mediante una transmisión únicamente electrotónica.

Una hipótesis plausible propone que las conductancias dependientes de voltaje subyacentes a los LTS en las neuronas NS son las responsables de amplificar las respuestas postsinápticas despolarizantes de estas neuronas. Y es posible que la amplificación de las respuestas postsinápticas contribuyan a la propagación de las mismas, reduciendo la atenuación espacial que resultaría de una propagación pasiva.

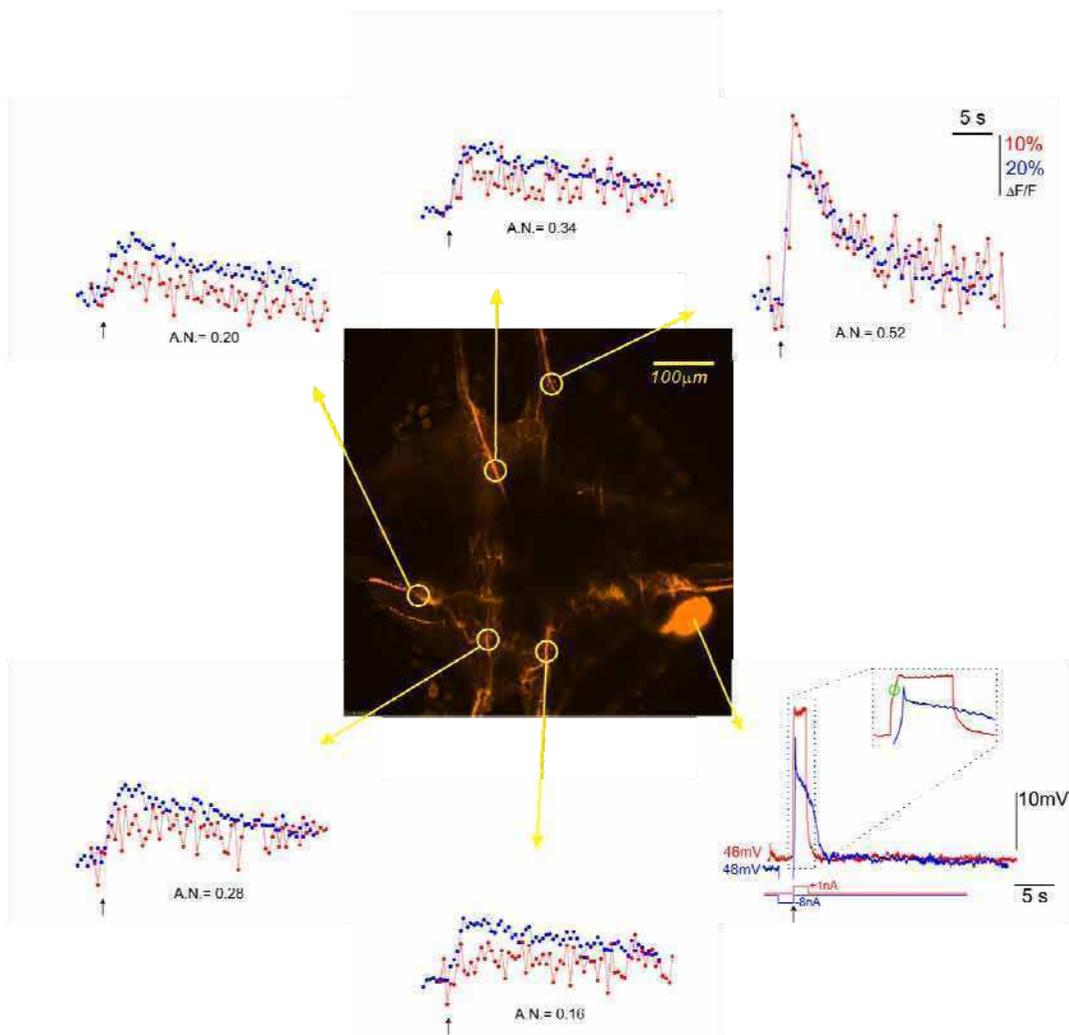
En un trabajo previo (Vilarchao, 2011) se postuló que la neurona NS cuentan con al menos dos mecanismos de amplificación de las señales despolarizantes que podría asistir a la propagación de las señales en el profuso árbol neurítico de estas neuronas: conductancias de calcio sensibles a voltaje (CCSVs) de bajo umbral de activación, sensibles a altas concentraciones de magnesio, y CCSVs persistentes, insensibles a magnesio. En este trabajo se

mostró que la respuesta de la neurona NS a pulsos despolarizantes depende del  $V_{mNS}$  basal. La amplitud de la respuesta en función de la corriente inyectada tiene una pendiente mucho mayor con  $V_{mNS}$  a -60 mV que a -40 mV y a -20 mV. Esto indica que la respuesta despolarizante desencadena una respuesta sensible al voltaje. Esta mayor respuesta a -60 mV es insensible a la presencia de altas concentraciones de magnesio. Sin embargo, en esta condición se anula la fase regenerativa de la respuesta al pulso despolarizante, que ha sido analoga al LTS desencadenado por pulsos hiperpolarizantes (Rela et al., 2009).

### **Los pulsos despolarizantes evocan transitorios de calcio**

Con el propósito de estudiar y caracterizar los transitorios de calcio evocados por pulsos despolarizantes iniciamos una serie de experimentos en los que las neuronas NS fueron sometidas a pulsos de corriente. Se aplicaron pulsos despolarizantes de 1 nA de intensidad y 2 s de duración que produjeron despolarizaciones comparables a las observadas durante el LTS (**figura RII.1**; los registros con pulsos despolarizantes fueron tomados en modo de fijación de corriente continua, por lo que los valores de  $V_m$  durante la inyección de corriente deben ser evaluados con cuidado).

Dada la similitud de los efectos producidos por los pulsos despolarizantes y el protocolo de pulsos hiperpolarizantes sobre la respuesta electrofisiológica (tanto respecto al grado de despolarización como a la apertura de canales de calcio en forma regenerativa), se esperaba poder medir una señal de  $\Delta F/F$  que refleje el aumento de la concentración de calcio intracelular. Luego procederíamos a estudiar las respuestas bajo este protocolo y obtener



**Figura RII.1. Transitorios de calcio evocados por pulsos despolarizantes.** Imagen de una neurona NS cargada con OGB-1 (imagen central) y señales representativas obtenidas en las ROIs indicadas. La estructura compacta es el soma y en ella se midió la actividad electrofisiológica que se muestra a la derecha de la misma; se indica el  $V_{m,rest}$  de reposo, se ilustra con un trazo en la parte inferior la corriente inyectada y se señala con un círculo verde el punto inflexión que corresponde al inicio del evento regenerativo. Los transitorios de calcio se miden en las cuatro neuritas primarias y en el tronco posterior. Los trazos azules corresponden a los generados por un LTS evocado por un pulso hiperpolarizante (-8 nA, 2 s) y los trazos rojos a los generados en respuesta a un pulso despolarizante (+1 nA, 2 s). Para cada ROI se indica el valor de la amplitud normalizada  $A.N.$ ; la amplitud  $\Delta F$  del transitorio de calcio evocado por el pulso despolarizante es normalizada respecto de la amplitud  $\Delta F$  de la señal óptica evocada por el LTS). La flecha indica el tiempo cero para cada forma de estimulación.

información que nos brinde un entendimiento más profundo de los mecanismos de integración y propagación de señales en esta neurona.

Como se puede observar en el registro representativo expuesto en la **figura RII.1**, el pulso de corriente positiva (1 nA, 2 s) genera la despolarización de la neurona y superpuesto a ella un evento regenerativo. Éste último se distingue a partir de la inflexión del  $V_m$ , luego de la cual la despolarización sigue una dinámica similar a la de un LTS. En simultáneo con la respuesta electrofisiológica, se registran señales de  $\Delta F/F$  en diferentes localizaciones del árbol neurítico. Además, con fines comparativos, se registran en los mismos sitios los transitorios de calcio evocados por LTS desencadenado por un pulso de corriente hiperpolarizante.

En todos los casos de este ejemplo, la amplitud $_{\Delta F}$  del transitorio de calcio evocado por el LTS fue mayor que el evocado por el pulso despolarizante de 1 nA. Las distribuciones espaciales de los transitorios de calcio evocados por estos dos protocolos resultaron ser disímiles: en algunas regiones la amplitud $_{\Delta F}$  de la señal óptica generada por el pulso despolarizante fue mayor a la mitad de la amplitud $_{\Delta F}$  evocada por el LTS (rCA), en otras la relación entre las amplitudes $_{\Delta F}$  fue aún menor (rCP y rIP), o prácticamente nula (tP y rIA). Es decir, los pulsos de corriente despolarizante no generaron transitorios de calcio en forma robusta como el LTS evocado por pulso hiperpolarizante. La situación perdió aún más consistencia cuando se repitió varias veces el protocolo de pulsos despolarizantes en un mismo preparado: en ese caso, se encontró que la distribución espacial de las señales ópticas podía variar de repetición en repetición (no mostrado).

Parte de este comportamiento se puede explicar por el proceso de inactivación de las CCSVs. La proporción de canales activables en el estado de reposo sería menor que cuando toda la neurona es sometida a una fuerte hiperpolarización. Además, la proporción de canales activables puede variar sensiblemente de lugar en lugar dentro de la neurona, así como de

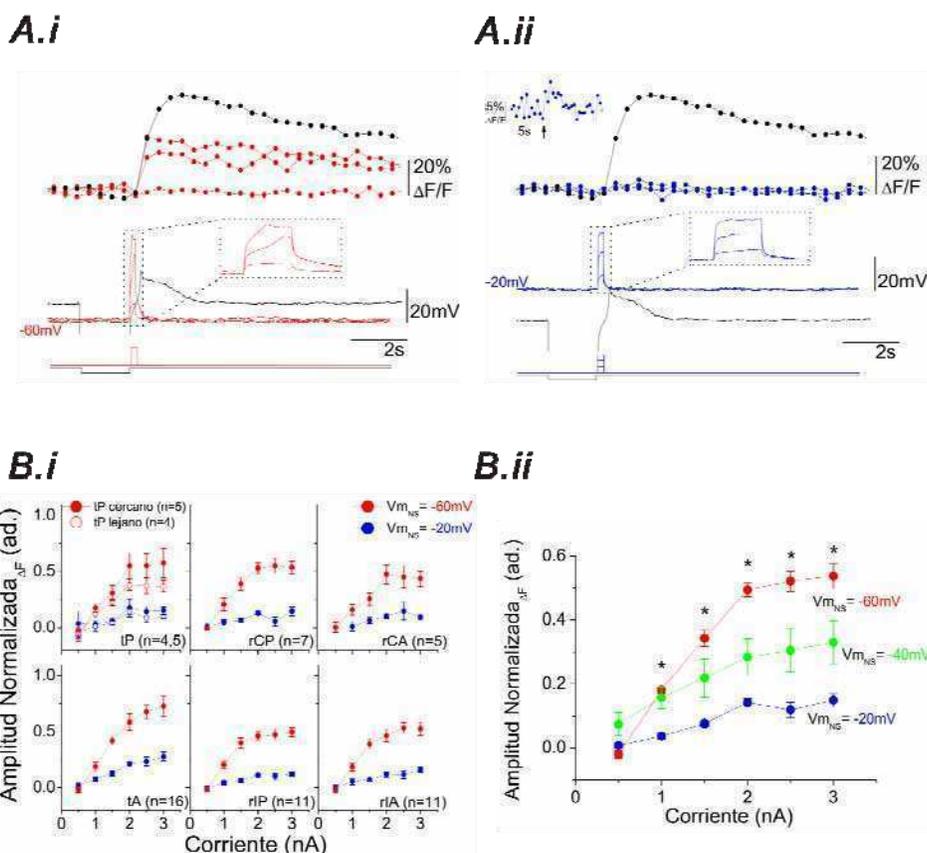
repetición en repetición del protocolo de estimulación, en especial si se tiene en cuenta que el umbral de activación de dichas conductancias está muy cercano al  $V_m$  de reposo de la neurona. Esto explicaría la falta de consistencia y repetitividad del fenómeno.

Bajo este panorama, una forma de obtener una respuesta de calcio robusta ante pulsos despolarizantes sería alejar el  $V_{mNS}$  basal del umbral de activación, para garantizar un estado bien definido en cualquiera de los dos sentidos: conductancias activables (hiperpolarizado) o inactivadas (despolarizado).

### **La respuesta a pulsos despolarizantes es modulada por el potencial de membrana**

Como se mencionó anteriormente, experimentos previos en el laboratorio mostraron que la respuesta electrofisiológica de la neurona NS ante pulsos de corriente despolarizante podía ser modulada por el potencial de membrana basal de la neurona (Vilarchao, 2011; Anexo 1). Con la meta de repetir este protocolo para estudiar su impacto sobre los transitorios de calcio, se llenaron las neuronas con OGB-1 y se les inyectó una serie de seis pulsos de corriente despolarizante (0.5 nA a 3 nA, a pasos de 0.5 nA) por 200 ms, partiendo de diferentes potenciales de membrana basales: -60 mV y -20 mV. Este protocolo fue originalmente diseñado para que las despolarizaciones generadas simulen entradas sinápticas en distintas condiciones basales.

Este diseño experimental de pulsos despolarizantes generó transitorios de calcio en ambas condiciones (**figura RII.2A**), pero como se esperaba, se observó una diferencia drástica en el tamaño de las señales de  $\Delta F/F$  entre el estado hiperpolarizado y el estado despolarizado. La magnitud de los transitorios de calcio aumentó gradualmente con la del estímulo, aunque en



**Figura RII.2. La respuesta a pulsos despolarizantes es sensible al potencial de membrana.** **A,** en rojo y en azul se muestran señales representativas superpuestas desencadenadas por pulsos despolarizantes de diferente amplitud (0.5 nA, 1.5 nA y 2.5 nA; 200 ms): transitorios de calcio (arriba) y respuestas electrofisiológicas (abajo). En el experimento completo se inyectaron pulsos de 0.5 nA a 3 nA, a intervalos de 0.5 nA. Los trazos negros corresponden a las respuestas evocadas en la misma célula por un LTS desencadenado por un pulso hiperpolarizante (-8 nA, 2 s). Se esquematiza en la parte inferior los pulsos de corriente inyectados en cada condición. Mediante la inyección de una corriente basal se fija el  $V_{m_{hb}}$  en -60mV (**A.i**) o -20mV (**A.ii**), como se indica junto a los registros electrofisiológicos. Se amplifica el transitorio de calcio frente al pulso de +2.5nA en **A.ii**, indicándose con una flecha el inicio del pulso. **B,** amplitud normalizada $_{\Delta F}$  promedio de los transitorios de calcio (ver Materiales y Métodos) evocados por pulsos breves de corriente despolarizante en función de la magnitud del estímulo, para las dos condiciones de  $V_{m_{hb}}$  basal. En el panel **B.i** se discriminan los datos para las cuatro neuritas primarias, el tronco anterior (tA), y el tronco posterior, dividido en los tramos con una distancia al soma menor (tP cercano) y mayor (tP lejano) a 160  $\mu m$ . Se indica la cantidad de preparados para cada arborización. En el panel **B.ii** se juntan los datos de las cuatro neuritas primarias (n=16 preparados). Para una dada magnitud de corriente, se comparan las amplitudes normalizadas $_{\Delta F}$  de las condiciones de  $V_{m_{hb}} = -20mV$  y -60mV; el grado de significancia estadística fue determinado usando el *t-test de t-Student pareado* (\* $p < 0.001$ ). Se presenta el caso de  $V_{m_{hb}} = -40mV$  (n=3 preparados).

forma más notoria para el caso en que  $V_{mNS}$  basal fue de -60 mV. Con NS a -20 mV, los transitorios de calcio son prácticamente imperceptibles (por claridad, se amplifica únicamente la respuesta ante un pulso de 2.5 nA). En este ejemplo representativo, así como en el resto de los preparados, los transitorios de calcio evocados por LTS son más grandes que las señales ópticas generadas por los diferentes pulsos despolarizantes.

Como la amplitud<sub>ΔF</sub> de las señales ópticas no refleja directamente la magnitud del  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ , sino que dependen, además, de una serie de condiciones experimentales locales (como la concentración del indicador de calcio), no es correcta la comparación del valor de dicha variable medida en distintos sitio. Por lo tanto, para poder agrupar los datos obtenidos en distintas preparaciones y para permitir un estudio comparativo a nivel espacial entre diferentes procesos neuríticos estudiados, la amplitud<sub>F</sub> generada bajo el protocolo de pulsos despolarizantes en cada ROI fue normalizada por la amplitud<sub>ΔF</sub> evocada por LTS en ese sitio (amplitud normalizada<sub>ΔF</sub>).

En la **figura RII.2Bi** se resumen los datos de todas las preparaciones estudiadas: se procedió a graficar la nueva variable amplitud normalizada<sub>ΔF</sub> en función de la intensidad del pulso de corriente inyectado, agrupándolos por arborización neurítica y condición de registro (según el  $V_{mNS}$  basal). En esta figura se incluyen, además de las cuatro ramas primarias, el tronco anterior y el tronco posterior (**figura RI.1**).

La amplitud normalizada<sub>ΔF</sub> (y por ende, también amplitud<sub>ΔF</sub>) de los transitorios de calcio creció con la corriente. Pero las curvas estímulo-respuesta difieren tanto cuantitativamente como cualitativamente entre ambas condiciones de  $V_m$  basal. Los transitorios de calcio evocados cuando el  $V_m$  basal fue de -20 mV fueron pequeños, y su crecimiento con el estímulo fue gradual. En cambio, los transitorios de calcio evocados a -60 mV fueron sensiblemente más grandes, y su crecimiento con la corriente fue pronunciado hasta el estímulo

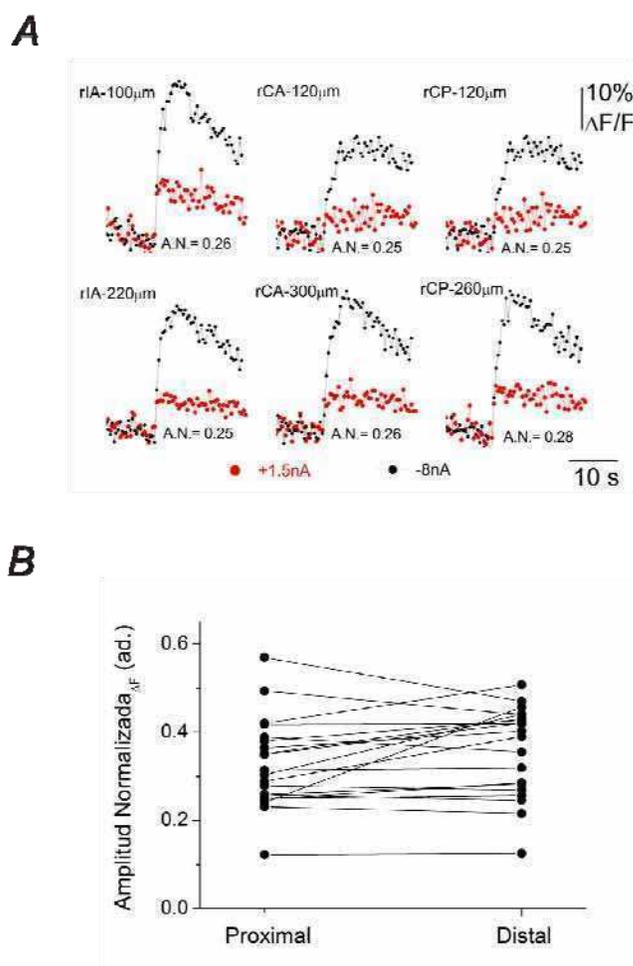
de 2 nA, a partir del cual la progresión fue mucho más suave. Este quiebre de la curva en 2 nA coincide con el punto en que los eventos regenerativos en la fase de subida del pulso alcanzan pleno desarrollo; a partir de ese punto dichos eventos cambian poco tanto en forma como en tamaño (ver Anexo 1).

Las curvas estímulo-respuesta para las señales de  $\Delta F/F$  de los diferentes sitios de las arborizaciones primarias no presentaron diferencias apreciables. Debido a la semejanza de las curvas, se decidió promediar los datos de las distintas ramas primarias, agregando la condición en que  $V_{m_{NS}}$  se mantuvo en su valor de reposo (-40 mV), y obtener una curva promedio de todos los preparados (**figura RII.2Bii**). Sobre estos datos se hicieron los test estadísticos: se compararon las respuestas en las condiciones de  $V_{m_{NS}}$  -60 mV y -20 mV, para cada intensidad de estímulo, y se encontró una diferencia significativa para todas las corrientes menos para la más pequeña (0.5 nA). Además, no se encontró diferencia significativa alguna entre las amplitudes normalizadas $_{\Delta F}$  de los transitorios de calcio evocados por pulsos mayores a 2 nA en la condición de  $V_{m_{NS}} = -60$  mV (p-valor = 0.41, *test de ANOVA* de un factor). Como se mencionó previamente, el caso de  $V_{m_{NS}} = -40$  mV no presentó un comportamiento robusto de los transitorios de calcio; pero a fines comparativos, se decidió promediar los datos de los diferentes procesos neuríticos y así mostrar que las respuestas de calcio evocadas por los pulsos despolarizantes en reposo tenían una amplitud intermedia entre las de -60 mV y -20 mV (excepto para la corriente de 0.5 nA, para la cual nuevamente no se encontraron diferencias significativas).

Aún cuando los transitorios de calcio de los distintos procesos neuríticos presentaron valores y perfiles similares entre sí, el tronco anterior presentó, en términos generales, los valores de amplitud normalizada $_{\Delta F}$  más grandes. Si comparamos la respuesta al pulso de 3 nA en la condición  $V_{m_{NS}} = -20$  mV, la del tronco anterior se diferenció significativamente (entre 42%

y 66%) de las respuestas de cada uno de los demás procesos (p-valor < 0.001, *test de ANOVA* de un factor; p-valor < 0.05, prueba de Tukey), cuando las demás arborizaciones no se diferenciaron entre si. En discrepancia con lo que ocurre en el estado despolarizado, cuando se comparó la respuesta al pulso de 3 nA para un  $V_m$  basal de -60 mV, el único par de procesos que mostró una diferencia estadísticamente significativa (p-valor < 0.05; *test de ANOVA* de un factor y prueba de Tukey) fue el tronco anterior y el tronco posterior lejano (porción del tP a una distancia mayor a 160  $\mu\text{m}$  del soma). Posiblemente esto se haya debido a que los pulsos despolarizantes llegan menos atenuados a las localizaciones cercanas (tA). Y en ausencia de evento regenerativo ( $V_{m_{NS}}$  basal de -20 mV), cuando la contribución de la despolarización inducida directamente por el pulso fue más importante, las diferencias a nivel de los transitorios de calcio causadas por la atenuación espacial pudieron ser más notorias (que con un  $V_{m_{NS}}$  basal de -60 mV).

Con el objeto de analizar la distribución espacial de los transitorios de calcio evocados por las despolarizaciones breves dentro de las neuritas primarias, se comparó la amplitud normalizada $_{\Delta F}$  de zonas proximales y distales (sitios de una misma neurita separados por lo menos 120  $\mu\text{m}$ , y donde proximal o distal fue en referencia al tronco). Las señales de la respuestas representativas expuestas en la **figura RII.3A** corresponden a transitorios de calcio evocados por pulsos de +1.5 nA y 200 ms, con  $V_{m_{NS}} = -60\text{mV}$ . Superpuestos a estas señales se muestran los transitorios de calcio evocados por un LTS en las mismas ROIs. Estos resultados indican que no existen diferencias entre ROIs proximales y distales dentro de una misma rama. Con el fin de resumir los datos obtenidos en esta serie experimental, la **figura RII.3B** enseña los valores de amplitudes normalizadas $_{\Delta F}$  para ROIs proximales y distales de una misma neurita primaria. Para cada ROI se promediaron los valores de amplitud normalizada $_{\Delta F}$  para los 6 valores corriente (de 0.5-3 nA) en la condición de  $V_{m_{NS}} = -60\text{mV}$ . Estos datos indican que no



**Figura RII.3. Los transitorios de calcio frente a pulsos despolarizantes tienen amplitud uniforme dentro de una misma neurita. A,** señales representativas de los transitorios de calcio en un ROI proximal (arriba) y otro distal (abajo) dentro de la misma neurita. Cada columna corresponde a una neurita diferente en una misma neurona. Los trazos rojos corresponden a la respuesta frente a un pulso despolarizante (1.5 nA, 200 ms) con un  $V_{m_{NS}}$  basal de -60mV y los negros a la evocada por un LTS con la neurona en reposo. En cada caso, se presenta el valor de la amplitud normalizada $_{\Delta F}$ , A.N. (la amplitud $_{\Delta F}$  del registro óptico evocado por el pulso despolarizante es normalizada respecto de la amplitud $_{\Delta F}$  de la señal óptica evocada por el LTS). **B,** amplitud normalizada $_{\Delta F}$  para las zonas proximal y distal de una misma neurita (n=20 neuritas, 10 preparados). Para cada ROI de cada neurita, se promedian las amplitudes normalizadas $_{\Delta F}$  correspondientes a pulsos de corriente de 0.5-3.0 nA, en la condición  $V_{m_{NS}}=-60mV$ . La clasificación de las zonas se hace de a pares, en función de sus distancias al tronco (entre la proximal y la distal siempre debe haber, por lo menos, 120  $\mu m$  de separación). La zona proximal tuvo una distancia promedio de  $120 \pm 15 \mu m$  y la distal  $268 \pm 17 \mu m$ . El *t-test de Student pareado* indica que no hay diferencias significativas entre las dos zonas ( $p > 0.05$ ).

hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ , *t-Student*) en la respuesta debido a la distancia dentro de un mismo proceso.

Es oportuno mencionar que cuando se le inyectó una corriente basal para llevar el  $V_m$  de la neurona NS a  $-60$  mV o  $-20$  mV, la intensidad de fluorescencia basal de toda la neurona cambió. Este fenómeno se observó en tiempo real durante el transcurso de los experimentos y generó que los parámetros para la adquisición de imágenes debieran ser modificados para poder tomar todos los registros en condiciones óptimas. Cuando la neurona fue llevada a  $-60$  mV, la intensidad de fluorescencia basal disminuyó respecto al reposo, y cuando se despolarizó a  $-20$  mV se generó el efecto contrario sobre la imagen. Esto estaría sugiriendo que la neurona NS cuenta con un mecanismo de regulación de la concentración basal de calcio intracelular dependiente de  $V_m$ .

Finalmente, podemos decir que los datos aquí expuestos dejan en evidencia la modulación de la magnitud de los transitorios de calcio por el potencial de membrana de la neurona, dando lugar a la amplificación de los  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  a potenciales hiperpolarizados.

### **Los transitorios de calcio necesitan de las CCSVs**

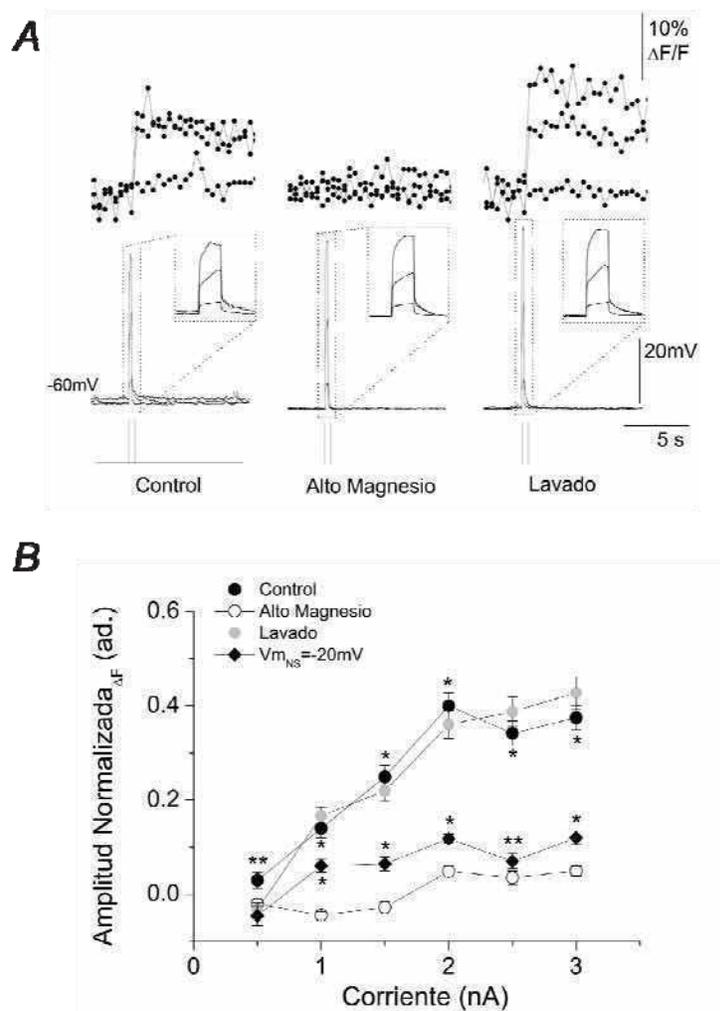
Se mostró que la amplificación de la respuesta electrofisiológica frente a pulsos de corriente despolarizantes es sensible al  $V_m$  basal y, por lo tanto, se infiere que parte de la respuesta está desencadenada por la activación de canales voltaje dependientes. Esta amplificación, a diferencia del LTS, es insensible al alto magnesio (Vilarchao, 2011; ver Anexo 2), pero sin embargo estos pulsos despolarizantes evocan transitorios de calcio. La pregunta que se suscita es si los transitorios evocados por los pulsos despolarizantes son, como los evocados por LTS, sensibles a altas concentraciones de magnesio.

Con el objeto de responder esta pregunta, se aplicaron pulsos de corriente de 0.5-3 nA y 200 ms, con el  $V_m$  basal fijado en  $-60\text{mV}$ , y se registraron las imágenes de fluorescencia junto con las respuestas electrofisiológicas mientras el ganglio era perfundido con diferentes soluciones extracelulares: 1) solución normal (control); 2) solución de alto magnesio (8 minutos); y 3) solución normal (lavado, 10 minutos).

El ejemplo representativo (**figura RII.4A**) ratifica que el grado de despolarización de la neurona no se ve afectado por el alto magnesio. El evento regenerativo efectivamente fue anulado por el bloqueante de canales de calcio pero esto casi no afectó la amplitud máxima alcanzada por la neurona en respuesta a la estimulación aplicada. Pero lo novedoso es que al igual que la respuesta regenerativa, los transitorios de calcio evocados por pulsos despolarizantes no se observaron en un preparado perfundido con la solución  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  20:1. Este efecto se revirtió cuando el ganglio es lavado con solución normal.

El efecto del magnesio bloqueando los transitorios de calcio se observa para todas las intensidades de corriente empleadas (**figura RII.4B**), es decir, para todos los grados de despolarización de la neurona. Más aún, las amplitudes normalizadas $_{\Delta F}$  de los transitorios de calcio en respuesta a despolarizaciones que se inducen a partir de un  $V_m$  de  $-20\text{mV}$  son significativamente más grandes que cuando se perfunde solución de alto magnesio y se estimula la neurona desde un potencial hiperpolarizado de  $-60\text{mV}$ . Esta diferencia se presenta para todas las intensidades de corriente, excepto para la más pequeña (0.5 nA).

Estos resultados sugieren que la activación de las conductancias de calcio sensibles tanto al voltaje como al alto magnesio es una condición necesaria para la generación de los transitorios de calcio inducidos por despolarización de la neurona NS.



**Figura RII.4. El magnesio bloquea los transitorios de calcio evocados con pulsos despolarizantes. A**, señales representativas superpuestas de una neurona NS en respuesta a pulsos breves de corriente despolarizante: transitorio de calcio (fila superior) y registro electrofisiológico (fila intermedia). El  $V_{m_{NS}}$  basal fue fijado en -60 mV. Se estudian tres condiciones: control con solución normal (columna izquierda), solución de alto magnesio (columna central), y lavado con solución normal (columna derecha). Los trazos inferiores esquematizan los pulsos de corriente inyectados (0.5, 1.5 y 2.5 nA; 200 ms). **B**, resumen: amplitud normalizada  $\Delta F$  promedio en función de la magnitud del pulso de corriente para las tres condiciones caracterizadas en A ( $V_{m_{NS}} = -60$  mV): control, alto magnesio y lavado. También se muestra el caso  $V_{m_{NS}} = -20$  mV en solución normal para los mismos preparados (n=81 ROIs, 19 neuritas/troncos, 3 preparados). La amplitud  $\Delta F$  del transitorio de calcio evocado por el pulso despolarizante es normalizada respecto de la amplitud  $\Delta F$  de la señal óptica evocada por un LTS. Para cada intensidad de corriente se comparan las amplitudes normalizadas  $\Delta F$  en solución de alto magnesio con las de condición control y con las de  $V_{m_{NS}} = -20$  mV; el grado de significancia estadística fue determinado usando el *t-test de Student pareado* (\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$ ).

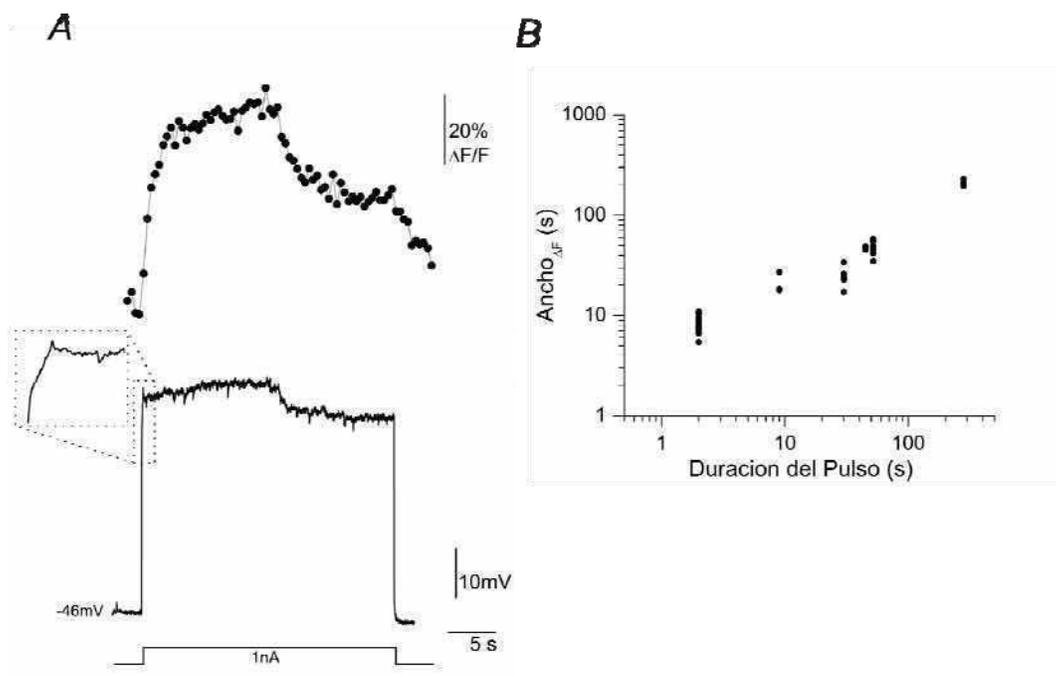
### Inactivación de las CCSVs

La activación de las CCSVs que da lugar a los eventos regenerativos, tanto en el caso de los protocolos de pulso hiperpolarizante (LTS) como los de pulso despolarizante recién estudiados, parece ser una condición necesaria para que se produzca un flujo apreciable de calcio hacia el medio intracelular. Además, se ha visto que la duración de los *plateaus* de los LTS mantiene estrecha relación con la duración de la señales de calcio.

Con el fin de estudiar la inactivación de las conductancias responsables de los transitorios de calcio en función del tiempo, se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes de diferentes duraciones (de 2 s hasta 5 min.) y 1 nA de intensidad.

La primera observación es que la señal de  $\Delta F/F$  duró tanto como la respuesta despolarizante (**figura RII.5A**). El cambio de la señal de fluorescencia comenzó con un crecimiento pronunciado, que es precedido por el evento regenerativo en la respuesta electrofisiológica. A continuación, la señal de  $\Delta F/F$  permaneció en un valor relativamente estable por un tiempo prolongado (~ 10 s), luego de lo cual experimentó una brusca caída a un valor intermedio, en coincidencia con una hiperpolarización espontánea de aproximadamente 7 mV. No obstante este cambio, la señal de  $\Delta F/F$  recién cayó por debajo de la mitad del valor máximo alcanzado cuando finalizó el pulso de corriente de 30 s y la neurona regresó a su  $V_m$  de reposo. Una explicación posible para esto último es que parte de las CCSVs permaneció en el estado activado, permitiendo un flujo continuo de calcio que mantiene la  $[Ca^{2+}]_i$  en un valor por encima del de reposo, ya que los sistemas de recaptación y extrusión del calcio no tienen una cinética lo suficientemente rápida para reestablecer la  $[Ca^{2+}]_i$  basal.

Como se puede notar en el registro representativo, las deflexiones pronunciadas (de algunos mV) en el  $V_m$  de la neurona se reflejaron inmediatamente en un  $\Delta F/F$ , apoyando la idea



**Figura RII.5. Los incrementos de  $\Delta F/F$  persisten durante el tiempo de estimulación con pulsos despolarizantes. A**, señales representativas de la respuesta de una neurona NS a un pulso de corriente despolarizante prolongado. Señal de  $\Delta F/F$  (panel superior) y registro electrofisiológico (panel inferior). Debajo del registro se esquematiza el pulso de corriente inyectado (1 nA, 30 s). **B**, duración promedio del transitorio de calcio para una neurita ( $\text{ancho}_{\Delta F}$ ; ver Materiales y Métodos) en función de la duración del pulso de corriente inyectado (n=60 neuritas, 20 preparados) .

de que los  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  son altamente sensibles al voltaje. Este tema se volverá a tratar en el Capítulo 3.

Un aspecto llamativo de estas respuestas es que los cambios en la señal de fluorescencia persisten durante el tiempo de estimulación con pulsos despolarizantes. Pulsos de corriente más largos, y por ende despolarizaciones más prolongadas, generan señales de  $\Delta F/F$  más duraderos (**figura RII.5B**). Esta correlación directa entre la duración del estado despolarizado y el ancho de las señales de  $\Delta F/F$  nos está indicando que el  $V_m$  es un factor importante en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la neurona NS.

Por último, es importante mencionar que con los protocolos de pulsos despolarizantes prolongados ( $> 20$  s) se alcanzaron señales de  $\Delta F/F$  de mayor valor máximo que los evocados por LTS. Esto nos permite afirmar que cuando trabajamos con los protocolos de pulsos hiperpolarizantes (que sirven también de control para el resto de los experimentos) los fluoróforos no llegan a un estado de saturación.

## RESULTADOS III

### SEÑALES DE CALCIO EVOCADAS POR ESTIMULACIÓN SINÁPTICA

Estímulos mecanosensoriales desencadenan varios de los comportamientos de la sanguijuela, como la natación, el desplazamiento lateral local, el acortamiento longitudinal y el desplazamiento sobre ventosas (Kristan et al., 1982). Los circuitos neuronales responsables de estos comportamientos motores han sido caracterizados en cuanto a las neuronas sensoriales y motoneuronas involucradas, pero en menor medida en términos de las interneuronas que participan.

Los circuitos neuronales descritos en la sanguijuela han sido caracterizados como circuitos distribuidos. Y la generación de los distintos comportamientos debería estar dada por el procesamiento que realizan las interneuronas a partir de la entrada sensorial. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Rodríguez et. al, 2012) indican que la neurona NS es un elemento que modula el generador central de patrones (CPG, por el término en inglés *central pattern generator*) que controla el desplazamiento sobre ventosas.

Las neuronas NS reciben señales sinápticas de las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (neuronas P) ejercida sobre la piel del animal. Dicha respuesta sináptica consta de un componente despolarizante rápido y un componente hiperpolarizante lento, que se superponen en el tiempo (Marín Burgin y Szczupak, 2000). Ambas respuestas están mediadas por vías polisinápticas. Cada potencial de acción en la neurona P genera una o más señales despolarizantes con fases de subida y repolarización rápidas. El componente hiperpolarizante se activa más lentamente y se manifiesta de manera monotonica durante una ráfaga de potenciales de acción de la neurona P, de tal manera que constituye una línea de base para las señales

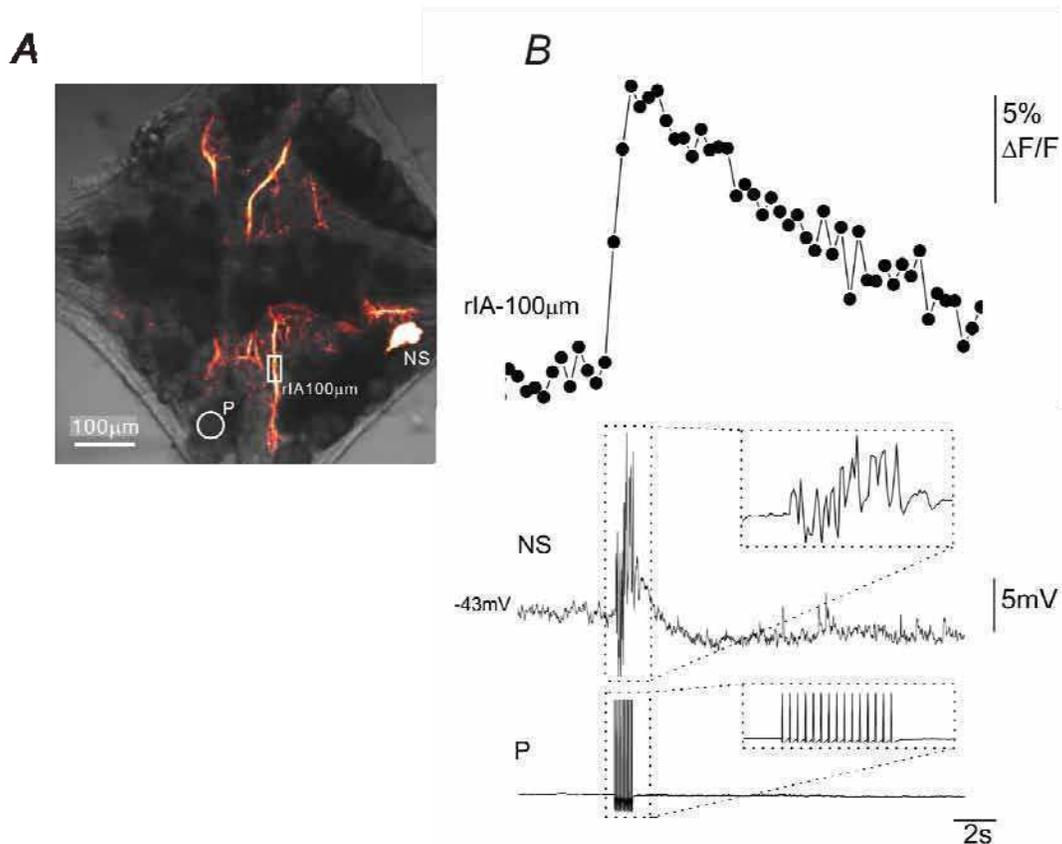
despolarizantes. La composición de las respuestas postsinápticas es muy variable de una neurona NS a otra.

Aprovechando el conocimiento que se tiene sobre la sinapsis entre la neurona NS y las neuronas mecanosensoriales P, la meta de la serie de experimentos que se describen en este capítulo es evaluar la hipótesis que postula que las CCSVs pueden tener un rol relevante en la propagación de las señales sinápticas despolarizantes en la neurona NS.

### **La estimulación sináptica produce transitorios de calcio**

Esta serie de experimentos se realizó en ganglios aislados utilizando doble registro intracelular. Un electrodo era empleado para registrar y estimular a una de las cuatro neuronas P del ganglio y el segundo electrodo para registrar a la neurona NS, previamente llenada con el fluoróforo sensible a calcio OGB-1 (**figura RIII.1A**). Los potenciales de acción de la neurona mecanosensorial P pueden ser evocados de manera consistente mediante la aplicación de pulsos de corriente de intensidad y duración adecuados (ver Materiales y Métodos). La **figura RIII.1B** muestra la respuesta electrofisiológica de una neurona NS a una ráfaga de 15 potenciales de acción a 15 Hz en una neurona P. En este ejemplo, la respuesta es mayoritariamente despolarizante y el componente hiperpolarizante lento no se observa. En la misma figura se enseña que dicha respuesta estuvo acompañada de un transitorio de calcio en la arborización neurítica. El aumento de la concentración de calcio intracelular en la neurona NS comienza con la aparición de la respuesta electrofisiológica a la estimulación de la sinapsis.

Como se mostró en el Capítulo 2, la despolarización de la neurona NS dió lugar a un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  detectado en forma de una señal de  $\Delta F/F$ , cuyo tamaño crecía con el grado

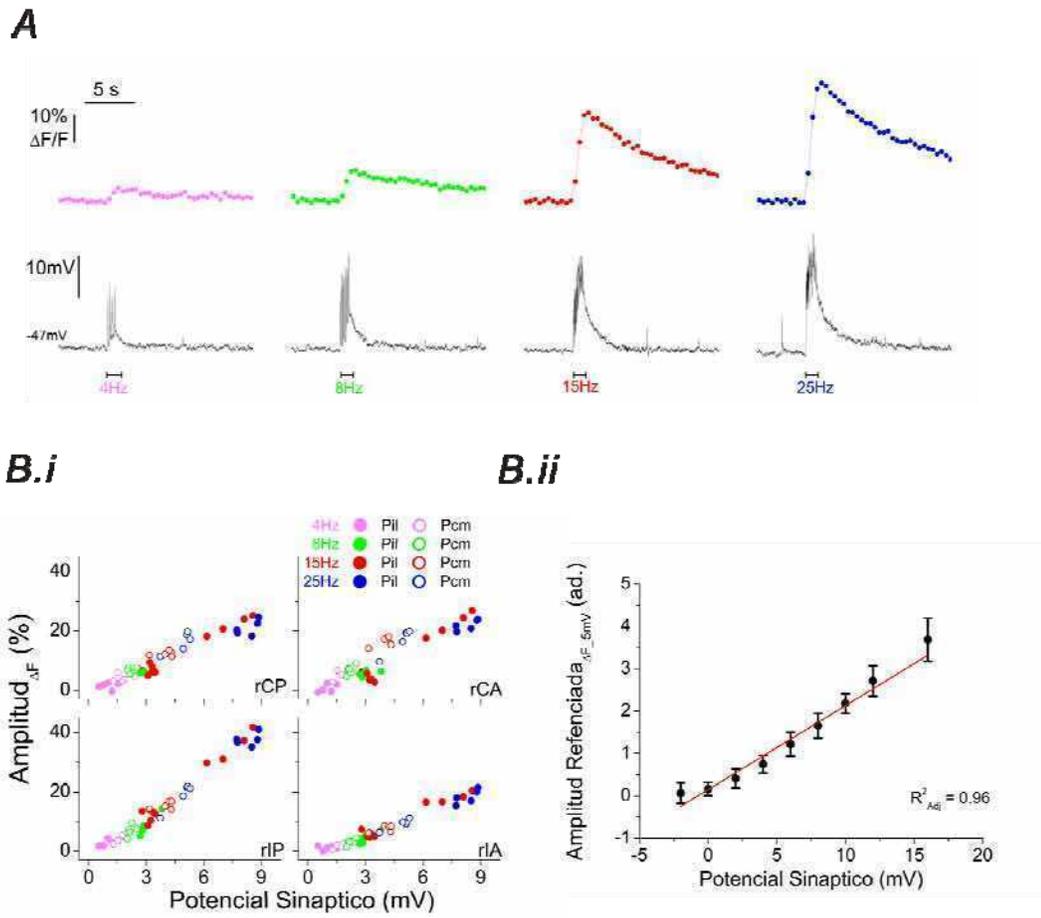


**Figura RIII.1. Transitorios de calcio evocados por estimulación sináptica.** **A**, imagen de fluorescencia de una neurona NS inyectada con OGB-1. Un electrodo de registro/estimulación se ubica en el soma de la neurona NS (estructura compacta de la derecha) y otro en el de la neurona mecanosensorial P ipsilateral lateral (esquemático por un círculo blanco). Se indica una región de interés (ROI) en la neurita rIA (rectángulo blanco). **B**, registros representativos de la respuesta de la neurona NS a la estimulación de una neurona P. La inyección de un tren de pulsos de corriente (ver Materiales y Métodos) en la neurona P genera una ráfaga de 15 potenciales de acción (panel inferior) durante 1 s. Este fenómeno evoca un potencial sináptico en la neurona NS (panel intermedio; se indica el  $V_{mNS}$  de reposo) así como el transitorio de calcio medido en la ROI demarcado en **A**. Sobre las señales electrofisiológicas de P y NS se muestra una ampliación del segmento de registro enmarcado en línea punteada.

de despolarización. Para evaluar cómo se relaciona la magnitud de la respuesta sináptica con la del transitorio de calcio procedimos a variar la intensidad del estímulo. Si las respuestas ópticas registradas durante la estimulación sináptica son mediadas principalmente por las CCSVs presentes en las neuronas NS, es razonable esperar que la amplitud del transitorio de calcio dependa del tamaño del potencial sináptico. En cambio, si el aumento de la concentración de calcio intracelular bajo el protocolo de estimulación sináptica está dominado por otras vías, como son receptores metabotrópicos que actúan sobre canales de calcio en la membrana plasmática o en el retículo endoplasmático, puede ser que el  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  dependa del patrón de disparo de la neurona mecanosensorial (y no haya una relación estrecha entre  $V_{mNS}$  y  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Es decir, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede estar regulada principalmente por vías señalizadas por neurotransmisores y segundos mensajeros, cuando el  $V_m$  puede estar controlado primordialmente por otros mecanismos paralelos.

### **El tamaño de los transitorios de calcio correlaciona con el potencial sináptico**

Aumentar la cantidad de potenciales de acción generados por la neurona mecanosensorial P durante la ventana temporal de 1 s en la que se la estimula condujo a un incremento del potencial sináptico. La **figura RIII.2A** muestra un ejemplo representativo en el cual se estimuló la neurona P ipsilateral lateral por un período de 1 s a diferentes frecuencias de disparo, y se midieron la amplitud de la respuesta sináptica y el de las señales de  $\Delta F/F$  en una ROI ubicada en la rama ipsilateral posterior. Las señales despolarizantes evocadas por cada potencial de acción se fueron sumando, alcanzándose despolarizaciones progresivamente más pronunciadas, y ese crecimiento del potencial sináptico fue acompañado de un aumento del



**Figura RIII.2. La amplitud de los transitorios de calcio depende linealmente del potencial sináptico. A**, señales representativas de los transitorios de calcio (arriba) y las respuestas electrofisiológicas (abajo) frente a la estimulación supraumbra de una neurona P ipsilateral lateral a diferentes frecuencias de disparo (las barras inferiores indican el tiempo de la estimulación eléctrica). Las respuestas ópticas fueron obtenidas en la misma ROI de la rIP. **B.i**, amplitud <sub>$\Delta F$</sub>  de los transitorios de calcio en función del potencial sináptico (ver Materiales y Métodos) obtenidos en el mismo preparado que el de los resultados mostrados en **A**. Cada panel corresponde a un solo ROI por neurita primaria. Se estimuló la neurona P ipsilateral lateral (Pii; círculos llenos) y, en otra serie experimental, la neurona P contralateral medial (Pcm; círculos vacíos), ambos a 4 frecuencias diferentes (4, 8, 15 y 25 Hz). En **B.ii** se expone la amplitud referenciada <sub>$\Delta F_{5mV}$</sub>  promedio (ver Materiales y Métodos) en función del potencial sináptico. Todos los datos (n=79 ROIs, 14 sinapsis, 9 preparados) fueron agrupados en rangos, de manera que cada valor de potencial sináptico incluyó dicho valor  $\pm 1$  mV. La barra de error indica la S.D.. La línea roja representa un ajuste lineal ( $R^2$  ajustado = 0.96).

transitorio de calcio. La naturaleza de esa correlación se ve claramente en la **figura RIII.2Bi**. En esta figura se presentan, además de la respuesta de la ROI mostrada en **A**, las respuestas de otras tres ROIs, cada una ubicada en una neurita primaria distinta. En todas ellas la correlación lineal entre la amplitud<sub>ΔF</sub> y el potencial sináptico resulta evidente. Puede observarse que dicha relación resultó no depender directamente de la frecuencia de disparo de la neurona mecanosensorial: dos series de estimulación a 15 Hz separadas en el tiempo evocaron potenciales sinápticos muy diferentes (alrededor de 3 mV y entre 6-9 mV, respectivamente), y junto a ello, respuestas ópticas consistentes con la correlación expuesta. La variabilidad en la respuesta sináptica a un mismo estímulo puede obedecer a cambios pre o postsinápticos que se producen en función del tiempo y de la actividad del preparado.

En el mismo preparado se estimuló la neurona P contralateral medial y los datos refuerzan la idea del estrecho vínculo entre el grado de despolarización de la neurona NS y el tamaño de los transitorios de calcio (**figura RIII.2Bi**). Más aún, la comparación de la respuesta de la neurona NS a la estimulación de las dos neuronas mecanosensoriales P no evidencia ninguna diferencia destacable. Es decir, los datos sugieren que en un sitio dado de la arborización, el  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  generado en respuesta a la estimulación sináptica no permite diferenciar cuál de las neuronas P fue activada.

Todos los preparados, sinapsis y localizaciones en el árbol neurítico estudiados se comportaron como el ejemplo descrito. Como era de esperarse, las diferentes series de datos presentaban una pendiente distinta. Es decir, el transitorio de calcio en respuesta a un mismo potencial sináptico variaba de preparado en preparado (y de sitio en sitio). Esto se puede deber a las diferentes condiciones de registro y a la variabilidad biológica intrínseca, entre otros factores. Por lo tanto, se normalizó cada serie de datos por un valor de referencia (valor de amplitud<sub>ΔF</sub> cuando el potencial sináptico era 5 mV). Dado que todas las series respondían a una relación

lineal, este procesamiento de los datos condujo a que todos los puntos se alinearan en una única recta. Para presentar los datos, se agruparon los datos según su valor de potencial sináptico, construyéndose rangos consecutivos de 2 mV de extensión. Se calculó el valor promedio de la amplitud referenciada  $\Delta F_{.5mV}$  en cada rango y se lo graficó en función del punto medio del mismo (**figura RIII.2Bii**). La amplitud referenciada  $\Delta F_{.5mV}$  de los transitorios de calcio y el potencial sináptico se ajustaron a una relación lineal con un coeficiente de determinación  $R_{ajustado}^2 = 0.96$ .

### **Distribución espacial de los transitorios de calcio evocados sinápticamente**

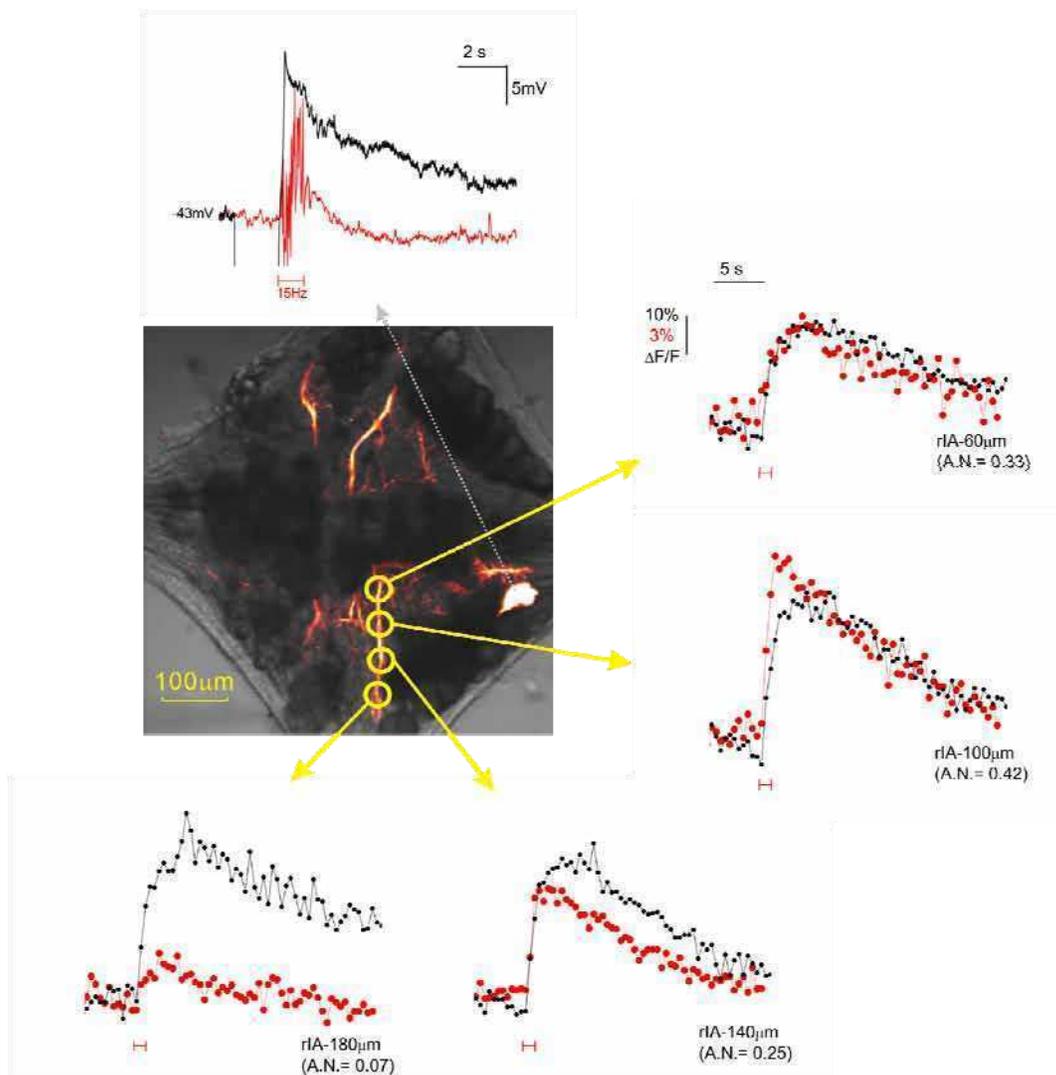
Como se viene discutiendo a lo largo de este trabajo, uno de los interrogantes más importantes trata sobre la distribución de señales en la neurona NS y la integración de las mismas en ella. Ahora nos proponemos estudiar la distribución espacial de los transitorios de calcio evocados por la activación de la sinapsis entre las neuronas mecanosensoriales P y la neurona NS.

Como dijimos en la **Introducción** respecto a la estructura eléctrica de la neurona, una posibilidad es que la célula se comporte como una serie de unidades funcionales eléctricamente aisladas. Dentro de esta alternativa, un escenario factible es que dentro de la neurona haya sitios de mayor sensibilidad y/o que generen respuestas más grandes frente a la estimulación sináptica (*hotspot*), separados por otros sitios de poca respuesta, que aislan los distintos compartimentos. La implementación de la búsqueda de estos sitios particulares que definen la distribución de las señales en la neurona fue complicada. El primer inconveniente fue que debido a la baja relación señal/ruido brindada por nuestro sistema de adquisición de imágenes, nos resultó prácticamente imposible estudiar señales de  $\Delta F/F$  pequeñas que estuviesen cerca del umbral de generación de las mismas, y así poder analizar la sensibilidad de las diferentes ROIs. Este defecto nos obligó a

trabajar con señales relativamente grandes. El segundo contratiempo deriva de otra deficiencia de la técnica: la emisión fluorescente de los indicadores de calcio podía ser desviada en su camino hacia el sistema de adquisición, en especial por los somas ubicados por encima de las ramas de la neurona NS, y así no alcanzar el fotomultiplicador. En muchos casos este fenómeno de *scattering* no permitió visualizar un trazo extenso de una misma neurita, dificultando la comparación de las respuestas a lo largo de la misma. La tercera situación conflictiva fue que los pocos patrones espaciales observados no presentaron un comportamiento consistente y repetitivo de preparado en preparado.

No obstante, no hay que ignorar los ejemplos como el expuesto en la **figura RIII.3**. La figura muestra los transitorios de calcio dentro de la rama ipsilateral anterior de una neurona NS evocados por la estimulación a 15Hz de una neurona P ipsilateral lateral y por un LTS. Las señales de  $\Delta F/F$  desencadenadas por la estimulación sináptica presentaron un máximo a una distancia de 100  $\mu\text{m}$  del tronco, atenuándose conforme se alejaban de esa ubicación. La diminuta señal de fluorescencia observada en la ROI a 180  $\mu\text{m}$  parece no ser un artefacto o una falla de la medición, ya que fue posible registrar en ese mismo sitio una señal óptica evocada por un LTS (más aún, esta respuesta es la más grande entre las evocadas por el LTS dentro de la rIA). Esto sirve de control de que en esa ubicación es posible medir señales de fluorescencia si se genera un  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

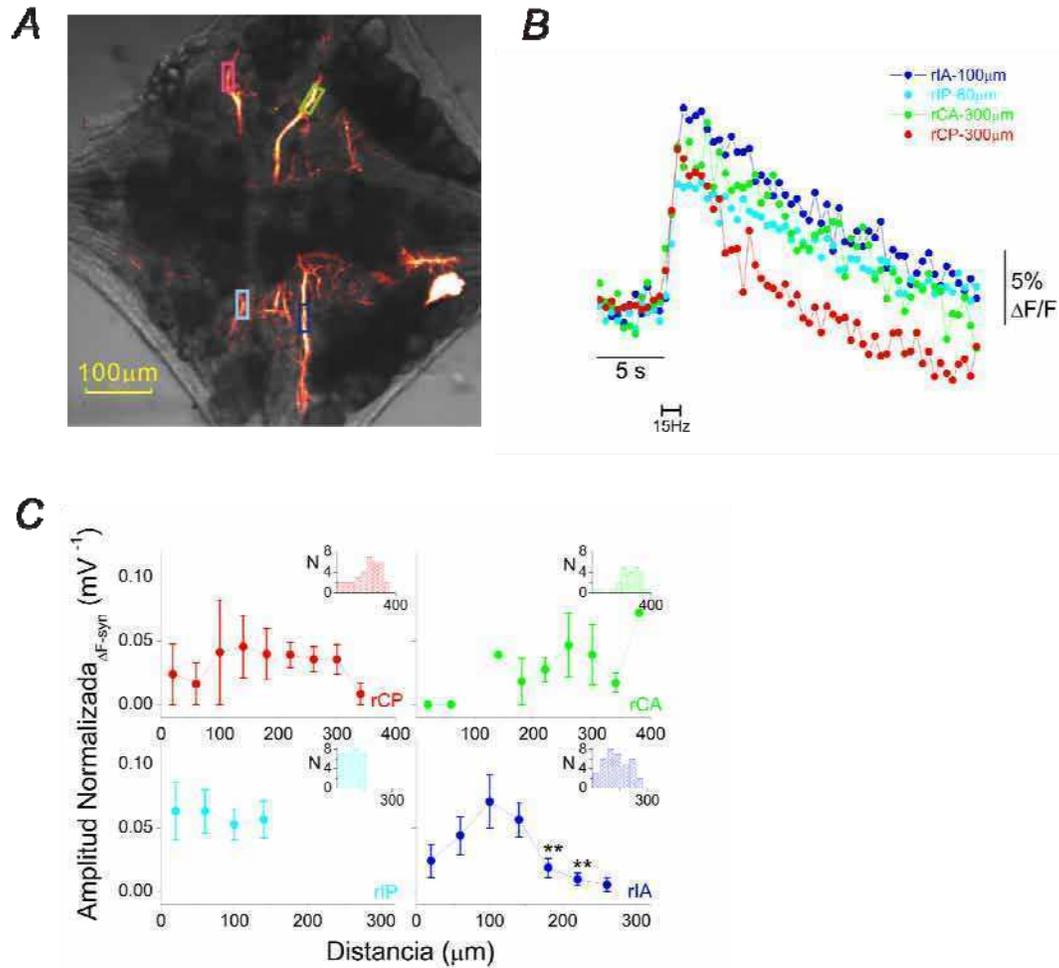
El ejemplo presentado y otros casos observados sugieren que existe dentro del árbol neurítico de la neurona NS *hotspots* donde el tamaño del transitorio de calcio tiene un máximo. Estos sitios pueden interpretarse como las ubicaciones donde se inicia el potencial sináptico, para luego propagarse velozmente por la arborización. Dentro del conjunto de experimentos realizados (que incluye la estimulación de diferentes neuronas P dentro de un mismo preparado),



**Figura RIII.3. Los transitorios de calcio desencadenados por estimulación sináptica pueden tener un patrón espacial diferente al evocado por LTS. Imagen de fluorescencia de una neurona NS cargada con OGB-1 (Imagen central) sobre la cual se indican las ROIs, a lo largo de la rIA, en las cuales se midieron los transitorios de calcio. La estructura compacta es el soma y en ella se midió la actividad electrofisiológica presentada en el panel superior. La neurona fue estimulada en forma directa con un pulso hiperpolarizante que desencadena un LTS (trazos negros), y en forma sináptica por estimulación supraumbra de la neurona P ipsilateral lateral (15 potenciales de acción a 15 Hz). Se esquematiza con una barra debajo de los registros la ubicación temporal del estímulo sobre la neurona P. La presentación de los registros se hace de tal forma que el fin del pulso hiperpolarizante coincide con el comienzo de la estimulación sináptica. Nótese la diferencia en las escalas de los  $\Delta F/F$  evocados por ambas formas de estimulación. Para cada ROI se indica el valor de la amplitud normalizada  $a_{\Delta F}$ .**

no se ha podido encontrar un patrón claro en lo que respecta a la ubicación espacial de esos *hotspots*. Sobre un total de 26 preparados (41 sinapsis), se encontró una cantidad limitada e inconsistente de aparentes *hotspots*, dificultando el análisis de los mismos. Se los encontró en 9 preparados diferentes (en 5 preparados se los observó en dos o más sitios distintos): se halló un *hotspot* en rIA en 6 preparados, en rIP en 3 preparados, en rCA en 4 preparados y en rCP en 2 preparados. En las ramas ipsilaterales los *hotspots* se encontraban a una distancia de entre 60  $\mu\text{m}$  y 140  $\mu\text{m}$  del tronco, y en las ramas contralaterales entre 140  $\mu\text{m}$  y 260  $\mu\text{m}$ . En la ROI situada en la rIA a 100  $\mu\text{m}$  del tronco se ubicó un *hotspot* en 3 preparados distintos, y en el resto de las ROI se halló en dos preparados o menos. En algunos preparados se estimularon dos sinapsis distintas (en forma separada): la ubicación de alguno de los *hotspot* se repitió al activar dos neuronas P diferentes en 5 casos (en 4 de los cuales participó la neurona P ipsilateral lateral), y en 6 casos un sitio de las ramas primarias presentaba un *hotspot* al estimular una neurona P pero no al activar otra neurona P (en 5 de estos casos era una neurona P ipsilateral y otra contralateral).

Más allá de estas apreciaciones cualitativas, realizamos un análisis cuantitativo de la distribución espacial de los transitorios de calcio en las cuatro ramas primarias de la neurona. En los preparados en los que fue posible visualizar parte de las cuatro neuritas primarias se pudo verificar que un potencial sináptico de tamaño suficiente fue capaz de evocar señales de  $\Delta F/F$  claras en las diversas ramas (**figura RIII.4A-B**). Con la intención de resumir los datos provenientes de los diferentes preparados se grafica la amplitud normalizada  $\Delta F_{\text{-syn}}$  promedio en función de la distancia, para los casos en que se estimuló la neurona P ipsilateral lateral (**figura RIII.4C**). La normalización se hizo con la amplitud  $\Delta F$  generada por LTS y con el potencial sináptico. La normalización respecto de la respuesta al LTS se hizo para relativizar los dato a un evento robusto y estereotipado, independizándonos de los factores locales, distintos al  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,



**Figura RIII.4. Distribución espacial de los transitorios de calcio evocados por estimulación sináptica.** **A**, imagen de fluorescencia de una neurona NS cargada con OGB-1. Se indican cuatro regiones de interés, una en cada neurita primaria: rectángulo azul (rIA), celeste (rIP), verde (rCA) y rojo (rCP). **B**, transitorios de calcio representativos, evocados por la estimulación de una neurona P ipsilateral lateral a 15Hz en cada uno de las ROIs marcadas en **A** (el segmento horizontal señala el tiempo del estímulo). El código de color indica la referencia espacial de cada trazo. La respuesta electrofisiológica que le corresponde es la mostrada en figura RIII.3. **C**, amplitud normalizada  $\Delta F_{\text{syn}}$  promedio de los transitorios de calcio evocados por estimulación de neuronas P ipsilaterales laterales (entre 4 y 25Hz) en función de la distancia respecto del tronco. La amplitud  $\Delta F$  evocada por estimulación sináptica se normaliza con respecto a la amplitud  $\Delta F$  desencadenada por LTS y también con respecto al potencial sináptico (ver Materiales y Métodos). Se presentan los datos de las cuatro neuritas primarias en función de la distancia. Los gráficos de barra insertos en las figuras muestran el número de preparados medidos para cada ROI (n=16 preparados en total). El doble asterisco indica diferencia estadística con rIA-100μm (\*\*p<0.05, test de Mann-Whitney).

que pueden afectar al tamaño de las señales de  $\Delta F/F$  (concentración de fluoróforo, relación superficie/volumen de la neurita, etc.). La normalización respecto del potencial sináptico busca independizarnos de la dependencia del transitorio de calcio respecto de este parámetro (nos permite agrupar los datos obtenidos a diferentes frecuencias de estimulación).

Como se dijo previamente, los transitorios de calcio desencadenados por estimulación sináptica se pueden encontrar en prácticamente cualquier sitio del árbol neurítico. La falta de algunas ROIs se debe a que por las limitaciones de la técnica antes expuestas no se pudo registrar en esas ubicaciones. En algunas ROIs la cantidad de muestras es muy pequeña ( $n = 1$  ó  $2$ ), por lo que esos datos no pueden ser analizados con profundidad. En muchas otras ROI, la variabilidad de la respuesta es notoria. El amplio abanico de valores refleja, en parte, la falta de consistencia y repetitividad en el perfil de la respuesta, que se hizo notar durante la búsqueda de los *hotspots*.

La distribución espacial de los transitorios de calcio en la rIA es interesante de observar. Como bien se pudo apreciar a través del ejemplo presentado en la **figura RIII.3**, el conjunto de los datos también parece indicar que la rama ipsilateral anterior presenta un *hotspot* local (en rIA-100 $\mu$ m). La señal en rIA-100 $\mu$ m es mayor que en rIA-180 $\mu$ m y rIA-220 $\mu$ m (para rIA-260 $\mu$ m sólo se tienen 2 datos), y las señales en rIA-20 $\mu$ m, rIA-60 $\mu$ m, rIA-180 $\mu$ m, rIA-220 $\mu$ m y rIA-260 $\mu$ m no presentan diferencias significativas entre ellas (*test de Kruskal-Wallis*,  $p$ -valor = 0.16). Este análisis cuantitativo confirma indica que la atenuación espacial de los transitorios de calcio evocados por estimulación de una neurona P lateral ipsilateral es mucho más pronunciada en dirección a la periferia del ganglio. Las otras ramas del árbol neurítico mostraron respuestas con una distribución relativamente uniforme.

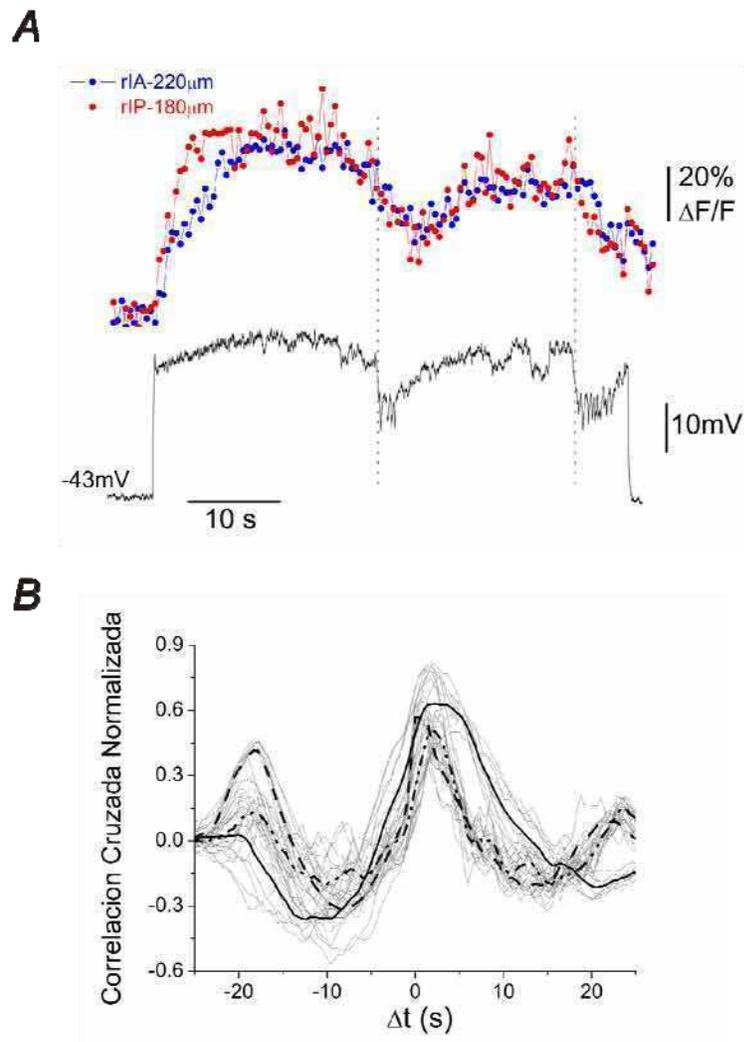
### **Hiperpolarizaciones espontáneas generan un $\Delta[Ca^{2+}]_i$**

Las neuronas NS están acopladas a la mayoría de las motoneuronas excitatorias mediante sinapsis eléctricas rectificantes. Además, la activación de las motoneuronas genera potenciales inhibitorios en la neurona NS que los transmiten por medio de una vía polisináptica (Wadepuhl, 1989; Rela y Szczupak, 2003). Estas respuestas tienen un potencial de reversión de alrededor de -55 mV, y por lo tanto, se magnifican cuando la neurona NS se encuentra despolarizada.

La **figura RIII.5A** muestra un registro representativo de la despolarización sostenida de una neurona NS, inducida mediante la inyección de un pulso largo de corriente de 1 nA, que es interrumpida por una serie de hiperpolarizaciones espontáneas. Estas señales hiperpolarizantes probablemente se deban a una ráfaga espontánea de potenciales de acción de alguna motoneurona.

Los potenciales hiperpolarizantes de mayor tamaño (~10mV) se vieron claramente reflejados como una caída en la señal de  $\Delta F/F$ . Esta alta correlación entre la señal electrofisiológica y la óptica fue registrada en diversos sitios de la estructura neuronal. De esta forma, se pudo comprobar que los transitorios de calcio son capaces de reflejar no sólo el grado de despolarización de la neurona, sino también las deflexiones de  $V_m$  en sentido hiperpolarizante.

Si se mide la correlación cruzada normalizada (ver Materiales y Métodos) entre la señal electrofisiológica y la señal de  $\Delta F/F$  (**figura RIII.5B**), se puede encontrar que ambas están estrechamente sincronizadas, con un retraso de 2-3 s de la señal óptica respecto a  $V_m$ . Este desfase está posiblemente sobreestimado, ya que intervienen factores como la interacción del fluoróforo con el calcio.



**Figura RIII.5. La hiperpolarización espontánea de la neurona NS produce una disminución en la señal de  $\Delta F/F$ .** **A**, señales representativas de la respuesta electrofisiológica (abajo) y los cambios de  $\Delta F/F$  (arriba) frente a un pulso despolarizante largo (1 nA, 50 s; esquematizado por el trazo debajo del registro). Se indican las ROIs a las cuales corresponden las señales de  $\Delta F/F$ . Nótese la presencia de respuestas hiperpolarizantes espontáneas en el curso de la despolarización en el registro electrofisiológico. Las líneas punteadas señalan el inicio de las mismas. **B**, resultado de la correlación cruzada normalizada entre los registros electrofisiológicos y las señales de  $\Delta F/F$  (ver Materiales y Métodos). Se muestran tanto los resultados individuales de cada ROI (líneas punteadas claras, una por cada ROI de cada preparado) como los promedios para cada preparado (líneas oscuras;  $n = 28$  ROIs, 3 preparados).

Aunque no se mencionó con anterioridad, es oportuno informar que en muchas oportunidades la hiperpolarización de la neurona NS generada por los pulsos de corriente inyectados para generar LTS también indujo una caída en la señal de  $\Delta F/F$ . Como muestra de ello, se puede observar la **figura RIII.3** y notar las diferencias entre las señales ópticas generadas por el LTS y la evocada por estimulación sináptica durante los 2 segundos previos al tiempo cero (en especial, en rIA-100 $\mu$ m y rIA-140 $\mu$ m).

## DISCUSIÓN

Se efectuaron registros electrofisiológicos intracelulares del potencial de membrana en simultáneo con mediciones ópticas empleando indicadores fluorescentes sensibles a calcio en la neurona NS de la sanguijuela. Estas técnicas permitieron analizar los transitorios de calcio evocados por LTS tras un pulso de corriente hiperpolarizante y los generados por pulsos despolarizantes progresivos a distintos  $V_{mNS}$  basales. Además, se estudiaron los transitorios de calcio evocados por estimulación sináptica por medio de la activación de la neurona mecanosensorial P.

### **Los LTS generan transitorios de calcio.**

La neurona NS de la sanguijuela dispone de CCSVs de bajo umbral de activación. En la fase de subida de la respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante, cuando la neurona vuelve a alcanzar su potencial de reposo, estos canales se activan en forma regenerativa y participan en la generación de un LTS (Rela et al., 2009). Nuestros experimentos mostraron que el LTS así evocado viene acompañado de incrementos transitorios de  $[Ca^{2+}]_i$  ampliamente distribuidos dentro del profuso árbol neurítico de las neuronas NS, siendo medibles tanto en el tronco como en las cuatro neuritas primarias estudiadas (**figura RI.4**).

Los transitorios de calcio asociados al LTS presentaron amplitudes relativamente uniformes en las ramas primarias. El leve aumento en la amplitud de los transitorios de calcio en función de la distancia respecto del soma (**figura RI.4**) es consistente con un posible gradiente en la concentración del indicador de calcio a lo largo de los procesos, producto de la difusión pasiva del fluoróforo que no alcanzó el equilibrio. Asimismo, no sólo el tamaño de los transitorios de calcio fue uniforme, sino que la dinámica de las señales también lo fue: los

parámetros que caracterizan la fase de subida ( $T_{\text{pico}_{\Delta F}}$  y  $T_{s50\%_{\Delta F}}$ ) y la duración ( $\text{ancho}_{\Delta F}$ ) presentaron valores relativamente uniformes a lo largo de cada una de las cuatro neuritas primarias y también entre ellas (**figura RI.5 y RI.9**).

La dinámica de los transitorios de calcio aquí observados ( $\text{ancho}_{\Delta F} \sim 3$  s) son comparables a los evocados por LTS en células granulares del bulbo olfatorio en tortugas ( $\text{ancho}_{\Delta F} \sim 2$  s; Pinato y Midtgaard, 2005), pero son más lentos que los generados por LTS en interneuronas neocorticales de ratón ( $\text{ancho}_{\Delta F} < 500$  ms, con un LTS que dura aproximadamente sólo 100 ms; Goldberg et al., 2004). Y se distinguen de los transitorios de calcio observados en otras preparaciones experimentales y bajo protocolos que desencadenan respuestas electrofisiológicas distintas al LTS, como las respuestas postsinápticas excitatorias (Eilers et al., 1995; Fitzpatrick et al., 2009), potencial de acción dependientes de sodio (Markram et al., 1995; Helmchen et al., 1996; Sabatini et al., 2002), ráfaga de potenciales de acción dependientes de sodio (Milojkovic et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2009), potencial de acción de calcio (Schiller et al., 1997); potencial de acción dendrítico local, con componente rápida dependiente de canales de sodio y componente lenta dependiente de receptores de NMDA (Losonczy et al., 2008). En todas estas preparaciones los transitorios de calcio tienen una duración medida a la mitad del máximo de entre 20 ms y 500 ms.

Los resultados indican que la generación del LTS es una condición necesaria para la evocación de los transitorios de calcio bajo el protocolo de pulsos de corriente hiperpolarizante, y que no son un efecto directo de la estimulación eléctrica *per se* (**figura RI.6 y RI.7**). Por otro lado, los transitorios de calcio se iniciaron en forma sincrónica con cada LTS y, ya sea en la fase de subida como en la fase de bajada, el LTS electrofisiológico de las neuronas NS precedió a la señal óptica. Además, la evolución temporal de los transitorios de calcio en la neurona NS se desarrolló en correspondencia con la dinámica del LTS al que acompañaban. Por ejemplo, el

ancho<sub>ΔF</sub> (entre 2 s y 5 s) de las señales ópticas aquí medidas es consistente con la componente *plateau* del LTS, que dura entre 1 s y 5 s (siempre termina antes que el transitorio de calcio). Si tomamos en cuenta la fase de subida de la señal óptica en la neurona NS a través de  $T_{pico_{\Delta F}}$  (~ 1 s) y el  $T_{s50\%_{\Delta F}}$  (~ 0.6 s), podemos observar que la cinética de las señales desencadenadas por el LTS en las neuronas NS resulta lenta en comparación, por ejemplo, a las desencadenadas por LTS ( $T_{pico_{\Delta F}} \sim 100$  ms; Goldberg et al., 2004) o potenciales de acción calcio ( $T_{pico_{\Delta F}} \sim 50$  ms; Schiller et al., 1997) en otras preparaciones. Pero esto es compatible con la cinética lenta del LTS de NS que alcanza su pico en aproximadamente 500 ms, un tiempo considerablemente mayor que el tiempo al pico de los eventos regenerativos dependientes de CCSVs mencionados en la comparación.

La detección de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  en un sitio determinado no implica necesariamente la presencia de canales iónicos que permitan el flujo del catión en esa localización. El transitorio de calcio puede haberse iniciado en otro sitio, para luego transmitirse en forma de onda de calcio. Las ondas de calcio son señales de calcio que surgen de la propagación (uni o bidireccional) de la liberación de calcio intracelular por activación de receptores de IP<sub>3</sub>. Éstas fueron descritas en dendritas de neuronas piramidales de hipocampo (Nakamura et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2009) y de neocorteza (Larkum et al., 2003) en respuesta a la actividad sináptica o por la actividad sinérgica de receptores metabotrópicos de glutamato y potenciales de acción retrógrados (Augustine et al., 2003).

En la literatura hay reportada una velocidad máxima de propagación de 90  $\mu\text{m/s}$  para la onda de calcio mediada por IP<sub>3</sub>, lo que equivale a un desfase de aproximadamente 220 ms entre señales registradas a 20  $\mu\text{m}$  de distancia. En nuestros experimentos, sólo en 2 de un total de 106 mediciones se registró un  $\Delta T_{20\mu\text{m}}$  mayor a 100 ms. Además, la distribución normal con media nula a la que responden las mediciones de  $\Delta T_{20\mu\text{m}}$  es consistente con la hipótesis de que

los desfases registrados son producto de la variabilidad intrínseca del proceso de medición, y que los transitorios de calcio se inician prácticamente en forma simultánea en todas las localizaciones. Con estos datos no descartamos la posibilidad de que los reservorios intracelulares contribuyan a los transitorios de calcio, pero los resultados indican que los transitorios de calcio se originaron localmente.

En experimentos realizados en extractos citosólicos de ovocito de *Xenopus laevis*, Allbritton y colaboradores mostraron que el coeficiente de difusión del calcio libre depende de su concentración y es de 13 y 65  $\mu\text{m}^2/\text{sec}$  para 90 nM y 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente (Allbritton et al., 1992). Además, el rango efectivo para el calcio antes (calcio libre) y luego de ser captado por los *buffer*, calculado a partir de los coeficientes de difusión y los tiempos de vida, fue de 0,1  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Con estos valores pequeños para el coeficiente de difusión del calcio y su rango efectivo observados en extractos de ovocito, la simple difusión del ión no podría sincronizar los transitorios de calcio medidos a lo largo de la arborización neurítica de la neurona NS. Aunque todavía permanece latente la posibilidad de que la difusión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -fluoróforo sea significativamente más rápido que la difusión del calcio libre y esto dar cuenta, aunque sea parcialmente, de nuestras observaciones.

Resumiendo, el estrecho vínculo entre los LTS electrofisiológicos y los transitorios de calcio, y el inicio prácticamente simultáneo del aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los diferentes sitios sugieren que los transitorios de calcio debieron originarse en la activación de CCSVs. Y la distribución de los transitorios de calcio indica que las CCSVs deben estar repartidas a lo largo de toda la extensión de la neurona. Esta hipótesis se ve reforzada por la observación de que la hiperpolarización o la depolarización de la neurona mediante inyección de corriente continua indujeron una disminución o un aumento, respectivamente, del nivel basal de fluorescencia en

toda la estructura neurítica, lo cual indicaría que las CCSVs podrían ser los canales de calcio que se encuentran a lo largo de toda la membrana neurítica.

Los datos parecen indicar que la despolarización de la neurona NS y/o la apertura de los canales involucrados en el evento regenerativo desencadenaron el  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Más aún, podemos concluir que la presencia de un transitorio de calcio bajo el protocolo de pulsos hiperpolarizantes en una ubicación del árbol neurítico indica que allí se alcanzó el umbral de apertura de CCSVs responsables de la generación (completa o parcial) del transitorio de calcio. En conclusión, el cambio de  $V_m$  y el transitorio de calcio parecen ser dos aspectos diferentes del mismo fenómeno regenerativo, el LTS.

Los resultados no permiten determinar si la distribución de CCSVs en la membrana de la neurona NS es homogénea o heterogénea. En el caso de trabajar con la técnica de *calcium imaging*, la interpretación cuantitativa de las diferencias de  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  en términos de variaciones en la densidad de canales requiere que se realicen correcciones por diferencias en el potencial de membrana y en la relación superficie/volumen, así como asumir que la capacidad de *buffering* del citoplasma es constante en todas las ubicaciones (Ross, 1989). Un menor nivel basal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  también podría resultar en un valor más grande de  $\Delta F/F$  (Rosza et al., 2004). Asimismo, en este caso hay que tener en cuenta el balance de las CCSVs con las conductancias de potasio. Pero en principio, los datos registrados no brindan evidencia alguna de regiones donde se hayan producido transitorios de calcio considerablemente más grandes o pequeños que las regiones neuríticas vecinas de calibre similar. Por lo tanto, los valores relativamente homogéneos de amplitud y de parámetros cinéticos de los transitorios de calcio a lo largo de las cuatro neuritas primarias hacen plausible la hipótesis de una distribución uniforme de las CCSVs en el árbol neurítico de la neurona NS.

Como ya se dijo, nuestros resultados son similares a los encontrados en las células granulares del bulbo olfatorio de tortuga (Pinato y Midtgaard, 2005). En ellas los LTSs identificados electrofisiológicamente que son evocados desde el soma están asociados con transitorios de calcio extensamente distribuidos. Y el flujo de calcio está regulado por la activación de canales de calcio de tipo T, tanto en las dendritas proximales como en las distales. En las interneuronas neocorticales de ratón (Goldberg et al., 2004) también se hallaron transitorios de calcio generados por LTS en todo el árbol dendrítico. Nuevamente, el fenómeno fue desencadenado por la activación de canales de calcio de tipo T mediante inyección de corriente desde el soma. Pero en este caso un gradiente significativo en la amplitud de los transitorios de calcio sugiere una mayor densidad de canales en las dendritas distales.

Extendiendo las comparaciones, experimentos hechos en las células de Purkinje del cerebelo parecen indicar que en ellas debe haber canales de calcio a lo largo de toda la membrana dendrítica (Lev-Ram et al., 1992). Estas células presentan potenciales de acción de calcio de alto umbral y potenciales *plateau* de calcio de bajo umbral de activación que usualmente son acompañados de incrementos transitorios en  $[Ca^{2+}]_i$  sobre todo el campo dendrítico. Pero también se pueden encontrar otro tipo de comportamientos: las neuronas piramidales neocorticales de rata (Schiller et al., 1997) presentan potenciales de acción de calcio restringidos a las dendritas apicales distales. Estos potenciales regenerativos, dependientes de CCSVs y canales de sodio, generan transitorios de calcio locales en las zonas distales.

En el caso de la neurona NS, los datos sugieren que las CCSVs están distribuidas ampliamente a lo largo del tronco principal y las cuatro neuritas primarias. La activación de dichas conductancias permitiría la entrada de calcio al medio intracelular, sin retardo aparente entre los diferentes sitios de la estructura neurítica. Si existen otros mecanismos para generar el  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ , que fueron desencadenados como consecuencia de la activación de las CCSVs, y el

peso relativo de cada fuente de calcio en el transitorio de calcio, son preguntas que quedan por resolver. Otras fuentes de calcio intracelular que pueden interactuar con el LTS son CCSVs de alto umbral de activación, liberación de calcio de reservorios internos y, mucho menos probable, receptores de NMDA o AMPA (Pinato y Midtgaard, 2005).

### **Pulsos despolarizantes evocan transitorios de calcio**

El protocolo de pulsos breves de corriente positiva produjo despolarizaciones de la neurona NS que crecieron en amplitud con la intensidad del estímulo y que estuvieron acompañadas por transitorios de calcio. La amplitud de los transitorios de calcio también se incrementó gradualmente con la magnitud de la corriente inyectada, y por consiguiente, con el grado de despolarización, hasta alcanzar un valor *plateau* con los estímulos de mayor intensidad (**figura RII.2**). Asimismo, la perfusión del ganglio con una solución de alto magnesio bloqueó de manera reversible la generación del transitorio de calcio para todos los pulsos de corriente inyectados (**figura RII.3**).

La sensibilidad al magnesio de los transitorios de calcio indica que la entrada de calcio del medio extracelular a través de canales iónicos es una condición necesaria para la evocación de los transitorios de calcio bajo el protocolo de pulsos breves de corriente despolarizante. Y el aumento progresivo de las señales de calcio con la intensidad de corriente sugiere la participación de CCSVs que pueden ser reclutadas en modo gradual dependiendo del grado de despolarización. Esto resultaría en transitorios de calcio que no son un fenómeno “todo o nada”, sino más bien una respuesta de amplitud variable.

En la neurona NS, además, el protocolo de pulsos breves de corriente despolarizante generó transitorios de calcio con una distribución espacial similar a los evocados por LTS

(**figura RII.2 y RII.3**): manifestación en el tronco principal y en todas las ramas primarias, con similar magnitud en regiones proximales y distales de las cuatro ramas. Este resultado sugiere que los dos fenómenos analizados pueden usar los mismos mecanismos celulares.

Por otro lado, la participación de CCSVs persistentes en los transitorios de calcio se evidenció con los pulsos despolarizantes de larga duración. Como se pudo observar en la **figura RIII.5**, una despolarización sostenida de la neurona puede ser interrumpida transitoriamente por hiperpolarizaciones espontáneas, y asociadas a estas hiperpolarizaciones, pudo verse una disminución en la señal de fluorescencia. Como la hiperpolarización de la neurona aumenta la fuerza electromotriz de las corrientes de calcio, este resultado sugiere fuertemente que en esta condición el nivel de  $[Ca^{2+}]_i$  está regulado primordialmente por una disminución en las CCSVs producida por la hiperpolarización. Además, los experimentos mostraron que la duración de los transitorios de calcio correlaciona con la duración de la despolarización, pudiendo prolongarse por varios minutos (**figura RII.5**). Estos resultados indicarían que CCSVs que se inactivan muy lentamente están presentes en la neurona, permitiendo mantener un nivel de  $[Ca^{2+}]_i$  por encima del basal durante un tiempo duradero.

Trabajando con neuronas de *Aplysia*, Chad y colaboradores estudiaron una corriente de calcio cuya amplitud está determinada por un balance entre la activación sensible a voltaje y la inactivación mediada por calcio (Chad et al., 1984). Luego de una fase inicial en la que el calcio acumulado inactiva parcialmente la corriente de calcio, el nivel de corriente alcanzado es tal que la tasa de entrada de calcio iguala a la tasa de remoción de calcio por difusión, secuestro o transporte de esa región de la membrana. Asumiendo que los *buffers* no se saturan, la actividad de calcio cerca de la superficie interior de la membrana alcanzaría un estado estacionario, en el que la inactivación no aumentaría ni disminuiría con el tiempo, permitiendo una corriente estacionaria, que no se inactiva.

Por lo tanto, los resultados parecen indicar que en la neurona NS hay por lo menos una subpoblación de canales de calcio sensibles a voltaje cuya cinética de inactivación es notablemente lenta. Sabemos que debe existir otra subpoblación de CCSVs con un umbral de activación cercano al potencial de reposo de la neurona NS (Rela et al., 2009). Éstas tendrían una cinética de inactivación rápida, y estarían subyacentes en la componente rápida de los LTSs. Además, estas conductancias de bajo umbral podrían estar involucradas en la fase de subida de las respuestas regenerativas frente a despolarizaciones, y dar lugar a la fase inicial de crecimiento de los transitorios de calcio. Finalmente, ambas subpoblaciones de CCSVs darían lugar a transitorios de calcio cuya magnitud es altamente sensible al  $V_m$  de la neurona NS.

El grupo de investigación de Calabrese trabaja también con el sistema nervioso de la sanguijuela y encontró que las interneuronas HN, involucradas en la regulación del ritmo circulatorio, presentan una corriente entrante de calcio con dos componentes cinéticamente diferentes: una corriente temprana y transitoria que se inactiva en 200 ms y otra corriente persistente que decae parcialmente sólo después de varios segundos (Angstadt y Calabrese, 1991). Ambas corrientes comienzan a activarse cerca de -60 mV, la inactivación de estado estacionario ocurre en el rango de voltaje de entre -70 y -45 mV y es completamente removida por un pulso hiperpolarizante a -80 mV de 1-2 s. Más aún, bajo un protocolo de hiperpolarización de -20 mV durante 2 s, semejante al empleado para evocar los LTSs en la neurona NS, se genera un LTS de características muy similares al analizado en este trabajo. Además, se proveen evidencias de que una componente importante de la inactivación es mediada por  $Ca^{2+}$ . Estas corrientes de calcio subyacen a los potenciales *plateau* y participan en la transmisión sináptica gradual de las células HN. Los autores hipotetizan que estas dos componentes de la corriente entrante podrían ser producto de dos clases diferentes de canales de calcio, una que inactiva rápidamente y otra que inactiva muy lentamente. Sin embargo, no

descartan la posibilidad de que una única clase de canales esté presente y que otros mecanismos den cuenta de la forma bifásica de las corrientes observadas. En un trabajo posterior del mismo grupo en las mismas interneuronas HN de la sanguijuela, se observó que un pulso de voltaje despolarizante para llevar de  $-70$  mV a  $-35$  mV durante 2 s genera una corriente con dos componentes (como ya se mencionó) y señales de calcio medidas con indicadores fluorescentes que se sostienen durante esos 2 s y que decaen exponencialmente cuando se corta la corriente (Ivanov y Calabrese, 2000)

El proceso de inactivación dependiente de voltaje de los canales de calcio de bajo umbral podría explicar que los transitorios de calcio evocados por pulsos despolarizantes a partir del  $V_m$  de reposo en la neurona NS no tengan una amplitud uniforme a lo largo de las ramas y que ante estímulos sucesivos el patrón de amplitud no se conserve (**figura RII.1**). Dado que el umbral de activación de dichas conductancias está muy cercano al  $V_m$  de reposo de la neurona, la proporción de canales activables podría variar sensiblemente de lugar en lugar dentro de la neurona, así como de repetición en repetición del protocolo de estimulación. En este sentido, el protocolo de generación de los LTSs por pulsos hiperpolarizantes evitó esta variabilidad y dió como resultado transitorios de calcio relativamente más estables en el tiempo y en el espacio, y siempre de mayor magnitud que los evocados por pulsos despolarizantes. La proporción de canales activables se maximizó cuando toda la neurona fue sometida a una fuerte hiperpolarización, por lo tanto, a pesar de que las despolarizaciones de la neurona fueron de tamaños similares, el protocolo de pulsos hiperpolarizantes generó flujos de calcio más grandes que los pulsos despolarizantes. Las diferencias en el grado de remoción de la inactivación se reflejaron en la envergadura del proceso de apertura regenerativa de CCSVs, impactando sobre la magnitud de los transitorios de calcio.

El comportamiento de NS es diferente al encontrado en las células granulares del bulbo olfatorio, donde despolarizaciones subumbrales para el LTS no evocan transitorios de calcio (Pinato y Midtgaard, 2005). El perfil de respuestas de las neuronas NS se parece más al caso de las células de Purkinje del cerebelo, donde cambios subumbrales de potenciales o potenciales *plateau*, evocados en condiciones que evitan el disparo de potenciales de acción dependientes de sodio, generan pequeños aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  ampliamente distribuidos en el árbol neurítico de la neurona (Levram, 1992). Estos resultados indicaron en su momento que la neurona contaría con conductancias de calcio distribuidas en todo el árbol dendrítico. Posteriormente, Isope y Murphy mostraron que las corrientes de calcio de bajo umbral de activación registradas en el soma están correlacionadas con transitorios de calcio sensibles a voltaje en las espinas dendríticas de las células de Purkinje (Isope y Murphy, 2005). Y dado que los canales de calcio tipo T son el componente principal de la entrada de calcio por canales de bajo umbral (LVA) en espinas, los datos sugerirían que dichos canales son los mediadores de los transitorios de calcio. Las observaciones que condujeron a estas conclusiones son similares a las obtenidas en nuestro trabajo con la neurona NS. Ellos mostraron que pulsos depolarizantes crecientes correlacionan con un aumento en la fluorescencia de OGB-1 en las espinas dendríticas. Además, prepulsos hiperpolarizantes de amplitud creciente permitirían un mayor reclutamiento de canales, como indican las corrientes registradas en el soma y el incremento en la fluorescencia de OGB-1 observada en las espinas dendríticas. Y cuando no se dan prepulsos hiperpolarizantes antes del pulso depolarizante, tanto la corriente como los transitorios de calcio son pequeños, sugiriendo que a un potencial basal cercano al potencial de membrana de reposo únicamente una fracción de los canales de calcio está disponible para la activación. En este trabajo se sugiere que los canales de calcio LVA pueden estar involucrados en el *boosting* de la generación de los

potenciales de acción de calcio mediada por canales tipo P en el árbol dendrítico o en la generación específica de LTS de calcio.

### **El transitorio de calcio depende del Vm basal**

El transitorio de calcio evocado por pulsos de corriente despolarizante presentó una dependencia marcada con el potencial de membrana basal. La amplitud de los transitorios de calcio aumentó cuando el Vm basal fue hiperpolarizado ( $V_{m_{NS}} = -60$  mV) respecto del reposo ( $V_{m_{NS}} = -40$  mV) y se redujo drásticamente cuando fue despolarizado ( $V_{m_{NS}} = -20$  mV) (**figura RII.2**).

Estos resultados se pueden interpretar en función de las características de las CCSVs mencionadas anteriormente y su proceso de inactivación dependiente de voltaje. La proporción de canales disponibles para la activación aumentaría con la hiperpolarización y disminuiría con la despolarización. De esta forma, pulsos despolarizantes de amplitud creciente generaron transitorios de calcio más grandes, siendo esta relación respuesta-estímulo modulada por el Vm basal. A un Vm de -60 mV un número mayor de canales de calcio estaban cerrados pero activables que a -40 mV y, en consecuencia, los transitorios de calcio alcanzaron una mayor amplitud. Y a -20 mV una gran parte de los canales estaban inactivados y, por lo tanto, los transitorios alcanzaron una amplitud menor.

La estimulación de la neurona NS con pulso despolarizante generó un evento regenerativo de características similares al LTS cuando el Vm basal estaba en su valor de reposo (-40 mV) o a un valor más negativo (-60 mV), y la corriente inyectada superaba cierto umbral. La aparición de estos eventos coincidió con la evocación de los transitorios de calcio de mayor amplitud. Asimismo, el grado de desarrollo de la respuesta regenerativa aumentaba con la

intensidad del estímulo, en consonancia con el tamaño de los transitorios de calcio: tanto los transitorios de calcio como la madurez de la respuesta regenerativa parecen llegar a un nivel de saturación cuando el pulso es de 2 nA. Esta relación entre las dos señales nos conduce a pensar que la apertura de los canales que subyacen a los fenómenos regenerativos es un elemento fundamental en la regulación del aumento transitorio de  $[Ca^{2+}]_i$ , determinando la amplitud de las señales de calcio.

En consonancia con esta hipótesis, la simple despolarización de la neurona, sin la evocación de una respuesta regenerativa, generó transitorios de calcio con una amplitud marcadamente menor. El tamaño reducido de estos aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  podría deberse a la apertura de una cantidad limitada de los canales que permiten el flujo del ión con respecto a los activados durante las respuestas regenerativas.

Por otra parte, la aparición de estos eventos regenerativos, y su dependencia con la corriente inyectada y el  $V_{mNS}$  basal, se superpusieron con el fenómeno de amplificación de la respuesta electrofisiológica que se produce con la hiperpolarización de la neurona; y con la activación de canales de inactivación lenta que correlaciona con el grado de desarrollo de la respuesta regenerativa (Vilarchao, 2011; ver Anexo 1). Como se desarrollará más adelante, la magnificación y la respuesta regenerativa tienen distinta sensibilidad al magnesio, indicando que no son el mismo fenómeno. De esta forma, otra explicación plausible para la modulación de la amplitud de los transitorios de calcio con la intensidad del estímulo y el  $V_m$  basal es la proporción total de canales abiertos por los pulsos despolarizantes, independientemente de la respuesta regenerativa y las conductancias subyacentes a ella.

Esta modulación por el  $V_m$  basal también se observa en otros preparados. Por ejemplo, las interneuronas neocorticales de ratón expresan una dinámica de calcio diferencial establecida por el estado de inactivación de los canales de calcio tipo T en las dendritas: con el potencial de

membrana en reposo o hiperpolarizado, se producen LTS que se propagan regenerativamente y evocan elevados cambios de  $[Ca^{2+}]_i$ , en especial en las dendritas distales; en cambio, a potenciales despolarizados los potenciales de acción retrógrados evocan transitorios de calcio más pequeños y uniformes (Goldberg et al., 2004).

### **Mecanismos de magnificación vs de *boosting***

Las conductancias despolarizantes activadas por voltaje en neuronas sin potenciales de acción o en dendritas, pueden tener un papel en la *boosting* de señales fisiológicas despolarizantes (Laurent, 1990; Uusitalo et al., 1995; Reyes, 2001), de modo de permitir la transmisión de señales a distancias mayores que las que podrían darse mediante una transmisión electrotonica. Los resultados hasta aquí presentados y discutidos sugieren que en las neuronas NS el decaimiento de las señales despolarizantes podría estar contrarrestado por conductancias de calcio dependientes de voltaje distribuidas a lo largo de toda la arborización neurítica.

Los transitorios de calcio evocados por despolarización se manifestaron en todas las ramas primarias y en el tronco principal (**figura RII.2**), y su magnitud en las regiones proximales y distales de los procesos neuríticos no presentó diferencias significativas (**figura RII.3**). Como se mencionó anteriormente, la interpretación de estos resultados es compleja, pero podría indicar que la señal electrofisiológica alcanzó la misma intensidad en los diferentes sitios de las arborizaciones. Es decir, podríamos estar ante la presencia de un mecanismo de *boosting* y propagación de señales despolarizantes.

Estudios realizados por la Lic. Vilarchao en nuestro laboratorio (Vilarchao, 2011) mostraron que la amplitud de las respuestas de las neuronas NS a pulsos despolarizantes dependen del  $V_m$  basal. Con la neurona ubicada en un potencial de -60 mV la amplitud de las

respuestas a pulsos despolarizantes de amplitud creciente fueron mucho mayores que a -20 mV (ver Anexo 1). Esto correlaciona inversamente con la resistencia de entrada de la neurona, que es mayor a -20mV que a -60 mV. Este fenómeno es insensible a altas concentraciones extracelulares de magnesio y, por lo tanto, no depende de la respuesta regenerativa anteriormente descrita. Tampoco depende de la concentración extracelular de sodio. Entonces, si bien la perfusión del ganglio con una solución de alto de magnesio no afecta a la amplitud de la señal electrofisiológica evocada por pulsos de corriente despolarizante (ver Anexo 2), los transitorios de calcio fueron bloqueados completamente y en forma reversible por la presencia de magnesio. Estos resultados indican que las neuronas NS presentan por lo menos dos tipos de conductancias sensibles a voltaje: las CCSVs de bajo umbral de activación sensibles a magnesio (Rela et al., 2009), y otro familia de canales sensibles a voltaje (posiblemente de calcio) persistentes e insensibles a magnesio, que serían responsables de la amplificación de las respuesta electrofisiológica, que se manifiesta como la despolarización exponencial al inyectar corriente positiva.

En solución de alto magnesio, a pesar de que estas conductancias persistentes sensibles a voltaje estarían abiertas posibilitando la amplificación de la señal electrofisiológica y generando la posterior cola de voltaje (Vilarchao, 2011), no se aprecia transitorio de calcio alguno. La activación de distintas vías para generar un  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  podría inducir la acción preferencial de diferentes mecanismos de extrusión o de *buffering* de calcio. Es decir, la apertura de las conductancias persistentes sensibles a voltaje podría movilizar un mecanismo de extrusión adicional o ser selectivamente más sensible a *buffers* de calcio de una alta tasa de activación. Por lo tanto, la capacidad efectiva de *buffer* endógeno podría ser diferente cuando se activan las conductancias activas insensibles a magnesio. De esta forma, cuando en solución de alto magnesio únicamente se activan estas conductancias persistentes, el calcio que ingresa a la

neurona podría ser captado rápida y eficientemente por los mecanismos endógenos, impactando en una señal  $\Delta F/F$  imperceptible. En cambio, cuando en solución normal tenemos la contribución de las CCSVs sensibles a magnesio, la entrada de calcio podría ser significativamente más grande, saturando los mecanismos de extrusión y buffer endógenos. Tanto en el caso de pulsos despolarizantes con  $V_{mNS} = -60\text{mV}$  como durante la evocación de LTS, la activación de las CCSVs de bajo umbral sensibles a magnesio estuvo acompañada de los transitorios de calcio de mayor tamaño, en especial cuando se generaban aperturas regenerativas de estas conductancias.

Un razonamiento análogo fue utilizado por Sabatini y colaboradores, quienes argumentaron que la capacidad efectiva de *buffering* endógeno que moldea los transitorios de calcio evocados por estímulos sinápticos puede ser más grande o más pequeña que aquella que da forma a los transitorios evocados por potenciales de acción dependientes de sodio (Sabatini et al., 2002). Los transitorios de calcio sinápticos pueden sobrecargar las bombas de calcio y por ende conducir a una tasa de extrusión más lenta. Por otra parte, niveles altos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pueden reclutar mecanismos adicionales de extrusión. Además, dicha vía puede saturar los *buffers* o ser selectivamente más sensible a *buffers* de calcio de cinética lenta.

Los resultados obtenidos por Vilarchao (2011) parecen indicar que las CCSVs de bajo umbral de activación sensibles a magnesio no son un factor de amplificación importante en las respuestas de las neuronas NS ya que en su ausencia las señales se amplifican igual que en condición control. Estas CCSVs poseen características que se ajustan a las de los canales de calcio tipo T, entre ellas se encuentra: un bajo umbral de activación, y que tanto la amplitud como la latencia pueden ser reguladas por las características del estímulo (Rela et al., 2009). Y a pesar de que no participarían de la magnificación, la hipótesis es que podrían ser relevantes en el *boosting* de las señales despolarizantes, garantizando la propagación a distancia de las señales.

Otra manera de interpretar nuestros resultados en conjunto con los datos existentes es pensar en una distribución espacial heterogénea de las distintas subpoblaciones de conductancias activas. La amplificación de la respuesta electrofisiológica y la ausencia de transitorios de calcio en una solución de alto magnesio podrían ser explicadas por una subpoblación de conductancias sensibles a voltaje insensibles a magnesio ubicadas en el soma y/o los procesos proximales. Otras dos subpoblaciones de CCSVs sensibles a magnesio, una de bajo umbral y otra persistente, distribuidas en los procesos neuríticos, darían cuenta de las propiedades de los transitorios de calcio y de su relación con las respuestas electrofisiológicas hasta aquí desarrolladas.

En neuronas piramidales del hipocampo (Christie et al., 1995) y en neuronas del núcleo del cerebelo (Gauck et al., 2001), los transitorios de calcio evocados por trenes de potenciales de acción retrógrados e inducidos por inyección de corriente, respectivamente, permitieron distinguir la contribución de dos familias diferentes de canales de calcio al flujo de dicho ión. Un cambio de la amplitud de las señales de fluorescencia dependiente de la posición indicó una distribución no uniforme de los canales de calcio subyacentes a las señales de fluorescencia observados. En ambos casos, los canales de alto umbral de activación (HVA) aportan principalmente a la entrada de calcio en el soma y las dendritas proximales, regulando los procesos somáticos dependientes de calcio; mientras que canales LVA contribuyen con mayor peso a las señales de calcio en las dendritas distales, cumpliendo un papel relevante en la integración dendrítica de entradas sinápticas.

Más allá de estas diferentes alternativas, hay que recordar que la respuesta electrofisiológica no es la única importante en el procesamiento de señales fisiológicas. Las señales de calcio mostraron ser relevantes en una infinidad de procesos que hacen a la actividad y funcionamiento de una neurona. Y los resultados aquí analizados sugieren que las neuronas

NS cuentan con al menos dos mecanismos de amplificación de las señales de calcio: las conductancias activas (probablemente de calcio) persistentes e insensibles a magnesio, y las CCSVs de bajo umbral sensibles a magnesio.

Finalmente, la interacción y sincronización de la apertura de las diferentes familias de conductancias sensibles a voltaje puede ser de interés, ya que potencialmente afectarían al grado en el que la neurona puede funcionar como un ensamble débilmente conectado de regiones individuales y aisladas de entrada/salida contra un funcionamiento colectivo que provee una salida global (Pinato y Midtgaard, 2005).

### **Transitorios de calcio evocados por estimulación sináptica**

La estimulación de la neurona mecanosensorial P en un rango de frecuencias fisiológico (4-25 Hz) evocó potenciales sinápticos en la neurona NS y transitorios de calcio extensamente distribuidos en el árbol neurítico de la misma (**figura RIII.1 y RIII.4**). La dinámica espacial y temporal del calcio intracelular libre es crucial para muchos aspectos del funcionamiento neuronal. Pero las mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$  no sólo son útiles para estudiar su rol como segundos mensajeros, sino que en muchos casos también puede servir para reportar excitación membranal y activación sináptica. Dada la gran extensión del árbol neurítico de la neurona NS, difícilmente este resultado signifique que la entrada sináptica se produce en todas las ubicaciones donde se midió un transitorio de calcio. En su lugar, es probable que el  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  nos esté indicando que la señal electrofisiológica alcanzó todos los sitios de la estructura neuronal, probablemente mediado por las CCSVs de bajo umbral de activación.

Los transitorios de calcio evocados por estimulación sináptica presentaron una magnitud proporcional al potencial sináptico generado, sin presentar una relación directa con la

frecuencia de disparo de la neurona mecanosensorial (**figura RIII.2**). Es decir que la respuesta sináptica a la neurona P puede regular gradualmente la concentración de calcio intracelular en la neurona NS. En el caso de que la generación de la señal de calcio estuviese mediada por canales ligando dependientes, podría observarse una relación entre el patrón de disparo de la neurona mecanosensorial y el cambio de  $[Ca^{2+}]_i$  en la neurona NS. Y esto no necesariamente debería verse reflejado en el potencial sináptico, ya que las señales de calcio en la neurona NS pueden no tener un correlato eléctrico directo. Un cambio de  $V_m$  puede asociarse a un  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  desproporcionadamente pequeño (Milojkovic et al., 2007), o una activación sináptica débil puede no producir señales de calcio postsinápticas, aún cuando se produce un potencial postsináptico excitatorio (e.p.s.p.) claro, dando testimonio de una relación no lineal entre los potenciales postsinápticos excitatorios y las señales de calcio (Eilers et al., 1995). En cambio, si la principal vía para generar los transitorios de calcio es la activación de las CCSVs, a través de los cambios de potencial producidos por la respuesta sináptica, se esperaría un comportamiento como el encontrado, en el que los transitorios de calcio son proporcionales a la señal electrofisiológica postsináptica, sin sugerir necesariamente una relación directa con la frecuencia de disparo de la neurona P estimulada. En este caso, dichas CCSVs deberían ser de bajo umbral, dado que los transitorios de calcio evocados sinápticamente se pueden observar con la neurona en el potencial de reposo.

Este comportamiento es diferente al encontrado, por ejemplo, en las neuronas piramidales de hipocampo, donde la entrada de calcio a través de receptores ionotrópicos NMDA o de canales activados por voltaje aumenta en forma sinérgica la liberación de calcio generado por movilización de  $IP_3$  mediada por receptores metabotrópicos de glutamato, derivando en incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  evocados sinápticamente cuya amplitud crece gradualmente con la intensidad del estímulo (Nakamura et al., 2002)

Como dijimos, la estimulación de la neurona mecanosensorial P evocó transitorios de calcio extensamente distribuidos en el árbol neurítico de la misma, al igual que los generados por el LTS y los pulsos despolarizantes. Por lo tanto, las conductancias dependientes de voltaje que proponemos que contribuyen al *boosting* y propagación de las respuestas postsinápticas despolarizantes de las neuronas NS podrían ser las mismas que, ante estímulos eléctricos, produjeron los LTS y las respuestas regenerativas ante pulsos despolarizantes en estas neuronas. Estas CCSVs de bajo umbral podrían, además, ser la vía de entrada del flujo de calcio desde el medio extracelular activado por estimulación sináptica. En ese caso, la menor amplitud de los transitorios de calcio sinápticos respecto a los evocados por LTS (**figura RIII.3**) se puede deber nuevamente al nivel de remoción de la inactivación de estas conductancias, que diferiría según la neurona esté en reposo o se la hiperpolarice. Esta hipótesis podrá confirmarse cuando se encuentre un bloqueante selectivo para la fase regenerativa de los LTSs y se analice su efecto sobre el decaimiento espacial de las respuestas sinápticas.

Los resultados hasta aquí discutidos parecen indicar que las CCSVs ampliamente distribuidas en el árbol neurítico de la neurona NS permiten la propagación de la señal evocada por la activación de la neurona mecanosensorial P, y además sirven de vía para la entrada de calcio sináptico.

Una neurona postsináptica puede contar tanto con CCSVs como canales de calcio activados por ligando, y aún así la actividad sináptica puede evocar un flujo de calcio cuya mayor parte sea a través de las CCSVs, como se observó en las espinas dendríticas de neuronas piramidales corticales (Schiller et al., 1998). Tanto en interneuronas neocorticales (Goldberg et al., 2004) como en células granulares del bulbo olfatorio (Egger et al., 2005) se encontró que la estimulación sináptica evoca un LTS de calcio global, mediada principalmente por CCSVs de bajo umbral y que produce una señal de calcio de naturaleza “todo o nada”. La mayor fuente de

entrada de calcio sináptico resultan las CCSVs, y los receptores activados por ligando posiblemente sólo contribuyan a una despolarización extendida que activa el flujo de calcio a través de las CCSVs pero tengan poco aporte directo al flujo del catión evocado por LTS. La diferencia es que en las interneuronas neocorticales, los canales de calcio tipo T en las dendritas participan en el *boosting* de pequeñas entradas sinápticas, haciendo que el árbol dendrítico entero se comporte como una única unidad “global” de disparo. En cambio, en las células granulares, una activación sináptica débil produce transitorios de calcio estocásticos en espinas individuales, y los LTSs globales son sólo producidos por una activación sináptica fuerte.

En consonancia con estos ejemplos, en las interneuronas oscilatorias HN de la sanguijuela se observó una transmisión sináptica gradual mediada por corrientes de calcio de bajo umbral (Angstadt y Calabrese, 1991), y además se encontró una correlación entre la cantidad de neurotransmisor liberado y los cambios de fluorescencia sensible a calcio (Ivanov y Calabrese, 2000). Los canales de calcio LVA están ampliamente distribuidos sobre todo el árbol neurítico de esta interneurona, y la asociación de los transitorios de calcio con los cambios en el potencial de membrana indican que la entrada del calcio extracelular a través de estas CCSVs es responsable, al menos en parte, del  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

A diferencia de estos casos donde las señales de calcio evocados por actividad sináptica se presentan extensamente distribuidos, también se pueden encontrar ejemplos de cómo un árbol dendrítico con conductancias activas puede amplificar potenciales postsinápticos excitatorios y procesar entradas sinápticas localmente en las dendritas. Un caso muy claro se presenta en las neuronas piramidales de neocorteza; ellas cuentan con CCSVs distribuidas en todo el árbol dendrítico y la propagación retrógrada de potenciales de acción evoca transitorios de calcio en todo el árbol (Schiller et al., 1995). Pero en estas mismas neuronas, la estimulación sináptica evoca transitorios de calcio restringidos a las dendritas apicales (Schiller et al., 1997).

Los e.p.s.p. generados en las dendritas apicales distales son amplificados por los canales de calcio dendríticos y así se inician potenciales regenerativos de naturaleza “todo o nada” que no consiguen propagarse activamente al soma o al axón. La iniciación de los potenciales regenerativos por estimulación sináptica requiere la coactivación de canales con receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA, y están mediados, a su vez, por CCSVs y canales de sodio. Algo similar ocurre en las neuronas piramidales de hipocampo, donde se encontró que la liberación localizada de glutamato, simulando una entrada sináptica, evoca una respuesta regenerativa subumbral para los potenciales de acción somáticos, pero que genera transitorios de calcio del tipo “todo o nada” restringidos a compartimentos individuales en las dendritas distales, indicando una electrogénesis mediada principalmente por CCSVs (Wei et al., 2001).

La estimulación de la neurona mecanosensorial P ipsilateral lateral generó transitorios de calcio con amplitud relativamente uniforme en las ramas contralaterales y en la ipsilateral posterior. Llama la atención el patrón espacial no uniforme sobre la rama ipsilateral anterior: los transitorios de calcio sugieren la presencia de un máximo aparente a 100  $\mu\text{m}$  del tronco, y su amplitud decreció sensiblemente en dirección a la periferia del ganglio, siendo significativa la diferencia con respecto al máximo aparente para las regiones a una distancia mayor a 150  $\mu\text{m}$  (**figura RIII.4**). Esta disimilitud dentro de un mismo proceso puede deberse a una disparidad en la densidad de CCSVs, pero dada la distribución espacial uniforme de los transitorios de calcio evocados por LTS y por pulsos despolarizantes, esta explicación quedaría descartada. En cambio, recordando que la respuesta de la neurona NS ante la estimulación de la neurona mecanosensorial P tiene tanto una componente despolarizante como otra hiperpolarizante, proponemos que los diferentes sitios a lo largo de la rama ipsilateral anterior desarrollaron cambios de  $V_m$  distintos, tal vez modulados por la componente hiperpolarizante de la respuesta sináptica. Una interpretación alternativa sugiere que el sitio de máximo aparente podría

coincidir con el punto de contacto sináptico de la componente despolarizante de la sinapsis NS-P. Si así fuese, el transitorio de calcio podría verse incrementado por la permeabilidad de los canales ligando dependientes a este catión o por la liberación de calcio desde retículo endoplasmático mediado por  $IP_3$ .

Las ramas contralaterales y la rama ipsilateral posterior presentaron transitorios de calcio de amplitud relativamente uniforme, tanto a lo largo de cada una de ellas como al comparar las tres ramas. Además, los niveles de respuesta fueron parecidos al máximo alcanzado en la rama ipsilateral anterior. Esto nos hace pensar, siguiendo el razonamiento hecho para la rIA, que la componente despolarizante de la respuesta sináptica se propagó a lo largo de estas tres ramas y que la componente hiperpolarizante al estimular la neurona mecanosensorial P ipsilateral lateral presentó un mismo nivel a lo largo de estas tres ramas, pero tuvo mayor preponderancia en gran parte de la rama ipsilateral anterior. Así, una distribución uniforme de CCSVs y un cambio de  $V_m$  dependiente de la posición conducirían a transitorios de calcio como los observados.

Más allá de todas estas hipótesis sobre las posibles causas de las diferencias en la magnitud del transitorio de calcio, un hecho destacable es que se observó una disparidad en el nivel de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  en una de las ramas de las neuronas NS, mientras en el resto de las ramas los niveles fueron relativamente uniformes. Dependiendo de las diferencias en la amplitud, la localización espacial y el curso temporal, distintas señales de calcio pueden tener significados bioquímicos diferentes para la célula y conducir a respuestas fisiológicas divergentes (Augustine et al., 2003). La activación de una sinapsis puede dar lugar a algo más que la producción de una señal eléctrica postsináptica, incluyendo eventos bioquímicos intracelulares como la generación de segundos mensajes, de tal forma que sea posible que la integración sináptica pueda ocurrir en varios niveles. Por ejemplo, ampliando la noción de *hotspots* locales

de electrogénesis de calcio dendrítico, hay evidencias de integración sináptica basada en señales de calcio postsináptico en compartimentos dendríticos restringidos, en lugar de las señales eléctricas convencionales (Eilers et al., 1995). Por lo tanto, hay que tener en cuenta que las señales de calcio medidas en esta neurona no sólo servirían como indicadores de los cambios de  $V_m$ , tanto en sentido despolarizante como hiperpolarizante, a lo largo del extenso árbol dendrítico. También hay que recordar la cantidad e importancia de procesos regidos por el nivel de calcio intracelular que regulan el funcionamiento celular, por lo que la técnica de *imaging* de calcio aquí aplicada puede ser un elemento útil en muchos aspectos del estudio de propiedades neuronales.

## CONCLUSIONES

Un número creciente de estudios señalan la importancia de la distribución espacial de las conductancias iónicas activas en el procesamiento de las entradas sinápticas y en la señalización intracelular (Magee, 1999). Un ejemplo de ello son las conductancias activas en dendritas y su capacidad para poder incrementar el poder computacional de algunos sistemas neuronales (Yuste y Tank, 1996; Golding et al., 2002). Otra faceta es el vínculo entre las conductancias iónicas activas y la propagación a distancia de señales sinápticas. Conocer la distribución de las conductancias sensibles a voltaje es importante porque éstas podrían servir como un mecanismo para el *boosting* y la propagación de las respuestas postsinápticas, reduciendo la atenuación espacial que resultaría de una propagación pasiva. Las ventajas y desventajas de la transmisión pasiva o activa de señales, y su influencia en la codificación, son temas abiertos de discusión. En algunos casos, es posible que la transmisión gradual resulte ventajosa por tener un mayor rango dinámico, dado que tanto las hiperpolarizaciones como las despolarizaciones progresivas pueden codificar información (Burrows y Siegler, 1976; Haag y Borst, 1998). Sin embargo, este tipo de transmisión presenta el problema de una mayor atenuación espacial. Como una potencial solución, se ha observado que algunas neuronas sin potenciales de acción tienen constantes de espacio grandes (Shaw, 1972), de modo que serían capaces de transmitir señales a distancias mayores que las predichas por las propiedades de membrana características de muchas neuronas activas. Por otra parte, no necesariamente la atenuación de señales debe concebirse como un problema, ya que puede permitir el aislamiento de diferentes zonas de la anatomía neuronal, de modo que constituyan compartimentos funcionales segregados (Nelson et al., 1975; Pearson, 1976; Dickinson et al., 1981). De esta forma, la célula como elemento de un circuito neuronal podría basar su funcionamiento en

compartimentos eléctricos relativamente aislados en los que las entradas y las salidas se dirimen en regiones específicas del árbol neurítico, sin necesidad de propagación a distancia.

Según nuestros datos, la neurona NS se comporta como una célula compacta para el caso del LTS evocado por pulso de corriente hiperpolarizante, y tanto los pulsos despolarizantes como las señales sinápticas se propagan eficientemente a lo largo de todo el árbol neurítico. Un mecanismo plausible para este comportamiento sería la participación de las CCSVs de bajo umbral ampliamente distribuidos en la regeneración activa de estas señales. Es decir, estas conductancias podrían servir como un mecanismo activo para el procesamiento, el *boosting* y la propagación de señales dentro del árbol neurítico. Asimismo, los resultados sugieren que las CCSVs pueden ser reclutadas en forma gradual, y no es un fenómeno “todo o nada”, lo que le brindaría a la célula un mayor poder computacional. Más aún, la amplitud de las señales de calcio en los procesos neuríticos está fuertemente modulada por el potencial de membrana, el cual es determinado por el nivel de actividad basal de la neurona.

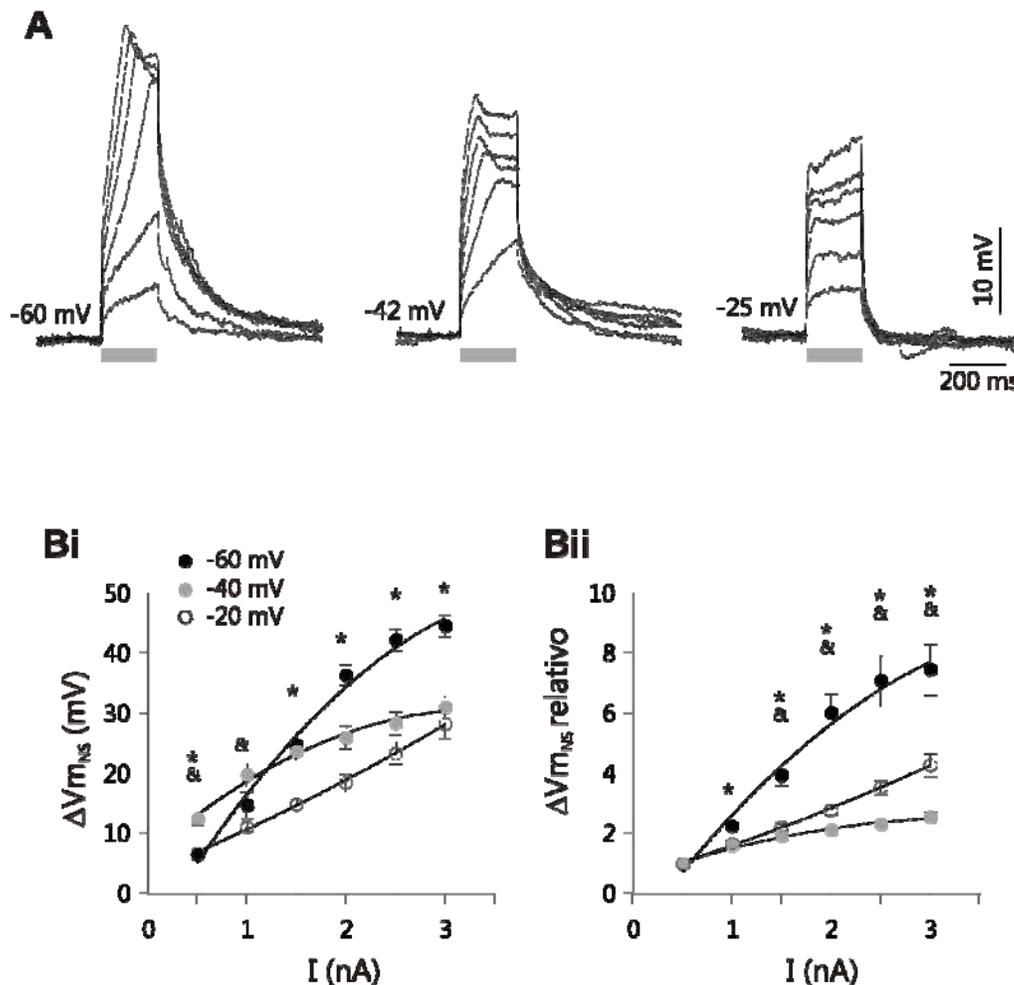
Dependiendo de las diferencias en amplitud, localización espacial y curso temporal, diferentes señales de calcio pueden tener distintos significados bioquímicos para la célula y conducir a respuestas altamente específicas (Berridge, 1997; Berridge, 1998; Rose y Konnerth, 2001; Sabatini et al., 2002). Por ejemplo, los mecanismos que dan origen a los transitorios de calcio estudiados en este trabajo podrían tener influencia sobre las respuestas celulares, ya sea regulando la excitabilidad de la neurona (Diaz-Rios et al., 2007; El Manira y Wallen, 2000) o a través del rol del calcio como modulador de las sinapsis eléctricas, entre otros medios posibles.

Nuestros resultados sugieren que además de las CCSVs de bajo umbral extensamente distribuidas en el árbol neurítico de la neurona NS, dichas células contarían con dos familias de conductancias persistentes sensibles a voltaje, unas de calcio dispuestas en los procesos neuríticos y otras probablemente también de calcio, insensibles a magnesio y localizados en y

cerca del soma. Más aún, no descartamos la contribución de otros mecanismos complementarios a los transitorios de calcio observados, como puede ser la liberación de calcio desde reservorios intracelulares. En conjunto, todas estas vías pueden tener un papel importante en los eventos celulares regulados por el nivel de calcio intracelular. Dado el caso, la distribución diferencial de poblaciones de canales de calcio sensibles a voltaje con diferentes características podría obedecer a las distintas funciones celulares que deban ser controladas.

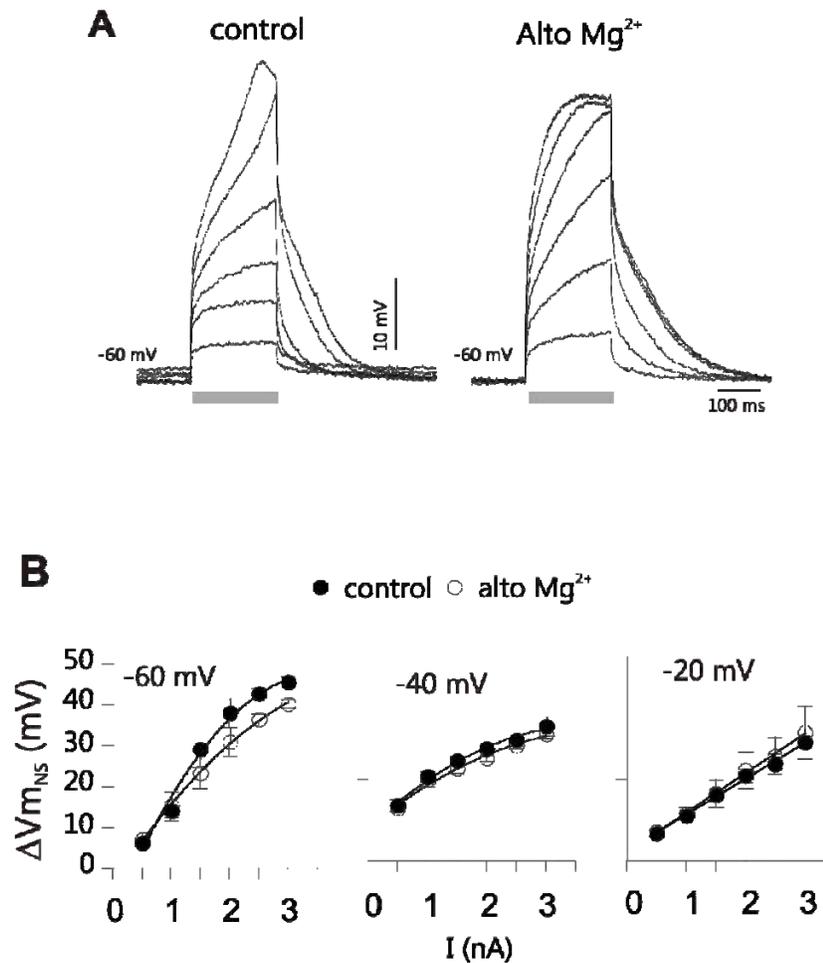
Finalmente, cabe mencionar que más allá de los resultados y las conclusiones alcanzados en este trabajo, el abanico de posibilidades que abre el desarrollo de esta técnica para el estudio de señales en múltiples localizaciones en simultáneo es uno de los legados más importantes. Muchas preguntas de relevancia para entender el funcionamiento de los circuitos neuronales y el rol de la neurona NS en ellos se precipitan a partir de los resultados presentados y la técnica de *calcium imaging* parece ser una de las herramientas centrales para abordar las respuestas.

## ANEXO I



**Anexo 1. Las respuestas de NS a pulsos despolarizantes son sensibles al voltaje. A,** Respuestas representativas de una neurona NS a una serie de pulsos de 200 ms de duración (0.5-3.0 nA, en intervalos de 0.5 nA) cuando el potencial basal fue sostenido cerca del reposo (-40 mV), o a -60 y -20 mV por inyección de corriente dc. El valor de potencial está indicado a la izquierda de cada serie de trazos. La barra gris indica el tiempo del pulso. Los experimentos fueron realizados en la modalidad "discontinuous current clamp" (DCC). **Bi,** Cambio de potencial promedio en función de la magnitud del pulso de corriente para los tres valores de potencial basal (n=7 ganglios). **Bii,** Como en Bi, pero el cambio de potencial fue expresado como relativo al cambio evocado por el pulso de 0.5 nA. En B los datos a -60 y -40 mV fueron unidos por una función polinómica de segundo orden, y los datos a -20 mV fueron ajustados a una función lineal ( $R > 0.99$  para los tres casos). Los datos fueron comparados con un test de Friedman y luego utilizando un test de Wilcoxon para muestras pareadas los datos a -60 mV (\*) y a -20 mV (&) fueron comparados con los valores obtenidos a -40 mV; los símbolos indican  $p < 0.05$ . (modificado de Vilarchao 2011)

## ANEXO II



**Anexo 2. Respuestas de NS en presencia de alto magnesio. A,** respuestas representativas de una neurona NS a una serie de pulso de 200 ms de duración (0.5-3.0 nA, en intervalos de 0.5 nA) cuando el potencial basal fue sostenido a -60 en solución normal y en presencia de alto magnesio. La barra gris indica el tiempo del pulso. Los experimentos fueron realizados en la modalidad DCC. **B,** cambio de potencial promedio en función de la magnitud del pulso de corriente para los tres valores de potencial basal (n=3 ganglios) en ambas condiciones. (modificado de Vilarchao 2011)

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alford, S., Frenguelli, B.G., Schofield, J.G., Collingridge, G.L. (1993). Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced in hippocampal CA1 neurons by the synaptic activation of NMDA receptors. *J. Physiol.* 469, 693-716.
- Allbritton, N.L., Meyer, T., Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 258, 1812-1815.
- Angstadt, J.D., Calabrese, R.L. (1991). Calcium currents and graded synaptic transmission between heart interneurons of the leech. *J. Neuroscience* 11, 746-759.
- Arbas, E., Calabrese, R. (1990). Leydig neuron activity modulates heartbeat in the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* 167, 665-671.
- Armstrong, C., Matteson, D. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227, 65-67.
- Augustine, G.J., Santamaria, F., Tanaka, K. (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40, 331-346.
- Baader, A.P. (1997). Internuonal and motor patterns during crawling behavior of semi-intact leeches. *J. Exp. Biol.* 200, 1369-1381.
- Baylor, D.A., Fuortes, M.G. (1970). Electrical response of single cones in the retina of the turtle. *J. Physiol.* 207, 77-92.
- 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.
- Berón de Astrada, M., Sztarker, J., Tomsic, D. (2001). Visual interneurons of the crab *Chasmagnatus* studied by intracellular recordings in vivo. *J. Comp. Physiol. A* 187, 27-44.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26.

- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 251, 751-754.
- Brehm, P., Eckert, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* 202, 1203-1206.
- Brunn, D. (1998). Cooperative mechanisms between leg joints of *Carausius morosus*. I. Nonspiking interneurons that contribute to interjoint coordination. *J. Neurophysiol.* 79, 2964-2976.
- Bufler, J., Zufall, F., Franke, C., Hatt, H. (1992). Patch-clamp recordings of spiking and nonspiking interneurons from rabbit olfactory bulb slices: membrane properties and ionic current. *J. Comp. Physiol. A* 170, 145-152.
- Burrows, M. (1979). Graded synaptic interactions between local premotor interneurons in the locust. *J. Neurophysiol.* 42, 1108-1123.
- Burrows, M. (1992) Local circuits for the control of leg movements in an insect. *TINS* 15, 226-232.
- Burrows, M., Laurent, G.J., Field, L.H. (1988). Proprioceptive inputs to nonspiking local interneurons contribute to local reflexes of a locust hindleg. *J. Neurosci.* 8, 3085-3093.
- Burrows, M., Siegler, M.V.S. (1976). Transmission without spikes between locust interneurons and motoneurons. *Nature* 262, 222-224.
- Burrows, M., Siegler, M.V.S. (1978). Graded synaptic transmission between local interneurons and motor neurons in the metathoracic ganglion of the locust. *J. Physiol.* 285, 231-255.
- Chad, J., Eckert, R., Ewald, D. (1984). Kinetics of calcium-dependent inactivation of calcium current in voltage-clamped neurons of *Aplysia Californica*. *J. Physiol.* 347, 279-300.
- Christie, B.R., Eliot, L.S., Ito, K., Miyakawa, H., Johnston, D. (1995). Different Ca<sup>2+</sup> channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Physiol.* 73, 2553-2557.

- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
- Coulter, D.A., Huguenard, J.R., Prince, D.A. (1989). Calcium currents in rat thalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *J. Physiol.* 414, 587-604.
- Debski, E.A., Friesen, W.O. (1987). Intracellular stimulation of sensory cells elicits swimming activity in the medicinal leech. *J Comp Physiol A* 160, 447-457.
- Dickinson, P.S., Nagy, F., Moulins, M. (1981). Interganglionic communication by spiking and nonspiking fibers in same neuron. *J. Neurophysiol.* 45, 1125-1138.
- Dupont, J.L., Bossu, J.L. & Feltz, A. (1986). Effect of internal calcium currents in rat sensory neurones. *Pflugers Archiv* 406, 433-435.
- Eckert, R., Lux, H.D. (1976). A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neuronal somata of Helix. *J Physiol.* 254, 129-151.
- Egger, V., Svoboda, K., Mainen, Z.F. (2003). Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J. Neuroscience* 23, 7551-7558.
- Egger, V., Svoboda, K., Mainen, Z.F. (2005). Dendrodendritic synaptic signals in olfactory bulb granule cells: local spine boost and global low-threshold spike. *J. Neuroscience* 25, 3521-3530.
- Eilers, J., Augustine, G.J., Konnerth, A. (1995). Subthreshold synaptic  $Ca^{2+}$  signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 373, 155-158.
- Emptage, N., Bliss, T.V.P., Fine, A. (1999). Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22, 115-124.
- Fedulova, S. A., Kostyuk, P. K., Veselovsky, N. S. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J.Physiol* 359, 431-446.

- Finch, E.A., Augustine, G.J. (1998). Local calcium signaling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature* 396, 753-756.
- Finch, E.A., Turner, T.J., Goldin, S.M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252, 443-446.
- Fitzpatrick, J.S., Hagenston, A.M., Hertle, D.N., Gipson, K.E., Bertetto-D'Angelo, L., Yeckel, M.F. (2009). Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-mediated  $Ca^{2+}$  waves in pyramidal neuron dendrites propagate through hot spots and cold spots. *J. Physiol.* 587.7, 1439-1459.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394, 149-172.
- Gauck, V., Thomann, M., Jaeger, D., Borst, A. (2001). Spatial distribution of low and high-voltage-activated calcium currents in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J. Neuroscience* 21:RC158, 1-4.
- Goldberg, J.H., Lacefield, C.O., Yuste, R. (2004). Global dendritic calcium spikes in mouse layer 5 low threshold spiking interneurons: implications for control of pyramidal cell bursting. *J. Physiol.* 558, 465-478.
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 573-586.
- Grillner, S., Markram, H., de Schutter, E., Silberberg, G., LeBeau FEN (2005). Microcircuits in action – from CPGs to neocortex. *Trends in Neurosciences* 28, 525-533.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biological Chemistry* 260, 3440-3450.
- Hagg, J.H., Borst, A. (1998). Active membrane properties and signal encoding in graded potential neurons. *J. Neuroscience.* 18, 7972-7986.

- Helmchen, F., Imoto, K., Sakmann, B. (1996). Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys. J.* 70, 1069-1081.
- Hill, E.S., Sakurai, A., Katz, P.S. (2008). Transient enhancement of spike-evoked calcium signaling by a serotonergic interneuron. *J Neurophysiol.* 100, 2919-2928.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos.
- Holthoff, K., Kovalchuk, Y., Yuste, R., Konnerth, A. (2004). Single-shock LTD by local dendritic spikes in pyramidal neurons of mouse visual cortex. *J. Physiol.* 560, 27-36.
- Huguenard J.R. (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 329-348.
- Isope, P., Murphy, T.H. (2005). Low threshold calcium currents in rat cerebellar Purkinje cell dendritic spines are mediated by T-type calcium channels. *J. Physiol.* 562, 257-269.
- Jacklet, J.W. (1969). Electrophysiological organization of the eye of Aplysia. *J. Gen. Physiol.* 53, 21-42.
- Jaffe, D.B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J.E., Miyakawa, H., Ross W.N. (1992). The spread of Na<sup>+</sup> spikes determines the pattern of dendritic Ca<sup>2+</sup> entry into hippocampal neurons. *Nature* 357, 244-246.
- Ivanov, A.I., Calabrese, R.L. (2000). Intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics during spontaneous and evoked activity of leech heart interneurons: low-threshold Ca currents and graded synaptic transmission. *J. Neuroscience* 20, 4930-4943
- Kaneko, A. (1971). Physiological studies of single retinal cells and their morphological identification. *Vision Res. Suppl.* 3, 17-26.
- Koester, H.J., Sackmann, B. (1998). Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating actions potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9596-9601.

- Kondoh, Y., Hisada, M. (1986). Distribution and ultrastructure of synapses on a premotor local nonspiking interneuron of the crayfish. *J. Comp. Neurol.* 254, 259-270.
- Kristan, W.B. (1982). Sensory and motor neurones responsible for the local bending response in leeches. *J Exp Biol* 96, 161-180.
- Kristan, W.B., Calabrese, R.L., Friesen W.O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Prog. Neurobiol.* 76, 279-327.
- Kristan, W.B., McGirr, S.J., Simpson, G.V. (1982). Behavioural and mechanosensory neurone responses to skin stimulation in leeches. *J. Exp. Biol.* 96, 143-160.
- Larkum, M.E., Zhu, J.J., Sakman, B. (1999). A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398, 338-341.
- Larkum, M.E., Watanabe, S., Nakamura, T., Lasser-Ross, N., Ross, W.N. (2003). Synaptically activated  $Ca^{2+}$  waves in layer 2/3 and layer 5 rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol.* 549, 471-488.
- Laurent G. (1990). Voltage-dependent nonlinearities in the membrane of locust nonspiking local interneurons, and their significance for synaptic integration. *J. Neuroscience* 10, 2268-2280.
- Laurent, G., Burrows, M. (1988). Direct excitation of nonspiking local interneurons by exteroceptors underlies tactile reflexes in the locust. *J. Comp. Physiol. A* 162, 563-572.
- Laurent, G., Burrows, M. (1989). Distribution of intersegmental inputs to nonspiking local interneurons and motor neurons in the locust. *J. Neuroscience.* 9, 3019-3029.
- Laurent, G., Seymour-Laurent, K.J., Johnson, K. (1993). Dendritic excitability and a voltage-gated calcium current in locust nonspiking local interneurons. *J. Neurophysiol.* 69, 1484-1498.
- Lev-ram, V., Miyakawa, H., Lasser-Ross, N., Ross W.M. (1992). Calcium transients in cerebellar Purkinje neurons evoked by intracellular stimulation. *J. Neurophysiol.* 68, 1167-1177.

- Llinas, R., Nicholson, C. (1971). Electrophysiological properties of dendrites and somata in alligator Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 34, 532-351.
- Lockery, S.R., Kristan, W.B. (1990a). Distributed processing of sensory information in the leech. I. Input-output relations of the local bending reflex. *J. Neuroscience* 10, 1811-1815.
- Lockery, S.R., Kristan, W.B. (1990b). Distributed processing of sensory information in the leech. II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex. *J. Neuroscience* 10, 1816-1829
- Losonczy, A., Makara, J.K., Magee, J.C. (2008). Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452, 436-441.
- Macagno, R.E. (1980). Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J. Comp. Neurol.* 190, 283-302.
- Magee, J.C. (1999). Voltage-gated ion channels in dendrites. En: *Dendrites* (Stuart, G.J., Spruston, N., Häusser, M., eds), 139-160. Oxford: Oxford UP.
- Maravall, M., Mainen, Z.M., Sabatini, B., Svoboda, K. (2000). Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* 78, 2655-2667.
- Markram, H., Helm, P.J., Sakmann, B. (1995). Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol.* 485, 1-20.
- McCrea, D.A. (2001). Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J. Physiol.* 533.1, 44-50.
- Migliore, M., Shepherd, G.M. (2002). Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat. Rev. Neuroscience.* 3, 362-370.
- Milojkovic, B.A., Zhou, W.L., Antic, S.D. (2007). Voltage and calcium transients in basal dendrites of the rat prefrontal cortex. *J. Physiol* 585.2, 447-468.

- Minta, A., Kao, J.P., Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264, 8171-8178.
- Miyakawa, H., Ross, W.N., Jaffe, D., Callaway, J.C., Lasser-Ross, N., Lisman, J.E., Johnston, D. (1992). Synaptically activated increases in  $Ca^{2+}$  concentration in hippocampal CA1 pyramidal cells are primarily due to voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron* 9, 1163-1173.
- Miyakawa, T., Mizushima, A., Hirose, K., Yamazawa, T., Bezprozvanny, I., Kurosaki, T., Lino, M. (2001).  $Ca^{2+}$ -sensor region of  $IP_3$  receptor controls intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. *EMBRO J.* 20, 1674-1680.
- Muller, K.J., Nicholls, J.G., Stent, G.S. (1981). Neurobiology of the leech. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Muller, K.J., Scott, S.A. (1981). Transmission at a direct electrical connexion mediated by an interneurone in the leech. *J. Physiol.* 311, 565-583.
- Nakamura T., Barbara J.G., Nakamura K., Ross W.N. (1999). Synergistic release of  $Ca^{2+}$  from  $IP_3$ -sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with Backpropagating Action Potentials. *Neuron* 24, 727-737.
- Nakamura, T., Lasser-Ross, N., Nakamura, K., Ross, W.N. (2002). Spatial segregation and interaction of calcium signalling mechanisms in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 543, 465-480.
- Neher, E., Augustine, G. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450, 273-301.
- Nelson, R. (1977). Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat. *J. Comp. Neurol.* 172, 109-135.
- Nelson, R., Kolb, H. (1983). Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina. *Vision Res.* 23, 1183-1195.
- Nelson, R., von Litzow, A., Kolb, H., Gouras, P. (1975). Horizontal cells in cat retina with independent dendritic systems. *Science* 189, 137-139.

- 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.
- Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. (2001). *From neuron to brain*. Sinauer.
- O'Malley, D.M., Burbach, B., Adams, P. (1999). Fluorescent calcium indicators: subcellular behavior and use in confocal imaging. En *Protocols in Confocal Microscopy*. S. Paddock, editor. Humana Press, New York.
- Pan, Z.H. (2000). Differential expression of high- and two types of low-voltage activated calcium currents in rod and cone bipolar cells of the rat retina. *J. Neurophysiol.* 83, 513-527.
- Pan, Z.H., Hu, H.J. (1999). Voltage-dependent Na<sup>+</sup> currents in mammalian retinal cone bipolar cells. *J. Neurophysiol.* 84, 2564-2571.
- Pearson, K.G. (1976). Nerve cells without action potentials en: *Simpler networks and behavior*, pp 99-110. Sunderland, Estados Unidos: Sinauer.
- Perez-Reyes, E. (1998). Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 313-318.4
- Pinato, G., Midtgaard, J. (2005). Dendritic sodium spikelets and low-threshold calcium spikes in turtle olfactory bulb granule cells. *J. Neurophysiol.* 93, 1285-1294.
- Poirazi, P., Mel, B.W. (2001). Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron* 29, 779-796.
- Protti, D.A., Flores-Herr, N., von Gersdorff, H. (2000). Light evokes Ca<sup>2+</sup> spikes in the axon terminals of a retinal bipolar cell. *Neuron* 25, 215-227.
- Rela, L. (2005). Tesis de Doctorado: Propiedades intrínsecas, conectividad e importancia fisiológica de las neuronas NS de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. FBMC, FCEN, UBA.
- Rela, L., Szczupak, L. (2003). Coactivation of motoneurons regulated by a network combining electrical and chemical synapses. *J. Neuroscience* 23, 682-692.

- Rela, L., Szczupak, L. (2007). In situ characterization of a rectifying electrical junction. *J. Neurophysiol.* 97, 1405-1412.
- Rela, L., Yang, S.M., Szczupak, L. (2009). Calcium spikes in a leech nonspiking neuron. *J. Comp. Physiol. A* 195, 139-150.
- Reyes, A. (2001). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu. Rev. Neuroscience* 24, 653-675.
- Rigoni, F., Deana, R. (1986). Ruthenium red inhibits the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in intact bovine spermatozoa and increases the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *FEBS Lett* 198, 103-108.
- Rodriguez, M.J., Alvares, R., Szczupak, L. (2012). Effect of nonspiking neuron on motor patterns of the leech. *J. Neurophysiol.* 107.
- Ross, W.N. (1989). Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 491-506.
- Rozsa, B., Zelles, T., Vizi, E.S., Lendvai, B. (2004). Distance-dependent scaling of calcium transients evoked by backpropagating spikes and synaptic activity in dendrites of hippocampal interneurons. *J. Neuroscience* 24, 661-670.
- Sabatini, B.L., Oertner, T.G., Svoboda, K. (2002). The life cycle of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in dendritic spines. *Neuron* 33, 439-452.
- Sabatini, B.L., Svoboda, K. (2000). Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408, 589-593.
- Sawyer, R.T. (1986). Leech biology and behavior. Oxford, Inglaterra: *Oxford University Press*.
- Schrader, S. (2000). The function of the cercal sensory system in escape behavior of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss. *Pflugers Arch.* 439, R187-189.

- Schiller, J., Helmchen, F., Sakmann, B. (1995). Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurones. *J. Physiol.* 487.3, 583-600.
- Schiller, J., Major, G., Koester, H.J., Schiller, Y. (2000). NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Nature* 404, 285-289.
- Schiller, J., Schiller, Y., Clapham, D.E. (1998). Amplification of calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation: the role of direct calcium influx through the NMDA receptor. *Nat. Neuroscience.* 1, 114-118.
- Schiller, J., Schiller, Y., Stuart, G., Sakmann, B. (1997). Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol.* 505.3, 605-616.
- Schwindt, P., Crill, W. (1999). Mechanisms underlying burst and regular spiking evoked by dendritic depolarization in layer 5 cortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 81, 1341-1354.
- Segev, I., London, M. (1999). A theoretical view of passive and active dendrites, en: Dendrites (G. Stuart, N. Spruston y M. Häuser, eds) pp. 231-270. Nueva York, Estados Unidos: *Oxford University Press*.
- Segev, I., Rall, W. (1998). Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations. *Trends Neuroscience.* 21, 453-460.
- Shaw, B.K., Kristan, W.B. (1995). The whole-body shortening reflex of the medicinal leech: motor pattern, sensory basis, and interneuronal pathway. *J. Comp. Physiol. A* 177, 667-681.
- Shaw, S.R. (1972). Decremental conduction of the visual signal in barnacle lateral eye. *J. Physiol.* 220, 145-175.
- Shepherd, G.M., Brayton, R.K. (1979). Computer simulation of a dendrodendritic synaptic circuit for self- and lateral-inhibition in the olfactory bulb. *Brain Res.* 175, 377-382.

- Spruston, N., Stuart, G., Häusser, M. (1999), Dendritic integration, en: Dendrites (G. Stuart, N. Spruston y M. Häusser, eds.) pp. 231-270. Nueva York, Estados Unidos: *Oxford University Press*.
- Steinberg, R.H., Schmidt, R. (1970). Identification of horizontal cells as S-potential generators in the cat retina by intracellular dye injection. *Vision Res.* 10, 817-820.
- Stuart, A.E. (1970). Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J. Physiol.* 209, 627-646.
- Tautz, J., Plummer, M.R. (1994). Comparison of directional selectivity in identified spiking and nonspiking mechanosensory neurons in the crayfish *Orconectes limosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5853-5857.
- Tillotson, D. (1979). Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1497-1500.
- Toyoda, J., Hashimoto, H., Anno, H., Tomita, T. (1970). The rod response in the frog as studied by intracellular recording. *Vision Res.* 10, 1093-1100.
- Tsien, R.Y. (1989). Fluorescent probes for cell signalling. *Annu. Rev. Neuroscience.* 12, 227-253.
- Tsien, R.Y., Waggoner, A. (1995). Fluorophores for confocal microscopy. En *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. J. B. Pawley, editor. *Plenum Press, New York*. 267-279.
- Uusitalo, R.O., Juusola, M., Weckstrom, M. (1995). Graded responses and spiking properties of identified first-order visual interneurons of the fly compound eye. *J. Neurophysiol.* 73, 1782-1792.
- Verkhatsky, A.J., Petersen, O.H. (1998). Neuronal calcium stores. *Cell Calcium* 24 (5/6), 333-343.
- Vilarchao, M.E. (2011). Tesis de Licenciatura: Caracterización de las conductancias de calcio voltaje-dependientes presentes en neuronas pasivas NS de la sanguijuela. FBMC, FCEN, UBA.

- Wadepuhl, M. (1989). Depression of excitatory motoneurons by a single neuron in the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* 143, 509-527.
- Wang-Bennett, L.T., Glantz, R.M. (1987). The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris. I. Nonspiking monopolar cells. *J. Comp. Physiol. (A)* 161, 131-145.
- Weckstrom M., Jarvilehto, M., Heimonen, K. (1993). Spike-like potentials in the axons of nonspiking photoreceptors. *J. Neurophysiol.* 69, 293-296.
- Weeks, J.C. (1981). Neuronal basis of leech swimming: separation of swim initiation, pattern generation and intersegmental coordination by selective lesions. *J. Neurophysiol.* 45, 698-723.
- Wei, D.S., Mei, Y.A., Bagal, A., Kao, J.P., Thompson, S.M., Tang, C.M. (2001). Compartmentalized and binary behavior of terminal dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Science* 293 (5538), 2272-2275.
- Werblin, F.S., Dowling, J.E. (1969). Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.* 32, 339-355.
- Wessel, R., Kristan, W.B., Kleinfeld, D. (1999). Supralinear summation of synaptic inputs by an invertebrate neuron: dendritic gain is mediated by an “inward rectifier” K<sup>+</sup> current. *J. Neuroscience.* 19, 5875-88.
- Wildman, M.H., Cannone, A.J. (1990). Action potentials in a ‘non-spiking’ neurone: graded responses and spikes in the afferent P fibre of the crab thoracic-coxal muscle receptor organ. *Brain Research* 509, 339-342.
- Willard, A.L. (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neuroscience* 1, 936-944.
- Wittenberg, G., Kristan, W.B. (1992). Analysis and modeling of the multisegmental coordination of shortening behavior in the medicinal leech. I. Motor output pattern. *J Neurophysiol* 68, 1683-1707.

- 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.
- Yue, D. T., Backx, P. H., Imredy, J. P. (1990). Calcium-sensitive inactivation in the gating of single calcium channels. *Science* 250, 1735- 1738.
- Yuste, R., Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684.
- Yuste, R., Lanni, F., Konnerth, A. (2000). *Imaging Neurons, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yuste, R., Majewska, A., Cash, S.S., Denk, W. (1999). Mechanisms of calcium influx into hippocampal spines: heterogeneity among spines, coincidence detection by NMDA receptors, and optical quantal analysis. *J. Neuroscience.* 19, 1976-1987.
- Yuste, R., Tank, D.W. (1996). Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* 16, 701-716.